

Ein neues antifungales Hexaenantibiotikum. Hexamycin. I

## Produktion, Isolierung und Reinigung des Hexamycins

Von K. EISENBRANDT

Mit 7 Abbildungen

### Inhaltsübersicht

Der Hexamycinbildner 4/122 gehört zur Gattung *Streptomyces*. Für die Fermentation erwies sich ein Nährmedium mit Sojabohnenmehl am geeignetsten. Das Hexaenantibiotikum wurde aus dem Myzel mit Methanol und aus dem Kulturfiltrat mit n-Butanol extrahiert. Nach Abtrennen eines „ätherlöslichen Antibiotikums“ wurde das Rohprodukt mit Wasser extrahiert und durch CRAIG-Verteilung im System n-Propanol—Äther—Wasser (1:3:3) gereinigt. Lyophilisation aus tert.-Amylalkohol führte zu einer gelben, amorphen Substanz.

Polyenantibiotika sind Stoffwechselprodukte von *Streptomyces*-Arten mit 4, 5, 6 oder 7 konjugierten Doppelbindungen, die vorwiegend das Wachstum von Pilzen hemmen. Im Jahre 1950 wurde von HAZEN und BROWN<sup>1)</sup> das erste Polyenantibiotikum, Fungicidin, isoliert. In den folgenden Jahren häuften sich die Mitteilungen über Neuisolierungen von Tetraen-, Pentaen- und Heptaenantibiotika. Die Zahl der Hexaenantibiotika blieb jedoch gering. Bisher wurden folgende Hexaenantibiotika beschrieben: Cryptocidin<sup>2)</sup>, Endomycin B<sup>3)</sup>, Flavacid<sup>4)</sup>, Fradycin<sup>5)</sup>, „Fradicin-like-Antibiotikum“<sup>6)</sup>, Mediocidin<sup>7)</sup> und Mycelin-IMO<sup>8)</sup>. Auf Grund abweichender

1) E. L. HAZEN u. R. BROWN, *Science* (Washington) **112**, 423 (1950).

2) J. M. J. SAKAMOTO, *J. Antibiotics* (Tokyo) **12 A**, 21 (1959).

3) D. GOTTLIEB, P. K. BHATTACHARYYA, H. E. CARTER u. H. W. ANDERSON, *Phytopathology* **41**, 393 (1951).

4) I. TAKAHASHI, *J. Antibiotics* (Tokyo) **6 A**, 117 (1953).

5) E. A. SWART, A. H. ROMANO u. S. A. WAKSMAN, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **73**, 376 (1950).

6) R. UTAHARA, H. YAMAZAKI, Y. OKAMI u. H. UMEZAWA, *J. Antibiotics* (Tokyo) **12 A**, 73 (1959).

7) Y. OKAMI, R. UTAHARA, S. NAKAMURA u. H. UMEZAWA, *J. Antibiotics* (Tokyo) **7 A**, 98 (1954).

8) S. IHARASHI u. K. OGATA, *J. Antibiotics* (Tokyo) **8 B**, 113 (1955).

physikalischer und chemischer Eigenschaften werden Fradycin, „Fradicin-like-Antibiotikum“ und Mycelin-IMO nicht zu den eigentlichen Makrolid-Polycyclantibiotika gerechnet.

Im Rahmen phytopathologischer Untersuchungen mit Kulturfiltraten von Aktinomyzetenstämmen wurde unsere Aufmerksamkeit auf einen Hexaenantibiotikumbildner gerichtet. Es zeigte sich, daß das von diesem Stamm produzierte Antibiotikum mit keinem der bisher beschriebenen identisch war. In einer kurzen Mitteilung wurde bereits über dieses Hexaenantibiotikum, Hexamycin, berichtet<sup>9)</sup>. In folgendem sollen diese Untersuchungen ausführlicher mitgeteilt werden.

### 1. Hexamycinbildner 4/122

Der Hexamycinbildner 4/122 wurde aus Bodenproben der Umgebung von Aschersleben isoliert<sup>10)</sup>. Er gehört zur Stammsammlung des Instituts für Phytopathologie, Aschersleben. 4/122 bildet auf Pepton-Glucose-Agar ein weißgraues Substratmyzel, das nach etwa 8 Wochen dunkelgrau wird. Abb. 1 zeigt das Wachstum des Aktinomyzeten auf Hafermehlagar und in Emerskultur. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Sporen (Abb.2)



Abb. 1. Wachstum von 4/122 auf Hafermehlagar (a) und in Nährlösung 29 in Oberflächenkultur (b)

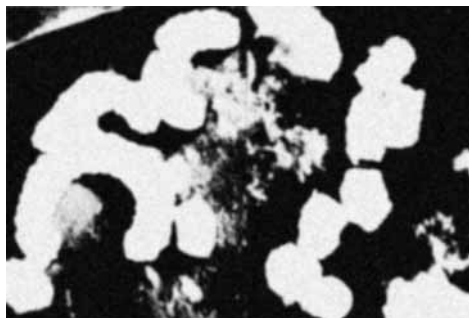


Abb. 2. Sporenanhäufungen und Einzelsporen von 4/122 bei 7000facher Vergrößerung (Aufnahme H. B. SCHMIDT)

<sup>9)</sup> K. EISENBRANDT, Z. Chem. 7, 311 (1967).

<sup>10)</sup> Fräulein Dr. HEDWIG KÖHLER möchte ich für die Überlassung des Stammes danken.

läßt an geraden Sporenträgern bischofsstabartige Ketten ovaler Sporen erkennen. Nach vorläufiger Bestimmung gehört 4/122 zur Gattung *Streptomyces*<sup>11)</sup>. Eine ausführliche Mitteilung darüber erfolgt an anderer Stelle.

## 2. Ermittlung geeigneter Kulturbedingungen

Zur Bestimmung geeigneter Kulturbedingungen wurden verschiedene im hiesigen Institut bereits für eine große Zahl anderer Aktinomyzetenstämme erprobter, komplexer Nährmedien (28, 29, A-4, A-7, A-12 und A-20a)<sup>12-15)</sup> verwendet.

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, wurde in Emerskulturen (25 °C, 21 Tage) in Nährlösung 29 und A-20a der meiste Wirkstoff gebildet. Nährlösung 29 enthielt zusätzlich zum Sojabohnenmehl Fleischextrakt, dem eine fördernde Wirkung zuzukommen schien. Im Unterschied zu Nährlösung 29 war im Nährmedium A-20a gekeimter Hafer enthalten.

Tabelle 1  
Abhängigkeit der Antibiotikumbildung von verschiedenen Nährlösungen in Emerskulturen

Nähr- lösungen	Verdünnungen der Kulturfiltrate, bei der die Sporenkeimung von <i>Fusarium culmorum</i> vollständig gehemmt wurde
28	1:10
29	> 1:50
A-4	1:25
A-7	1:5
A-12	1:5
A-20a	1:50

Den zeitlichen Verlauf der Antibiotikumbildung in Emerskultur gibt Tab. 2 wieder. Die höchste Leistung erreicht 4/122 in Nährlösung 29 nach 19 Tagen. Unabhängig vom Nährmedium wurde allgemein der meiste Wirkstoff nach 18–22 Tagen gebildet.

<sup>11)</sup> Herrn Dr. H. J. MÜLLER danke ich für die Unterstützung bei der vorläufigen Bestimmung des Stammes und Herrn Dr. H. B. SCHMIDT für die Anfertigung der elektronenoptischen Aufnahmen.

<sup>12)</sup> H. KÖHLER, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., Abt. II, **115**, 701 (1962).

<sup>13)</sup> S. A. WAKSMAN, *Chronica Botanica*, Waltham, Mass., 1 (1950).

<sup>14)</sup> D. R. WARREN, J. F. PROKOP u. W. E. GRUNDY, *Antibiot. and Chemother.* **5**, 6 (1955).

<sup>15)</sup> W. A. GOSS u. E. KATZ, *Appl. Microbiol.* **5**, 95 (1957).

Tabelle 2

Abhängigkeit der Antibiotikumbildung von der Kulturdauer in Emerskulturen

Kulturdauer in Tagen	Verdünnungen der Kulturfiltrate, bei der die Sporenceimung von <i>Fusarium culmorum</i> vollständig gehemmt wurde					
	Nährlösung					
	28	29	A-4	A-7	A-12	A-20a
15	1:5	1:5	1:10	1:5	0	1:1
16	1:5	1:5	1:10	1:5	1:1	1:10
17	1:10	1:5	1:10	1:5	1:1	1:25
18	1:10	1:25	1:10	1:5	1:1	1:50
19	1:25	>1:50	1:10	1:5	1:5	1:50
21	1:25	>1:50	1:25	1:5	1:5	1:50
22	1:25	1:50	1:25	1:5	1:5	1:50
23	1:25	1:50	1:25	1:5	1:5	1:25
24	1:25	>1:50	1:25	1:5	1:5	1:25
25	1:25	1:50	1:25	1:5	1:5	1:25
27	1:25	>1:50	1:10	1:1	1:5	1:10
28	1:10	1:50	1:10	1:1	1:5	1:1
29	1:10	1:50	1:5	1:1	1:1	1:1
30	1:10	1:25	1:5	1:1	1:1	0
31	1:10	1:25	1:5	1:1	1:1	0

In Schüttelkulturen waren die Nährlösungen 29 und A-4 annähernd gleich gut (Tab. 3). Nach 6 bzw. 7 Tagen kam es zur optimalen Bildung des Antibiotikums. Für die übrigen Nährlösungen schwankte die Kulturdauer zwischen 5 und 10 Tagen.

Tabelle 3

Abhängigkeit der Antibiotikumbildung von der Kulturdauer in Schüttelkulturen

Kulturdauer in Tagen	Verdünnungen der Kulturfiltrate, bei der die Sporenceimung von <i>Fusarium culmorum</i> vollständig gehemmt wurde							
	Nährlösung							
	23	28	29	A-4	A-7	A-12	A-20a	S
3	0	1:1	1:5	1:1	0	0	0	0
4	1:1	1:10	1:5	1:5	0	0	0	0
5	1:1	1:25	1:25	1:10	0	0	0	0
6	1:10	1:25	1:50	1:10	0	0	1:10	0
7	1:10	1:10	>1:50	1:50	0	1:1	1:50	0
8	1:1	1:5	1:50	1:50	1:1	1:1	1:25	0
9	1:5	1:1	>1:50	1:50	1:5	1:5	1:10	0
10	1:1	0	1:50	1:25	1:5	1:10	1:25	1:1
11	0	0	1:50	1:1	1:5	1:5	1:5	1:1
12	0	0	1:50	1:5	1:1	1:5	1:1	0

Die Kulturbedingungen für das Tieftankverfahren wurden in 6-l-Vierhalsrührkolben ermittelt. Als Substrat diente Nährlösung 29, die sich bei den bereits beschriebenen Fermentationen als die geeignetste erwiesen hatte. Sie wurde mit 7 Tage alten Schüttelkulturen beimpft und belüftet. In Tab. 4 ist die Abhängigkeit der Wirkstoffbildung vom Luftdurchsatz und von der Kulturdauer dargestellt. Durch Vergrößerung der Luftmenge von 50 auf 300 l/Stunde wurde die antibiotische Aktivität beträchtlich gesteigert. Die Kulturflüssigkeit erreichte nach 7—8 Tagen ihre größte Aktivität. Alle Fermentationen erfolgten bei 25—26 °C.

Tabelle 4  
Abhängigkeit der Antibiotikumbildung von Kulturdauer und Luftmenge in Submerskulturen

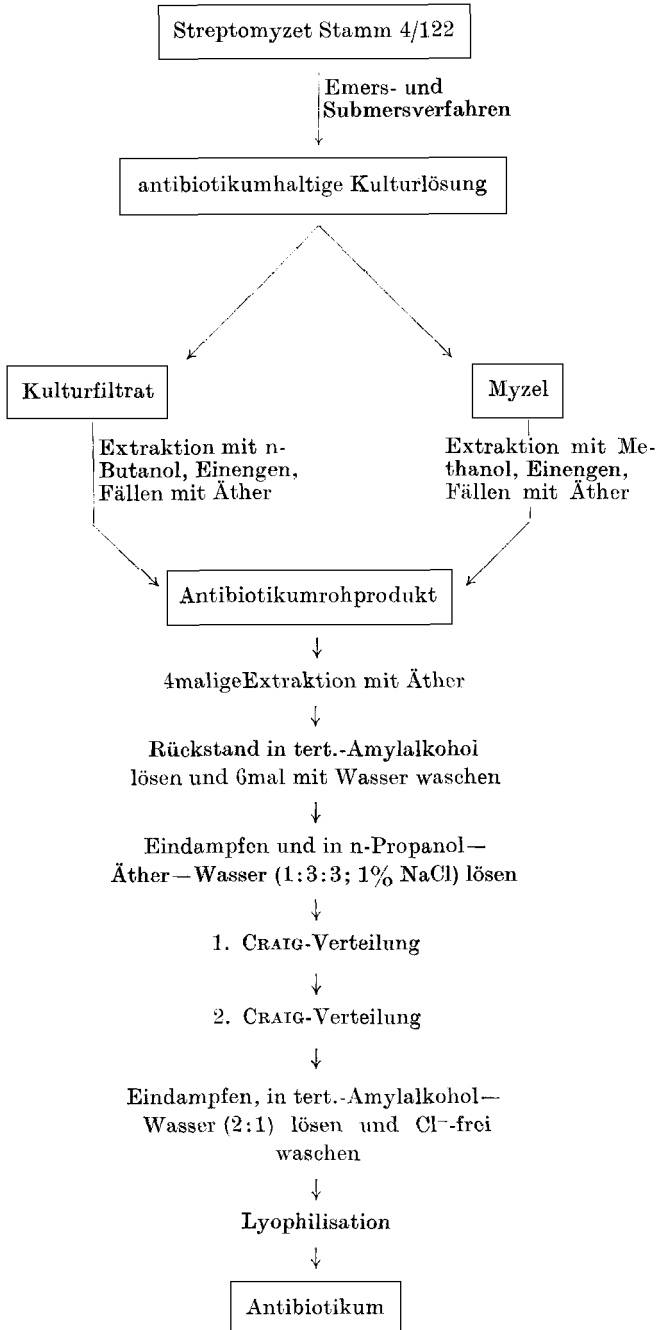
Kulturdauer in Tagen	Verdünnungen der Kulturfiltrate, bei der die Sporenkeimung von <i>Fusarium culmorum</i> vollständig gehemmt wurde Luft (l/Stunde)			
	50	100	200	300
3	0	0	0	0
4	0	0	0	1:5
5	0	0	1:5	1:5
6	0	0	1:5	1:10
7	1:1	1:1	1:25	1:25
8	1:1	1:5	1:10	1:50
9	1:1	1:5	1:25	1:50
10	0	1:1	1:10	1:50
11	0	0	1:10	1:25
12			1:10	
13			1:10	

### 3. Isolierung des Rohproduktes

Der Stamm 4/122 bildete zwei verschiedene Antibiotika, ein „ätherlösliches Antibiotikum“ und ein Hexaenantibiotikum. Beide waren sowohl im Myzel als auch im Kulturfiltrat enthalten. Die Kulturbrühe wurde deshalb filtriert und Myzel und Kulturfiltrat wurden getrennt aufgearbeitet.

Die Extraktion des Myzels erfolgte mit Methanol. Die gelbgefärbten methanolischen Lösungen wurden im Vakuum zur Trockne gebracht, der Rückstand in wenig Methanol gelöst und mit einem Ätherüberschuß ausgefällt. Das getrocknete Rohprodukt stellte eine gelbe amorphe Substanz dar, die bis zur weiteren Reinigung kühl gelagert wurde. Zur Abtrennung des Antibiotikums aus den Kulturfiltraten diente n-Butanol. Zweimalige Extraktion war ausreichend. Die Butanolextrakte wurden im Vakuum ein-

## Schema der Produktion, Isolierung und Reinigung des Hexamycins



gedampft und nach Lösen des Rückstandes in Methanol mit Äther das Rohprodukt ausgefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und über  $\text{CaCl}_2$  getrocknet. Das bioautographisch entwickelte Summenchromatogramm des Butanolextraktes zeigt Abb. 3 [Lösungsmittel von links nach



Abb. 3. Summenchromatogramm des Butanolextraktes

rechts: Wasser (1), 20proz.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lösung (2), 50proz. Aceton (3), 100proz. Aceton (4), 90proz. Methanol (5), wassergesättigtes n-Butanol (6), n-Butanol—Methanol—Wasser (7), wassergesättigtes Äthylacetat (8) und wassergesättigter Äther (9)]. Die Chromatogramme 4, 8 und 9 enthielten deutlich zwei verschiedene Antibiotika. Die Substanz mit dem  $R_f$ -Wert um 0 (Chromatogramm 4, 8 und 9) stellt das Hexaenantibiotikum dar.

Andere Methoden zur Abtrennung des Antibiotikums aus der Kulturbühe wie Adsorption an  $\alpha$ -Kohle und Aluminiumoxid sowie die Verwendung von Ionenaustauschern verliefen unbefriedigend.

#### 4. Reinigung des Rohproduktes

Zunächst wurde das „ätherlösliche Antibiotikum“ mit Äther extrahiert. Es schlossen sich mehrere Behandlungen mit Wasser an, um hydrophile Verunreinigungen zu eliminieren. Danach wurde die verbliebene Substanz durch CRAIG-Verteilung in einem 50fachen Grundprozeß im System n-Propanol—Äther—Wasser (1 : 3 : 3); 1% NaCl weiter gereinigt (Abb. 4). Hierfür stand eine automatische Apparatur zur Verfügung<sup>16)</sup>. Die ermittelte Verteilungskurve besaß 3 Maxima. Nach den UV-Spektren mußten die Fraktionen des mittleren Gipfels das Hexaenantibiotikum enthalten. Erneute Verteilung der Hexaenantibiotikum-Fraktionen im gleichen Lösungsmittelsystem führte zu einer symmetrischen Verteilungskurve mit nur einem Maximum (Abb. 5). Nochmalige Trennung in den Systemen n-Butanol—

<sup>16)</sup> R. SEILER u. K. EISENBRANDT, Chem. Techn. 18, 369 (1966).

Äthylacetat—Wasser und Chloroform—Methanol - 0,1 n Na-Acetat (2 : 2 : 1) zeigte gleichfalls nur einen Aktivitätsgipfel (Abb. 6 und 7). Das Summenchromatogramm enthielt nur eine aktive Substanz.

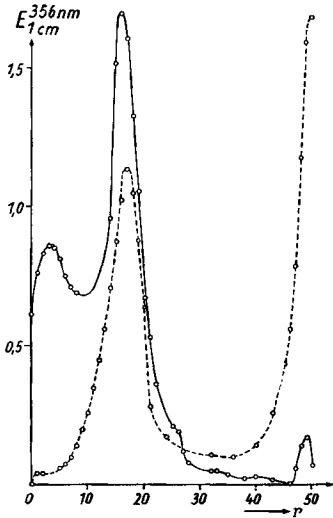


Abb. 4. 1. Verteilung in n-Propanol—Äther—Wasser (1:3:3)  
 — untere Phase,  
 - - - obere Phase

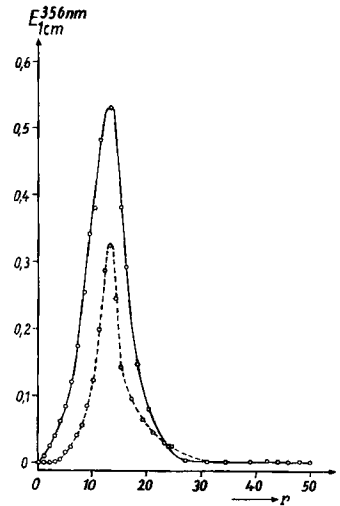


Abb. 5. 2. Verteilung in n-Propanol—Äther—Wasser (1:3:3)  
 — untere Phase  
 - - - obere Phase

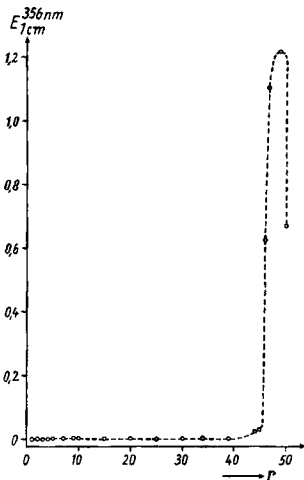


Abb. 6. 3. Verteilung in Chloroform—Methanol—0,1 n Na-Acetat (2:2:1)  
 - - - obere Phase

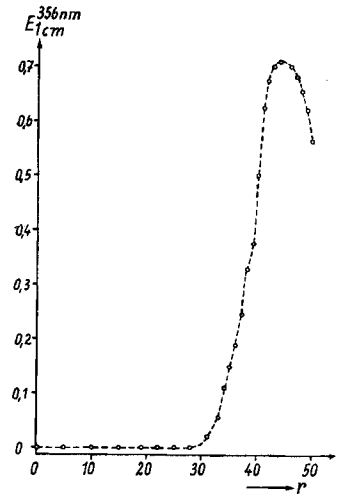


Abb. 7. 3. Verteilung in n-Butanol—Äthylacetat—Wasser (1:1:2), - - - obere Phase



Für die Reinigung einschließlich Produktion und Isolierung des Rohproduktes wurde der im Schema dargestellte Weg beschrrieben. Die Ausbeute betrug 3—4 mg Reinsubstanz/l Kulturfiltrat.

## Experimenteller Teil

### 1. Nährmedien

Pepton-Glucose-Agar: 5 g Pepton, 5 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 10 g Glucose, 1 g  $KH_2PO_4$ , 20 g Agar, 1000 ml Wasser; pH 7.

Hafermehlagar; 30 g Haferflocken, 20 g Agar, 1000 ml Wasser; pH 7.

Nährlösung 23: 5 g Pepton, 10 g Glucose, 5 g Fleischextrakt, 5 g NaCl, 1000 ml Wasser; pH 7,1 (WAKSMAN 1950).

Nährlösung 28: 5 g Pepton, 15 g Maisschrot, 5 g NaCl, 10 g Glucose, 1000 ml Wasser; pH 7,1 (WAKSMAN 1950).

Nährlösung 29: 10 g Sojabohnenmehl, 10 g Glucose, 0,5 g Liebigs Fleischextrakt, 5 g NaCl, 1 g  $CaCO_3$ , 1000 ml Wasser; pH 7,1 (WAKSMAN 1950).

Nährlösung A-4: 10 g Sojabohnenmehl, 10 g Glucose, 5 g NaCl, 1 g  $CaCO_3$ , 1000 ml Wasser; pH 7,1 (WARREN, PROKOP und GRUNDY 1955).

Nährlösung A-7: 7 g Sojabohnenmehl, 20 g Glucose, 2,5 g Hefeextrakt, 4 g KCl, 5 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 8 g  $CaCO_3$ , 0,4 g  $KH_2PO_4$ , 1000 ml Wasser; pH 7,1 (WARREN, PROKOP und GRUNDY 1955).

Nährlösung A-12: 10 g Sojabohnenmehl, 10 g Dextrin, 20 g „cornsteep-liquor“, 5 g NaCl, 2 g  $CaCO_3$ , 2 g  $K_2HPO_4$ , 1000 ml Wasser; pH 7,1 (Goss und KATZ 1957).

Nährlösung A-20a: 20 g gekeimter, gemahlener Hafer, 5 g Glucose, 10 g Dextrin, 5 g NaCl, 5 g  $NH_4NO_3$ , 5 g  $CaCO_3$ , 1000 ml Wasser; pH 7,2 (modifiziert von KÖHLER; WARREN, PROKOP und GRUNDY 1955).

### 2. Mikrobiologische Teste

Der Sporenceimverdünnungstest wurde entsprechend einer Vorschrift von KÖHLER<sup>17)</sup> mit *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. durchgeführt. Für das bioautographische Entwickeln der Papierchromatogramme fanden Spiegelglasplatten, 25×33 cm, und Aluminiumrahmen, 2,5×20,5×29,5 cm, Verwendung. Sie wurden im Trockenschrank 2 bis 3 Stunden bei 150°C sterilisiert. Auf die durch die Aluminiumrahmen begrenzte Fläche wurde unter sterilen Bedingungen 300 ml auf 45—50°C abgekühlter Pepton-Glucose-Agar gegossen. Im Pepton-Glucose-Agar befanden sich 5 ml Sporensuspension eines *Fusarium culmorum*-Schrägröhrchens. Sobald der Agar erstarrt war, konnten die mit Kaltluft getrockneten Papierchromatogramme aufgelegt werden. Die abgedeckten Platten standen 48 Stunden bei 25°C. An den Stellen der Papierchromatogramme, die das Antibiotikum enthielten, bildeten sich Hemmhöfe.

### 3. Herstellung der Kulturflüssigkeiten

a) Emersverfahren: Je 500 ml der Nährlösung 29 wurden in Penicillinkolben eingefüllt, mit Wattestopfen verschlossen und 4mal an aufeinander folgenden Tagen im Dampftopf sterilisiert. Danach wurden die Nährlösungen beimpft. Hierfür wurden 6—8 Wochen

<sup>17)</sup> H. KÖHLER, Einführung in die Methoden der pflanzlichen Antibiotikaforschung, Akademie-Verlag, Berlin, 1956.

alte Schrägröhrchenkulturen von 4/122 in 10 ml sterilem Wasser aufgenommen und der Inhalt eines Röhrchens auf 2 Penicillinkolben verteilt. Sie wurden anschließend 19 Tage bei 25°C bebrütet.

b) Submersverfahren: Für die Herstellung von Schüttelkulturen wurden in 500-ml-Kochflaschen je 100 ml der Nährlösung 29 eingefüllt, mit Wattestopfen verschlossen und 4mal im Dampftopf sterilisiert. Die mit 10 ml sterilem Wasser hergestellte Sporensuspension einer Schrägröhrchenkultur von 4/122 reichte für 5–6 Kolben. Danach erfolgte 6tägige Fermentation bei 25°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine. Die Umdrehungsgeschwindigkeit des Schüttelrahmens betrug 130 U/min. Die Tieftankfermentation erfolgte in 6-l-Vierhalskolben bei 25°C. Alle Einzelteile wurden im Trockenschrank bei 150°C 3 Stunden sterilisiert. Das Kulturgefäß war mit KPG-Rührer, Thermometer, Einleitungsrohr und einer 30 cm langen, mit Watte gefüllten Raschigkolonne bestückt. Bevor die von außen durch eine Wasserstrahlpumpe angesaugte Luft in das Gefäß gelangte, strömte sie durch einen Rotamesser und eine mit Watte gefüllte Raschigkolonne. Die Abluft passierte anschließend einen weiteren Wattefilter und gelangte über eine WOLFFSche Flasche zur Wasserstrahlpumpe. Über den Hahn der WOLFFSchen Flasche konnte die Luftmenge reguliert werden. Sterilisation von 5 l der Nährlösung 29 erfolgte in 6-l-Kolben im Dampftopf unter den üblichen Bedingungen. Nach Einfüllen wurde sie mit 500 ml Impflösung, die in Schüttelkulturen hergestellt worden waren, beimpft.

#### 4. Isolierung und Reinigung des Hexaenantibiotikums

Sowohl Emers- als auch Submerskulturen wurden durch Wattefilter gesaugt und anschließend bei 8°C an Papierfiltern geklärt. Zur Abtrennung des Myzels großer Ansätze diente der Klärseparator SBI des VEB Separatorenbau, Hainichen/Sa. mit einem Schlammraum von 3 l. Die Umdrehungsgeschwindigkeit betrug 9000 U/min.

Das noch feuchte Myzel von 35 l eines Schüttelansatzes wurde in 4 Teilen mit der gleichen Menge Seesand im Mörser zerrieben und 2mal mit je 1 l Methanol auf einer Schüttelmaschine extrahiert. Die gelbgefärbten Extrakte wurden filtriert und je 2 l in 1-l-Kolben im Vakuum bei 20–30°C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 50–100 ml Methanol gelöst, filtriert und mit der 5–6fachen Menge Äther das gelbe Rohprodukt ausgefällt. Die Proben standen über Nacht bei 4°C, wurden zentrifugiert und der Rückstand über CaCl<sub>2</sub> im Vakuum getrocknet. Aus dem Myzel von 35 l Kulturflüssigkeit konnten 5–6 g Rohprodukt erhalten werden.

35 l Kulturfiltrat eines Schüttelkolbenansatzes wurden 2mal mit je 7 l n-Butanol durch 2stündiges Rühren extrahiert. Phasentrennung trat nach mehreren Stunden ein. Nach der 2. Extraktion mußte eine milchige Zwischenschicht zentrifugiert werden. Für größere Ansätze diente hierfür der Milchseparator BS 25 des VEB Maschinenfabrik Kyffhäuserhütte, Artern. Jeweils 2 l Butanolextrakt wurden in einem 1-l-Kolben im Vakuum bei 20 bis 26°C zur Trockne gebracht, in 50–100 ml Methanol gelöst, filtriert und mit 300–500 ml Äther das Antibiotikumrohprodukt ausgefällt. Nach Zentrifugation und Trocknen über CaCl<sub>2</sub> im Vakuum konnten 3–4 g Rohprodukt/35 l Kulturfiltrat erhalten werden.

In 250-ml-Rundkolben wurden 4 g Rohsubstanz 4mal mit je 40 ml Äther am Rückfluß gekocht. Zum Lösen des Rückstandes dienten 40 ml tert.-Amylalkohol und 20 ml Wasser. Nach Zentrifugation (2 Minuten bei 2500 g) wurde die wäßrige Schicht verworfen und der Amylalkohol erneut mit 10 ml destilliertem Wasser geschüttelt. Der Prozeß wurde 6mal mit je 5 ml Wasser wiederholt, bis die wäßrige Schicht farblos blieb.

Die obere Phase wurde anschließend im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand in je 20 ml Unter- und Oberphase des Systems n-Propanol–Äther–Wasser (1:3:3; 1% NaCl) gelöst. Beide Phasen waren gelb gefärbt. Sie wurden filtriert und 10 ml

Unter- und Oberphase in das 3. und 4. Verteilerrohr eingefüllt (Nr. 0). Die ersten zwei Gefäße enthielten je 10 ml reine Ober- und Unterphase, während sich in allen anderen Verteilerrohren nur Unterphase befand. Die Verteilung wurde nach 50 Schritten abgebrochen und die Extinktionen der oberen und unteren Phase bei 356 nm ermittelt. Die das Hexaen-antibiotikum enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, im Vakuum unter Stickstoff eingedampft und unter gleichen Bedingungen ein zweites Mal verteilt. Erneutes Eindampfen der entsprechenden Fraktionen unter Stickstoff führte zu einem Rückstand, der in tert.-Amylalkohol-Wasser (40:20 ml) gelöst und mit destilliertem Wasser chloridfrei gewaschen wurde. Schließlich erfolgte Lyophilisation. Die Ausbeute betrug 30–40 mg pro 4 g Rohsubstanz.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. RIECHE danke ich für das große Interesse an dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. M. KLINKOWSKI für die Anregung der Arbeit und die stete Anteilnahme und Herrn Dr. H. WOLFFGANG für die großzügige Unterstützung und wertvollen Hinweise. Frau INKEN STOLLE danke ich für die technische Assistenz. Fräulein HANNA-CHRISTA NORDMANN sowie Fräulein URSULA BRUNNE bin ich für die Anfertigung der photographischen Aufnahmen und Herrn A. SAHLMANN für die Zeichnung der Abbildungen zu Dank verpflichtet.

Aschersleben, Institut für Phytopathologie der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. M. KLINKOWSKI).

Bei der Redaktion eingegangen am 11. Oktober 1967.