

195. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

237. Mitteilung¹⁾**(2S, 3R, 4R, 6R)-2,3,4-Trihydroxy-6-methylcyclohexanon
aus zwei Actinomyceten-Stämmen**

von André Müller und Walter Keller-Schierlein*

Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Universitätstrasse 16,
CH-8092 Zürichund Jacek Bielecki²⁾, Gabriele Rak, Joachim Stümpfel und Hans Zähler

Institut für Biologie II, Lehrstuhl für Mikrobiologie I der Universität, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen

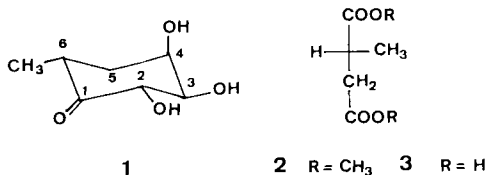
(12.IX.86)

(2S, 3R, 4R, 6R)-2,3,4-Trihydroxy-6-methylcyclohexanone from Two Strains of Actinomycetes

A tetrazolium-blue positive compound was isolated from two strains of actinomycetes. Its constitution and relative configuration **1** were determined by spectroscopic methods, and the absolute configuration by degradation to (+)-(R)-methylsuccinic acid.

Extrakte aus Kulturen von *Streptomyces phaeochromogenes* ssp. *venezuelae*, Stamm *Tü 3154*, enthielten eine Verbindung, die auf der DC-Platte mit Tetrazolblau einen tief blauen Fleck gab. Die gleiche Verbindung wurde wenig später aus einem zweiten Stamm, *Streptomyces albus*, Stamm *Tü 3226*, ebenfalls isoliert. Die Isolierung erfolgte durch Extraktion des Mycels mit MeOH bzw. durch Adsorption aus dem Kulturfiltrat an *Amberlite XAD-16* und Elution mit MeOH. Nach dem Abdampfen des MeOH i.V. konnte der Metabolit aus dem wässrigen Rückstand mit AcOEt extrahiert werden. Chromatographie an Kieselgel lieferte ein nicht ganz einheitliches öliges Produkt, aus dem sich die tetrazolblau-positive Verbindung i.HV. heraussublimieren liess. Das in farblosen Nadelchen anfallende Sublimat wurde darauf aus Aceton Et₂O umkristallisiert.

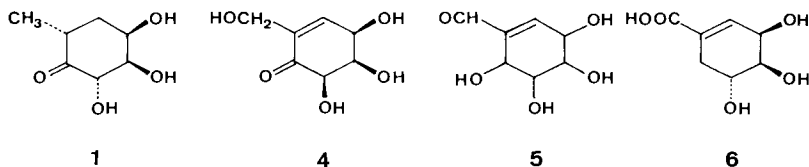
Die Bruttoformel C₇H₁₂O₄ ergab sich aus der Elementaranalyse und dem MS mit M⁺ = 160. Die Konstitution **1** und die relative Konfiguration folgen aus dem ¹H-NMR

¹⁾ 236. Mitt.: [1].²⁾ Gegenwärtige Adresse: Institute of Microbiology, University of Warsaw, Warsaw, Poland.

Tab. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) von (2S, 3R, 4R, 6R)-2,3,4-Trihydroxy-6-methylcyclohexanon

H-Atom	δ [ppm]	Multiplizität	J [Hz]
H-C(2)	4,49	<i>d</i>	$J(2,3) = 9,7$
H-C(3)	3,56	<i>dd</i>	$J(3,2) = 9,7; J(3,4) = 2,8$
H-C(4)	4,21	<i>q</i> -ähnlich	$J(4,3) = J(4,5\text{eq}) = J(4,5\text{ax}) \approx 2,5$
H _{eq} -C(5)	2,28	<i>dd</i>	$J(5\text{eq}, 5\text{ax}) = 14; J(5\text{eq}, 6) = 6,5; J(5\text{eq}, 4) = 3,1$
H _{ax} -C(5)	1,42	<i>dt</i>	$J(5\text{ax}, 5\text{eq}) = J(5\text{ax}, 6) = 14; J(5\text{ax}, 4) = 2,4$
H-C(6)	3,00	<i>sept.</i> -ähnlich	$J(6, \text{CH}_3) = J(6, 5\text{eq}) = 6,5; J(6, 5\text{ax}) = 14$
CH ₃	1,10	<i>d</i>	$J(\text{CH}_3, 6) = 6,5$
3 OH	3,1–4,1	br.	

(Tab.), wobei die Zuordnungen durch Spin-Entkopplung erhärtet wurden. So verlangt die grosse Kopplungskonstante $J(2,3) = 9,7$ die äquatoriale Lage der OH-Gruppen an C(2) und C(3), während die kleinen Kopplungskonstanten $J(3,4) = 2,8$ und $J(4,5) = 2,4$ auf die axiale Lage der OH-Gruppe an C(4) hinweisen. Die Nachbarschaft von H-C(2) zu einer Keto-Gruppe (IR: 1715 cm^{-1}) ergibt sich aus deren relativ starken chemischen Verschiebung. Für die Bestimmung des Chiralitätssinnes wurde **1** mit HIO_3 abgebaut und die rohe Aldehydosäure sofort mit Jones-Reagens zur Methylbernsteinsäure oxydiert, deren mit CH_2N_2 bereiteter Dimethylester leicht chromatographisch gereinigt und destilliert wurde. Da für den in verdünnter Lösung linksdrehenden Methylester **2** in der Literatur kein geeigneter Vergleichswert der optischen Drehung gefunden wurde (für den unverdünnten Ester der (*R*)-Säure wird ein Wert von $[\alpha]_D^{20} = +4,69^\circ$ angegeben [2]), wurde der gereinigte Dimethylester mit NaOH zur kristallinen (+)-(*R*)-Methylbernsteinsäure (**3**) verseift. Die wohl zur Zeit zuverlässigste Bestimmung der (*R*)-Chiralität der (+)-Säure **3** besteht im Abbau von Ergoflavin zu (–)-(*S*)-Methylbernsteinsäure [3]. Der Chiralitätssinn des Ergoflavins folgt aus der Röntgen-Strukturanalyse (*Bijvoet*-Methode) eines Schweratom-Derivates [4].



Vor einiger Zeit sind vereinzelte Polyhydroxy-Verbindungen mit dem gleichen C-Gerüst aus Actinomyceten isoliert worden, nämlich die Substanz *KD 16-U 1* (**4**) [5], die auch als Hydrolyseprodukt eines Glyoxylase-Hemmstoffes bekannt ist [6], sowie das antibakteriell wirksame Rancinamycin III (**5**) mit unbekannter Konfiguration [7], von dem ebenfalls mehrere antibiotisch wirksame Ester bekannt sind. Sie werden als Abkömmlinge der Shikimsäure (**6**) aufgefasst. Es fällt auf, dass **1** die erste Verbindung dieser Reihe aus Actinomyceten ist, bei der die Seitenkette bis zur CH_3 -Gruppe reduziert ist, während aus Pilzen mehrere Verbindungen dieser Art mit einer CH_3 -Seitenkette bekannt sind (Terremutin, Spinulosin u.a.).

Für die Verbindung **1** konnte keine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden.

Experimenteller Teil

Allgemeines. S. [8].

Beschreibung der Stämme. Der Stamm *Tü 3154*, isoliert aus einer Bodenprobe von Ajanta (Indien), wird durch folgende Merkmale gekennzeichnet: rot-braunes Luftmycel (*cinnamomeus*) Sporen mit glatter Oberfläche (Grösse ca. $0,6-1,4 \times 0,5-1,2 \mu\text{m}$), Sporenketten gerade; auf Pepton-Eisen-Agar wird kein Melanin gebildet. Er wurde aufgrund dieser Eigenschaften nach Hütter [9] und Buchanan und Gibbons [10] als *Streptomyces phaeochromogenes* (CONN 1917) WAKSMAN 1957, *ssp. venezuelae* EHRLICH et al. 1948 (*comb. nov.*) bezeichnet (Nomenklatur nach Skerman et al. [11]).

Der Stamm *Tü 3226* wurde aus einer Bodenprobe aus Melbourne (Australien) isoliert und hat kreideweisses Luftmycel (*niveus*), ellipsoide Sporen der Grösse $0,8-1,4 \times 0,4-0,9 \mu\text{m}$ mit glatter Oberfläche, monopodial verzweigte Sporenketten mit kurzen Schrauben; keine Melaninbildung auf Pepton-Eisen-Agar. Aufgrund der angeführten Merkmale ist *Tü 3226* nach der Einteilung von Hütter [9] der Art *Streptomyces albus* (ROSSI-DORIA 1891) WAKSMAN et HENRICT 1943 zuzuordnen.

Fermentierung. 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit einem seitlichen Einstich und je 100 ml sterile Nährlsg. (2% Sojamehl, 2% Mannit) wurden aus einer Schrägagarkultur beimpft und bei 27° rotierend geschüttelt (120 U/min). Der Inhalt von 10 24-h alten Erlenmeyer-Kulturen diente als Impfmateriale für Fermenter mit 10 l Nutzinhalt (Modell F-14, New Brunswick Scientific Co.), gefüllt mit 9 l der gleichen Nährlsg. Fermentiert wurde bei 27° mit 220 U/min (Blattrührer); Belüftung: 4 l Luft pro min. Zur Schaumbekämpfung wurden einige Tropfen Polyol zugegeben. Der Inhalt der 10-l-Fermenter wurde entweder nach 96 h direkt aufgearbeitet oder nach 24 h als Impfmateriale für den 100-l-Fermenter (Modell F-130, New Brunswick Scientific Co.) verwendet. Fermentation im 100-l-Fermenter: 96 h bei 27°, 200 U/min (Blattrührer) und 40 l Luft pro min. Die Schaumbekämpfung erfolgte auch hier mit Polyol.

Isolierung von (2S, 3R, 4R, 6R)-2,3,4-Trihydroxy-6-methylcyclohexanon (1). Die Kulturbrühe (10 l) wurde bei pH 7 mit Hilfe von Celite filtriert. Der Mycelkuchen wurde 2mal mit je 2,5 l MeOH extrahiert. Das Kulturfiltrat wurde auf eine Säule aus 1 kg Amberlite XAD-16 gegeben, die Säule mit 4 l H₂O gewaschen, mit MeOH eluiert und das Eluat zusammen mit dem Mycelextrakt i.V. bis zu einem wässr. Rückstand konzentriert. Dieser wurde auf pH 5-6 eingestellt und 2mal mit AcOEt extrahiert. Der nach dem Trocknen (Na₂SO₄) und Einengen i.V. erhaltene bräunliche ölige Rückstand (300 mg) wurde an 25 g Kieselgel mit CHCl₃/MeOH 9:1 chromatographiert. Die tetrazolblau-positiven Fraktionen gaben beim Eindampfen 248 mg fast farbloses Öl. Daraus konnte bei 85° 0,01 Torr 34 mg farblose Kristalle heraussublimiert werden. Der Sublimationsrückstand enthielt nur noch Spuren der tetrazolbau-positiven Verbindung. Die Kristalle wurden aus Aceton/Et₂O umkristallisiert und nochmals i.HV. sublimiert, Schmp. 88°, $[\alpha]_D^{20} = -106^\circ$ (MeOH, $c = 0,45$). IR (CHCl₃): 3570m, 3450m, 3020w, 2990w, 2965m, 2915m, 2890m, 2870w, 1715s, 1600w, 1452w, 1440w, 1403w, 1383m, 1320w, 1290m, 1270m, 1120m, 1080s, 1060s, 1029m, 1000s, 912w, 885w, 860w, 840m. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): s. Tab. EI-MS: 160 (9, M⁺), 142 (8), 129 (2), 127 (1), 125 (2), 124 (9), 114 (19), 113 (15), 111 (4), 100 (15), 97 (10), 96 (11), 95 (5), 88 (31), 87 (60), 86 (13), 85 (7), 83 (8), 81 (6), 74 (38), 73 (100), 72 (10), 71 (25), 70 (16), 69 (20), 68 (6), 67 (8), 60 (20), 58 (11), 57 (80), 56 (24), 55 (16), 53 (6), 45 (7), 44 (10), 43 (30), 42 (20), 41 (33), 39 (13), 31 (13), 29 (16), 28 (10), 27 (16), 19 (5), 18 (6), 15 (4). Anal. ber. für C₇H₁₂O₄ (160,116): C 52,49, H 7,55; gef.: C 52,29, H 7,45.

Abbau zu (R)-Methylbernsteinsäure-dimethylester (2). Zu einer Lsg. von 160 mg 1 in 10 ml EtOH wurden 1,10 g NaIO₄ in 12 ml 1N H₂SO₄ gegeben und 150 min bei RT. gerührt. Darauf wurde das überschüssige Oxydationsmittel mit 10 Tropfen Glycerin zersetzt und nach 15 min 3mal mit AcOEt ausgeschüttelt. Die mit ges. NaCl-Lsg. gewaschene Lsg. wurde getrocknet (MgSO₄) und i.V. zu 137 mg tiefbraunem Öl eingedampft. Das Rohprodukt wurde in 5 ml Aceton mit 2 Tropfen Jones-Reagens bei RT. oxydiert. Nach 5 min wurden weitere 10 Tropfen Reagens zugegeben. Nach 10 min wurde mit H₂O auf 40 ml verdünnt und 3mal mit AcOEt ausgeschüttelt. Die mit H₂O gewaschene und getrocknete (MgSO₄) Lsg. gab beim Eindampfen i.V. 123 mg rohe Methylbernsteinsäure als grünliches Öl.

Nach der Veresterung in 1 ml Aceton mit CH₂N₂ in Et₂O wurden durch Eindampfen i.V. 113 mg roher Ester 2 erhalten. Dann wurde an 5 g Kieselgel chromatographiert. Das farblose Eluat gab durch Destillation i.V. (Kugelrohr) 46 mg farblosen Ester 2; Kapillar-GC (Ucon HB 5100, 20 m × 0,3 mm, 60° Ofentemp.): t_R 4,9 min, 2 Verunreinigungen zu je ca. 5% mit t_R 6,4 und 6,7 min. $[\alpha]_D^{25} = -4,52^\circ$ (MeOH, $c = 3,58$). ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 1,23 (d, J = 7, 3 H); 2,42 (dd, J = 16, 6, 1 H); 2,75 (dd, J = 16, 7, 5, 1 H); 2,92 (sext.-ähnlich, J ≈ 7, 1 H); 3,70 (s, 3 H); 3,72 (s, 3 H); 3,72 (s, 3 H). EI-MS: 129 (35, M⁺ - OCH₃), 128 (20), 101 (21), 100 (18), 87 (13), 74 (6), 69 (15), 59 (74), 57 (5), 55 (7), 45 (3), 42 (10), 41 (23), 39 (10), 32 (22), 29 (11), 28 (100), 18 (20), 15 (16).

(+) – (R)-Methylbernsteinsäure (3). Der Ester 2 (41 mg) wurde mit 5 ml 2% NaOH in EtOH 4 h unter Rückfluss gekocht. Die Lsg. wurde i.V. auf ca. $\frac{1}{3}$ des Vol. eingeengt, mit 10 ml H₂O verdünnt und 3mal mit AcOEt ausgeschüttelt (3 mg Neutralteil). Die wässr. Lsg. wurde mit 6N HCl auf pH 1 angesäuert und 3mal mit AcOEt ausgezogen. Nach dem Waschen mit H₂O wurde getrocknet (MgSO₄) und i.V. zu 29 mg krist. Rückstand eingeengt. Nach einer weiteren Reinigung an 5 g *Sephadex LH-20* (MeOH) wurden 20 mg Produkt erhalten und aus Et₂O/Pentan umkristallisiert. Schmp. 103–104°. $[\alpha]_D^{20} = +13,6^\circ$ (EtOH, $c = 1$); $[\alpha]_D^{20} = +15,7^\circ$ (Aceton, $c = 0,98$). [2]: Schmp. 107–108°; $[\alpha]_D^{20} = +12,91^\circ$ (EtOH); [3]: $[\alpha]_D^{21} = -11,78^\circ$ (Aceton) für die (–)-(S)-form.

Für die NMR-Spektren danken wir Fr. B. Brandenberg, für die MS Frau L. Golgowski und für die Elementaranalyse Herrn D. Manser.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. Meyer, W. Keller-Schierlein, S. Megahed, H. Zähler, A. Segre, *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1356.
- [2] R. Rossi, P. Diversi, G. Ingrosso, *Gazz. Chim. Ital.* **1968**, *98*, 1391.
- [3] J. W. ApSimon, J. A. Corran, N. G. Creasey, K. Y. Sim, W. B. Whalley, *J. Chem. Soc.* **1965**, 4130.
- [4] A. T. McPhail, G. A. Sim, J. D. M. Asher, J. M. Robertson, J. V. Silvertown, *J. Chem. Soc. (B)* **1966**, 18.
- [5] K. Tatsuta, T. Tsuchiya, N. Mikami, S. Umezawa, H. Umezawa, H. Naganawa, *J. Antibiot.* **1974**, *27*, 579; S. Mirza, L. P. Molleyres, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 988.
- [6] T. Takeuchi, H. Chimura, M. Hamada, H. Umezawa, O. Yoshioka, N. Oguchi, Y. Takahashi, A. Matsuda, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 737.
- [7] A. D. Argoudelis, T. R. Pyke, R. W. Sprague, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 777; A. D. Argoudelis, R. W. Sprague, S. A. Mizsak, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 787.
- [8] L. Bassi, B. Joos, P. Gassmann, H.-P. Kaiser, H. Leuenberger, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1983**, *66*, 92.
- [9] R. Hütter, 'Systematik der Streptomyceten', Verlag S. Karger, Basel, 1967.
- [10] R. Buchanan, N. Gibbons, in 'Bergeys Manual of Determinative Bacteriology', The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- [11] V. B. D. Skerman, V. McGowan, P. H. A. Sneath, 'Approved Lists of Bacterial Names', in *J. Syst. Bacteriol.* **1980**, *30*, 225–420.