

## 89. Welkstoffe und Antibiotika.

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

### Über die Isolierung neuartiger Antibiotika aus Fusarien

von Pl. A. Plattner, U. Nager und A. Boller.

(7. II. 48.)

Über den Stoffwechsel der Pilzgattung *Fusarium* liegen bereits ausgedehnte Untersuchungen vor<sup>2)</sup>). Besonderes Interesse erweckte dabei die Beobachtung, dass viele dieser Pilze (z. B. *F. lycopersici*<sup>3)</sup>) imstande sind, aus Kohlehydraten Fette zu produzieren, die in ihren chemischen Eigenschaften dem Olivenöl sehr nahe stehen.

Gewisse Fusarien sind ferner als Urheber von Welkekrankheiten<sup>4)</sup> verschiedener Pflanzen bekannt. Im Falle der Tomatenwelke konnte aus dem Parasiten *Fusarium lycopersici* das dafür verantwortliche Toxin, das Lycomarasmin<sup>5)</sup>, isoliert werden.

Obwohl demnach der Stoffwechsel der Fusarien schon verhältnismässig gut bekannt ist, lagen zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Angaben über antibiotische Eigenschaften dieser Pilzgattung vor<sup>6)</sup>.

Chemisch näher bearbeitet war in dieser Richtung u. W. nur das Kulturfiltrat von *F. javanicum* Koorders, aus welchem *Arnstein*, *Cook* und *Lacey* zwei antibiotisch aktive Pigmente, Javanicin ( $C_{15}H_{14}O_6$ ) und Oxy-javanicin ( $C_{15}H_{14}O_7$ ) in reiner Form isoliert haben<sup>7)</sup>.

Bei Versuchen mit antibiotischen Pilzen verschiedener Gattungen wurde im Institut für spezielle Botanik der E.T.H. beobachtet, dass eine Reihe von Fusarien eine spezifische Wirkung gegen Myco-

<sup>1)</sup> 1.—6. Mitt. dieser Reihe: *Helv.* **28**, 188 (1945); *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **54**, 523 (1944); *Exper.* **1**, 195 (1945); **3**, 202 (1947); **3**, 325 (1947); *Helv.* **30**, 1472 (1947).

<sup>2)</sup> Vgl. die Zusammenfassung von *F. F. Nord* und *R. P. Mull*, *Adv. Enzymol.* **5**, 165 (1945).

<sup>3)</sup> Vgl. auch *R. F. Witter* und *E. Stotz*, *Arch. Biochem.* **9**, 331 (1946).

<sup>4)</sup> Vgl. z. B. *H. W. Wollenweber* und *O. A. Reinking*, *Die Fusarien*, Berlin 1935, und *E. Gäumann*, *Pflanzliche Infektionslehre*, Basel 1946.

<sup>5)</sup> *N. Clauson-Kaas*, *Pl. A. Plattner* und *E. Gäumann*, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **54**, 523 (1944); *Pl. A. Plattner* und *N. Clauson-Kaas*, *Helv.* **28**, 188 (1945); *Exper.* **1**, 195 (1945); *E. Gäumann* und *O. Jaag*, *Exper.* **2**, 215 (1946); *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **57**, 5, 132, 227 (1947); *E. Gäumann*, *O. Jaag* und *R. Braun*, *Exper.* **3**, 70 (1947); *E. Gäumann* und *A. von Arx*, *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **57**, 174 (1947).

<sup>6)</sup> Vgl. *E. Gäumann*, *St. Roth*, *L. Etlinger*, *Pl. A. Plattner* und *U. Nager*, *Exper.* **3**, 202 (1947); Anm. 2 und 3).

<sup>7)</sup> *A. H. Cook* und *M. S. Lacey*, *Brit. J. Exp. Path.* **26**, 404 (1945); *H. R. V. Arnstein*, *A. H. Cook* und *M. S. Lacey*, *Nature* **157**, 333 (1946); *H. R. V. Arnstein* und *A. H. Cook*, *Soc.* **1947**, 1021.

bakterien zeigen<sup>1)</sup>. Die systematische Bearbeitung dieser Imperfektengattung führte zur Isolierung einer grossen Anzahl aktiver Stämme<sup>2)</sup>.

Einige derselben wurden im organisch-chemischen Institut der E.T.H. einer chemischen Bearbeitung unterzogen. Dabei gelang es, mindestens 2 verschiedene aktive Substanzen zu isolieren, die nahe miteinander verwandt sind.

Aus *Fusarium orthoceras* var. *enniatinum*, Stamm ETH 1523, isolierten wir das Enniatin (A)<sup>1,3)</sup>, dem die Zusammensetzung  $C_{24}H_{42}O_6N_2$  zukommt. Die gleiche Verbindung wurde auch bei *Fusarium scirpi* Lamb. et Fautr., Stamm ETH 1536, als Stoffwechselprodukt gefunden.

Die zweite aktive Substanz, das Enniatin B,  $C_{22}H_{38}O_6N_2$ , erhielten wir aus den Fusarienstämmen ETH 4363 und ETH 1574.

Während die vier genannten Fusarien die entsprechenden Enniatine in relativ einheitlicher Form produzierten, lieferte der Stamm ETH 1524 eine aktive Verbindung, die wir vorläufig<sup>3)</sup> Enniatin C nannten, die aber nach neueren Ergebnissen vermutlich als Gemisch von Enniatin A und B anzusprechen ist.

Über die Isolierung und Charakterisierung dieser neuen Antibiotika wird im experimentellen Teil eingehender berichtet. Als Endergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle A die Eigenschaften der beiden Enniatine zusammengestellt.

Tabelle A.

	Enniatin A	Enniatin B
Smp.	121—122°	173—175°
$[\alpha]_D$ (in $CHCl_3$ )	—91°	—107°
Bruttoformel	$C_{24}H_{42}O_6N_2$	$C_{22}H_{38}O_6N_2$
Aktivität <sup>4)</sup>		
a) <i>Mycobact. paratuberculosis</i> ETH 2001	1 000 000	200 000
b) <i>Mycobact. phlei</i> ATCC 354	800 000	300 000

<sup>1)</sup> Vorläufige Mitt. E. Gäumann, St. Roth, L. Ettlinger, Pl. A. Plattner und U. Nager, Exper. **3**, 202 (1947); vgl. auch C. H. Boissevain, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **63**, 555 (1946).

<sup>2)</sup> E. Gäumann, St. Roth und L. Ettlinger, Ber. Schweiz. Bot. Ges. 1948 (im Druck).

<sup>3)</sup> Vorläufige Mitt. Pl. A. Plattner und U. Nager, Exper. **3**, 325 (1947).

<sup>4)</sup> In Verdünnungseinheiten pro g. Mittel aus 20 Bestimmungen. (Relativer Fehler  $\pm 12\%$ .)

Einige Zeit nach unserer ersten vorläufigen Mitteilung über Enniatin<sup>1)</sup> haben *A. H. Cook, S. F. Cox, T. H. Farmer und M. S. Lacey*<sup>2)</sup> über eine Gruppe neuer Antibiotika aus Fusarien berichtet. Die von diesen Forschern als Lateritiin I (angegebene Formel C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>) bezeichnete Verbindung zeigte, worauf wir bereits hingewiesen haben<sup>3)</sup>, grösste Ähnlichkeit mit Enniatin A. Die Identität der beiden Antibiotika konnte inzwischen durch Mischprobe<sup>4)</sup>, Aufnahme der Infrarot-Spektren und röntgenographische Messungen sichergestellt werden.

Für die Durchführung dieser Arbeit konnten Mittel aus den Eidg. Arbeitsbeschaffungskrediten verwendet werden.

Wir danken ferner der *CIBA-Aktiengellschaft* in Basel für die Unterstützung dieser Arbeit.

## Experimenteller Teil.

### Enniatin A.

Isolierung aus *Fusarium orthoceras* var. *enniatinum* Stamm ETH 1523.

Der verwendete Fusarienstamm wurde bei 27° auf Nährösung nach *Richard* gezüchtet<sup>5)</sup>.

Kulturfiltrat. Das Kulturfiltrat wies nach drei bis vier Wochen ein p<sub>H</sub> von 7,5 bis 8 auf und hatte eine Aktivität von 10—14 ME/cm<sup>3</sup><sup>6)</sup>. Seine antibiotische Wirkung wurde durch längeres Stehen bei 0° oder Erwärmen während einer Stunde auf 80° nicht beeinflusst. Proben, die bei p<sub>H</sub> 2 und 10 eine Stunde auf 80° gehalten wurden, waren bei neutraler Reaktion nicht mehr aktiv.

Aus dem Kulturfiltrat liess sich die Aktivität mit Äther oder Essigester teilweise extrahieren. Da es sich jedoch bald zeigte, dass im Mycel bis hundertmal mehr Aktivität vorhanden war, wurden diese Extraktionsversuche nicht fortgesetzt.

Extraktion des Mycels. Als Beispiel beschreiben wir die Aufarbeitung eines Ansatzes von 103 Glaso-Kolben à 500 cm<sup>3</sup> Nährösung nach *Richard*, der nach 21 Tagen Inkubation geerntet wurde.

<sup>1)</sup> Exper. 3, 202 (1947).

<sup>2)</sup> *A. H. Cook, S. F. Cox, T. H. Farmer und M. S. Lacey*, Nature 160, 31 (1947).

<sup>3)</sup> Exper. 3, 325 (1947).

<sup>4)</sup> Herrn Prof. *Cook* danken wir bestens für die Überlassung eines Präparates von Lateritiin I.

<sup>5)</sup> Die Züchtung der Pilze und die Ausführung der Bakterienteste erfolgte im Institut für spezielle Botanik der E.T.H. (Leitung Prof. Dr. *E. Gäumann*) durch Frau *Stephi Naef-Roth*, der wir unseren besten Dank aussprechen möchten.

<sup>6)</sup> ME bedeutet Verdünnungseinheiten gegen *Mycobacterium paratuberculosis* ETH 2001. Die angegebenen Werte stellen, sofern nichts anderes bemerkt wurde, das Mittel aus zwei Parallelbestimmungen dar.

Ausführung des Bakterientests. Die aktiven Mycelextrakte bzw. die daraus isolierten Enniatine mussten zufolge ihrer Unlöslichkeit in Wasser in Äthanol oder Aceton aufgenommen und durch Verdünnen mit den genannten Lösungsmitteln auf die maximale Konzentration 0,5—1 mg/cm<sup>3</sup> gebracht werden. Von diesem Punkte an tritt bei Zusatz von Wasser keine Fällung oder Trübung mehr ein, was die genaue Testierung sonst verunmöglicht. Zum Test wurde 1 Teil dieser Lösung zuerst mit 9 Teilen sterilem Wasser verdünnt. Mit dieser Grundlösung wurde jeweils die Herstellung der Verdünnungsreihen begonnen. Durch Vergleich mit einer Standardlösung liessen sich die täglichen Testschwankungen eliminieren.

Das Mycel wurde abfiltriert und mit einer Obstpresse von der anhaftenden Kulturlösung weitgehend befreit. Der noch feuchte Presskuchen (1,5 kg) wurde maschinell zerhackt, mit 1,5 Teilen wasserfreiem Natriumsulfat vermengt, das Gemisch in einer Kugelmühle pulverisiert und im Perkolator erschöpfend mit Äther extrahiert. Systematische Vorversuche zeigten, dass kalte und warme Extraktion gleiche Ausbeuten an Aktivität ergeben und dass das Antibiotikum in organischen Lösungsmitteln thermostabil ist.

Die ätherische Lösung wurde nun mit Natriumsulfat getrocknet und getestet. Die Gesamtaktivität betrug im vorliegenden Falle  $37 \cdot 10^6$  ME, entsprechend  $720 \text{ ME/cm}^3$  der angesetzten Nährlösung. Der erhaltene rotbraune, ölige Rückstand wog 82 g und hatte demnach 450 ME/mg.

Mycelextraktionen anderer Ansätze lieferten jeweils 600—1200 ME/cm<sup>3</sup> Nährlösung, was einer mittleren Ausbeute von 900 mg Enniatin pro Liter Nährlösung entspricht.

Eigenschaften des Rohextraktes. Die Aktivität solcher Ätherextrakte blieb während 6 Monaten und mehr unverändert, wenn diese bei  $-10^\circ$  aufbewahrt wurden.

Destillationsversuche bei 0,005 mm ergaben, dass das Antibiotikum auf  $150-170^\circ$  erhitzt werden konnte, ohne seine Aktivität zu verlieren. Es gelang jedoch dabei nicht, die aktive Substanz im Destillat wesentlich anzureichern.

Chromatographische Reinigung. Viel erfolgreicher liess sich das Antibiotikum durch chromatographische Adsorption an Aluminiumoxyd von inaktivem Material trennen.

Chromatogramme mit der zehnfachen Menge an neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität III, nach Brockmann) lieferten als Anfangsfraktionen farblose, ölige, wenig aktive Petroläther-Eluate (20—50 ME/mg), die bei ca.  $5^\circ$  erstarrten.

Verseifungszahl: Gef.  $192 \pm 4$ ;  $n_D^{24} = 1,4695$ .

Diese Fraktionen zeigten demnach die Eigenschaften der von Nord und Mull<sup>1)</sup> eingehender beschriebenen (Vers.zahl 189,3) Fusarienfette. Die späteren, stark aktiven Fraktionen waren weitgehend mit diesen Fetten verunreinigt und liessen sich deshalb nur schwierig reinigen.

In mehreren Versuchen zeigte es sich, dass bei Verwendung der 25—30fachen Menge an neutralem Aluminiumoxyd der Aktivität I diese Fette, welche bis  $\frac{2}{3}$  des Gesamtextraktes ausmachen, wahrscheinlich nach Verseifung stark adsorbiert werden, so dass das Enniatin in sehr reiner Form eluiert werden konnte. In allen Fällen liess sich die auf die Säule gebrachte Gesamtaktivität wieder vollständig zurückhalten.

Ein typisches Chromatogramm von 186 g Rohextrakt aus 119 Liter Nährlösung (Aktivität:  $95 \cdot 10^6$  ME) mit 4,5 kg Aluminiumoxyd ist in nachstehender Tabelle S. 598 angeführt.

Krystallisation der chromatographierten Fraktionen. Auf Grund der Aktivitätsteste wurden die Fraktionen 6—27 des obigen Chromatogramms, die alle bereits annähernd reines Enniatin A darstellen, zu 4 Anteilen vereinigt und weiter aufgearbeitet. Die Eluate wurden in Methanol aufgenommen ( $6 \text{ cm}^3/\text{g}$  Enniatin A) und auf  $-10$  bis  $-15^\circ$  gekühlt. Nun wurde destilliertes Wasser zugesetzt, bis die Konzentration an Methanol 66% betrug. In den meisten Fällen krystallisierte das Enniatin A spontan in langen, feinen Nadeln (bis zu 12 mm Länge) aus. In den übrigen Fällen konnte es durch Impfen zur Krystallisation gebracht werden. Zur vollständigen Fällung wurde allmählich mehr Wasser zugesetzt (Endkonzentration an Methanol ca. 30%).

Das krystallisierte Enniatin A wurde über Kaliumhydroxyd bei 11 mm und Zimmertemperatur, anschliessend während 10 Stunden über Phosphorpentoxyd bei  $80^\circ$  und 0,01 mm getrocknet.

<sup>1)</sup> F. F. Nord und R. P. Mull, Adv. Enzymol. **5**, 165 (1945).

Fraktion	Eluierungsmittel	L	Gewicht g	Aussehen
1—3	Petroläther . . . . .	3	0,3	teilweise krystallin
4	Benzol . . . . .	2	1,3	" "
5	" . . . . .	1	1,0	krystallin
6	Benzol-Äther 1% . . .	1	9,2	"
7	" " 10% . . .	1	15,1	"
8—9	" " 50% . . .	2	10,3	farblos amorph
10—12	Äther . . . . .	5	9,9	" "
13—20	" . . . . .	16	11,8	" "
21	Äther-Essigester 0,5% .	1	0,3	" "
22	" " 0,5% .	1	0,4	" "
23—26	" " 10% .	2	10,4	krystallin
27	" " 10% .	1	10,2	"
28	" " 10% .	1	2,9	gelbes Öl, krystallin
29	" " 10% .	1	1,8	braunes "
30—32	" " 50% .	4	1,6	" "
Total		42	86,5	

Chromatogramm eines Mycelextraktes aus *Fusarium orthoceras* var. *enniatinum* Stamm ETH 1523.

Die durch Krystallisation aus den angegebenen Fraktionen des erwähnten Chromatogramms erhaltenen Präparate, sowie deren Drehungen, Schmelzpunkte und Aktivitäten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Es zeigt sich demnach, dass dieser Stamm praktisch ausschliesslich Enniatin A produziert.

Umkrist. Präp.	Chromato- grammfakt.	Gewicht g	$[\alpha]_D^{18}$ <sup>1)</sup>	Smp. <sup>1)</sup>	Aktivität ME/mg <sup>2)</sup>
I	6—7	22,0	-91,8	120,5—121,5	900
II	8—12	17,5	-91,8	121,5—122	800
III	13—21	11,0	-90,7	120 —120,5	800
IVa	22—27	9,5	-89,3	120 —120,5	1050
IVb <sup>3)</sup>	22—27	8,5	-92,2	120 —120,5	1050

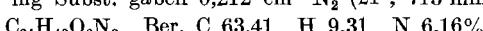
Physikalische und biologische Daten krystallisierter Präparate von Enniatin A.

Das Präparat I schmolz nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol-Wasser bei 121,5°. Zur Analyse wurde 14 Stunden bei 85° und 0,005 mm getrocknet.

$$[\alpha]_D^{18} = -90,0^\circ \text{ (c = 1,000 in Chloroform)}$$

3,630 mg Subst. gaben 8,405 mg CO<sub>2</sub> und 2,948 mg H<sub>2</sub>O

3,766 mg Subst. gaben 0,212 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (21°, 715 mm)



Gef. ,, 63,18 ,, 9,09 ,, 6,14%

<sup>1)</sup> Sämtliche Schmelzpunkte sind korrigiert. Die Drehungen wurden in Chloroform bei 1 dm Schichtdicke bestimmt.

<sup>2)</sup> Mittel von 10 Bestimmungen.

<sup>3)</sup> Aus den Mutterlaugen von IVa.

Aus einer andern Aufarbeitung wurde ein Enniatin A (Präp. V) vom Smp. 122—122,5° erhalten.

$$[\alpha]_D^{18} = -91,9^\circ \text{ (c = 0,926 in Chloroform).}$$

Die Substanz wurde vor dem Verbrennen geschmolzen.

3,863 mg Subst. gaben 8,957 mg CO<sub>2</sub> und 3,187 mg H<sub>2</sub>O

3,147 mg Subst. gaben 0,173 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 727 mm) (*Dumas*)

9,630 mg Subst. verbr. 2,102 cm<sup>3</sup> 0,02-n. HCl (*Kjeldahl*)

5,714 mg Subst. verbr. 7,454 cm<sup>3</sup> 0,02-n. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Methyliimid)

C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 63,41 H 9,31 N 6,16 2 CH<sub>3</sub> 6,62%

Gef., 63,28 „, 9,25 „, 6,17 (*Dumas*) CH<sub>3</sub> 6,53%

„, 6,11 (*Kjeldahl*)

Mol.-Gew. Ber. 454,59

Gef. 432 ± 24; 443 ± 13 (kryoskop. in Benzol)

„, 446 (nach *Barger* und *Rast*)

Ausser den zwei gefundenen N-Methyl-Gruppen liessen sich im Enniatin weder aktiver Wasserstoff, noch Methoxyl-Gruppen finden. Quantitative katalytische Hydrierung mit Platinoxyd in Eisessig ergab keine Wasserstoffaufnahme. Das Enniatin A zeigte im ultravioletten Bereich keine charakteristische Absorption, noch wies es eine polarographische Stufe auf.

150 mg Enniatin A (Präp. V) liessen sich innerhalb 12 Stunden bei 127—128° (Ölbadtemperatur) und 10<sup>-4</sup> mm sublimieren. Das Sublimat schmolz bei 122° und hatte eine unveränderte Aktivität von 1100 ME/mg.

3,982 mg Subst. gaben 9,223 mg CO<sub>2</sub> und 3,288 mg H<sub>2</sub>O

Gef. C 63,21 H 9,24%

#### Isolierung aus *Fusarium scirpi* Lamb. et Fautr. Stamm ETH 1536.

Ein Ansatz von 20 *Fernbach*-Kolben à 500 cm<sup>3</sup> Nährlösung nach *Cook* und *Tulloch* wurde nach 28 Tagen Inkubation bei 22° analog *Fusarium* Stamm ETH 1523 aufgearbeitet. Der rohe Ätherextrakt wog 23,5 g und hatte eine Aktivität von 14,3 · 10<sup>6</sup> ME<sup>1)</sup>, was einer Ausbeute von 1 g Enniatin A pro L Nährlösung entspricht.

Der Rohextrakt wurde an 575 g neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität I) chromatographiert. Die krystallisierten Fraktionen wogen 11 g und wiesen eine Aktivität von 13,9 · 10<sup>6</sup> ME auf. Ein mit Benzol-Äther (1:1) eluiertes Präparat schmolz nach dreimaligem Umkrystallisieren aus Methanol-Wasser bei 121,5°. Aktivität: 800 ME/mg<sup>2)</sup>.

$$[\alpha]_D^{18} = -86,1^\circ \text{ (c = 1,162 in Chloroform)}$$

Die Substanz wurde vor dem Verbrennen geschmolzen.

3,864 mg Subst. gaben 8,938 mg CO<sub>2</sub> und 3,106 mg H<sub>2</sub>O

2,938 mg Subst. gaben 0,166 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 726 mm)

C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 63,41 H 9,31 N 6,16%

Gef., 63,13 „, 8,99 „, 6,33%

Das Präparat ist mit Enniatin A identisch.

#### Enniatin B.

##### Isolierung aus *Fusarium* Stamm ETH 4363.

Der Pilz wurde bei 27° auf synthetischem Nährmedium nach *Czapek-Dox* gezüchtet. Wir beschreiben die Aufarbeitung eines Ansatzes von 20 *Fernbach*-Kolben à 500 cm<sup>3</sup> Nährösung, der nach 17 Tagen Inkubation geerntet wurde.

<sup>1)</sup> Mittel aus 4 Bestimmungen.

<sup>2)</sup> Mittel aus 10 Bestimmungen.

**Extraktion des Mycels.** Das abgepresste Mycel (340 g) wurde, wie unter Enniatin A beschrieben, getrocknet und im Perkolator mit Äther extrahiert. Wir erhielten 5,99 g Rohextrakt mit total  $1,7 \cdot 10^6$  ME. Dieser wurde bei  $-10^\circ$  aufbewahrt und erst 2 Monate später weiterverarbeitet. Seine Aktivität war unverändert ( $2,05 \cdot 10^6$  ME).

**Chromatographische Reinigung.** Das Chromatogramm des Mycelextraktes an 125 g neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität III) ist unten wiedergegeben.

Fraktion	Eluierungsmittel	Volumen cm <sup>3</sup>	Gewicht mg	Smp.
1—2	Petroläther . . . . .	250	40	162
3	Petroläther-Benzol . . .	100	3110	168,5
4—6	Benzol . . . . .	200	440	167—169,5
7—9	Benzol-Äther 1—10% .	150	190	164,5—169
10—13	Benzol-Äther 10—50% .	200	330	164—166
14—16	Äther . . . . .	200	105	163—165,5
17—18	Äther-Essigester 1% .	100	30	163—169
19—20	Äther-Essigester 10% .	150	220	162—168
21	Äther-Essigester 50% .	100	260	140
22—27	Essigester-Methanol .	800	545	—
	Total . . . . .	2250	5270	

#### Chromatogramm des Mycelextraktes von *Fusarium* Stamm ETH 4363.

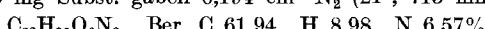
Die erhaltenen kristallinen Fraktionen wogen zusammen 4,7 g und wiesen untereinander sehr ähnliche Schmelzpunkte und Aktivitäten (ca. 190 ME/mg) auf. Die Ausbeute an chromatographisch gereinigtem Enniatin B ist demnach bei diesem Ansatz 470 mg/L Nährlösung.

**Umkristallisation der Chromatogrammfractionen.** Die Fraktionen 10—16 wurden vereinigt und viermal aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Das erhaltene Enniatin B (Präp. I) schmolz bei  $174,5—175,5^\circ$ . Aktivität: 180 ME/mg. Zur Analyse wurde 16 Stunden bei  $50^\circ$  und 0,01 mm getrocknet.

$$[\alpha]_D^{21} = -106,3^\circ \text{ (c = 0,695 in Chloroform)}$$

3,722 mg Subst. gaben 8,504 mg CO<sub>2</sub> und 2,927 mg H<sub>2</sub>O

3,125 mg Subst. gaben 0,194 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> ( $21^\circ$ , 715 mm)



Gef. „ 62,35 „ 8,80 „ 6,78%

Das gleiche Präparat schmolz nach zweimaligem Sublimieren ( $160^\circ$  und 0,01 mm) bei  $173,5—174^\circ$  und hatte eine Aktivität von 125 ME/mg.

$$[\alpha]_D^{19} = -105,9^\circ \text{ (c = 1,200 in Chloroform)}$$

3,768 mg Subst. gaben 8,546 mg CO<sub>2</sub> und 2,927 mg H<sub>2</sub>O

3,086 mg Subst. gaben 0,186 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> ( $19,5^\circ$ , 715 mm)

Gef. C 61,89 H 8,69 N 6,62%

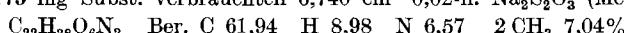
Die Fraktion 3 wurde viermal aus Petroläther (Sdp. 25—30°) umkristallisiert und während 3 Stunden bei  $60^\circ$  und 0,01 mm getrocknet. Smp. 175—175,5°. Aktivität: 170 ME/mg (Präparat II).

$$[\alpha]_D^{20} = -107,9^\circ \text{ (c = 0,631 in Chloroform)}$$

3,840 mg Subst. gaben 8,716 mg CO<sub>2</sub> und 3,067 mg H<sub>2</sub>O

3,650 mg Subst. gaben 0,223 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> ( $20^\circ$ , 712 mm)

4,173 mg Subst. verbrauchten 6,740 cm<sup>3</sup> 0,02-n. Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Methylimid)



Gef. „ 61,94 „ 8,94 „ 6,66 „ 8,10%

Isolierung aus *Fusarium* Stamm ETH 1574.

Die Züchtung des *Fusarium* Stamm ETH 1574 erfolgte bei 22° in *Fernbach*-Kolben à 500 cm<sup>3</sup> Nährösung nach *Cook* und *Tulloch*.

Extraktion und chromatographische Reinigung. Ein Ansatz von 5 Liter Nährösung wurde nach 14 Tagen geerntet und das Mycel wie früher beschrieben auf aktive Substanz aufgearbeitet. Wir erhielten 11,4 g Ätherextrakt mit total 2,2 · 10<sup>6</sup> ME entsprechend 190 ME/mg. Bezogen auf die Nährösung beträgt die Aktivität des Mycels 440 ME/cm<sup>3</sup>.

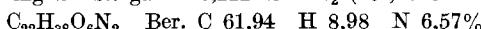
Ein Chromatogramm mit der 30-fachen Menge neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität I) ergab ein analoges Bild wie beim Rohextrakt von *Fusarium* Stamm ETH 4363. Die erhaltenen krystallinen Fraktionen wogen zusammen 8,5 g, schmolzen einheitlich bei 171—172° und waren alle aktiv (ca. 200 ME/mg). Die Produktion dieses *Fusariums* beträgt demnach 1,7 g Enniatin B pro Liter Nährösung, also etwa 3½ mal mehr als bei Stamm ETH 4363.

Aufarbeitung der Chromatogrammfractionen. Eine mit Benzol-Äther (1:1) eluierte Fraktion wurde dreimal aus Petroläther umkristallisiert und zur Analyse 42 Stunden bei 80° und 0,01 mm getrocknet. Smp. 173—173,5°; Aktivität: 130 ME/mg (Präparat I).

$$[\alpha]_D^{19} = -107,5^\circ \quad (c = 1,053 \text{ in Chloroform})$$

3,622 mg Subst. gaben 8,205 mg CO<sub>2</sub> und 2,998 mg H<sub>2</sub>O

3,439 mg Subst. gaben 0,212 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (20°, 713 mm)



Gef. „, 61,83 „, 8,92 „, 6,74%

Ein zweites Präparat wurde aus den vereinigten Fraktionen aus Petroläther-Benzol, Benzol und Benzol-Äther erhalten, die dreimal aus Äther-Petroläther umkristallisiert und vor der Analyse 14 Stunden bei 55° und 0,003 mm getrocknet wurden. Smp. 173—173,5°; Aktivität: 210 ME/mg<sup>1</sup>.

$$[\alpha]_D^{19} = -107,1^\circ \quad (c = 1,108 \text{ in Chloroform})$$

3,616 mg Subst. gaben 8,183 mg CO<sub>2</sub> und 2,836 mg H<sub>2</sub>O

3,102 mg Subst. gaben 0,186 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (18°, 710 mm)

Gef. C 61,76 H 8,76 N 6,57%

<i>Fusarium</i> Stamm ETH	Präparat	Smp.	$[\alpha]_D$	Aktivität ME/mg
4363	I	174,5—175,5°	-106,3	180
4363	Subl. v. I	173,5—174°	-105,9	125
4363	II <sup>2</sup> )	175—175,5°	-107,9	170
1574	I	173—173,5	-107,5	130
1574	II	173—173,5	-107,1	210

Eigenschaften der Präparate von Enniatin B aus den *Fusarien* Stamm ETH 4363 und ETH 1574.

Die aus den *Fusarien* Stamm ETH 4363 und ETH 1574 isolierten Antibiotika erwiesen sich demnach auf Grund von Schmelzpunkt, Drehung und Aktivität als identisch.

<sup>1</sup>) Mittel aus 20 Bestimmungen.

<sup>2</sup>) Der Mischschmelzpunkt mit Präparat I aus *Fusarium* Stamm ETH 1574 lag bei 174,5—176,5°.

**Enniatin „C“<sup>1)</sup>.**

Ein Ansatz von 10 *Fernbach*-Kolben à 500 cm<sup>3</sup> des bei 22° auf Nährlösung nach *Richard* gezüchteten *Fusariums* Stamm ETH 1524 wurde nach 18 Tagen geerntet und wie im Vorangehenden beschrieben auf aktive Substanz aufgearbeitet. Der Ätherextrakt (4,2 g) wurde an 105 g neutralem Aluminiumoxyd (Aktivität I) chromatographiert. Die aktiven, krystallinen Fraktionen (3,0 g) schmolzen bei 145—148° und hatten im Mittel 350 ME/mg.

Vier im Chromatogramm aufeinanderfolgende, mit Benzol-Äther, Äther und Äther-Essigester eluierte Fraktionen wurden vereinigt und wiederholt aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Die dabei erhaltenen Präparate zeigten jedoch keinen scharfen Schmelzpunkt.

Eine dreimal umkristallisierte Probe wurde zur Analyse 14 Stunden bei 65° und 0,005 mm getrocknet. Smp. 152—153° (Sintern ab 139°); Aktivität: 340 ME/mg.

$$[\alpha]_D^{18,5} = -104,4^0 \quad (c = 1,081 \text{ in Chloroform})$$

3,578 mg Subst. gaben 8,108 mg CO<sub>2</sub> und 2,772 mg H<sub>2</sub>O

5,042 mg Subst. gaben 0,292 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> (24°, 722 mm)

C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> Ber. C 63,41 H 9,31 N 6,16%

C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> „ „ 61,94 „ 8,98 „ 6,57%

Gef. „ 61,84 „ 8,67 „ 6,32%

Auf Grund von Schmelzpunkt, Drehung, Analyse und Aktivität ist es wahrscheinlich, dass dieses Präparat ein Gemisch der Enniatine A und B darstellt.

Unter den von uns untersuchten Fusarien war der Stamm ETH 1524 der einzige, der gleichzeitig wesentliche Mengen verschiedener Antibiotika produzierte.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Hrn. *W. Manser* ausgeführt.

### Zusammenfassung.

Bei der Untersuchung von fünf verschiedenen Fusarienstämmen, die in vitro alle spezifisch gegen Mycobacterien antibiotisch wirksam waren, wurden in reiner Form zwei neuartige Antibiotika isoliert. Eine als Enniatin A (C<sub>24</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>) bezeichnete Verbindung liess sich aus *F. orthoceras* var. *enniatinum* Stamm ETH 1523 und aus *F. scirpi* Lamb. et Fautr. Stamm ETH 1536 erhalten, während die *Fusarien* Stamm ETH 4363 und ETH 1574 ein Enniatin B (C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>) genanntes Antibiotikum lieferten. Die Isolierung dieser chemisch und physikalisch als einheitlich charakterisierten Stoffe wird eingehender beschrieben.

Das neuerdings von *Cook* und Mitarbeitern aus *F. lateritium* isolierte Lateritiin I (angegebene Formel C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>) ist mit Enniatin A identisch.

Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

<sup>1)</sup> Exper. 3, 325 (1947).