

Mikrobiologische Umwandlungen nichtsteroider Strukturen, VII¹⁾

Mikrobielle Glucosidierung einer phenolischen Hydroxylgruppe

Klaus Kieslich*, Hans-Jörg Vidic, Karl Petzoldt, Georg-Alexander Hoyer

Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen,
Max-Dohrn-Straße, D-1000 Berlin 10

Eingegangen am 31. Oktober 1975

5,7-Dichlor-2-methyl-8-chinolinol (1) wird mit *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159) in das 4-*O*-Methyl- β -glucosid 2 übergeführt. 5-Chlor-2-methyl-7,8-chinolindiol (3) ergibt sowohl das 7- als auch das 8-(4-*O*-Methyl- β -glucosid) (4, 5). 6-Hydroxytetralon (6) bildet ebenfalls ein 4-*O*-Methyl- β -glucosid (7). Bis(4-acetoxyphenyl)methylenecyclohexan (8) wird nach intermediärer enzymatischer Verseifung mit *Sporotrichum sulfurescens* in ein Mono-4-*O*-methyl- β -glucosid (10) umgewandelt, während *Rhizopus colinii* (ATCC 8996) ein unsubstituiertes β -Glucosid (11) bildet.

Microbiological Transformations of Nonsteroidal Structures, VII¹⁾

Microbiological Glucosidation of a Phenolic Hydroxyl Group

5,7-Dichloro-2-methyl-8-quinolinol (1) is transformed to the 4-*O*-methyl- β -glucoside (2) by *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159). 5-Chloro-2-methyl-7,8-quinolinediol (3) yields the 7- and the 8-(4-*O*-methyl- β -glucoside) (4, 5). 6-Hydroxytetralone forms also the 4-*O*-methyl- β -glucoside (7). Bis(4-acetoxyphenyl)methylenecyclohexane (8) is transformed after intermediary saponification to the mono-4-*O*-methyl- β -glucoside (10) by *Sporotrichum sulfurescens*, whereas *Rhizopus colinii* (ATCC 8996) forms the unsubstituted mono- β -glucoside (11).

Eine mikrobiologisch-enzymatische Übertragung von Glucose von einem Polysaccharid auf ein Aglykon ohne Kohlenhydratstruktur ist eine bisher selten beschriebene Reaktion. Die Umwandlungen von Uracil und Orotsäure über Uridin zu Uridin-5'-diphosphat-glucose mit Hefen und Bakterien²⁾ ist formal als Ersatz der normalen Phosphoribosidierung aufzufassen. Zellfreie Hefeextrakte ergeben aus Uridin-mono- und -diphosphat das gleiche Endprodukt³⁾; Cytidinsäure wird durch *Candida petrophilum* analog zu Cytidin-diphosphat-glucose vergrößert⁴⁾. Die Reaktion von Antranilsäure zu einem β -Glucosidester mit *Bacillus megaterium*⁵⁾ ist als Sonderfall schwer einzuordnen. Dagegen kommt die Bildung eines 5 α -Glucosides des Pyrid-

¹⁾ VI. Mitteil.: J. Daum und K. Kieslich, Naturwissenschaften 61, 167 (1974); K. Kieslich, H. Wiegand, G.-A. Hoyer und D. Rosenberg, Chem. Ber. 106, 2636 (1973).

²⁾ Kyowa Fermentation Co., Ltd. (Erf. K. Nakayama und H. Hagino), DOS 2000879 (6. Aug. 1970) [C. A. 73, 1100080r (1970)].

³⁾ E. Raul und E. Trucco, Arch. Biochem. Biophys. 34, 482 (1951).

⁴⁾ Asahi Chem. Ind. (Erf. I. Takeda, S. Watanabe und N. Kitajima), Jap. Pat. 7333390 (1969) [C. A. 80, 119212 (1974)].

⁵⁾ D. Tabone und J. Tabone, Bull. Soc. Chim. Biol. J. Microbiol. Serol. 36, 561 (1954).

oxins mit *Micrococcus* sp.⁶⁾ oder *Sarcina lutea*⁷⁾ sowie eines Riboflavin-glucosides mit *Lactobacillus*-, *Leuconostoc*- und *Streptomyces*-spec.^{8, 9)} oder verschiedenen Mucorstämmen¹⁰⁾ der Vorstellung eines Glucosetransfers näher. Die Verwendung einer zellfreien Amylase oder Transglycosylase aus Aspergillen und einem Poly- oder Oligosaccharid als Glucosendonor ermöglicht schließlich die Herstellung der 16 α - α -D-Glucoside von 16 α -Hydroxysteroiden mit vicinaler 17-Hydroxygruppe^{11, 12)} in eindeutiger Reaktion.

Kürzlich beschrieben *Hovorková* und Mitarbb.^{13, 14)} eine mikrobiologische Glucosidierung von Monohydroxy-¹³⁾ und Dihydroxyanthrachinonen¹⁴⁾ mit *Streptomyces aureofaciens*, einem Stamm, der neben Chlortetracyclin ein 6 β -Glucosid des Tetracyclins (Aureovocin) bildet¹⁵⁾.

Parallel zu diesen letzten Arbeiten fanden wir ebenfalls eine mikrobiologisch-enzymatische Glucosidierung einer phenolischen Hydroxygruppe mit einer β -Glucosidbildung von 3-Hydroxy-1,3,5-östratrienen mit *Rhizopus*- und *Sporotrichum*-Stämmen¹⁶⁾. Der Pilz *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159) bildete vorwiegend ein 4-O-Methylglucosid¹⁶⁾.

Diese Reaktion wurde auch bei der anschließenden analogen Incubation einiger Nichtsteroidstrukturen mit phenolischer Hydroxygruppe beobachtet, worüber hier berichtet wird.

5,7-Dichlor-2-methyl-8-chinolinol (**1**) – ein Bakteriostatikum, bekannt unter dem Namen Chlorquinaldol – sollte zur Wirkungs- und Löslichkeitsveränderung hydroxyliert werden. Dafür war eine Hydroxylierung des Methylsubstituenten mit dem Pilz *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159) beabsichtigt, dessen Oxygenase grundsätzlich zu einer solchen Reaktion befähigt ist¹⁷⁾. Überraschenderweise entstand jedoch nur ein polares Umwandlungsprodukt, dessen Struktur als 4-O-Methyl- β -glucosid **2** aufgeklärt wurde. Die Ausbeute an isoliertem Reinprodukt betrug 30%.

Das NMR-Spektrum und das Massenspektrum von **2** zeigen, daß ein O-Methyl- β -glucosid von **1** vorliegen muß. Die Stellung der Methoxygruppe läßt sich durch Vergleich mit den NMR-Spektren der analogen Zuckerderivate von 3-Hydroxy-1,3,5-östratrienen¹⁶⁾ bestimmen. Im Zuckerteil sind die Spektren sowohl in den Signallagen als auch in den Signalformen vollkommen übereinstimmend, was das Vorliegen des gleichen Zuckers bedeutet. Bei den Steroidderivaten konnten in den Triacetaten im NMR das 4'-H, 5'-H und die beiden 6'-H klar voneinander getrennt und über die gegenseitigen Kopplungen eindeutig zugeordnet werden. Da das 4'-H (CDCl₃; δ 3.44 ppm t (9); C₅D₅N:

⁶⁾ F. Kawai, H. Yamada und K. Ogata, Agric. Biol. Chem. **35**, 184, 1660 (1971).

⁷⁾ K. Ogata, Jap. Pat. 7133198 (4. April 1967) [C. A. **76**, 2556d (1972)].

⁸⁾ Y. Suzuki und K. Uchida, Agric. Biol. Chem. **32**, 228 (1968).

⁹⁾ Y. Suzuki und K. Uchida, J. Agric. Chem. **45**, 247 (1971).

¹⁰⁾ Hayashibara Co., Ltd. (Erf. Y. Suzuki), US-Pat. 3669835 (14. April 1970) [C. A. **77**, 86677a (1972)].

¹¹⁾ Squibb, E. R., and Sons, Inc. (Erf. S. C. Pan und L. J. Lerner), US-Pat. 3451995 (19. April 1967) [C. A. **71**, 70909t (1969)].

¹²⁾ S. C. Pan und L. J. Lerner, US-Pat. 3616227 (16. Sept. 1968) [C. A. **76**, 111689v (1972)].

¹³⁾ N. Hovorková, J. Cudlin, J. Matěju, M. Blumauerová und Z. Vaněk, Collect. Czech. Chem. Commun. **39**, 3568 (1974).

¹⁴⁾ N. Hovorková, J. Cudlin, J. Matěju, M. Blumauerová und Z. Vaněk, Collect. Czech. Chem. Commun. **39**, 662 (1973).

¹⁵⁾ J. Vokoun, Z. Vaněk, M. Podojil, M. Blumauerová, M. Vondráček und A. Bendo, Czechoslov. Pat. Appl. PV 8211-70 (1970).

¹⁶⁾ Schering AG (Erf. K. Petzoldt, K. Kieslich und H. Steinbeck), DOS 2326084 (19. Mai 1973) [C. A. **82**, 86566s (1975)].

¹⁷⁾ R. A. Johnson, M. E. Herr, H. C. Murray und L. M. Reineke, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 4880 (1971).

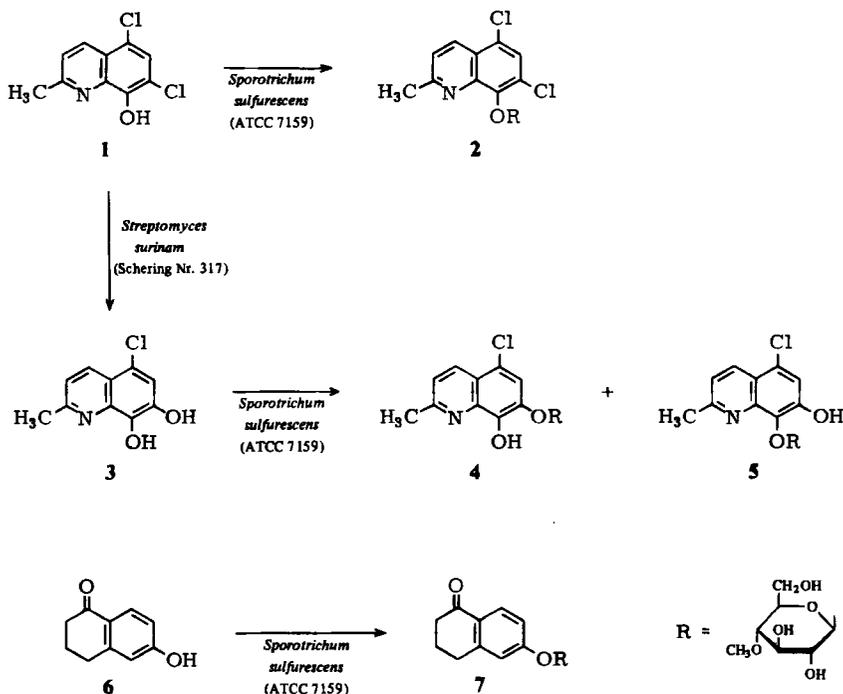
δ 3.62 ppm t (9)) von allen Zuckerprotonen bei höchstem Feld erscheint, muß es geminal zur Methoxygruppe angeordnet sein.

Bei dem Versuch der Methylhydroxylierung des Chlorquinaldols (1) mit einem Streptomyceten erfolgte mit *Streptomyces surinam* ein unerwarteter Austausch des 7-Chlorsubstituenten gegen eine Hydroxylgruppe, was in 16proz. Ausbeute zu einem 5-Chlor-2-methyl-7,8-chinolindiol (3) führte.

Der Ort der neuen Hydroxygruppe kann über die Lösungsmittelverschiebungen im NMR ($\text{CDCl}_3 \rightarrow \text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 4-H: $\Delta\delta = -0.07$ ppm; 6-H: $+0.28$ ppm¹⁸⁾) bestimmt werden. Nach Demarco et al.¹⁸⁾ sollte eine 5-Hydroxygruppe sowohl 4-H als auch 6-H kräftig paramagnetisch verschieben, während eine 7-Hydroxygruppe nur 6-H zu tiefem Feld verändern darf. Nach den vorliegenden NMR-Daten trifft der letztere Fall zu.

Auch 3 zeigte mit *Sporotrichum sulfurescens* 4-O-Methyl- β -Glucosidierung, wobei zwei isomere Glucoside (4 und 5) isoliert werden konnten. Beide lieferten bei der chemischen Spaltung 4-O-Methylglucose, die durch DC-Vergleich bestimmt werden konnte.

Im NMR zeigen beide Verbindungen das typische Bild von 4-O-Methyl- β -glucosiden. Bei 4 erscheint jedoch das 6-H bei 7.96 ppm. Diese ungewöhnliche Tieffeldlage kann nur erklärt werden, wenn der Zucker mit der 7-Hydroxygruppe verknüpft ist. Außerdem ähnelt das UV-Spektrum von 4 sehr dem von 1 (in Methanol λ_{max} (ϵ) 250 (45000), 315 (3520), 331 s nm (3100); in Methanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{NaOH}$ λ_{max} (ϵ) 264 (33300), 347 (4360), 371 s nm



¹⁸⁾ P. V. Demarco, E. Farkas, D. Doddrell, B. L. Mylari und E. Wenkert, J. Amer. Chem. Soc. **90**, 5480 (1968).

^{a)} + = paramagnetische Verschiebung; - = diamagnetische Verschiebung.

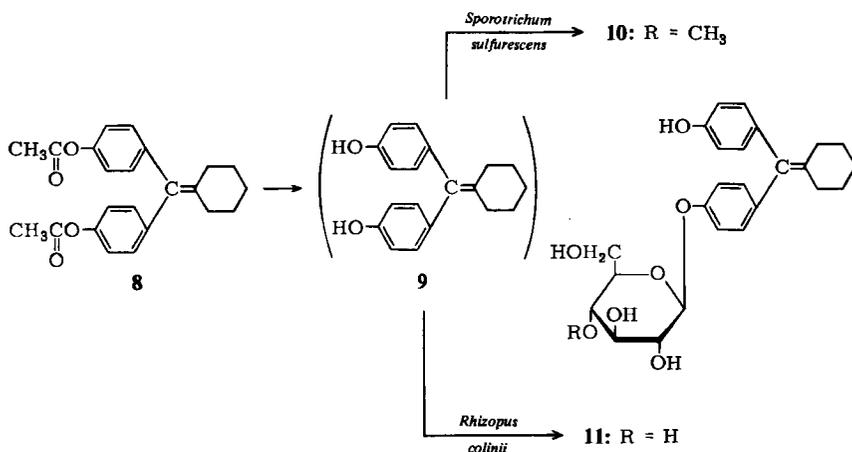
(3610)), besonders im alkalischen Medium, was auf gleiche Stellung der Hydroxygruppe hinweist. Bei **5** dagegen liegt das 8-(4-*O*-Methyl- β -glucosid) vor, wie aus der Ähnlichkeit der NMR-Signallagen des Chinolinsystems von **5** und **2** folgt.

Als einfache Grundstruktur wurde schließlich 6-Hydroxy-1-tetralon (**6**) eingesetzt, welches unter gleichen Bedingungen wieder das 4-*O*-Methyl- β -glucosid (**7**) bildete, wie aus dem typischen Bild im NMR zu ersehen ist.

Ebenfalls mit der Zielsetzung einer Hydroxylierung wurde das als nichtsteroider Ovulationsauslöser bekannte Cyclofenil mit *Sporotrichum sulfurescens* incubiert. Hierbei war eine Hydroxylierung des Cycloalkylrestes des Bis(4-acetoxyphenyl)methylencyclohexans (**8**) in Anlehnung an Hydroxylierungen von Benzylcyclohexan¹⁹⁾ angestrebt.

Die in Pilzstämmen weitverbreiteten Esterasen verseiften primär wie erwartet die beiden Acetatgruppen des Substrates. Das intermediär beobachtete **9** wurde jedoch wiederum ohne Hydroxylierungsreaktion zu 60% in ein [4-(α -Cyclohexylden-4-hydroxybenzyl)-phenyl]-4-*O*-methyl- β -D-glucopyranosid (**10**) umgewandelt, wie aus dem NMR-Spektrum ersichtlich.

Analog zur Umwandlung eines 3-Hydroxy-1,3,5-östratriens¹⁶⁾ wird bei der Verwendung von *Rhizopus colinii* (ATCC 8996) das nichtmethylierte Glucosid **11** gebildet.



Alle hier isolierten Glycoside sind β -Glucoside. Hinweise liegen vor, daß die 4'-*O*-Methylierung offenbar eine Folgereaktion des bereits entstandenen Glucosides ist²⁰⁾. Somit ist es wahrscheinlich, daß die Glucosidbildung eine normale Übertragung der vorgegebenen Glucose auf das Aglykon darstellt. Ob dieser Transfer über die allgemein übliche intermediäre Bildung von Uridin-diphosphat-glucose verläuft, wäre später zu klären.

Obwohl Substrate von kleinerer Molekulargröße wie Resorcin, Tyrosinol oder Salicylsäure unter gleichen Bedingungen keine Glucosidbildung zeigen, ist anzunehmen, daß diese Reaktion der phenolischen Hydroxylgruppe die Aufgabe einer gewissen Entgiftung des Substrates erfüllen soll.

¹⁹⁾ Upjohn Co. (Erf. G. S. Fonken, M. E. Herr und H. C. Murray), US-Pat. 3281330 (20. März 1964), Neth. Appl. 6503532 [C. A. 66, 9974v (1967)].

²⁰⁾ K. Petzoldt, unveröffentlicht.

Experimenteller Teil

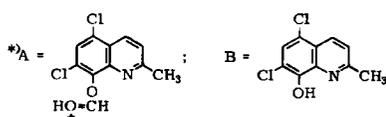
Schmelzpunkte: im Apparat nach Büchi SMP 20 bestimmt; nicht korrigiert. Dünnschichtchromatographie: an Kieselgel-Fertigplatten (Merck 60-F-254) aufsteigend; Sprühreagenz: 1 ml konz. Schwefelsäure + 20 ml 95proz. Äthanol mit 30 min Trocknung bei 130°C (Betrachtung im UV-Licht). NMR-Spektren: Varian HA 100, TMS als interner Standard. IR-Spektren: Perkin-Elmer PE 621 in KBr; UV-Spektren: Cary 14; Massenspektren: Varian MAT CH 7 bei 70 eV. Bei den MS-Daten werden nur die charakteristischen Fragment-Ionen mit einer Erklärung ihrer Entstehung angegeben. Die Basispeaks sind jeweils kursiv gedruckt. Die Fermentationen wurden in 2-Liter-Erlenmeyerkolben auf Rotationsschüttlern einer Eigenkonstruktion oder in 20-Liter-Glas- bzw. 50-Liter-Stahlfermentern (nichtrostend) entsprechender Marubishi-Yar-Fermenter-Analogen durchgeführt. Die Mikroanalysen wurden in unserem analytischen Kontrolllaboratorium unter Leitung von Dipl.-Ing. J. Huber ausgeführt.

(5,7-Dichlor-2-methyl-8-chinolinyl)-4-O-methyl- β -D-glucopyranosid (2): Ein 2-Liter-Erlenmeyerkolben mit 500 ml einer Nährlösung, bestehend aus 3% Glucose, 1% Cornsteep-liquor, 0,2% NaNO₃, 0,1% KH₂PO₄, 0,2% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,002% FeSO₄, 0,05% KCl, wurde mit der Abschwemmung einer 14-tägigen Schrägagarkultur von *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159) beimpft. Nach dreitägigem Wachstum auf einem Rotationsschüttler bei 30°C und 300 U/min wurde die Mycelsuspension als Inoculum für die Beimpfung eines 20-Liter-Glasfermenters verwendet, der mit 15 Liter eines sterilisierten Mediums der gleichen Zusammensetzung beschickt war. Die Germination wurde bei 29°C, einer Belüftung von 15 Liter/min und einer Rührgeschwindigkeit von 220 U/min durchgeführt, unter gelegentlicher Zugabe von Silicon SH als Antischaummittel. Nach einer Anwachszeit von 12 h wurde das Substrat in Form einer sterilfiltrierten Lösung von 3 g 5,7-Dichlor-2-methyl-8-chinolinol (1) in 100 ml Dimethylformamid zugesetzt. Die Umwandlung wurde durch Entnahme von Intervallproben kontrolliert, die mit Isobutylmethylketon extrahiert und durch Dünnschichtchromatographie im System Chloroform/Methanol/Eisessig 90 + 9 + 1 (2malige Entwicklung) analysiert wurden. Nach 23 h Kontaktzeit war das Ausgangsmaterial vollständig umgewandelt zu einem Hauptprodukt mit R_F 0.41 und einem Nebenprodukt mit R_F 0.13. Das Mycel wurde durch Zentrifugieren der Kulturbühe abgetrennt und mit Isobutylmethylketon ausgewaschen. Das Zentrifugat wurde zweimal mit Isobutylmethylketon extrahiert. Die vereinigten Waschlösungen und Extrakte (ca. 15 Liter) wurden in einem Umlaufverdampfer bei 50°C i. Vak. konzentriert und in einem Rotationsverdampfer bei gleicher Maximaltemp. zur Trockne evaporiert. Der Rückstand wurde durch Auswaschen mit Hexan von anhaftendem Siliconöl befreit und aus Aceton umkristallisiert: 1.58 g (30%) 2 mit Schmp. 205/207–208°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 209 (38600), 244 (47700), 294 s (5000), 300 (5290), 312 (4710), 326 nm (3270). – IR (KBr): 3420 (HO), 1605, 1590, 1495 (C=C), 1080 cm⁻¹ (C–O). – NMR (C₅D₅N): δ 2.66 (s, 3H, 2-CH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 3.70–4.00 (m, 2H, 4'-H und 5'-H), 4.10–4.50 (m, 4H, 2'-H, 3'-H und 2 6'-H), 5.73 (d, J = 8 Hz, 1H, 1'-H), 7.32 (d, J = 9 Hz, 1H, 3-H), 7.62 (s, 1H, 6-H), 8.26 ppm (d, J = 9 Hz, 1H, 4-H). – MS: m/e 403/405/407 (9 : 6 : 1; M⁺), 402/404/406 (9 : 6 : 1; M⁺ – H), 372/374/376 (9 : 6 : 1; M⁺ – CH₂OH), 256/258/260 (9 : 6 : 1; A^{*}), 227/229/231 (9 : 6 : 1; B^{*}), 199/201/203 (9 : 6 : 1, 227 – CO), 164/166 (3 : 1; 199 – Cl), 163/165 (3 : 1; 199 – HCl), 128 (199 – HCl – Cl).

C₁₇H₁₉Cl₂NO₆ (404.2) Ber. C 50.7 H 4.9 Cl 17.5 N 3.4 O 23.7

Gef. C 48.9 H 5.0 Cl 19.4 N 3.6 O 24.4



5-Chlor-2-methyl-7,8-chinolindiol (3): Unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen wurde *Streptomyces surinam* (Schering 317/2) angezüchtet und mit einer sterilfiltrierten Lösung von 3 g 5,7-Dichlor-2-methyl-8-chinolinol (1) in 100 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 52 h Kontaktzeit wurden noch 2% Ausgangsmaterial beobachtet und drei Umwandlungsprodukte (R_F 0,48, 0,22 und 0,10) nachgewiesen. Aufarbeitung wie oben ergab 2,9 g stark verunreinigtes Rohprodukt, das durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit Gradientenelution (Aceton/Hexan) aufgetrennt wurde. Aus den mittleren Fraktionen wurden 1,4 g des Hauptproduktes (R_F 0,48) isoliert, das zweimal aus Essigester umkristallisiert wurde: 440 mg (16%) 3 mit Schmp. 153/154–156°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 207 (28000), 252 (41100), 305 (1810), 350 nm (3040). – IR (KBr): 3500, 3320, 3100–2000 (HO), 1615, 1575, 1515 (C=C), 1200, 1175, 1160 cm^{-1} (C–O). – NMR (CDCl_3): δ 2,70 (s, 3H, 2- CH_3), 7,23 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 3-H), 7,33 (s, 1H, 6-H), 8,32 ppm (d, $J = 9$ Hz, 1H, 4-H); ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 2,49 (s, 3H, 2- CH_3), 7,09 (d, $J = 9$ Hz, 1H, 3-H), 7,61 (s, 1H, 6-H), 8,25 ppm (d, $J = 9$ Hz, 1H, 4-H).

$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClNO}_2$ (209,6) Ber. C 57,3 H 3,8 Cl 16,9 N 6,7 O 15,3

Gef. C 56,5 H 4,1 Cl 16,1 N 6,9 O 16,2

(5-Chlor-8-hydroxy-2-methyl-7-chinolinyl)- (4) und (5-Chlor-7-hydroxy-2-methyl-8-chinolinyl)-4-O-methyl- β -D-glucopyranosid (5): *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159) wurde unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen in einem 2-Liter-Erlenmeyer-Kolben 94 h angezüchtet. Jeweils 50 ml der Anzuchtkultur wurde zur Beimpfung von zehn 2-Liter-Erlenmeyer mit jeweils 500 ml Nährlösung verwendet. Nach 24 h Anwuchszeit wurden jeweils 100 mg 3 in 5 ml Dimethylformamid zugesetzt und bei 30°C und 300 U/min weitergeschüttelt. Nach 24 h Kontaktzeit war das Ausgangsmaterial vollständig umgesetzt zu zwei Umwandlungsprodukten mit R_F 0,50 und R_F 0,25 (DC-System Chloroform/Methanol/Eisessig (88 + 10 + 2)). Nach Aufarbeitung erhielt man 545 mg öligen Rückstand, der durch präp. Dünnschichtchromatographie aufgetrennt wurde. Die beiden kristallinen Fraktionen wurden aus Essigester umkristallisiert:

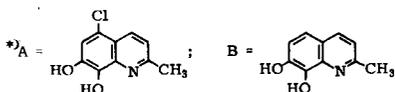
a) 46 mg (6%) 4 (R_F 0,23), Schmp. 190/192–194°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 251 (35500), 323 (2410), 335 nm (2400). – UV (Methanol/ H_2O /NaOH): λ_{\max} (ϵ) 264 (29600), 343 (2770), 373 nm (2590). – NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 2,55 (s, 3H, 2- CH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3), 3,70–4,00 (m, 2H, 4'-H und 5'-H), 4,10–4,50 (m, 4H, 2'-H, 3'-H und 2 6'-H), 5,72 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 1'-H), \approx 7,18 (3-H), 7,96 (s, 1H, 6-H), 8,22 ppm (d, $J = 9$ Hz, 1H, 4-H). – MS: m/e M^+ fehlt, 209/211 (3:1; A^*), 181/183 (3:1; 209 – CO), 175 (B^*), 147 (175 – CO), 146 (181 – Cl), 118 (146 – CO).

b) 10 mg (1%) 5 (R_F 0,50), Schmp. 190/192–195°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 209 (25400), 223s (17600), 242 (23700), 279 (3350), 306 (2490), 333 nm (3230). – UV (Methanol/ H_2O /NaOH): λ_{\max} (ϵ) 260 (23600), 292 (4200), 377 nm (3450). – NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 2,64 (s, 3H, 2- CH_3), 3,83 (s, 3H, OCH_3), 3,70–4,00 (m, 2H, 4'-H und 5'-H), 4,10–4,50 (m, 4H, 2'-H, 3'-H und 2 6'-H), 5,82 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 1'-H), \approx 7,20 (3-H), 7,60 (s, 1H, 6-H), 8,27 ppm (d, $J = 9$ Hz, 1H, 4-H).

Chemische Spaltung der Glycoside: 20 mg Glycosid wurden in 5 ml 2N H_2SO_4 1 h auf dem Dampfbad erhitzt. Nach dem Erkalten wurde zweimal mit Isobutylmethylketon extrahiert und die wäbr. Phase mit 2N NaOH neutralisiert. Bei Dünnschichtchromatographie einer Probe der wäbr. Phase im System Butanol/Pyridin/Wasser (70 + 15 + 15) und Anfärbung mit 0,2% Naphthoresorcin in Äthanol/20proz. Schwefelsäure (1:1) (10 min auf 140°C erwärmt) trat eine



violette Zone (R_F 0.83) auf. Diese Zone war identisch mit einem als 4-O-Methylglucose angesprochenen Zucker, der bei der analogen Spaltung eines mit *Sporotrichum sulfurescens* und Östron gebildeten Glycosids¹⁶⁾ resultierte.

(1-Oxo-6-tetralinyl)-4-O-methyl- β -D-glucopyranosid (7): Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurden in zehn 2-Liter-Erlenmeyer-Kolben insgesamt 1 g 6-Hydroxy-1-tetralon (6) in 50 ml Dimethylformamid mit *Sporotrichum sulfurescens* (ATCC 7159) fermentiert. Nach 24 h Kontaktzeit war bei vollständiger Umwandlung nur ein Reaktionsprodukt mit R_F 0.10 (System Benzol/Essigester 1 + 4) zu erkennen. Nach Aufarbeitung wurden 2.3 g Rohprodukt erhalten, das mehrmals aus Essigester umkristallisiert wurde: 250 mg (12%) 7, Schmp. 167/169–171°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 218 (15800), 268 nm (15700). – IR (KBr): 3380 (HO), 1670 (C=O), 1600, 1570, 1490 (C=C), 1265, 1250 (=C–O), 1085 cm^{-1} (C–O). – NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.81 (quin, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2), 2.51 (t, $J = 6$ Hz, 2H, COCH_2), 2.67 (t, $J = 6$ Hz, 2H, ArCH_2), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.70–4.00 (m, 2H, 4'-H und 5'-H), 4.10–4.50 (m, 4H, 2'-H, 3'-H und 2'6'-H), 5.56 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 1'-H), 7.02 (d, $J = 2$ Hz, 1H, 5-H), 7.07 (dd, $J = 8$ und 2 Hz, 1H, 7-H), 8.15 ppm (d, $J = 8$ Hz, 1H, 8-H).

$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$ (338.4) Ber. C 60.3 H 6.5 O 33.2 Gef. C 59.87 H 6.85 O 33.65

[4-(α -Cyclohexyliden-4-hydroxybenzyl)phenyl]-4-O-methyl- β -D-glucopyranosid (10): Unter den Bedingungen des ersten Beispiels – jedoch in einem 50-Liter-Fermenter aus nichtrostendem Stahl – wurden in 30 Liter Kulturbrühe 6 g Bis(4-acetoxyphenyl)methylen-cyclohexan (8) in 300 ml Dimethylformamid eingesetzt. Nach 60 h Kontaktzeit wurden nur noch geringe Anteile an Ausgangsmaterial (8) mit R_F 0.92 (System Chloroform/Methanol 85 + 15) und versieftem Ausgangsmaterial (9) mit R_F 0.78 ermittelt. Das Hauptprodukt mit R_F 0.32 wurde zu 50–70% analysiert. Nach Aufarbeitung und Umkristallisieren des Rohproduktes aus Isobutylmethylketon erhielt man 3.65 g 10, Schmp. 235–236°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 243 nm (18100). – IR (KBr): 3380 (HO), 1610, 1590, 1510 (C=C), 1235 (=C–O), 1100, 1085, 1060 (C–O), 835 cm^{-1} (aromat. C–H). – NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.55 (m, $W_{1/2} = 9$ Hz, 6H, 3 mal CH_2), 2.34 (m, $W_{1/2} = 20$ Hz, 4H, 2 mal =C– CH_2), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.70–4.00 (m, 2H, 4'-H und 5'-H), 4.10–4.50 (m, 4H, 2'-H, 3'-H und 2'6'-H), 5.47 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 1'-H), 7.00–7.40 ppm (m, 8H, aromat. H). – MS: m/e 456 (M^+), 280 (A^*), 263 (280 – HO), 251 (280 – C_2H_5), 237 (280 – C_3H_7), 223 (280 – C_4H_9), 211, 199, 186 (280 – $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), 107 (B^*).

[4-(α -Cyclohexyliden-4-hydroxybenzyl)phenyl]- β -D-glucopyranosid (11): Unter gleichen Bedingungen – jedoch mit *Rhizopus colinii* (ATCC 8996) – wurden 6 g 8 fermentiert. Nach 90 h Kontaktzeit entstanden 10% eines Umwandlungsproduktes mit R_F 0.18, das fast ausschließlich in der zentrifugierten Kulturbrühe enthalten ist. Das Konzentrat der Isobutylmethylketon-Extrakte wurde mit Natriumhydrogencarbonat gewaschen, um Fumarsäure und andere Inhaltsstoffe zu entfernen. Anschließend wurde das Umwandlungsprodukt, das noch eine freie phenolische Hydroxylgruppe enthält, mit 2 N NaOH extrahiert. Nach dem Ansäuern der alkalischen Phase wurde abermals mit Isobutylmethylketon extrahiert. Nach dem Einengen wurde der Rückstand aus Aceton/Isopropyläther/Hexan zur Kristallisation gebracht: 330 mg 11 mit Schmp. 230–232°C.

UV (Methanol): λ_{\max} (ϵ) 243 nm (18100). – IR (KBr): 3400 (HO), 1610, 1510 (C=C), 1230 (=C–O), 1085, 1070, 1060 (C–O), 835 cm^{-1} (aromat. C–H). – NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 1.56 (m, $W_{1/2} = 9$ Hz, 6H, 3 mal CH_2), 2.34 (m, $W_{1/2} = 20$ Hz, 4H, 2 mal =C– CH_2), 4.00–4.60 (m, 6H, 2'-H, 3'-H, 4'-H, 5'-H und 2'6'-H), 5.58 (d, $J = 7$ Hz, 1H, 1'-H), 7.00–7.40 ppm (m, 8H, aromat. H).

