

257. Welkstoffe und Antibiotica

23. Mitteilung¹⁾

Über die Isolierung von *Culmomasmin*, einem peptidartigen Welkstoff aus dem Kulturfiltrat von *Fusarium culmorum* (W. G. SM.) SACC.

von J. Kiss²⁾, St. Naef-Roth, E. Hardegger, A. Boller, F. Lohse,
E. Gäumann und Pl. A. Plattner

(6. X. 60)

Fusarium culmorum (W. G. SM.) SACC., ein Erreger von Keimlingskrankheiten, Ähren- und Wurzelfusariosen bei verschiedenen Getreidearten, bildet *in vitro* toxische Stoffwechselprodukte, die an Testpflanzen ähnliche Schadenbilder auszulösen vermögen wie sie bei erkrankten Pflanzen auftreten. Eines dieser Toxine, das wir im folgenden *Culmomasmin* nennen möchten, erwies sich als eines der aktivsten bisher bekannten Welketoxine³⁾.

Die Verbindung ist thermolabil und auch gegenüber pH-Schwankungen sehr empfindlich. Die Stabilität in Lösungsmitteln, namentlich in solchen mit polarem Charakter, ist gering. Aus Kulturfiltraten desselben Pilzstammes, ETH Nr. 4229, isolierte LANDOLT⁴⁾ einen welkaktiven Stoff, der jedoch mit *Culmomasmin* nicht identisch ist. Die von LANDOLT beschriebene Verbindung ist im Gegensatz zu *Culmomasmin* thermostabil, in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich, und die Lösungen zeichnen sich durch eine bemerkenswerte Stabilität aus.

Die erste Aufarbeitungsstufe bei der Isolierung von *Culmomasmin* besteht in der Adsorption der welkaktiven Fraktionen an Asmit (No. 173N) (Adsorberharz mit schwachen anionen Eigenschaften), gefolgt von fraktionierter Ablösung durch Methanol. Schonendes Eindampfen der Methanol-Eluate lieferte den rohen Welkstoff in fester Form. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem folgenden Schema.

Aus der Rohfraktion I liessen sich inaktive Begleitsubstanzen durch Äther herauslösen. Der Äther-unlösliche Anteil enthält das *Culmomasmin* in vorgereinigter Form. Weitere Verunreinigungen, namentlich D-Weinsäure, konnten durch Digerieren der Fraktion II mit Aceton abgetrennt werden.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte durch Herauslösen der aktiven Anteile mit Dimethylformamid aus der Fraktion III. Anschliessend wurde das *Culmomasmin* an vorbehandelter Norit-Suprakohle⁵⁾ adsorbiert und anschliessend mit Dimethyl-

¹⁾ 22. Mitteilung: Helv. 43, 1436 (1960).

²⁾ Vorgetragen an der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft, Genf, 27. Februar 1960; Chimia 14, 174 (1960); Angew. Chem. 72, 271 (1960).

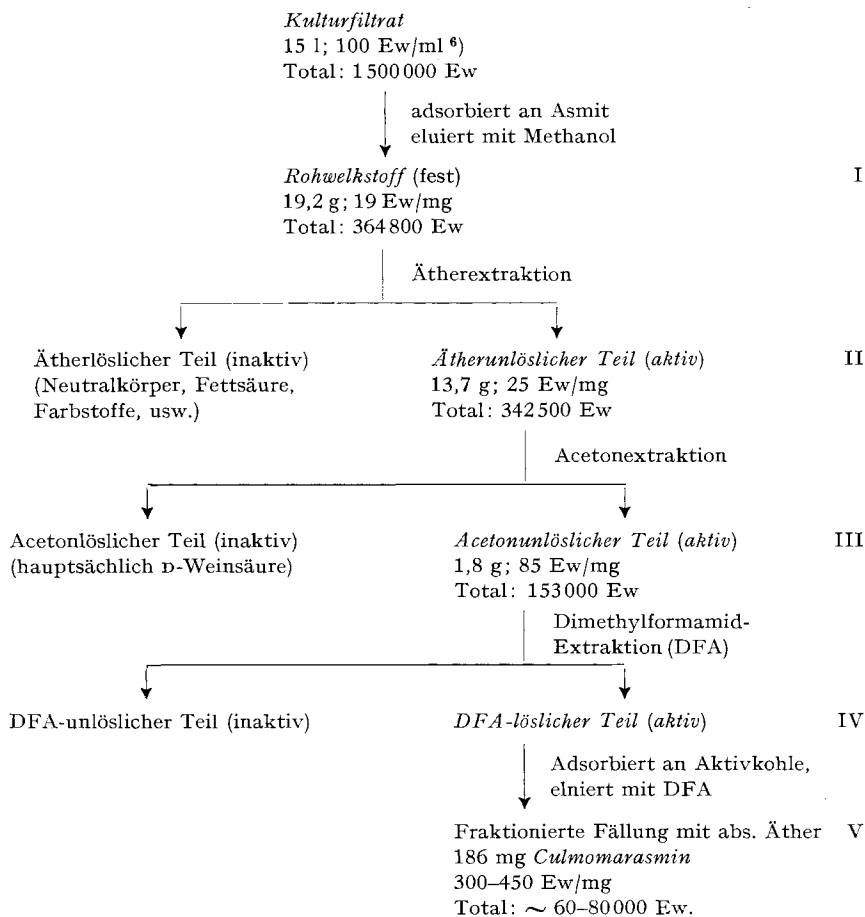
³⁾ E. GÄUMANN und Mitarb., Phytopathol. Z. 36, 111 (1959); PL. A. PLATTNER und Mitarb., Helv. 28, 188 (1945); 31, 860 (1948); 37, 1379 (1954); A. E. DIMOND, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe 17, 298 (1959).

⁴⁾ E. LANDOLT, Phytopathol. Z. 19, 126 (1952).

⁵⁾ Zu diesem Zweck konnten verschiedene Aktivkohlesorten verwendet werden, welche mit 12-proz. Salzsäure ausgekocht, mit Wasser neutral gewaschen und im Vakuumexsiccator über Phosphorpentoxyd scharf getrocknet wurden.

formamid fraktioniert eluiert. Die letzte Reinigungsstufe (IV → V) besteht in einer fraktionierten Fällung des Culmomarasmins.

Das so erhaltene Culmomarasmin ist eine farblose mikrokristalline Verbindung, die in unserem Test eine Welkaktivität von 300–450 Ew besitzt. Eine Erhöhung der Aktivität konnte durch eine weitere Reinigung (chromatographische Adsorption, fraktionierte Fällung, usw.) nicht erreicht werden. Wie bereits erwähnt, ist Culmomarasmin gegen Alkalien und Mineralsäuren äusserst empfindlich.



Culmomarasmin lässt sich mittels den folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften charakterisieren: Zersetzungspunkt: 215–218°; $[\alpha]_D^{22} = -0,6^\circ \pm 0,2^\circ$; pK-Werte: 5,7 und $8,4 \pm 0,1$.

In Dimethylformamid-Lösung weist Culmomarasmin das folgende UZ.-Diagramm auf (Zentrifugalfeld: 180000 g; 50000 U.p.M.) Sedimentationskonstante: $s_{20} = 0,62 \times 10^{-13}$. Auf Grund des UZ.-Diagrammes darf das Präparat als einheitlich angesehen werden. Die sehr niedrige Sedimentationskonstante (sofern sie nicht durch

⁶⁾ Vgl. exptl. Teil.

ein hohes, scheinbar partielles, spezifisches Volumen des Culmomarasmins bedingt ist), sowie die rasch einsetzende Diffusion weisen mit grosser Wahrscheinlichkeit auf ein relativ kleines Molekulargewicht der Substanz hin. – Die übrigen Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes (Schmelzpunktniedrigung, Siedepunkterhöhung, usw.) führen beim Culmomarasmin zu wenig übereinstimmenden Werten.

Das IR.-Absorptionsspektrum (Nujol) weist im Gebiet von 3300 und 1730 cm^{-1} ausgeprägte Banden auf (vgl. Fig. 2).

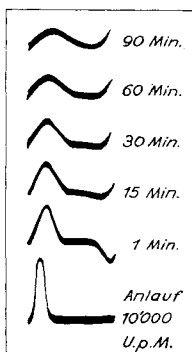


Fig. 1. Ultrazentrifugierungsdiagramm von Culmomarasmin

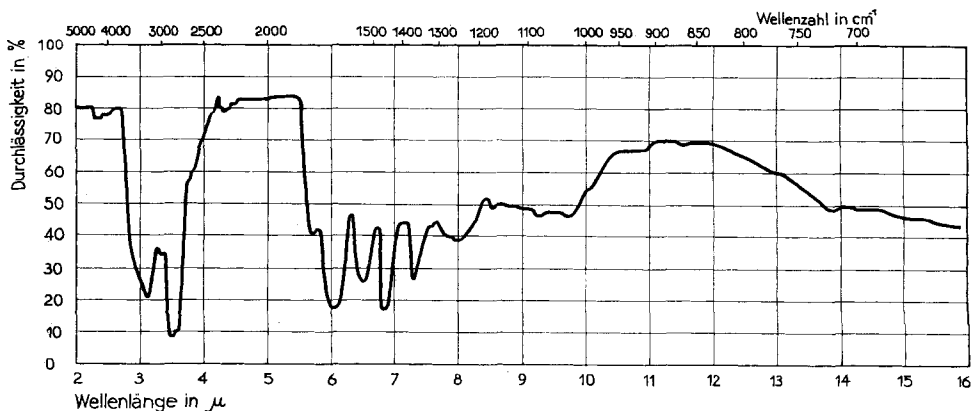


Fig. 2. IR.-Absorptionsspektrum von Culmomarasmin

Die Elementaranalyse zeigt einen hohen Gehalt von N, S und Cl im Culmomarasmin an. Neben C, H, O, N, S und Cl wurde bei der Verbrennungsanalyse ein geringer anorganischer Rückstand festgestellt, in welchem Eisen nachgewiesen werden konnte. Die Aminosäureanalyse nach STEIN & MOORE lässt neben NH_3 auf die Anwesenheit der folgenden Aminosäuren schliessen: Cys., Leu., Ser., Asp., Glu., Ala., Val., Allo-Ile., Pro., Gly., Thr.

Auf Grund der vorliegenden experimentellen Befunde vermuten wir, dass es sich bei dem von uns untersuchten Stoffwechselprodukt von *Fusarium culmorum*

(W. G. SM). SACC um eine weitgehend einheitliche Substanz handelt. Das Culmomarasmin stellt mit Sicherheit einen neuen peptidartigen, pflanzlichen Welkstoff dar, über dessen biologische Eigenschaften an anderer Stelle näher berichtet werden soll.

Experimenteller Teil

Züchtung und Isolierung. Zur Herstellung der Welkstofflösung wurde der Stamm von *Fasarium culmorum* (W. G. SM.) SACC in Schüttelkultur bei 27° 3 Tage auf folgender Nährlösung gezüchtet: Ionenaustauscher-Wasser 1500 ml; Rohrzucker 75 g; Weinsäure 4 g; Ammoniumtartrat 4 g; Ammoniumphosphat 0,6 g; Ammoniumsulfat 0,25 g; Kaliumcarbonat 0,6 g; Magnesiumcarbonat 0,4 g; Zinksulfat 0,07 g; Ferrisulfat 0,07 g; Kaliumsilicat 0,07 g. Die Lösung wurde bei 1 atü 20 Min. sterilisiert.

15 l Kulturfiltrat (100 Ew/ml. total 1500000 Ew) liess man durch eine 2,5 l Asmit-Ionenaustauscher-Säule laufen. Der adsorbierte Welkstoff wurde mit Methanol (16mal 500 ml) bei Zimmertemperatur eluiert. Die Fraktionen 4–16 wurden im Vakuum (ca. 20 Torr) bei 25–30° Badtemperatur eingedampft. Es ist wesentlich, dass das Methanol-Eluat kein Wasser enthält, da sonst beim Eindampfen der Lösung keine aktive, feste Substanz isoliert werden kann. Es wurden 19,2 g feste, pulverisierbare, gelbbraune Substanz I isoliert, mit einer Welkaktivität von 19 Ew/mg, total 364800 Ew.

Die Bestimmung der Aktivität unserer Präparate im Welketest wird nach der folgenden Methode ausgeführt: Im Gewächshaus gezogene Tomaten der Sorte TUCKSWOOD werden im 4-Blatt-Stadium geschnitten, gewogen und in Lösungen von verschiedenem Toxingehalt eingestellt (je 5–10 Pflanzen pro Konzentration; PHILIPS Fluoreszenzlampen TL 25W-33 in 60 cm Abstand; 60–70% rel. Feuchtigkeit; Temperatur 21–22°). Nach Aufnahme von 0,25 ml Tomatenfrischgewicht werden die Sprosse in Brunnenwasser gestellt und die Schädigungen der einzelnen Blätter nach 24 Std. in 5 qualitativen Stufen (0–4) bonitiert. Mit Hilfe der Regressionsgeraden, die aus den gefundenen Mittelwerten resultiert, wird diejenige Konzentration ermittelt, die eine mittlere Schädigung von 1,5 auslöst. Eine Welkeinheit (Ew) ist somit diejenige Menge eines aktiven Körpers, die in 1 ml Wasser gelöst bei einer Aufnahme von 0,25 ml/g Tomatenfrischgewicht eine Schädigung von 1,5 bewirkt.

Der früher verwendete Begriff der *Dosis minima*⁷⁾, der in mg pro kg Tomatenfrischgewicht ausgedrückt wird, lässt sich aus der Einheit Ew/mg Toxin leicht berechnen: *Dosis minima* (mg/kg) = 250/Ew.

z. B. Culmomarasmin	300 Ew/mg hat eine <i>Dosis minima</i> von	0,83 mg/kg
Fusarinsäure	1,6 Ew/mg hat eine <i>Dosis minima</i> von	158 mg/kg
Lycomarasmin	1,7 Ew/mg hat eine <i>Dosis minima</i> von	150 mg/kg
Lycomarasminsäure	3,6 Ew/mg hat eine <i>Dosis minima</i> von	70 mg/kg

Die Reinigung des Welkstoffes wurde durch Behandlung mit verschiedenen neutralen Lösungsmitteln weiterverfolgt: 18 g trockene Substanz I wurden viermal mit 50 ml Äther bei 22° unter Schütteln extrahiert (48 Std.). Die unlösliche Substanz II, 13,7 g, zeigte 25 Ew/mg.

Die vereinigten gelbroten Ätherextrakte wurden eingedampft und ergaben einen Rückstand von 4,3 g, die geringe Welkaktivität zeigten. Sie bestehen aus verschiedenen, in Natriumhydrogencarbonat löslichen Säuren und unlöslichen Neutralkörpern.

Der Rohwelkstoff II ist in geschlossenem Gefäss bei 0° haltbar. In 4–5 Monaten konnte nur eine geringe Erniedrigung der Welkaktivität beobachtet werden.

Zur weiteren Reinigung des Rohstoffes II (65,0 g; 25 Ew/mg, total 1625000 Ew) wurde 8–10mal mit 500 ml Aceton bei 22° unter Schütteln extrahiert (2–3 Tage). Der Acetonextrakt wies geringe Welkaktivität auf (um 1 Ew/mg). Aus den Acetonextrakten konnte D-Weinsäure isoliert werden.

Der acetonunlösliche Anteil (III) – 7,2 g – zeigte eine Welkaktivität von 140 Ew/mg (total 1008000 Ew). Die hellbraune, gereinigte Substanz erwies sich bei 0° im geschlossenen Gefäss als beständig; während 6 Monaten konnte kein bemerkenswerter Aktivitätsverlust beobachtet werden.

⁷⁾ E. GÄUMANN und Mitarb., *Phytopathol. Z.* 16, 17 (1950); 20, 1 (1952); 34, 426 (1959).

7,2 g Substanz III wurden zweimal mit 120 ml abs. Dimethylformamid 24 Std. bei 22° geschüttelt. Der unlösliche Anteil wurde abgenutscht, mit Äther ausgewaschen und im Hochvakuum getrocknet: 3,62 g weissgraues Pulver (IV), Zers. 240-242°. Diese Substanz ist schlecht löslich in Wasser und in gewöhnlichen organischen Lösungsmitteln. Sie zeigte eine geringe Welkaktivität (ca. 11 Ew/mg.)

Die vereinigten Dimethylformamidlösungen wurden durch eine Norit-Supra-Säule (25 g) gesaugt (12-15 Std.) und danach mit 120 ml Dimethylformamid nachgewaschen. Die vereinigten wasserklaren Dimethylformamidlösungen wurden mit abs. Äther bis zur beginnenden Trübung verdünnt bei 0° 2-3 Tage stehengelassen. Anschliessend wurde die Lösung von den sedimentierten kolloidartigen Substanzen dekantiert. Diese Lösung wurde mit abs. Äther weiter verdünnt, bis keine weitere Trübung mehr beobachtet werden konnte (3-4 l Äther), und wieder bei 0° 24-26 Std. stehengelassen. Nach Abdekantierung des Lösungsmittels von der ausgefallenen Substanz wird die letztere mit abs. Äther auf die Nutsche gebracht und mit abs. Äther nachgewaschen. Die Trocknung erfolgt 6-8 Std. bei 22° im Hochvakuum; Ausbeute: 1,123 g.

Das so erhaltene Produkt (V) ist ein weisses Pulver, schwach hygroskopisch, mit einer Welkaktivität von 440 Ew/mg (total 494000 Ew). Die Welkaktivität konnte weder durch wiederholte Behandlung mit Tierkohle noch durch fraktionierte Ausfällung mittels abs. Äther aus der Dimethylformamidlösung erhöht werden. Die Substanz (Culmomasmin) erwies sich im geschlossenen Gefäss als stabil.

Das *Culmomasmin* ist löslich in Dimethylformamid und in Methylcellosolve; es ist schlecht löslich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Das *Culmomasmin* ist gegen Alkalien und Mineralsäuren sehr empfindlich: bei pH 1 verliert es in 1 Std. ca. 50% seiner Welkaktivität und bei pH 13 bleibt nach 1 Std. nur 2% der ursprünglichen Welkaktivität zurück. $[\alpha]_D^{25} = -0,6 \pm 0,2^\circ$ ($c = 0,1$ in Dimethylformamid). Beim Erhitzen bräunt sich *Culmomasmin* bei 180° und zerfällt unter Gasentwicklung bei 215-218°.

Verbrennungswerte von *Culmomasmin*:

Gef. C 45,31 H 7,08 O 27,56 N 10,56 Amino N 3,34
S 4,76 Cl 4,19 C-CH₃ 3,17 OCH₃ 1,08 C=C Ø Rückstand 1,39%

Summe: (Elemente und Rückstand) 100,85%

Hydrolyseversuch: Das *Culmomasmin* wurde unter Sauerstoffausschluss in 6N Salzsäure bei 110° 24 Std. hydrolysiert und die Hydrolysate im Apparat für automatische Ionenaustauschchromatographie nach STEIN & MOORE analysiert. Die Aminosäuren wurden als Mikromole pro 10 mg Ausgangssubstanz tabelliert.

Mikromole Aminosäuren pro 10 mg Culmomasmin nach 24 h Hydrolyse mit 6N Salzsäure bei 110°

Aminosäure	Mikromole	Aminosäure	Mikromole	Aminosäure	Mikromole
Lys	1,0 ± 0,1	Ser	8,62 ± 0,2	Val	1,33 ± 0,06
Hist	0	Glu	4,74 ± 0,2	Meth	ev. Spuren
NH ₃	11,0 ± 1	Pro	0,6 ± 0,1	Allo-Ile	1,25 ± 0,06
Arg	0	Gly	0,56 ± 0,03	Ile	ev. Spuren
Asp	4,8 ± 0,3	Ala	1,9 ± 0,04	Leu	8,9 ± 0,2
Thr	0,23 ± 0,05	Cys	16,6 ± 0,5	Tyr, Phe	ev. Spuren

Aus dem Hydrolysat konnte neben den obigen Aminosäuren auf papierchromatographischem Wege eine Substanz (Rf-Wert: 0,08, rel., bezogen auf Leucin = 1) nachgewiesen werden (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1, 15 Std. absteigend).

Die Elementaranalysen, Spektren, Bestimmungen der pK-Werte und Sedimentationskonstante, Papierchromatogramme, wurden teilweise im Organisch-chemischen Laboratorium der ETH in Zürich (Herr W. MANSER), teilweise in der Chemischen Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG. in Basel (Herren Dr. K. DIRSCHERL, Dr. L. CHOPARD, A. RAYROUD, W. LERGIER) ausgeführt. Die quantitative Aminosäurebestimmung wurde von Herrn Dr. R. WEBER (Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel) gemacht.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Kulturfiltrat von *Fusarium culmorum* (W. G. SM.) SACC. wurde ein hoch wirksames Welketoxin, das *Culmomasmin* isoliert, das seinem chemischen Verhalten nach zu den Polypeptiden gehört.

Organisch-chemisches Laboratorium und
Institut für spezielle Botanik der
Eidg. Technischen Hochschule Zürich;
Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co., AG, Basel

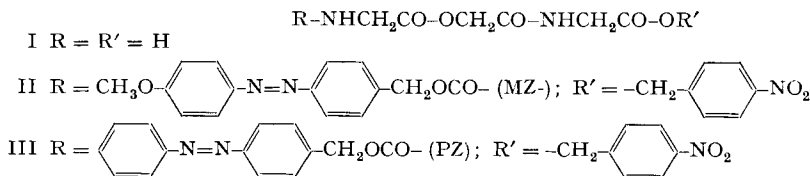
258. Synthese geschützter Depsipeptide

von R. Schwyzer und J. P. Carrión

(6. X. 60)

Die Synthese offenkettiger und cyclischer Depsipeptide¹⁾ gewinnt mit fortschreitender Erkenntnis der Peptolidstruktur²⁾ verschiedener Naturstoffe (Enniatine, Valinomycin, Amidomycin usw.³⁾) immer mehr an Bedeutung. Unser spezielles Interesse an solchen Verbindungen stammt z. T. auch her von theoretischen Überlegungen betreffend Verdoppelungserscheinungen⁴⁾ bei der Synthese cyclischer Peptide.

Angesichts verschiedener vorläufiger Publikationen (leider ohne experimentelle Einzelheiten)¹⁾⁵⁾ möchten wir in aller Kürze über einen Teil unserer Versuche, geschützte, für weitere Synthesen geeignete Derivate des Glycyl-glykoly-glycins (I) herzustellen, berichten.



Carbobenzoxy-glycyl-glycin-p-nitrobenzylester (IV) wurde aus Carbobenzoxy-glycyl-glycin⁶⁾ und p-Nitrobenzylchlorid hergestellt⁷⁾. Die Abspaltung der Carbo-

¹⁾ M. M. SCHEMJAKIN, Angew. Chem. 72, 342 (1960).

²⁾ D. W. RUSSEL & M. E. BROWN, Biochim. biophysica Acta 33, 382 (1960).

³⁾ Vgl. R. SCHWYZER, Chimia 12, 53 (1958), wo Literatur zusammengestellt ist.

⁴⁾ R. SCHWYZER, CIBA Foundation Symposium on Amino Acids and peptides with Anti-metabolic Activity, London 1958, S. 171; R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. 41, 2186, 2190 (1958). R. SCHWYZER & B. RORUP, Helv. 41, 2199 (1958).

⁵⁾ H. GIBIAN & K. LÜBKE, Angew. Chem. 72, 523 (1960).

⁶⁾ M. BERGMANN & L. ZERVAS, Ber. deutsch. chem. Ges. 65, 1192 (1932); hergestellt aus Carbobenzoxyglycin-cyanmethylester [R. SCHWYZER, M. FEURER, B. ISELIN & H. KÄGI, Helv. 38, 80 (1955)] über Carbobenzoxy-glycyl-glycin-äthylester [S. GOLDSCHMIDT & M. WICK, Liebigs Ann. Chem. 575, 227 (1952)].

⁷⁾ R. SCHWYZER, B. ISELIN & M. FEURER, Helv. 38, 69 (1955).