

## 205. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 6-Chlorogenistein und 6,3'-Dichlorogenistein

164. Mitteilung<sup>1)</sup>

von W. A. König, C. Krauss und H. Zähler

Institut für organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg, D-2000 Hamburg und,  
Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen, D-7400 Tübingen

(27. VI. 77)

---

### Metabolites from Microorganisms. 6-Chlorogenistein and 6,3'-Dichlorogenistein

#### Summary

A strain of *Streptomyces griseus* produced chlorinated metabolites in media containing soybean meal. Two of these metabolites were isolated together with a chlorine free compound which could be identified as the isoflavone genistein (I) by its spectral properties and by comparison with an authentic sample. By NMR. and mass spectroscopy the chlorinated compounds were shown to be 6-chlorogenistein (II) and 6,3'-dichlorogenistein (III).

The 7-glucoside of genistein is a constituent of soybean meal; it is hydrolysed and chlorinated by *Streptomyces griseus*.

---

Bei der Suche nach chlorhaltigen Metaboliten aus Mikroorganismen fanden wir einen Stamm von *Streptomyces griseus*, der auf sojamehlhaltiger Nährlösung ein Gemisch chlorhaltiger Metabolite bildet. Ihr Nachweis beim Screening und während der Isolierung erfolgte über den Einbau von <sup>36</sup>Cl in die lipophilen Fraktionen. Die Auftrennung der Fraktionen an *Sephadex* LH 20 lieferte die Substanzen I, chlorfrei, II und III, beide chlorhaltig, und ein nicht weiter aufgetrenntes Gemisch chlorhaltiger Nebenkompenten. In Dünnschichtchromatogrammen liessen sich I, II und III durch ihre Fluoreszenz-Löschung in UV.-Licht von 350 nm sowie durch Violettfrärbung nach Besprühen mit Eisen(III)chlorid erkennen. Dadurch konnten die Metabolite auch ohne radioaktive Markierung isoliert werden.

Alle drei Verbindungen haben das gleiche UV.-Absorptionsspektrum (*Fig. 1*), dessen Maximum bei Zusatz von Natriummethylat eine bathochrome Verschiebung erfährt. Die IR.-Spektren sind sehr ähnlich und zeigen breite Hydroxylbanden sowie für aromatische Verbindungen charakteristische Absorptionen von (C=C)-Valenzschwingungen bei 1600, eine Carbonylabsorption bei 1650 und die (C-O)-Valenzschwingung bei 1250 cm<sup>-1</sup> (*Fig. 2*).

**Massenspektrometrische Untersuchungen.** – a) *Substanz I*. Das MS. von I weist einen Molekularpik (100% rel. Int.) bei *m/e* 270 auf (*Fig. 3*). Eine exakte Massenbe-

<sup>1)</sup> 163. Mitteilung, siehe [1].

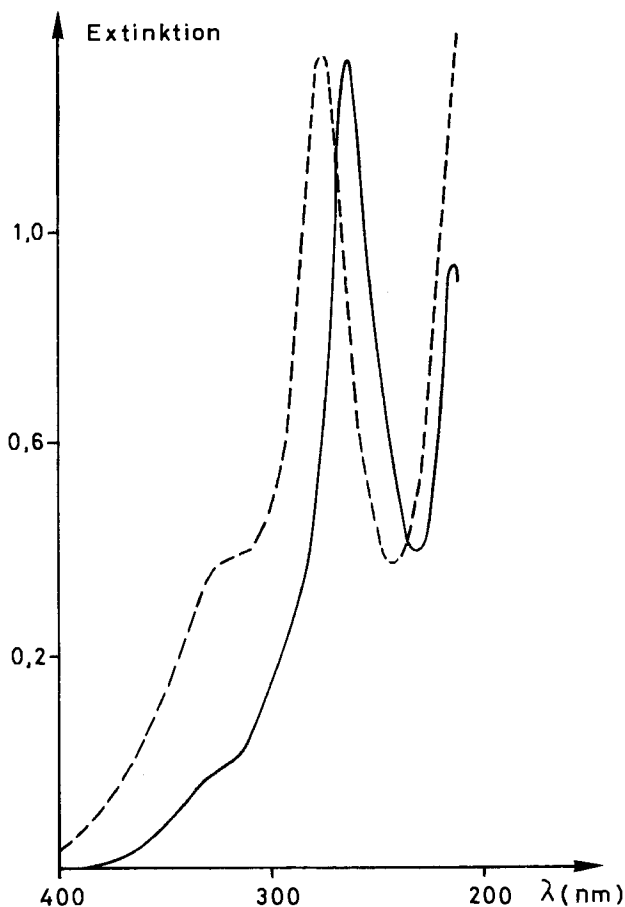


Fig. 1. UV.-Spektrum von I, II und III in Uvasol (—) und nach Zusatz von Natrium (---)

stimmung durch Hochauflösung ergab die Summenformel  $C_{15}H_{10}O_5$ . Die Anzahl der Hydroxygruppen wurde durch Trifluoracetylierung bzw. Trimethylsilylierung bestimmt. Die MS. beider Derivate lassen erkennen, dass drei OH-Gruppen reagiert haben. Das Molekulargewicht des Trifluoracetylderivates beträgt 558, das des Trimethylsilylderivates 486. Die Molekel-Ionen in den MS. dieser Derivate können eindeutig zugeordnet werden.

Diese Daten und die Untersuchung der massenspektrometrischen Fragmentierung von I wiesen auf ein Flavonderivat hin. I ist nicht identisch – wie zunächst vermutet – mit Apigenin (5, 7, 4'-Trihydroxyflavon), wohl aber mit dem entsprechenden Isoflavon Genistein (5, 7, 4'-Trihydroxyisoflavon). Die MS. von Flavonen und Isoflavonen sind von Audier [2] untersucht worden. Im *Schema 1* sind die charakteristischen Fragment-Ionen von Genistein wiedergegeben. Die MS. von Apigenin und Genistein und deren Trimethylsilyl-derivate unterscheiden sich nur geringfügig. Charakteristische Unterschiede weisen dagegen die NMR.- und UV.-Spektren auf.

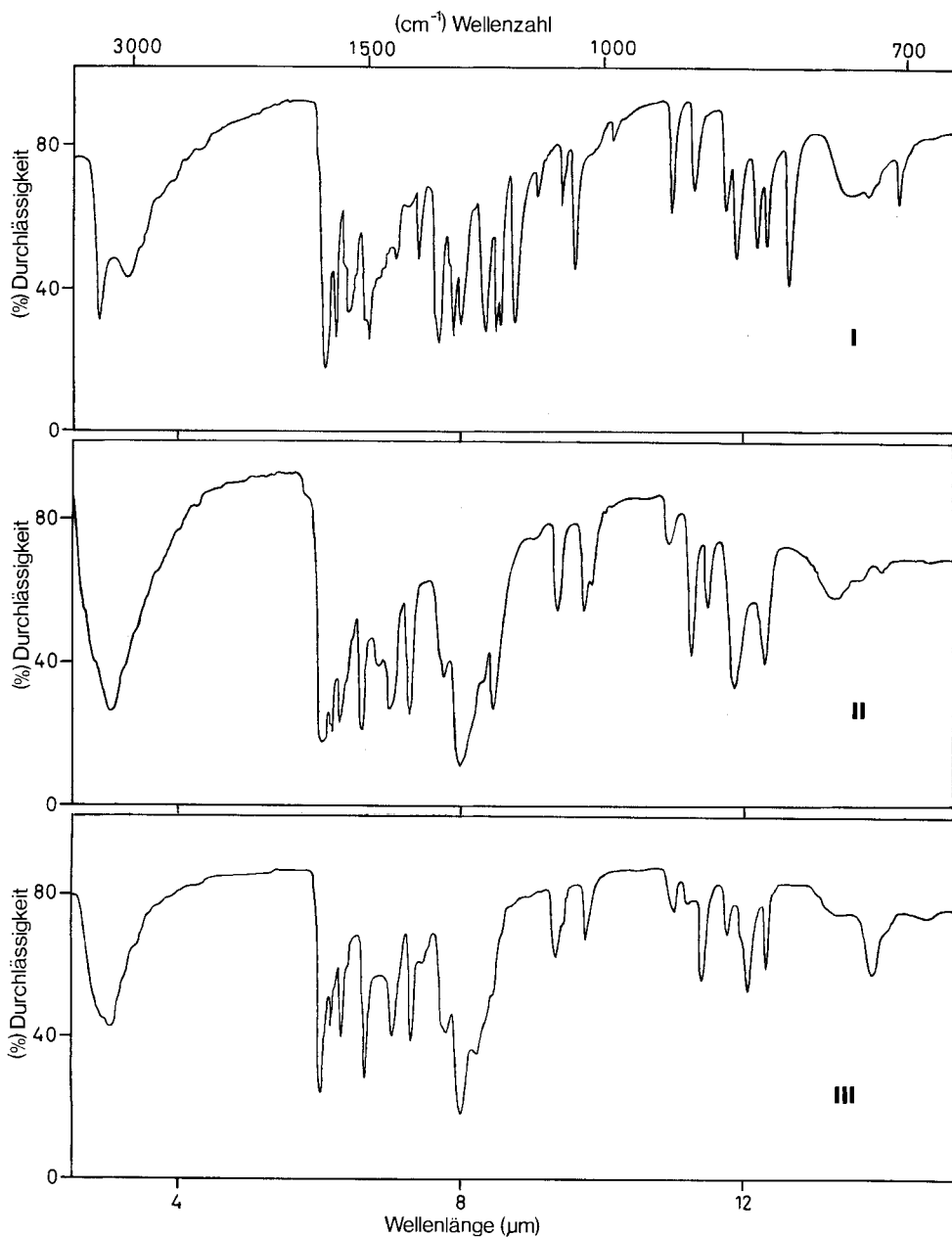


Fig. 2. IR.-Spektren von I, II und III

b) *Substanz II*. Die Molekel-Ionen im MS. von II (Fig. 4) bei  $m/e$  304 und 306 lassen das Isotopenverhältnis einer Monochlorverbindung erkennen. Die Verschiebung von  $M^+$  (für Genistein bei  $m/e$  270) nach  $m/e$  304 weist auf die Substitution eines H- durch ein Cl-Atom hin. Dies wird durch Hochauflösung (Summenformel:

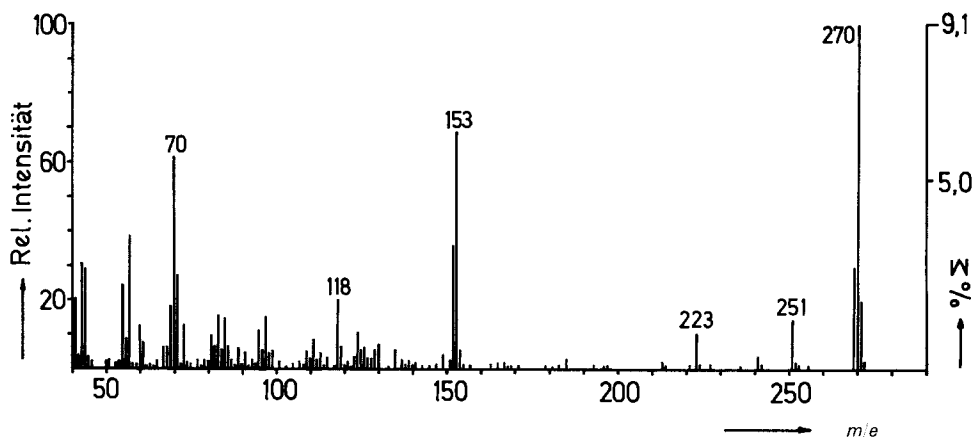
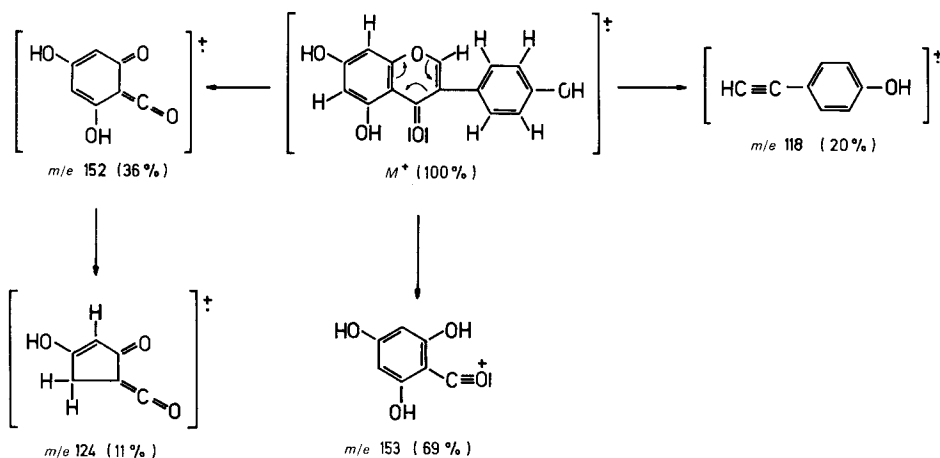


Fig. 3. MS. von Genistein (I)

Schema 1. Fragment-Ionen und relative Intensitäten im MS. von Genistein (I)



$\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClO}_5$ ) bestätigt. Die Tatsache, dass das Fragment-Ion von II mit  $m/e$  118 gegenüber dem entsprechenden Ion von Genistein (I) nicht nach höheren Massenzahlen verschoben ist, deutet an, dass der Chlor-Substituent im Benzopyron-System zu suchen ist. Das Fehlen eines intensiven Ions bei  $m/e$  152 und 153 und das Auftreten des um 34 Einheiten nach  $m/e$  186 und 187 verschobenen Ions lässt den Schluss zu, dass das Cl-Atom an C(6) oder C(8) des Genisteins haftet. Dieser Befund wird durch eine Verschiebung des Ions von  $m/e$  124 in I nach  $m/e$  158 in II gestützt und durch Hochauflösung des Ions  $m/e$  186 ( $\text{C}_7\text{H}_3\text{ClO}_4$ ) bewiesen.

c) *Substanz III*. Das Molekül-Ion im MS. (Fig. 5) bei  $m/e$  338 sowie das Isotopenverhältnis von  $m/e$  338 zu  $m/e$  340 spricht für die Gegenwart von zwei Chloratomen. Auch in diesem Fall lassen Verschiebungen im unteren Massenzahlenbereich Hinweise auf die Lage der Chlor-Substituenten zu. Die Fragment-Ionen des Genistein-

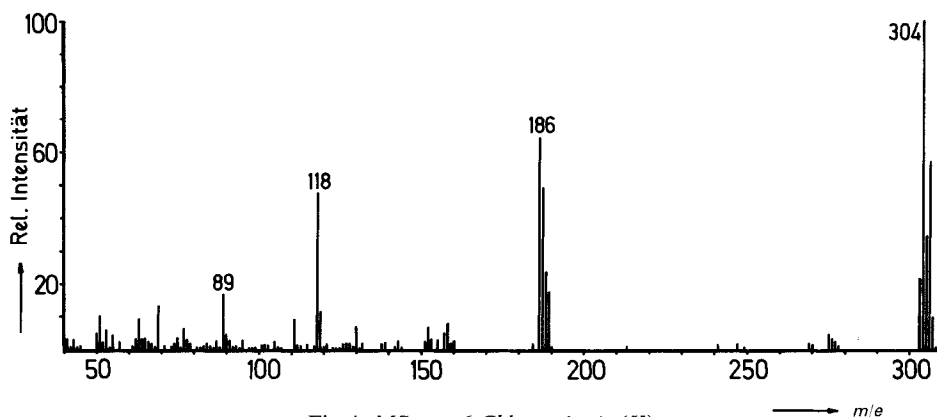


Fig. 4. MS. von 6-Chlorogenin (II)

Spektrums bei  $m/e$  118, 152 und 153 liegen bei III jeweils um 34 Einheiten höher, nämlich bei  $m/e$  152 ( $C_8H_5ClO$ ), 186 ( $C_7H_3ClO_4$ ) und 187 ( $C_7H_4ClO_4$ ). Daraus folgt, dass sich sowohl in 6- oder 8-Stellung des Genisteins als auch am *p*-Hydroxyphenyl-Substituenten ein Chloratom befindet.

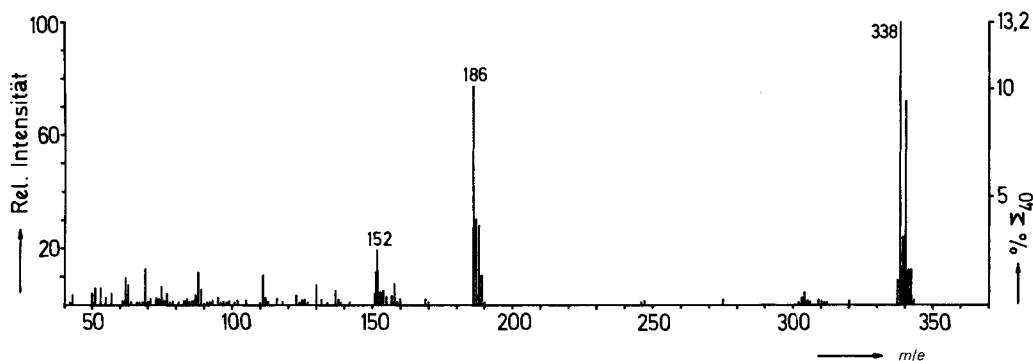


Fig. 5. MS. von 6,3'-Dichlorogenin (III)

**NMR.-Untersuchungen.** – Die  $^1H$ -NMR.-Spektren (270 MHz) der drei Isoflavone wurden in  $CDCl_3$ /Aceton- $d_6$  untersucht (Fig. 6) und mit den Spektren von Flavon- und Isoflavon-Derivaten aus der Literatur [3] verglichen. Die Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte nach den Angaben von *Mabry et al.* [3]. Ein Vergleich des Spektrums von II mit dem von Genistein (I) lässt erkennen, dass das Signal von H-C(6) für II fehlt ( $\delta$  bei 6,3 ppm für I), während das bei I durch *m*-Kopplung zwischen H-C(6) und H-C(8) ( $J=2,2$  Hz) als Dublett erscheinende Signal von H-C(8) (6,42 ppm) bei II als Singulett (6,5 ppm) erscheint; die übrigen Signale sind, abgesehen von geringen Abweichungen der chemischen Verschiebungen gleich, insbesondere die durch *o*-Kopplung als Dublette ( $J=8,6$  Hz) erscheinenden Signale von H-C(3') und H-C(5') (6,93 ppm) bzw. von H-C(2') und H-C(6') (7,48 ppm). Da sich die Einführung eines Chloratoms in ein aromatisches System auf die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen nur wenig auswirkt, kann angenommen werden,

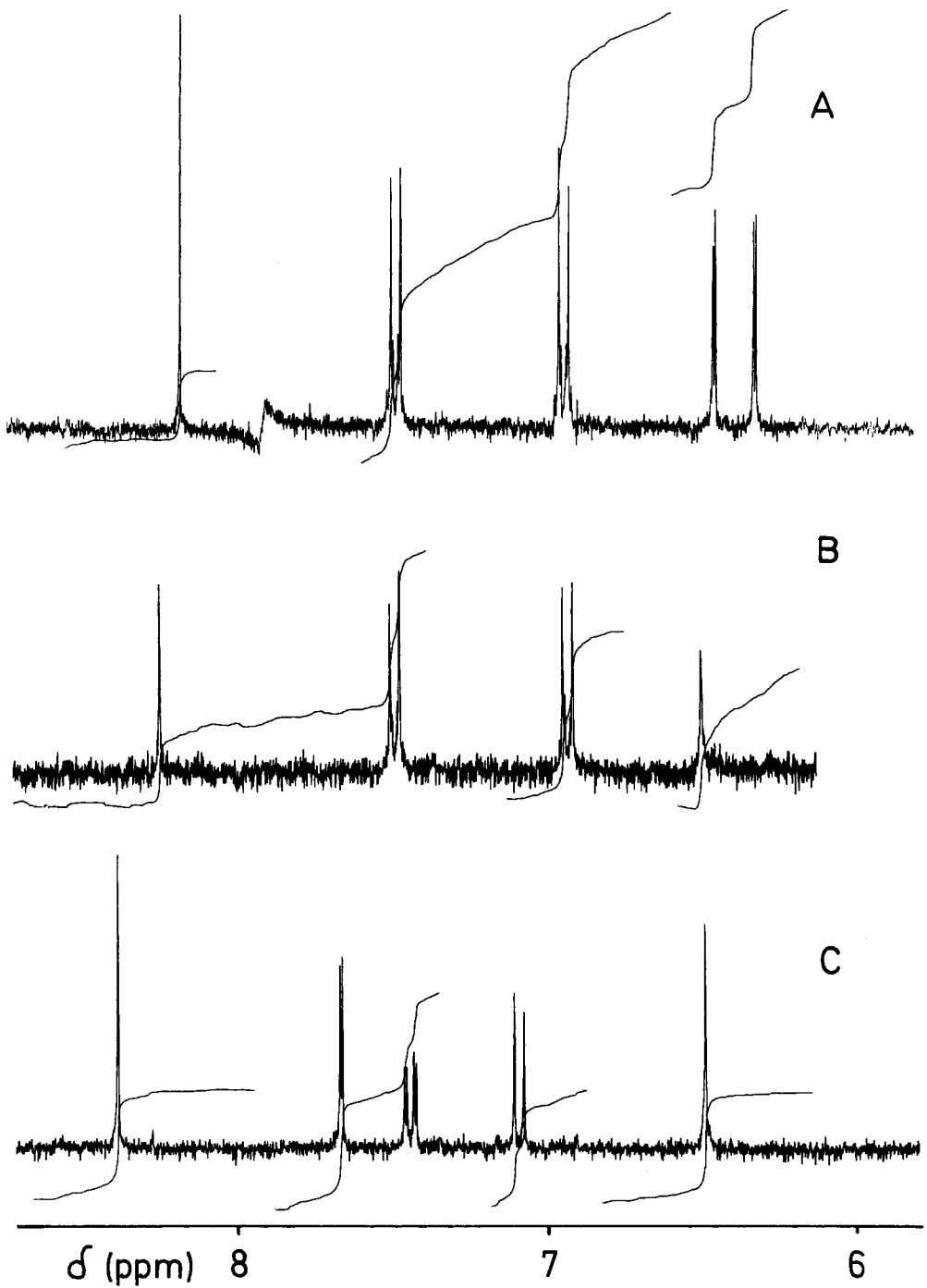


Fig. 6. NMR.-Spektren von I-III; A: Genistein (I); B: 6-Chlorogenistein (II); C: 6,3'-Dichlorogenistein (III)

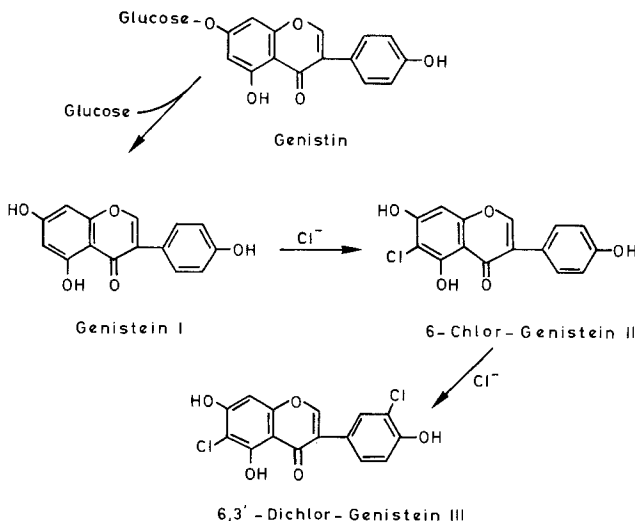
dass das fehlende Signal von H-C(6) auf eine Chlor-Substitution an C(6) zurückzuführen ist.

Eine tiefgreifende Veränderung ist im NMR.-Spektrum des Dichlor-Derivats III zu beobachten. Das Signal von H-C(6) fehlt auch hier, was für Cl-C(6) spricht. Zusätzlich ist erkenntlich, dass für die Protonen des *p*-Hydroxyphenyl-Substituenten drei Signale auftreten. Zwei *o*-ständige Protonen erscheinen als Dublett ( $J=8,6$  Hz) bei 7,1 ppm bzw. als Dublett eines Dubletts ( $J_1=8,6$ ,  $J_2=2,2$  Hz) bei 7,46 ppm. Hierbei kann es sich nur um H-C(5') und H-C(6') handeln. Ein weiteres Signal bei 7,68 ppm tritt als Dublett ( $J=2,2$  Hz) auf. Die Kopplungskonstante spricht für *m*-Kopplung, während die chemische Verschiebung zeigt, dass dieses Signal H-C(2') zuzuordnen ist. Bei III muss es sich daher um 6,3'-Dichlor-genistein handeln.

**Herkunft der Isoflavone.** - Sojamehl enthält die Glucoside der Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein, wobei das Genistein-glucosid, Genistin, die Hauptkomponente darstellt [4]. Es ist anzunehmen, dass der Streptomyces Tü 6 das Genistin spaltet, die Glucose verwertet und das verbleibende Isoflavon in zwei Stufen zum 6,3'-Dichlor-genistein chloriert (*Schema 2*). Die Summe der isolierten Substanzen I-III entspricht dem Gehalt an Genistein im Sojamehl der Nährlösung. Die nicht getrennten Nebenkomponenten dürften mit einiger Wahrscheinlichkeit chlorierte Derivate des Daidzeins und des Glyciteins darstellen.

Kürzlich haben *Umezawa et al.* [5] bei der Suche nach Substanzen mit blutdrucksenkender Wirkung Genistein sowie Hydroxy- und Methoxyderivate isoliert. Die Autoren halten auch für diese Isoflavone eine Herkunft aus dem Sojamehl der Nährlösung für möglich. Chlorierte Metabolite aus Mikroorganismen sind in grösserer Zahl bekannt [6] und sind alle dem Sekundärstoffwechsel zuzuordnen. Welche Funktion die Chlorierung eines Metaboliten oder gar eines von aussen zugeführten Substrates für den Produzenten hat, ist jedoch noch völlig offen.

Schema 2. Mikrobielle Transformation von Genistin in Genistein (I), 6-Chlorgenistein (II) und 6,3'-Dichlorgenistein (III) durch *Streptomyces griseus* Tü 6



### Experimenteller Teil

**Spektroskopie.** Die UV.-Spektren wurden mit einem *Varian*-Techtron-Spektralphotometer (Modell 635) aufgenommen. Zuerst wurde das Spektrum in Methanol (*Uvasol*, *Merck*) registriert; dann wurden 3 Tropfen einer Lösung von 2,5 g Natrium in 100 ml Methanol zugesetzt und das Spektrum erneut aufgenommen. Die IR.-Spektren wurden mit einem *Perkin-Elmer*-Spektrophotometer (Modell 137) registriert. Die Massenspektren (MS.) der Genistein-Derivate wurden an einem Massenspektrometer *Varian*-MAT-CH-7 durch Direkteinlass bei 70 eV aufgenommen. Die exakten Massenbestimmungen erfolgten an einem *Varian*-MAT-SM-1B nach dem «Peak-Match»-Verfahren bei einer Auflösung von 10000.  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden an einem *Brucker*-WH-270-Gerät (270 MHz) registriert. Als Lösungsmittel diente  $\text{CDCl}_3$  unter Zusatz von wenig Aceton- $d_6$ ; als interner Standard wurde Tetramethylsilan verwendet.

**Mikroorganismus.** Der Stamm Tü 6 *Streptomyces griseus* ist identisch mit dem bei *Hütter* [7] beschriebenen Stamm ETH 7419. Unter anderen Bedingungen bildet Tü 6 Albomycin.

**Fermentationsbedingungen.** Für die Herstellung von 6-Chlorgenistein und 6,3'-Dichlorgenistein wurde der Stamm Tü 6 auf der folgenden Nährlösung angezogen: 2% vollfettes Sojamehl, 2% Mannit, 0,2% Kalk, 0,1% NaCl in Leitungswasser; pH vor der Sterilisation mit Natriumhydroxid-Lösung auf 7,5 eingestellt. Inkubationstemperatur 27°; im 10-l-Fermenter (*New Brunswick*, Modell MF 14) wurden bei 220 U./Min. 3 l Luft pro Min. zugeführt, Kolben wurden auf rotierender Schüttelmaschine inkubiert. Als Impfmateriale dienten 10% einer 24 Std. alten Vorkultur auf gleicher Nährlösung.

Für Screening und Einbauversuche von  $^{36}\text{Cl}$  wurde NaCl in der Nährlösung durch  $\text{Na}^{36}\text{Cl}$  ersetzt und anstelle von Leitungswasser entionisiertes Wasser verwendet.

**Isolierung und Reinigung.** Das Mycel wurde im *Westfalia*-Separator abgetrennt und verworfen. Die Kulturlösung wurde filtriert und über eine *Amberlite*-XAD-2-Säule (Korngrösse 300–1000  $\mu\text{m}$ ) gegeben. Das Bettvolumen betrug 10% des Filtratvolumens. Anschliessend wurde mit einem Filtratvolumen entionisiertem Wasser und mit je 0,3 Filtratvolumen Methanol/Wasser 1:9, 3:7 und 1:1 gewaschen. Die Isoflavone liessen sich mit Methanol eluieren. Das Methanol-Eluat wurde i. V. stark eingengt und der wässrige Rückstand 3mal mit Äthylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden an *Sephadex* LH 20 in I, II, III und die Nebenkomponenten getrennt. Letztere fielen als Gemisch an.

**Dünnschichtchromatographie (DC).** Für DC. wurden Kieselgel-Alufolien (Kieselgel 60/Kieselgur F<sub>254</sub>, *Merck*) und als Fliessmittel Chloroform/Methanol 92:8 verwendet. Folgende R<sub>f</sub>-Werte wurden erhalten: Genistein-glucosid 0,04, Genistein 0,62, 6-Chlorgenistein 0,65 und 6,3'-Dichlorgenistein 0,70. Sichtbarmachen im UV.-Licht von 254 nm und 350 nm; beim Besprühen mit 3proz. Eisen(III)-chlorid in 0,5N Salzsäure Violettfärbung. Durch Autoradiographie der Chromatogramme wurden die chlorhaltigen Banden in  $^{36}\text{Cl}$ -markierten Präparaten bestimmt.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* für die Förderung der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 76 und für eine Sachspende (Projekt KO 608/1). Für die Überlassung von Vergleichsproben von Genistein danken wir Herrn P.D.Dr. *Zeeck*, Universität Göttingen, und Herrn Dr. *Müller* von der *Ciba-Geigy AG*, Basel. Fräulein *B. Walter*, Universität Hamburg, verdanken wir die Aufnahmen der NMR.-Spektren.

### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *H. Anke*, *J. Antibiot.*, **30**, 125 (1977).
- [2] *H. Audier*, *Bull. Soc. Chim. France* 1966, 2892.
- [3] *T. J. Mabry*, *K. R. Markham* & *M. B. Thomas*, 'The Systematic Identification of Flavonoids', Springer-Verlag, New York 1970.
- [4] *M. Naim*, *B. Gestetner*, *I. Kirson*, *Y. Birk* & *A. Bondi*, *Phytochemistry* **12**, 169 (1973); *J. B. Harborne*, *T. J. Mabry* & *H. Mabry*, 'The flavonoids', Chapman and Hall, London 1975.
- [5] *H. Umezawa*, *H. Tobe*, *N. Shibamoto*, *F. Nakamura*, *K. Nakamura*, *M. Matsuzaki* & *T. Takeuchi*, *J. Antibiot.* **28**, 947 (1975).
- [6] *G. M. Strunz*, in 'Handbook of Microbiology', Band III, CRC Press, Cleveland 1973.
- [7] *R. Hütter*, «Systematik der Streptomyceten», *Bibliotheca Microbiol.*, Fasc. 6 (1967).