Tetrahedron Vol 37, pp 559 to 563
Pergamon Press Ltd., 1981. Printed in Great Britain

0040 4020 81 0201 0559 $02.00 0

UNTERSUCHUNGEN AN STOFFWECHSELPRODUKTEN VON MIKROORGANISMEN,—XXII[1]

UNTERSUCHUNG DER PIGMENTE AUS FLAVOBACTERIUM SPEC. STAMM C1/2

H. ACHENBACH,* W. KOHL und A. BÖTTGER-VETTER

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg, Albertstr. 21, D-7800 Freiburg i. Br.

und

H. REICHENBACH

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, D-3300 Braunschweig-Stöckheim

(*Received in Germany* 11 *February* 1980)

Zusammenfassung —Der von *Flavobacterium spec.* Stamm C1/2 gebidete Pigmentkomplex besteht aus den Farbstoffen **1a** bis **1d**, über deren Isolierung und Strukturaufklärung berichtet wird. Es handelt sich ausnahmslos um neue Pigmente vom Flexirubin-Typ. Farbstoffe dieses Typs waren bisher nur aus gleitenden Bakterien bekannt.

Abstract -The pigment complex from *Flavobacterium spec.* strain C1/2 consists of pigments **1a** to **1d**, whose isolation and structure elucidations are reported. These pigments exclusively belong to the new class of flexirubin-type pigments. Up to now, pigments of this type have been found in gliding bacteria only.

Mikroorganismen der Gattung *Flavobacterium* sind relativ weit verbreitet und sowohl ökonomisch wie auch medizinisch von Bedeutung.[2-5] In der Lebensmittelchemie führt der Befall mit Flavobakterien zum Verderb,[3] in der Biotechnologie werden Flavobakterien zur Gewinnung interessanter Enzyme und zur Herstellung von Aminosäuren eingesetzt,[4] als humanpathogen ist u.a. *Flavobacterium meningosepticum* bekannt.[5]

Während früher die Taxonomie von Flavobakterien sich relativ undifferenziert im wesentlichen an der Farbstoffproduktion orientiert hat, legen neuere taxonomische Untersuchungen diese Gattung genauer fest:[6] Bei den eigentlichen Flavobakterien handelt es sich um gram-negative, unbegeisselte und gelbgefärbte Keime, deren Pigmente nicht wasserlöslich sind, auch eine Gleitbewegung ist nicht nachweisbar.[6]

Zwar liegen einige Berichte über Carotinoid-Strukturen von Pigmenten aus sog. Flavobakterien vor;[7] bedauerlicherweise wurden diese Arbeiten jedoch nur an solchen Bakterien durchgeführt, die nach der neueren Taxonomie nicht der Gattung *Flavobacterium* zuzuordnen sind.

Es schien daher sinnvoll, die Farbstoffe eines taxonomisch eindeutigen Flavobakteriums zu isolieren und in ihrer Struktur abzuklären, zumal kürzlich Versuche bekannt wurden, elektronenspektroskopische Messungen an Bakterienkulturen oder Totalextrakten zur taxonomischen Festlegung mit heranzuziehen.[8]

Die von *Flavobacterium spec.* Stamm C1/2 gebildeten Pigmente befinden sich ausschliesslich in der Bakterienmasse, aus der sie mit Aceton extrahierbar sind. Durch Chromatographie des Acetonextraktes an Al_2O_3 kann man die Farbstoffe von ungefärbtem Material weitgehend abscheiden. Bei der nachfolgenden Chromatographie an Kieselgel erreicht man eine Separierung des Farbstoffgemisches in Fraktionen, deren Überprüfung mittels HPTLC-Platten zeigte, dass bereits eine weitgehende Auftrennung in insgesamt 5 verschiedene Pigmente Fla-P1 bis Fla-P5 — erreicht worden war. Aus den Massenspektren lässt sich für alle Pigmente ein Fragmentierungsverhalten erkennen, wie es für Verbindungen vom Flexirubin-Typ (**1**) charakteristisch ist.[9]

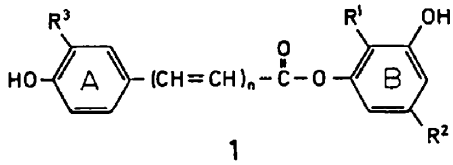
Zur weiteren Strukturabklärung wurde mit CH_3I methyliert: Wie die spektroskopische Überprüfung der Methylierungsprodukte zeigt, gehen dabei sämtliche Pigmente in entsprechende Dimethylderivate über. Die Maxima der Elektronenspektren und auch das Auftreten entsprechender Schlüsselfragmente in den Massenspektren sprechen dafür, dass als gemeinsames Strukturelement in allen Pigmenten ein ω-Phenyloctaensäureester als Chromophor vorliegt (Formel **1**: n = 8).

Für die weiteren Untersuchungen haben wir einen Teil der methylierten Fraktionen katalytisch hydriert. In Übereinstimmung mit den elektronenspektroskopischen Befunden nehmen unter diesen Bedingungen die Pigmente 8 Mol Wasserstoff auf, und es entstehen die entsprechenden farblosen Hexadecahydro-Produkte.

Aus den ^{1}H–NMR- und Massen-Spektren der 5 chromatographisch getrennten Pigmente und der genannten Derivate lassen sich sämtliche Strukturdetails eindeutig ableiten; dabei konnten wir uns auf früher gewonnene Erfahrungen stützen.[10,11] Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

In Tabelle 1 sind ausserdem Angaben über die ungefähre relative Zusammensetzung des von *Flavobacterium spec.* Stamm C1/2 gebildeten

Tabelle 1. Strukturen und Konzentrationen der einzelnen Pigmente aus *Flavobacterium spec.* Stamm C1/2 (Gehalt: Gesamtpigmente = 100%)



1

Pigment	Gehalt (%)	Struktur	n	R^1	R^2	R^3
Fla-P1	10	1a	8	$n\cdot C_{12}H_{25}$	$CH_2CH(CH_3)_2$	Cl
Fla-P2	ca.2	1b	8	$n\cdot C_{12}H_{25}$	$n\cdot C_3H_7$	Cl
Fla-P3	45	1c	8	$n\cdot C_{12}H_{25}$	$CH_2CH(CH_3)_2$	H
Fla-P4	33	1d	8	$n\cdot C_{12}H_{25}$	$n\cdot C_3H_7$	H
Fla-P5	10	1e	8	$n\cdot C_{12}H_{25}$	CH_3	H

Pigmentgemisches gemacht. Farbstoffanteile mit carotinoider Struktur waren in nennenswerten Mengen nicht nachweisbar.

Bisher hat man Farbstoffe vom Strukturtyp des Flexirubins nur in Flexibakterien der Gattungen *Flexibacter* und *Cytophaga* gefunden;[10-12] interessant ist der Befund, dass diese Pigmentstrukturen nun auch in einem weiteren Mikroorganismus angetroffen wurden, der mit den *Cytophagales* nicht unmittelbar taxonomisch verwandt zu sein scheint.

Auch in *Flavobacterium spec.* Stamm C1/2 liegen die Farbstoffe wie bei den Flexibakterien in einem Pigmentgemisch der monochlorierten Pigmente neben den entsprechenden unchlorierten Verbindungen vor. Hier machen die chlorierten Verbindungen etwa 10% der Gesamtpigmente aus.

Ein Vergleich der Pigmentstrukturen aus *Flavobacterium spec.* Stamm C1/2 mit den anderen bisher bekannten — mehr als 25 — Pigmenten vom Flexirubin-Typ lässt erkennen, dass im vorliegenden Falle bei gleichbleibender Polyenlänge (n = 8) und gleichbleibendem Alkylrest R^1 ($R^1 = C_{12}H_{25}$) die Strukturvariabilität ausschliesslich in der Modifizierung des Restes R^2 liegt. Dabei weist das Pigment Fla-P5 (= **1e**) eine besonders grosse Ähnlichkeit mit Flexirubin (**1**: $R^1 = n.C_{12}H_{25}$, $R^2 = R^3 = CH_3$) auf; es kann strukturell als 3-Demethyl-flexirubin aufgefasst werden.

Die gefundenen Strukturdaten sind in Übereinstimmung mit der fruher von uns geäusserten Hypothese, dass aus biogenetischen Gründen ein Zusammenhang zwischen der Kohlenstoffzahl der Alkylreste einerseits und einer eventuellen Endverzweigung der Alkylkette andererseits besteht.[10] Entsprechende Untersuchungen zur Biosynthese sind im Gange.

Die Entdeckung weiterer neuer Pigmente vom Strukturtyp des Flexirubins in Mikroorganismen, die taxonomisch von den bisher bekannten Produzenten dieser Farbstoffklasse verschieden zu sein scheinen, wirft erneut die bisher noch nicht definitiv beantwortete Frage auf nach einer physiologischen Bedeutung dieser Pigmente.

EXPERIMENTELLER TEIL

Elektronen-Spektren: Spektralphotometer DMR 21 (Fa. Zeiss); Lösungsmittel: (wenn nicht anders vermerkt) Hexan, Uvasol. IR-Spektren: in Chloroform–Lösung; Spektrometer 457 (Fa. Perkin–Elmer). ^{1}H–NMR-Spektren: Wenn nicht anders vermerkt, FT-Kernresonanzspektrometer WM 250 (Fa. Bruker-Physik); Lösungsmittel Deuteriochloroform; innerer Standard Tetramethylsilan.

Massenspektren: Wenn nicht anders vermerkt, Massenspektrometer Typ SM 1 B (Fa. Varian-MAT) bei einer Auflösung von $M/\Delta M = 1000$; Ionenquelle EH 1; Ionisierungsenergie 70 eV; Temp. der Ionenquelle *ca.* 200 C; Einlassystem Schubstange; Probentemp. 180–200 C. Die Massenspektren sind, insbesondere bezüglich relativer Peakintensitäten, von der thermischen Belastung bei den Aufnahmebedingungen abhängig. Angegeben sind die Daten im allgemeinen für m/e > 100 und, soweit es sich nicht um M^+ oder um wesentliche Schlüsselfragmente[9] handelt, für relat. Intensitäten > 5%. Hochaufgelöste Daten: SM 1 B, "Peak-matching"-Methode, Auflösung $M/\Delta M = 14000$ (10% Tal). Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC): WATERS-Anlage mit Pumpe M 6000 A, Injektionssystem U6K und Photometer M 440, Fertigsäulen (30 cm × 4 mm, Fa. Macherey-Nage), Durchfluss 2.0 ml/min; Detektion bei 280 oder 436 nm (je nach Problemstellung). System I: Nucleosil 10-C_{18} mit Aceton/THF/H_2O (70:8:22); System II: Nucleosil 10-C_8 mit Aceton/H_2O (83:17); System III: Nucleosil 10-C_8 mit Methanol/H_2O (96:4); System IV: Nucleosil 10-C_{18} mit Aceton/H_2O (84:16).

Dünnschichtchromatographie (DC): Nano-Platten SIL-UV_{254} (Fa. Macherey–Nagel); Laufmittel, falls nicht anders vermerkt, Benzol/Essigester (9:1). Detektion durch Fluoreszenz-Loschung und mit Joddampf.

Herkunft des Bakterienstammes

Flavobacterium spec. Stamm C1/2 wurde durch P. R. Hayes aus einem geschlachteten Hähnchen isoliert. Der Stamm ist in

die umfangreiche Studie über die Taxonomie der Gattung *Flavobacterium* einbezogen[6c,6d] und erscheint dort in Phenon la das nach Hayes die Gattung *Flavobacterium* im engeren Sinne repräsentiert. Für die DNA des Organismus wurde eine Basenzusammensetzung von Guanidin + Cytidin = 33.8 Mol %[13] bzw. 34.8 Mol %[6d] bestimmt.

Züchtung der Bakterien

Die Bakterien wurden in Steilbrustflaschen in 10 l-Ansätzen kultiviert. Medium: Fx A 1 m. Pepton aus Casein (tryptisch, Merck) 1%, Yeast extract (Difco) 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, Antischaumemulsion Silicon-M-30 reinst (Serva) 0.5 ml auf 10 l, pH 7.2, autoklaviert. Je 9 l Medium wurden mit 600 ml aus Schüttelkolben beimpft. Die Kulturen wurden bei Raumtemp. gehalten (um 20 C) und über 3 Sinterfritten kräftig mit Pressluft begast. Ernte nach etwa 18 h. Die Zellen wurden in der Durchlaufzentrifuge abgetrennt und gegebenenfalls bei −20°C tiefgefroren bis zur Aufarbeitung aufbewahrt. Aus 3 Serien von 5, 6 bzw. 7 Fermentationsansätzen (50, 60 bzw. 70 l Kulturmedium) erhielten wir 500, 690 bzw. 760 g Bakterienmasse (Feuchtgewicht).

Extraktion der Bakterien

Die Extraktion der feuchten Bakterienmasse erfolgte mit Aceton bei Raumtemp. Einengen des Extraktes am Rotationsverdampfer ergab aus den Bakterienmassen 800, 1500 bzw. 1200 mg Rückstand.

Abtrennung der Pigmente

Aus den eingeengten Rückständen wurden — für die 3 genannten Serien von Fermentationsansätzen separat — die Pigmente durch Chromatographie an Al_2O_3 neutral (Fa. Macherey-Nagel; Säulendurchmesser 25 mm, Füllhöhe 30 cm) abgetrennt. Mit 1.5 l Benzol/Essigester = 9:1, 0.5 l Chloroform/Methanol = 98:2 und 1.5 l Chloroform/Methanol = 9:1 wurden 140 Fraktionen à 15 ml eluiert. Die Pigmente fielen jeweils in den Fraktionen 60 bis 140 an. Aufgrund der DC-Kontrolle mit Nano-Platten lag in allen gefärbten Fraktionen ein Gemisch der gleichen 5 Pigmente — allerdings in etwas unterschiedlichen Konzentrationen — vor. Wir haben daher die Fraktionen 60 bis 140 (= Fraktion A5) vereinigt. Aus allen 3 Fermentationsserien zusammen erhielten wir nach Einengen insgesamt 220 mg A5, die über Kieselgel in die Einzelpigmente separiert wurden.

Chromatographie der Fraktion A5 an Kieselgel

110 mg A5 wurden an Kieselgel 60 (< 0.08 mm, Fa. Macherey-Nagel; Säulendurchmesser 25 mm, Füllhöhe 88 cm) chromatographiert; Elution mit Benzol/Essigester = 9:1 ergab 90 Fraktionen à 15 ml, die nach DC-Kontrolle zu Fraktionen A5-B vereinigt wurde. Die vereinigten Fraktionen haben wir zusätzlich mit HPLC und MS überprüft, wobei Reinheitsgrade >90% (für P2 etwas geringer) festgestellt wurden.

Spektroskopische Untersuchung der isolierten Pigmente

Fla-P1 = 17-(3-*Chlor*-4-*hydroxyphenyl*-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-[2-*dodecyl*-3-*hydroxy*-5-(2-*methylpropyl*)-*phenylester*]-(**1a**): MS (MAT 312): *m/e* (%) = 698 (4, M^+ für ^{37}Cl), 697 (4), 696 (8, M^+ für ^{35}Cl), 620 (6), 619 (6), 618 (11), 363 (10), 335 (23), 334 (37), 287 (19), 286 (13), 285 (45), 284 (11), 259 (6), 258 (8), 257 (12), 256 (15), 221 (7), 209 (17), 208 (9), 207 (53), 205 (6), 193 (11), 191 (15), 181 (10), 180 (16), 179 (100), 178 (6), 169 (6), 167 (11), 165 (17), 163 (16), 161 (10), 157 (12), 149 (6), 145 (6), 144 (12), 143 (15), 141 (35), 137 (27), 136 (13), 133 (8), 132 (10), 131 (29), 129 (16), 128 (10), 123 (9), 121 (6), 117 (10), 116 (6), 115 (16), 107 (16), 105 (19), 103 (8). Hochauflösung: *m/e* = 696.3940 ($C_{45}H_{57}O_4Cl$, M^+ für ^{35}Cl). UV/VIS: λ_{max} (MeOH) = 444 nm; λ_{max} (MeOH + KOH) = 474 nm. IR: 1715 cm^{-1} (C=O).

Fla-P2 = 17-(3-*Chlor*-4-*hydroxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-(2-*dodecyl*-3-*hydroxy*-5-*propylphenylester*) (**1b**): MS (MAT 312): *m/e* (%) = 684 (4.5, M^+ für ^{37}Cl), 683 (5), 682 (9, M^+ für ^{35}Cl), 607 (2), 606 (3), 605 (3), 604 (7), 365 (6), 363 (14), 337 (10), 335 (10), 334 (10), 321 (18), 320 (25), 287 (18), 286 (14), 285 (53), 284 (8), 259 (16), 257 (12), 256 (10), 251 (8), 245 (7), 233 (8), 231 (8), 225 (10), 209 (10), 207 (27), 205 (8), 193 (14), 191 (20), 181 (12), 179 (25), 169 (8), 167 (18), 166 (16), 165 (100), 157 (14), 149 (18), 145 (8), 144 (12), 143 (16), 141 (41), 137 (12), 136 (12), 133 (8), 132 (14), 131 (37), 129 (16), 128 (10), 123 (8), 117 (14), 116 (8), 115 (16), 107 (24), 105 (16). Hochauflösung: *m/e* = 682.3795 ($C_{44}H_{55}O_4Cl$, M^+ für ^{35}Cl). UV/VIS: λ_{max} (MeOH) = 446 nm; λ_{max} (MeOH + KOH) = 472 nm. IR: 1710 cm^{-1} (C=O).

Fla-P3 = 17-(4-*hydroxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-[2-*dodecyl*-3-*hydroxy*-5-(2-*methylpropyl*)*phenylester*] (**1c**): MS (MAT 312): *m/e*

Tabelle 2. Chromatographie der Fraktion A5

Fraktion vereinigt zu: [Nr.]	[Bezeichnung]	Menge [mg]	Fla-Pigmente*)	R_F	t_R [min.]
1-23	A5-B1	< 1	-		
24-28	A5-B2	10	P1	0.67	13.8
29-32	A5-B3	2	P2	0.60	11.5
33-37	A5-B4	4	P2 + P3		
38-45	A5-B5	47	P3	0.54	10.0
46-47	A5-B6	7	P3 + P4		
48-57	A5-B7	20	P4	0.50	8.6
58-69	A5-B8	3	P4 + P5		
70-88	A5-B9	12	P5	0.40	7.8
89-90	A5-B10	4	P5 (verunreinigt)		

*Numerierung der Pigmente in Reihenfolge abnehmender Rf-Werte. R_F: DC - Standardbedingungen; t_R: HPLC Standardbedingungen I.

(%) = 662 (15, M^+), 586 (2), 585 (4), 584 (8), 335 (21), 334 (35), 252 (12), 251 (47), 250 (16), 225 (7), 223 (16), 222 (16), 215 (9), 197 (9), 196 (12), 181 (9), 180 (16), 179 (100), 174 (9), 173 (53), 165 (14), 163 (10), 159 (9), 157 (19), 137 (26), 136 (12), 133 (14), 131 (26), 129 (12), 123 (8), 117 (7), 115 (9), 108 (7), 107 (56), 105 (23). Hochauflösung: *m/e* = 662.4350 ($C_{45}H_{58}O_4$, M^+). UV/VIS: λ_{max} (MeOH) = 448; λ_{max} (MeOH + KOH) = 472 nm. IR: 1715 cm^{-1} (C=O).

Fla-P$_4$ = 17-(4-*Hydroxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure* (2-*dodecyl*-3-*hydroxy*-5-*propylphenylester*) (**1d**): MS (MAT 312): *m/e* (%) = 648 (2, M^+), 647 (1), 571 (2), 570 (6), 329 (8), 321 (12), 320 (21), 301 (6), 252 (8), 251 (35), 250 (13), 249 (8), 223 (19), 222 (17), 221 (6), 197 (8), 196 (10), 181 (7), 179 (10), 174 (8), 173 (59), 166 (15), 165 (100), 159 (8), 157 (15), 149 (13), 145 (9), 144 (7), 137 (15), 136 (9), 133 (12), 131 (25), 129 (14), 128 (9), 127 (8), 123 (7), 117 (8), 115 (11), 108 (9), 107 (21), 105 (21). Hochauflösung: *m/e* = 648.4176 ($C_{44}H_{56}O_4$, M^+). UV/VIS: λ_{max} (MeOH) = 446 nm; λ_{max} (MeOH + KOH) = 474 nm. IR: 1710 cm^{-1} (C=O).

Fla-P5 = 17-(4-*Hydroxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure* (2-*dodecyl*-3-*hydroxy*-5-*methylphenylester*) (**1e**): MS (MAT 312): *m/e* (%) = 620 (4, M^+), 543 (3), 542 (7), 329 (5), 293 (8), 292 (15), 252 (7), 251 (30), 250 (7), 223 (11), 222 (9), 221 (6), 197 (7), 196 (8), 181 (6), 179 (6), 174 (6), 173 (36), 167 (7), 165 (7), 159 (7), 158 (5), 157 (15), 149 (13), 145 (7), 144 (6), 138 (11), 137 (100), 133 (11), 131 (21), 129 (12), 128 (8), 127 (6), 121 (11), 119 (6), 117 (15), 116 (8), 115 (12), 108 (7), 107 (44), 105 (19). Hochauflösung: *m/e* = 620.3875 ($C_{42}H_{52}O_4$, M^+). UV/VIS: λ_{max} (MeOH) = 440 nm; λ_{max} (MeOH + KOH) = 468 nm. IR: 1720 cm^{-1} (C=O).

Herstellung der Dimethylether

Ca. 5–10 mg Pigment wurden in 10–20 ml Aceton gelöst und mit 5–10 ml CH_3I und 50 mg K_2CO_3 versetzt und über Nacht am Rückfluss gekocht. Das Produkt wurde nach Filtration und Einengen über Fractogel PVA 2000 (Fa. Merck) chromatographiert (Chloroform/Petrolether (60/70) = 50:50) und durch HPLC auf Reinheit überprüft. Ausbeuten: Nahezu quantitativ.

17-(3-*Chlor*-4-*methoxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-[2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-(2-*methylpropyl*)-*phenylester*] (**1a**-*Dimethylether*): DC: R_f = 0.70. HPLC(II): t_R=9.6 min; HPLC(IV): t_R = 24.0 min. MS: *m/e* (%) = 726 (5, M^+ für ^{37}Cl), 725 (6), 724 (12, M^+ für ^{35}Cl), 648 (6), 647 (7), 646 (15), 378 (7), 377 (14), 376 (9), 350 (7), 349 (33), 348 (43), 347 (6) 302 (6), 301 (32), 300 (25), 299 (97), 298 (15), 297 (7), 273 (10), 272 (12), 271 (22), 270 (22), 264 (10), 245 (6), 244 (7), 236 (6), 235 (11), 234 (7), 233 (9), 231 (6), 223 (20), 222 (12), 221 (58), 220 (10), 219 (10), 207 (14), 206 (7), 205 (17), 195 (6), 194 (16), 193 (100), 191 (7), 181 (15), 180 (6), 179 (19), 178 (9), 177 (21), 165 (9), 163 (9), 158 (11), 157 (26), 156 (6), 155 (54), 151 (14), 150 (12), 146 (7), 137 (6), 131 (28), 129 (16), 128 (10), 121 (14), 117 (7), 115 (11), 107 (11), 105 (16). Hochauflösung: *m/e* = 724.4274 ($C_{45}H_{61}O_4Cl$, M^+ für ^{35}Cl). UV/VIS: λ_{max} = 423, 446, 474 nm.—IR: 1715 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR: δ = 7.51 (1 H, dd, J_1 = 14.5 Hz, J_2 = 10 Hz), 7.46 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 7.25 [1 H, dd, (J_1 = 7 Hz, J_2 ~ 1 Hz; teilweise verdeckt von $CHCl_3$)], 6.88 (1 H, d, J = 7 Hz), 6.8–6.1 (ca. 16 H), 6.06 (1 H, d, J = 14.5 Hz), 3.92 (3 H, s), 3.81 (3 H, s), 2.59–2.3 (4 H, m), 1.94–1.74 (ca. 1 H, m), 1.60 (H_2O, breit), 1.53–1.38 (ca. 3 H, m), 1.38–1.1 (18 ± 2 H), 0.91 (t, J = 7 Hz) und 0.87 (t-verbr., J = 7 Hz) (insgesamt 9 H).

17-(3-*Chlor*-4-*methoxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-(2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-*propylphenylester*) (**1b**-*Dimethylether*). Nach nochmaliger chromatographischer Reinigung an einder Kieselgel-60-Säule (<0.08 mm, Fa. Macherey-Nagel Säulendurchmesser 9 mm, Füllhöhe 22 cm) mit Benzol/Essigester 9:1. DC: R_f = 0.70. HPLC(II): t_R = 9.0 min; HPLC(IV): t_R = 21.0 min. MS: *m/e* (%) = 712 (4, M^+ für ^{37}Cl), 711 (4), 710 (9, M^+ für ^{35}Cl), 634 (3), 633 (2), 632 (6), 379 (6), 378 (7), 377 (17), 376 (9), 351 (5), 349 (11), 348 (8), 335 (21), 334 (27), 302 (7), 301 (34), 300 (22), 299 (100), 298 (9), 273 (7), 272 (6), 271 (11), 270 (9), 264 (7), 223 (6), 221 (19), 207 (6), 205 (13), 204 (11), 203 (11), 193 (6), 181 (7), 180 (13), 179 (32), 163 (8), 157 (9), 155 (17), 149 (7), 131 (12), 123 (8), 121 (10), 109 (13), 108 (6), 107 (10). Hochauflösung: *m/e* = 710.4148 ($C_{46}H_{59}O_4Cl$, M^+ für ^{35}Cl). UV/VIS: λ_{max} = 424, 446, 474 nm. IR: 1720 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR: δ = 7.50 (1 H, dd, J_1 = 15 Hz, J_2 = 10 Hz), 7.45 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 7.25 [1 H, dd, (J_1 = 7 Hz, J_2 ~ 1 Hz; teilweise verdeckt von $CHCl_3$)], 6.88 (1 H, d, J = 7 Hz), 6.8–6.2 (ca. 16 H), 6.07 (1 H, d, J = 15 Hz), 3.92 (3 H, s), 3.82 (3 H, s), 2.6–2.39 (4 H, m), 1.76–1.38 [m, darin 1.56 (s-br.: H_2O)], 1.4–1.1 (18 ± 2 H), 0.95 (3 H, t, J = 7 Hz), und 0.88 (t-verbr., J = 7 Hz) (insgesamt 6 H).

17-(4-*Methoxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-[2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-(2-*methylpropyl*)*phenylester*] (**1c**-*Dimethylether*). DC: R_f = 0.70. HPLC(II): t_R = 9.5 min; HPLC(IV): t_R = 20.0 min. MS: *m/e* (%) = 690 (38, M^+), 613 (5), 612 (9), 349 (17), 348 (28), 344 (8), 343 (29), 342 (6), 315 (9), 266 (22), 265 (97), 237 (6), 199 (7), 197 (6), 195 (6), 194 (15), 193 (100), 187 (8), 179 (9), 177 (7), 173 (12), 172 (7), 171 (16), 159 (6), 157 (7), 151 (8), 147 (20), 145 (9), 137 (13), 131 (32), 129 (9), 122 (7), 121 (67), 117 (6), 115 (6), 107 (13), 105 (8). Hochauflösung: *m/e* = 690.4630 ($C_{47}H_{62}O_4$, M^+). UV/VIS: λ_{max} = 429, 452, 481 nm. IR: 1720 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR: δ = 7.51 (1 H, dd, J_1 = 14 Hz, J_2 = 10 Hz), 7.32 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.83 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.8–6.1 (*ca.* 16 H), 6.03 (1 H, d, J = 14 Hz), 3.81 (s) und 3.80(s) (insgesamt 6 H), 2.50–2.38 (4 H, m), 1.93–1.75 (1 H, m) 1.56 (H_2O), 1.50–1.37 (ca. 2 H, m), 1.37–1.1 (18 ± 2 H), 0.91 (d, J = 7 Hz) und 0.87 (t-verbr., J = 7 Hz) (insgesamt 9 H).

17-(4-*Methoxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-(2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-*propylphenylester*) (**1d**-*Dimethylether*). DC: R_F = 0.70. HPLC(II): t_R = 8.7 min; HPLC(IV): t_R = 16.4 min. MS: *m/e* (%) = 676 (14, M^+), 598 (4), 344 (5), 343 (18), 342 (7), 335 (16), 334 (30), 315 (10), 266 (22), 265 (91), 237 (7), 199 (6), 193 (9), 187 (12), 180 (16), 179 (100), 178 (6), 173 (14), 172 (10), 171 (21), 165 (8), 163 (11), 159 (7), 157 (8), 150 (6), 149 (8), 147 (19), 145 (7), 141 (6), 131 (24), 129 (11), 128 (7), 122 (7), 121 (61), 111 (7), 115 (8), 107 (12), 105 (9). Hochauflösung: *m/e* = 676.4504 ($C_{46}H_{60}O_4$, M^+). UV/VIS: λ_{max} = 428, 451, 481 nm. IR: 1713 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR: δ = 7.50 (1 H, dd, J_1 = 14 Hz, J_2 = 10 Hz), 7.33 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.84 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.8–6.1 (*ca.* 16 H), 6.05 (1 H, d, J = 14 Hz), 3.82(s) und 3.81(s) (insgesamt 6 H), 2.59–2.37 (4 H, m), 1.70–1.57 (ca. 2 H, m), 1.57 (H_2O), 1.53–1.36 (ca. 2 H, m), 1.36–1.1 (18 ± 2 H), 0.95 (t, J = 7 Hz) und 0.88 (t-verbr., J = 7 Hz) (insgesamt 6 H).

(17-(4-*Methoxyphenyl*)-2,4,6,8,10,12,14,16-*heptadecaoctaensäure*-(2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-*methylphenylester*) (**1e**-*Dimethylether*). DC: R_F = 0.70. HPLC(II): t_R = 6.2 min; HPLC(IV): t_R = 15.2 min. MS: *m/e* (%) = 648 (17, M^+), 571 (5), 570 (12), 344 (5), 343 (20), 342 (10), 316 (5), 315 (16), 314 (7), 307 (12), 306 (11), 266 (24), 265 (100), 264 (7), 263 (6), 249 (5), 239 (9), 237 (15), 236 (8), 187 (11), 173 (9), 172 (7), 171 (16), 157 (7), 152 (5), 151 (36), 147 (13), 145 (9), 135 (6), 131 (19), 129 (6), 121 (41), 107 (7). Hochauflösung: *m/e* = 648.4182 ($C_{44}H_{56}O_4$). UV/VIS: λ_{max} = 428, 449, 477 nm. IR: 1720 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR(WH 270): δ = 7.51 (dd, J_1 = 14 Hz, J_2 = 10 Hz), 7.35 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.84 (2 H, d, J = 8.5 Hz), 6.8–6.1 (ca. 16 H), 6.05 (1 H, d, J = 14 Hz), 3.80(s) und 3.79(s) (insgesamt 6 H), 2.47 (2 H, t-verbr., J = 6 Hz), 2.32 (3 H, s), 1.57 (H_2O), 1.54–1.35 (*ca.* 2 H, m), 1.38–1.1 (18 ± 2 H), 0.90 (3 H, t-verbr. J = 6 Hz).

Herstellung der Hexadecahydro-dimethylether

Ca. 4–10 mg (bei **1b**-Dimethylether: *ca.* 1 mg) der Dimethylether wurden in 5–10 ml Essigsäureethylester suspendiert, mit 10–20 mg Pd/C (10%-Fa. Merck) versetzt und unter Normaldruck und Rühren 1 h bei Raumtemp. hydriert. Filtration, mehrmaliges Waschen des Filters mit

Chloroform und anschliessendes Einengen *i. Vak.* führt zu den Hexadecahydro-Produkten (bei **1b**-Dimethylether im Gemisch mit der entsprechenden dehalogenierten Verbindung). Ausbeuten: Nahezu quantitativ.

17-(3-*Chlor*-4-*methoxyphenyl*)-*heptadecansäure*-[2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-(2-*methylpropyl*)*phenylester*]-(*Hexadecahydro*-**1a**-*Dimethylether*). DC: R_f = 0.7. HPLC(III): t_R = 17.9 min. MS: *m/e* (%) = 742 (3, M^+ für ^{37}Cl), 741 (3), 740 (6, M^+ für ^{35}Cl), 394 (1.5), 393 (1.5), 392 (1.5), 391 (1.5), 349 (29), 348 (100), 193 (52), 157 (5), 155 (14). UV/VIS: λ_{max} = 271 (sh), 278, 288 nm. IR: 1740 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR: δ = 7.16 (1 H, d, J = 2 Hz), 7.00 (1 H, dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 2 Hz), 6.82 (1 H, d, J = 8 Hz), 6.48 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 6.40 (1 H, J ~ 1 Hz), 3.86 (3 H, s), 3.78 (3 H, s), 2.59–2.35 (8 H, m), 1.90–1.65 (ca. 3 H, m), 1.55 (H_2O), 1.47–1.1 (45 ± 4 H), 0.88 (d, J = 7 Hz) und 0.86 (t, J = 7 Hz) (insgesamt 9 H).

17-(3-*Chlor*-4-*methoxyphenyl*)-*heptadecansäure*-(2-*dodecyl*)-3-*methoxy*-5-*propylphenylester*) = (*Hexadecahydro*-**1b**-*dimethylether*). (im Gemisch mit Hexadecahydro-**1d**-dimethylether entstanden durch hydrogenolytische Abspaltung des Chlors im Zuge der Hydrierung) DC: R_f = 0.7. HPLC(III): t_R = um 16 min breit, keine Trennung. MS: *m/e* (%) = 728 (7, M^+ für ^{37}Cl), 727 (7), 726 (15, M^+ für ^{35}Cl), 349 (31), 348 (100), 320 (29, Verunr.?), 306 (22, Verunr.?) 193 (33), 157 (1), 155 (43), zusätzlich die Ionen von Hexadecahydro-**1d**-dimethylether. ^{1}H NMR: δ = 7.19 (1 H, d, J = 2 Hz), 7.02 (1 H, dd, J_1 = 8 Hz, J_2 = 2 Hz), 6.84 (1 H, J = 8 Hz), 6.54 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 6.46 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 3.88 (3 H, s), 3.81 (3 H, s), 2.52 (ca. 6 H, t-verbr., J ~ 7 Hz), 2.44 (ca. 2 H, t-verbr., J ~ 7 Hz), 1.8–1.5 [m, darin 1.57 (s-br.: H_2O)], 1.5–1.1 (42 ± 4 H), 0.94 (t, J = 7 Hz) und 0.88 (t-verbr., J = 7 Hz) (insgesamt 6 H), zusätzlich die Signale von Hexadecahydro-**1d**-dimethylether.

17-(4-*Methoxyphenyl*)-*heptadecansäure*-[2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-(2-*methylpropyl*)*phenylester*] = (*Hexadecahydro*-**1c**-*dimethylether*), DC: R_f = 0.7. HPLC(III): t_R = 16.8 min. MS: *m/e* (%) = 706 (14, M^+), 359 (2), 358 (3), 349 (29), 348 (100), 193 (42), 121 (26). UV/VIS: λ_{max} = 269(sh), 277.5, 284 nm. IR: 1745 cm^{-1} (C=O). ^{1}H NMR (WH 270): δ = 7.07 (2 H, d, J = 7 Hz), 6.80 (2 H, d, J = 7 Hz), 6.49 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 6.41 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 3.79 (2) und 3.77 (s) (insgesamt 6 H), 2.52 (4 H, 2xt, J = 7 Hz), 2.47–2.35 (4 H, m), 1.9–1.6 (ca. 5 H, m), 1.54 (H_2O), 1.45–1.1 (45 ± 4 H), 0.91 (d, J = 7 Hz) und 0.89 (t, J = Hz) (insgesamt 9 H).

17-(4-*Methoxyphenyl*)-*heptadecansäure*-(2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-*propylphenylester*) = (*Hexadecahydro*-**1d**-*dimethylether*). DC: R_F = 0.7. HPLC(III): t_R = 15.2 min. MS: *m/e* (%) = 692 (10, M^+), 359 (2), 358 (3), 335 (27), 334 (100), 179 (40), 121 (24). UV/VIS: λ_{max} = 270 (sh), 278, 284 nm. IR: 1745 cm^{-1} (C=O). ^{1}H NMR (WH 270): δ = 7.07 (2 H, d, J = 7 Hz), 6.80 (2 H, d, J = 7 Hz), 6.54 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 6.45 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 3.81 (s) und 3.79 (s) (insgesamt 6 H), 2.54 (6 H, 3xt-verbr., J ~ 7 Hz), 2.44 (2 H, t-verbr., J = 7 Hz), 1.80–1.55 (ca. 7 H, m), 1.54 (H_2O), 1.48–1.2 (42 ± 4 H), 0.95 (t, J = 7 Hz) und 0.89 (t, J = 7 Hz) (insgesamt 6 H).

17-(4-*Methoxyphenyl*)-*heptadecansäure*(2-*dodecyl*-3-*methoxy*-5-*methylphenylester*) = (*Hexadecahydro*-**1e**-*dimethylether*). DC: R_F = 0.7. HPLC(III): t_R = 12.6 min. MS: *m/e* (%) = 664 (8, M^+), 359 (4), 358 (8), 330 (13), 320 (13), 307 (27), 306 (100), 151 (63), 121 (36). UV/VIS: λ_{max} = 270.5 (sh), 277.5, 284 nm. IR: 1740 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR: δ = 7.07 (2 H, d, J = 7 Hz), 6.80 (2 H, d, J = 7 Hz), 6.53 (1 H, d, J ~ 1 Hz) 6.43 (1 H, d, J ~ 1 Hz), 3.78(s) und 3.77(s) (insgesamt 6 H), 2.51 (4 H, t-verbr., J = 7 Hz), 2.42 (2 H, t-verbr., J = 7 Hz), 2.28 (3 H, s), 1.7 (2 H, m), 1.6–1.1 (45 ± 4 H), 0.85 (3 H, t, J = 6 Hz).

Danksagungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für Sachbeihilfen. Der Bakterienstamm wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. P. R. Hayes, University of Leeds, Leeds, England, zur Verfügung gestellt. Ferner schulden wir Dank Fräulein Susanne Petersen für geschickte technische Assistenz bei der Anzucht und Aufarbeitung der Bakterienansätze, sowie dem Biotechnikum der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung für das Abernten der Zellen.

LITERATUR

[1]XXI. Mitteil.: H. Achenbach, A. Böttger, W. Kohl, E. Fautz und H. Reichenbach, *Phytochemistry* **18**, 961 (1979); s. auch: H. Reichenbach, W. Kohl, A. Böttger-Vetter und H. Achenbach, *Arch Microbiol.* **126**, 291 (1980).

[2]S.z.B.: O. B. Weeks, In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Hers: R. E. Buchanan und M. E. Gibbons), 8. Aufl., S. 357, Williams & Wilkins, Baltimore (1974); J. M. Shewan, *J. Appl. Bact.* **32**, 1 (1969); P. R. Hayes, *J. Gen. Microbiol.* **30**, 1 (1963).

[3]S.z.B.: C. Lahellec, C. Meurier, G. Bennejean und M. Catsaras, *J. Appl. Microbiol.* **38**, 89 (1975); P. G. Bean und J. R. Everton, *J. Appl. Bact.* **32**, 51 (1969).

[4]S.z.B.: M. Kitamikado und Y. Z. Lee, *Appl. Microbiol.* **29**, 414 (1975); M. J. Dorey, *J. Gen. Microbiol.* **20**, 91 (1959); N. Payza und E. D. Korn, *J. Biol. Chem.* **223**, 853 (1956); S. Yamata, K. Nabe, T. Ujimaru, N. Izuo und I. Chibata, *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1063 (1979) [*Chem. Abstr.* **91**, 52448a (1979)]; Ajinomoto Co., Inc. (Erf. K. Ishii, K. Yokozeki und K. Takinami), *Japan. Kokai* 7834.990 (31.3.1978) [*Chem. Abstr.* **89**, 105882e (1978)]; Ajinomoto Co., Inc. (Erf. K. Ishii und K. Takinami), *Japan. Kokai Tokkyo Koho* 7886.093 (29.7.1978) [*Chem. Abstr.* **90**, P4432y (1979)].

[5]S.z.B.: A. von Graevenitz, *FEMS Microbiol. Lett.* **2**, 289 (1977); J. M. Matsen, *Health Lab. Sci.* **12**, 305 (1975); H. Olsen, *Acta Path. Microbiol. Scand.* **75**, 313 (1969); R. M. George, C. P. Cochran und W. E. Wheeler, *Am. J. Dis. Child.* **101**, 296 (1961); L. G. Herman und C. K. Himmelsbach, *Hospitals, J.A.H.A.* **39**, 72 (1965); B. Holmes, J. J. S. Snell und S. P. Lapage, *Internat. J. Syst. Bact.* **27**, 330 (1977); E. O. King, *Am. J. Clinic. Path.* **31**, 241 (1959).

[6a]T. A. McMeekin, D. B. Stewart und J. G. Murray, *J. Appl. Bact.* **35**, 129 (1972); [b]M. Goodfellow, B. Austin und C. H. Dickinson, *J. Gen. Microbiol.* **97**, 219 (1976); [c]P. R. Hayes, *J. Appl. Bact.* **43**, 345 (1977); [d]P. R. Hayes, A. P. D. Wilcock und J. H. Parish, *Ibid.* **43**, 111 (1977), [e]E. Callies und W. Mannheim, *Internat. J. System. Bact.* **28**, 14 (1978); [f]R. J. Owen und J. J. S. Snell, *J. Gen. Microbiol.* **93**, 89 (1976).

[7]F. J. Leuenberger, A. J. Schocher, G. Britton und T. W. Goodwin, *FEBS Letters* **33**, 205 (1973), O. B. Weeks, A. G. Andrewes, B. O. Brown und B. C. L. Weedon, *Nature* **224**, 879 (1969); S. Liaaen-Jensen, S. Hertzberg, O. B. Weeks und W. Schwiefer, *Acta Chem. Scand.* **22**, 1171 (1968).

[8]R. Twarog, *Antonie van Leeuwenhoek* **27**, 316 (1961); J. R. Cohen, R. C. Fuller und W. Litsky, *Health Laboratory Science* **14**, 107 (1977); T. A. McMeekin, J. T. Patterson und J. G. Murray, *J. Appl. Bact.* **34**, 699 (1971).

[9]H. Achenbach und W. Kohl, *Chem. Ber.* **112**, 209 (1979).

[10]H. Achenbach, W. Kohl und H. Reichenbach, *Ibid.* **112**, 1999 (1979).

[11]H. Achenbach, W. Kohl, S. Alexanian und H. Reichenbach, *Ibid.* **112**, 196 (1979) und dort zit. Lit.

[12]H. Achenbach, W. Kohl, H. Reichenbach und H. Kleinig, *Tetrahedron Letters* 2555, (1974); H. Achenbach, W. Kohl und H. Reichenbach, *Chem. Ber.* **109**, 2490 (1976).

[13]H. Behrens, Dissertation, TU Braunschweig (1978).