

3-Acetamino-4-hydroxy-benzoesäure und 2-Acetaminophenol aus *Pseudomonas*-Kulturen [1]

3-Acetamino-4-hydroxy Benzoic Acid and 2-Acetamino Phenol from *Pseudomonas* Cultures

S. Winkler, W. Neuenhaus, H. Budzikiewicz

Institut für Organische Chemie der Universität, Greinstr. 4, D-5000 Köln 41
und

H. Korth und G. Pulverer

Hygiene-Institut der Universität, Goldenfelsstr. 21, D-5000 Köln 41

Z. Naturforsch. **40c**, 474–476 (1985); received February 22, 1985

Pseudomonas, Chorismic Acid Metabolism (Alternative Route), Phenazine Biosynthesis

From *Pseudomonas cepacia* cultures 3-acetamino-4-hydroxy-benzoic acid has been isolated. This compound is of biogenetic interest as it suggests an alternative route in the chorismic acid metabolism initiated by an attack of an equivalent of NH_3 at C-5 rather than at C-2 as usually observed. Implications on the phenazine biosynthesis have been discussed.

Eine Reihe experimenteller Befunde weist darauf hin, daß die mikrobielle Biosynthese mehrerer wichtiger Heterozyklen (z. B. Phenazine, Phenoxazine) über eine Zwischenstufe verläuft, die durch Angriff von NH_3 (z. B. in Form des Amidstickstoffs des Glutamins [2]) an C-2 der Chorisminsäure (**1**) entstanden ist (**2**) [2, 3]. An einfachen Verbindungen, die sich von **2** ableiten, konnten isoliert werden: (2S, 3S)-2,3-Dihydro-3-hydroxyanthranilsäure (**3**) aus *Streptomyces aureofaciens* [4] und *St. zaomyceticus* [5], ihr Milchsäureester (= Oryzoxymycin) aus *St. venezuelae* [6], der entsprechende Aldehyd aus *St. amylovorus* [7] sowie 3-Hydroxyanthranilsäure (**4**) aus *Klebsiella pneumoniae* [8]. Alternativer Angriff von NH_3 an C-5 von **1** sollte zu **5** führen. Daß diese Konkurrenzreaktion stattfindet, dafür spricht die Isolierung von 3-Acetamino-4-hydroxybenzoesäure (**6**) aus dem Kulturmedium von *Pseudomonas cepacia* Stamm 59d [9].

Das ^1H -NMR-Spektrum von **6** zeigt neben dem CH_3CO -Singulett bei 2,18 ppm das für einen 1,3,4-trisubstituierten Benzolring typische Muster: 6,89 (d, 8,5 Hz): H-5, 7,69 (dd, 8,5 und 2,1 Hz): H-6 und 8,40 (d, 2,1 Hz) ppm: H-2. Im Massenspektrum finden sich m/z (% rel. Int.) 195 (16): M^+ , 177 (4): $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 153 (100): $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CO}]^+$, m/z 136 (35): $[m/z$

153-OH] $^+$ und m/z 43 (65): CH_3CO^+ . Die Tatsache, daß m/z 153 OH und nicht H_2O (sog. *ortho*-Effekt [10]) verliert, schließt aus, daß sich die NHCOCH_3 - oder die OH-Gruppe *o*-ständig zur Carboxylgruppe befindet (vergl. Acetylanthranilsäure: $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CO}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 100%, bei *p*-Acetaminobenoesäure fehlt dieses Ion; ebenso zeigt Salicylsäure, nicht aber *m*- und *p*-Hydroxybenzoesäure $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ [11]). Damit bleiben als mögliche Strukturen **6** und **7** (letzte mußte auch in Betracht gezogen werden, da 4-Amino-2,3-dihydro-3-hydroxybenzoesäure als Vorläufer von *p*-Aminobenoesäure bei *Aerobacter aerogenes* nachgewiesen worden ist [12]. Eine Entscheidung konnte durch Synthese getroffen werden: Das Acetylierungsprodukt von 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure war identisch mit der isolierten Verbindung. Insbesondere unterscheidet sich das Aromatenmuster im ^1H -NMR-Spektrum (s. o.) deutlich von dem von **7** (7,48–7,51 (m): H-5+H-6 und 7,97 (d, 9,0 Hz) ppm): H-2. Daß es sich bei **6** und **7** um die N- und nicht um die O-Acetylverbindungen handelt, ergibt sich aus dem IR-Spektrum (1670: Amid I, 1600: Aromat, 1540 cm^{-1} : Amid II).

Weder **6** noch die freie 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure sind bisher in der Natur aufgefunden worden. Interessant ist aber, daß das aus einer *Streptomyces*-Art isolierte Pigment Ferroverdin 4-Hydroxy-3-nitrosobenoesäure als Baustein enthält [13]. Erwähnt sei auch, daß aus *Pseudomonas aeruginosa* (Mutante 13 cR) [14] 2-Acetaminophenol **8** isoliert

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz
Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/85/0700–0474 \$ 01.30/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

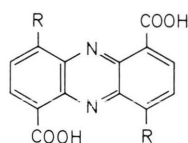
Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

und durch Vergleich mit synthetischem Material identifiziert werden konnte. Ob sich dies allerdings von **3** oder von **5** ableitet, ist nicht zu entscheiden.

Das Auffinden von **6** könnte auch ein neues Licht auf die Biosynthese hydroxylierter Phenazine werfen. Untersuchungen insbesondere an *Pseudomonas aureofaciens* [15] stehen mit der These im Einklang, daß aus zwei Molekülen **3** Phenazin-1,6-dicarbonsäure (**9**) entsteht, und daß Hydroxygruppen (gegebenenfalls nach ein- oder zweimaliger Decarboxylierung) nachträglich eingeführt werden. *Pseudomonas cepacia* nimmt unter den Phenazinbildnern [16] eine Sonderstellung ein, da sie als einzige 4,9-Dihydroxyphenazin-1,6-dicarbonsäure (**10**) (und zwar als Hauptpigment) bildet [17]. Es liegt nahe anzunehmen, daß zwei Moleküle **5** sich unter Oxidation zu **10** zusammenlagern, daß also hier ein alternativer Weg beschritten wird [18].



9: R = H

10: R = OH

Experimenteller Teil

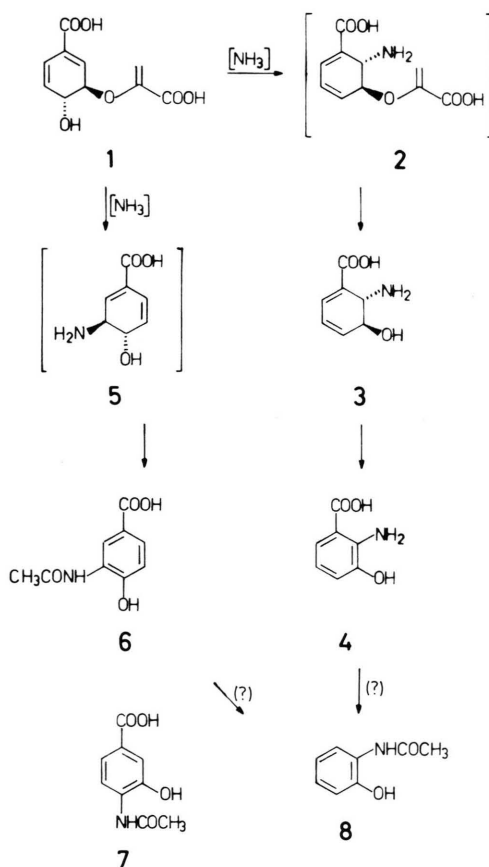
Geräte:

Massenspektrometer FINNIGAN 3200; NMR Bruker WM 300 (**6** und **7**) und EM 390 (**8**); IR-Spektrophotometer 720, Perkin-Elmer.

3-Acetamino-4-hydroxybenzoesäure (6). (a) Zehn 1-l-Rührkulturen von *Pseudomonas cepacia* (Stamm 59d) [9] wurden durch Zentrifugieren von den Zellen befreit, die polaren Verbindungen an XAD Typ 4 (SERVA, Heidelberg) adsorbiert und mit CH₃OH eluiert. Säulenchromatographie an Kieselgel mit CHCl₃/CH₃OH 5:1 erlaubte die Isolierung von **6**, das durch erneute Chromatographie gereinigt wurde (Reinheitskontrolle durch Dünnschichtchromatographie, Detektion durch Besprühen mit FeCl₃-Lösung). (b) Durch 5-min-Kochen von 500 mg 3-Amino-4-hydroxybenzoesäure (FLUKA, Buchs) mit 1,6 ml Acetanhydrid und 1,5 ml Eisessig unter Rückfluß. Aufarbeitung und chromatographische Reinigung wie oben. Schmp. 249–250 °C (Zers.); Lit. [19] 251–252 °C. IR-, ¹H-NMR- (CD₃OD) und Massenspektrum siehe Text.

4-Acetamino-3-hydroxybenzoesäure (7) wurde in analoger Weise aus 4-Amino-3-hydroxybenzoesäure (aus 3-Hydroxy-4-nitrobenzoesäure, EGA, Steinheim) hergestellt. Schmp. 245–247 °C; Lit. [19] 250–251 °C. IR: siehe Text. ¹H-NMR (CD₃OD): 2,20 (s): CH₃CO, 7,48–7,51 (m): H-5 + H-6, 7,97 (d, 9,0 Hz) ppm: H-2. Massenspektrum *m/z* (% rel. Int.): 195 (6): M⁺, 177 (1), 178 (1), 153 (57), 146 (40), 124 (8), 43 (100).

2-Acetaminophenol (8). (a) Die CHCl₃-Fraktion des Kulturmediums von *Pseudomonas aeruginosa* (Mutante 13 cR) [14] wurde auf Kieselgelplatten mit CCl₄/Ethylacetat 1:2 aufgetrennt, wobei **8** zwischen 2-Hydroxyphenazin und Phenazin-1-carbonsäure lief. Weitere Reinigung erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel 60 mit demselben Laufmittel und anschließend mit CHCl₃/Aceton 5:1. Schmp. 163 °C. Massenspektrum *m/z* (% rel. Int.): 151 (14): M⁺, 133 (3): [M-H₂O]⁺, 109 (100): [M-CH₂CO]⁺, 80 (32): [*m/z* 109-CHO]⁺. ¹H-NMR (CD₃OD): 2,18 (s): CH₃CO, 6,87–7,10 (m): H-3, H-4, H-5, 7,60 (d,



6Hz): H-6. IR: 1658, 1600, 1520 cm^{-1} (Amid-Banden und Aromat). (b) 1 g *o*-Aminophenol wurde mit 1 g Acetanhydrid und 10 ml Pyridin 4 Std. auf 50 °C erwärmt, mit Wasser versetzt, mit Ethylacetat extrahiert und zur Abtrennung des O-Acetates mit ver-

dünnter NaOH-Lösung ausgeschüttelt. Nach Aufarbeitung und Chromatographie an Kieselgel 60 mit $\text{CHCl}_3/\text{Aceton}$ 5:1 Ausbeute 500 mg (36,2%). Schmp. und Misch-Schmp. 163 °C. Spektroskopische Daten wie oben.

- [1] Teil XXIV der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“. Für Teil XXIII s.: U. Hildebrand, K. Taraz, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **40c**, 201 (1985).
- [2] R. B. Herbert, J. Mann und A. Römer, *Z. Naturforsch.* **37c**, 159 (1982).
- [3] P. P. Policastro, K. G. Au, Ch. T. Walsh und G. A. Berchtold, *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 2443 (1984).
- [4] J. R. D. McCormick, J. Reichenenthal, U. Hirsch und N. O. Sjolander, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 3711 (1962).
- [5] M. Iwata, Y. Kodama, B. Asada, H. Iwamatsu, Y. Suzuki, T. Watanabe, T. Ito und Y. Sekizawa, *Sci. Reports Meiji Seika Kaisha* **18**, 18 (1979).
- [6] T. Hashimoto, Sh. Takahashi, H. Naganawa, T. Takita, K. Maeda und H. Umezawa, *J. Antibiot.* **25**, 350 (1972); T. Hashimoto, Sh. Kondo, H. Naganawa und T. Takita, *J. Antibiot.* **27**, 86 (1974).
- [7] Y. Sumino, Sh. Akiyama, K. Haibara, M. Asai und K. Mizuno, *J. Antibiotics* **29**, 479 (1976).
- [8] N. Mohr, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Liebigs Ann. Chem.* **1981**, 1515.
- [9] G. J. Bukovits, N. Mohr, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **37b**, 877 (1982).
- [10] H. Schwarz, *Topics of Current Chemistry* **73**, 231 (1978).
- [11] EPA/NIH Mass Spectral Data Base, U.S. Govt. Printing Office, 1978–1980, S. 885 und 4315 bzw. 330.
- [12] K. Altendorf und B. Gilch, *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* **220**, 296 (1972).
- [13] A. Ballio, H. Bertholdt, A. Carilli, E. B. Chain, V. Di Vittorio, A. Tonolo und L. Vero-Barcellona, *Proc. Royal Soc. B.* **158**, 43 (1963).
- [14] W. Neuenhaus, A. Römer, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **35b**, 385 (1980).
- [15] A. Römer und E. Lange, *Z. Naturforsch.* **38c**, 539 (1983) und dort angegebene Literatur.
- [16] A. Römer, H. Scholl, H. Budzikiewicz, H. Korth und G. Pulverer, *Z. Naturforsch.* **36b**, 1037 (1981).
- [17] H. Korth, A. Römer, H. Budzikiewicz und G. Pulverer, *J. Gen. Microbiol.* **104**, 299 (1978); s. auch V. V. Smirnov, A. D. Gavagula und E. A. Kiprianova, *Antibiotiki* **27**, 577 (1982).
- [18] M. Podojil und N. N. Gerber, *Biochemistry* **9**, 4616 (1970).
- [19] G. Heller, *J. prakt. Chem.* **129**, 257 (1931).