

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

150. Mitteilung*. Ferricrocin, Triacetylfulsigen und andere Sideramine aus Pilzen der Gattung *Aspergillus*, Gruppe *Fumigatus*

H. DIEKMANN und E. KREZDORN

Lehrstuhl Mikrobiologie I, Institut für Biologie II der Universität Tübingen

Eingegangen am 13. Juni 1975

Metabolic Products of Microorganisms

150. Ferricrocin, Triacetylfulsigen and Other Sideramines from Fungi of the Genus *Aspergillus*, Group *Fumigatus*

Abstract. The sideramines of 14 species of the genus *Aspergillus*, group *Fumigatus*, were isolated and analyzed. Ferricrocin was identified in 11 extracts, ferrichrome in 2 others. A lipophilic sideramine produced by 4 species was identified as triacetylfulsigen, another minor component as triacetylfulsigen B. Six species produced an alanine-containing sideramine, which may be identical with ferrichrom C.

Zusammenfassung. Die Sideramine von 14 Arten der Gattung *Aspergillus*, Gruppe *Fumigatus*, wurden isoliert und analysiert. Ferricrocin wurde in 11 Extrakten nachgewiesen, Ferrichrom in 2 anderen. Ein lipophiles Sideramin, das von 4 Arten produziert wird, wurde als Triacetylfulsigen identifiziert, eine andere Komponente, die in geringer Konzentration vorkommt, als Triacetylfulsigen B. Sechs Arten produzieren ein Alanin-haltiges Sideramin, das mit Ferrichrom C identisch sein könnte.

Key words: *Aspergillus* – Sideramines – Ferricrocin – Ferrichrom – Triacetylfulsigen.

Neben den Sideraminen vom Fusigen- und Coprogen-Typ waren bis 1969 sechs Trihydroxamate aus Pilzen beschrieben, die sich vom Ferrichrom durch die Acylkomponente und durch unterschiedlichen Gehalt des Hexapeptidringes an Glycin und Serin unterscheiden (für eine Übersicht über Strukturen und Vorkommen, vgl. Diekmann, 1973). Später wurden in *Cryptococcus melibiosum* (Atkin *et al.*, 1970) sowie *Aspergillus oryzae* (Sato *et al.*, 1971) Sideramine vom Ferrichrom-Typ gefunden, die Alanin enthalten. Beobachtungen von Zähler *et al.* (1963) sowie Crueger u. Zähler (1968) ließen darauf schließen, daß noch weitere Cyclohexapeptid-Sideramine vorkommen.

Als von Loeffler 14 Arten der Gattung *Aspergillus*, Gruppe *Fumigatus* systematisch untersucht wurden (vgl. auch Raper u. Fennell, 1965), haben wir die Gelegenheit benutzt zu bestimmen, welche Sideramine von diesen Stämmen produziert werden. Neben Ferricrocin haben wir Ferrichrom, Fusigen und 3 weitere, bisher unbekannte Sideramine isoliert.

Material und Methoden

Die Anzucht der in Tabelle 1 aufgeführten Mikroorganismen, der Nachweis und die Isolierung der Sideramine sowie ihrer

* 149. Mitteilung: H. Drautz, W. Keller-Schierlein u. H. Zähler: Lysolipin I, ein neues Antibiotikum aus *Streptomyces violaceoniger*. Arch. Microbiol. **106**, 175–190 (1975).

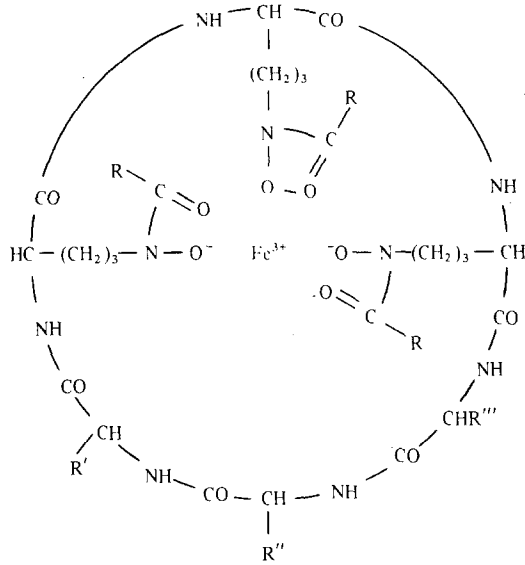
Bausteine erfolgte wie früher beschrieben (Diekmann, 1967, 1968, 1970; Diekmann u. Zähler, 1967).

Zur Aminosäureanalyse wurden 0,5–1,5 mg der eisenfreien Sideramine in einem 10 ml-Spitzkolben mit 2 ml 6n HCl gelöst, 2 min mit Stickstoff begast und nach dem Verschließen des Kolbens mit einem Glasstopfen 18 Std bei 100°C im Trockenschrank belassen, danach am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Die Analyse wurde mit einem Beckman-Aminosäure-Analysator Unichrom durchgeführt.

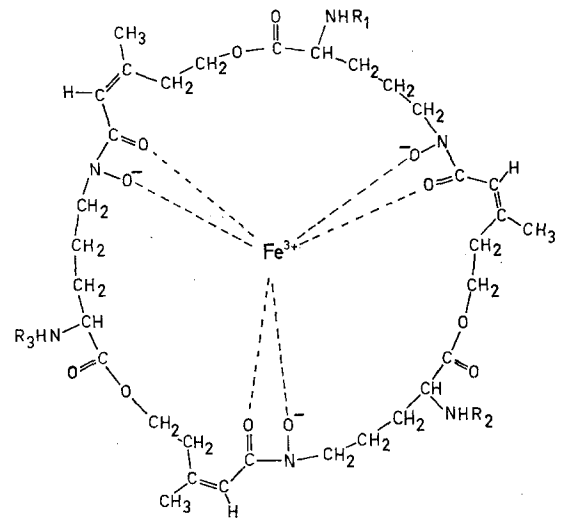
Elektronenspektren wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer DB-GT, Infrarotspektren mit einem Perkin-Elmer-Spektrometer Infracord Modell 137, NMR-Spektren von Herrn Dr. W. König mit einem Varian-Spektrometer EM 360 aufgenommen. Für die Dünnschichtchromatographie wurden Fertigplatten (Merck 5744) verwendet, für die präparative Trennung Platten mit Kieselgel G (Merck 7731) von 1 mm Schichtdicke angefertigt.

Ergebnisse

Die in Tabelle 1 gegebene Übersicht über das Vorkommen von Sideraminen bei den untersuchten 14 Pilzen zeigt, daß Ferricrocin (I, Llinás u. Neilands, 1972) in den Kulturfiltraten von 11 Pilzen vorhanden und bei 5 Pilzen Hauptkomponente ist. Die höchsten beobachteten Ausbeuten (ohne Optimierung) betragen in Schüttelkolben oder Fermentern (10 l) bei *Aspergillus unilateralis* 125, *A. viridi-nutans* 900, *A. fischeri* var. *glaber* 350, *A. stramenius* 100 und *A. auratus* 275 mg/l. Als Nebenkomponenten treten bei den genannten Stämmen Ferrichrom (II) und eine „Sideramin B“



- I R=CH₃ R'=R''=H R'''=CH₂OH
- II R=CH₃ R'=R''=R'''=H



- III R₁=R₂=R₃=H
- IV R₁=R₂=R₃=COCH₃

Tabelle 1. Sideramine in Kulturfiltraten von Pilzen der Gattung *Aspergillus*, Gruppe *Fumigatus*

	CBS- Nummer	Fusigene	Triacetyl- fusigen	Ferri- chrom	Ferri- crocin	„Sider- amin B“
Serie <i>Fumigatus</i>						
<i>A. fumigatus</i> Fres. mut. <i>helvolus</i> E. Yuill.	110.46	+	+		+	
<i>A. fumigatus</i> Fres. var. <i>ellipticus</i> Raper & Fennell	487.65	+	+		+	
<i>A. unilateralis</i> Thrower	126.56				++*	+
<i>A. viridi-nutans</i> Ducker & Thrower	127.56				++*	+
<i>A. breviceps</i> G. Smith	118.53		+			
<i>A. duricaulis</i> Raper & Fennell	481.65			+		++*
Serie <i>Fischeri</i>						
<i>A. fischeri</i> Wehmer, st. asc. <i>Sartorya fumigata</i> Vuill.	101.12	+			+	
<i>A. fischeri</i> Wehmer var. <i>spinosus</i> Raper & Fennell	483.65	+			+	
<i>A. fischeri</i> Wehmer var. <i>thermomutatus</i> Paden	404.67	+			+	
<i>A. fischeri</i> Wehmer var. <i>glaber</i> Fennell & Raper	111.55				++*	+
<i>A. quadricinctus</i> E. Yuill.	135.52			++*		
<i>A. aureolus</i> Fennell & Raper	105.55		+		+	
<i>A. stramenius</i> Novak & Raper	498.65				++	+
<i>A. auratus</i> Warcup	466.65				++*	+

+ = vorhanden; ++ = Hauptkomponente; * = Aminosäureanalyse.

benannte Komponente (s.u.) auf; bei *A. aureolus* beträgt der Anteil von Ferricrocin am Gesamtsideramin (790 mg/l) etwa 50%. Bei der Trennung der Sideramine durch Dünnschichtchromatographie (Tabelle 2) hat sich besonders das Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) bewährt (H. G. Müller, unveröffentlicht). Elektronen- und Infrarotspektren sowie die Verteilungskoeffizienten der durch Craigverteilung und anschließende präparative Dünnschichtchromatographie gereinigten Ferricrocin-Präparate waren mit denen von authentischem Ferricrocin (Keller-Schierlein u. Deér, 1963) identisch. Bei der Aminosäureanalyse von 5 Präparaten wurde außer Ornithin und Ammoniak Glycin und Serin im Verhältnis 2:1 gefunden.

Zwei der untersuchten Pilze produzieren Ferrichrom, *A. quadricinctus* (bis zu 1 g/l) nahezu frei von Nebenkomponenten, *A. duricaulis* (Gesamtsideramin

Tabelle 2. R_f -Werte von Sideraminen bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G

	Laufmittel ^a	
	I	II
Triacetylfulsigen	0,50	0,65
Triacetylfulsigen B	0,40	0,22
Ferrichrom	0,20	0,54
„Sideramin B“	0,23	0,61
Ferricrocin	0,25	0,52
Ferrichrysin	0,26	0,51
Ferrirhodin	0,48	0,56
Ferrirubin	0,46	0,41

^a I Propanol/Eisessig/Wasser = 4:1:1; II Chloroform/Methanol/Wasser = 65:25:4.

200 mg/l) zusammen mit „Sideramin B“. Auch diese Identifizierung wurde durch Aminosäureanalyse bestätigt.

Bei der dünnschichtchromatographischen Trennung der Fermentationsprodukte findet man bei diesen Pilzstämmen außer Fusigen (III) und dessen Abbauprodukten weitere bisher nicht identifizierte Sideramine. Drei davon, die in größeren Mengen vorkommen, wurden näher untersucht (R_f -Werte im Laufmittel II: 0,65; 0,61; 0,22).

Das Sideramin mit $R_f = 0,65$ ist bei *A. aureolus* zur Hälfte am Gesamtsideramin beteiligt und ist Nebenkomponente bei 3 anderen Pilzen (Tabelle 1). Zusammen mit diesem Sideramin wurden immer geringe Anteile des Sideramins $R_f = 0,22$ gefunden. Das Produkt einer 10 l-Fermentation mit *A. aureolus* wurde durch Craigverteilung gereinigt, wobei die Sideramine $R_f = 0,65$ und 0,22 mit der Front der beweglichen Phase wandern. Das aus den Fraktionen 24–30 ($n = 30$) isolierte Produkt enthielt 81,5% des Sideramins $R_f = 0,65$ und 12,5% des Sideramins $R_f = 0,22$, daneben 3% „Sideramin B“. Es wurde in Chloroform gelöst und mit Phosphatpuffer pH 7,5 extrahiert, wobei der größte Teil des Sideramins $R_f = 0,22$ in die wäßrige Phase geht. Das „Sideramin B“ wurde durch präparative Dünnschichtchromatographie quantitativ abgetrennt.

Das Sideramin $R_f = 0,65$ wandert bei der Elektrophorese pH 5,0 nicht, hat einen Verteilungskoeffizienten (System nach Zähler *et al.*, 1963) von 42 und enthält keine Aminosäure außer Ornithin. UV- und IR-Spektren deuteten auf einen Gehalt an einer Anhydromevalonsäure. Nach Spaltung mit Perjodat wurde cis-Anhydromevalonsäure gefunden. Im IR-Spektrum fiel eine Bande bei 1750 cm^{-1} auf, die für die Sideramine vom Fusigentyp charakteristisch ist. Das NMR-Spektrum der eisenfreien Verbindung in D_2O erwies sich als identisch mit dem von Triacetylfulsigen (IV),

das zuvor durch Acetylierung aus Fusigen erhalten war (Diekmann u. Zähler, 1967).

Alle Daten des Sideramins $R_f = 0,22$ waren identisch mit denen von Triacetylfulsigen B; es entsteht demnach aus Triacetylfulsigen durch Hydrolyse einer Esterbindung.

Das Sideramin $R_f = 0,61$ („Sideramin B“) wird als Hauptkomponente von *A. duricaulis* gebildet und findet sich als schwache Nebenkomponente bei allen Ferricrocin-produzierenden Stämmen. Im Lösungsmittelsystem der Craigverteilung zeigt es einen Verteilungskoeffizienten von 2,5. Es ist etwas lipophiler als Ferrichrom. Das Elektronenspektrum in Äthanol weist ein Maximum bei 426 nm ($E_{1\text{ cm}}^1 = 35,7$) auf. Das IR-Spektrum ist typisch für Ferrichromanaloge. Nach saurer Hydrolyse des Desferrisideramins wurden neben Ornithin Glycin und Alanin im Verhältnis 2:1 gefunden. „Sideramin B“ ist möglicherweise identisch mit dem von Atkin *et al.* (1970) beschriebenen Ferrichrom C.

Diskussion

Obwohl die Sideramine einer großen Zahl von Pilzen identifiziert wurden, läßt sich keine Regel erkennen, die Taxonomie und Sideraminbildung verbindet. Bei *Fusarium*-Arten wurde häufig Fusigen, bei *Penicillium*-Arten Coprogen als Hauptsideramin gefunden. Bei der hier beschriebenen Serie überrascht das nahezu regelmäßige Vorkommen von Ferricrocin und eine ähnliche Zusammensetzung des Sideramingemisches bei Arten, die bei der morphologischen Analyse als nahe verwandt bezeichnet wurden (Loeffler, persönliche Mitteilung).

Die Bewertung wird dadurch erschwert, daß bei den untersuchten 14 Arten – ebenso wie es früher bei *Aspergillus melleus* beobachtet war (Crueger u. Zähler, 1968) – eine Vielzahl von Komponenten auftreten. Wir konnten die Struktur von 3 weiteren Verbindungen aufklären, doch bleiben einige, die teilweise in sehr geringen Konzentrationen vorkommen, unbekannt. Betrachtet man die Liste der gefundenen Sideramine, so wird klar, daß theoretisch noch eine ganze Reihe Sideramine möglich sind, wenn man alle denkbaren Kombinationen zwischen Aminosäure- und Carbonsäurebausteinen zuläßt. Aufgrund des Verhaltens der bekannten Sideramine vor allem im Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser können Voraussagen über das Verhalten der „fehlenden“ Sideramine bei der Dünnschichtchromatographie gemacht werden. Die Carbonsäurebausteine bewirken eine Erhöhung des R_f -Wertes in der Reihenfolge β -Methylglutaconsäure < *trans*-Anhydromevalonsäure < Essigsäure < *cis*-Anhydromevalonsäure. Der R_f -Wert ist außerdem um so höher, je lipophiler (Ser

<Gly<Ala) die austauschbaren Aminosäuren des Hexapaptidringes sind.

Vorläufige Ergebnisse mit den Sideraminen aus *A. melleus* Tü 142 lassen vermuten, daß die früher nicht identifizierten Sideramine Hexapeptidringe enthalten, in denen Glycin gegen Serin oder Alanin ausgetauscht wurde.

Triacetylfuligin, das hier zum ersten Mal als Naturprodukt nachgewiesen wurde, ist lipophiler als alle anderen bekannten Pilzsideramine. Es wird von Interesse sein, seine Eisentransporteigenschaften (vgl. Barnekow *et al.*, 1974) zu untersuchen.

Herrn Prof. Dr. W. Loeffler danken wir für Diskussionen und Hinweise, Frau G. Bär für gewissenhafte Mitarbeit. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat diese Untersuchungen durch eine Sachbeihilfe im Rahmen des SFB 76 unterstützt.

Literatur

- Atkin, C. L., Neilands, J. B., Phaff, H. J.: Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrom from *Cryptococcus melibiosum*. *J. Bact.* **103**, 722–733 (1970)
- Barnekow, A., Winkelmann, G., Zähler, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 138. Mitteilung. Vergleichende Untersuchungen zum Eisentransport durch Sideramine an Knochenmarkzellen (Typ Detroit-98). *Arch. Microbiol.* **100**, 329–340 (1974)
- Crueger, W., Zähler, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 70. Mitteilung. Über den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Sideraminbildung von *Aspergillus melleus* Yukawa. *Arch. Microbiol.* **63**, 376–384 (1968)
- Diekmann, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 56. Mitteilung. Fusigen – ein neues Sideramin aus Pilzen. *Arch. Microbiol.* **58**, 1–5 (1967)
- Diekmann, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 68. Mitteilung. Die Isolierung und Darstellung von trans-5-Hydroxy-3-methylpenten-(2)-säure. *Arch. Microbiol.* **62**, 322–327 (1968)
- Diekmann, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 81. Mitteilung. Vorkommen und Strukturen von Coprogen B und Dimerumsäure. *Arch. Microbiol.* **73**, 65–76 (1970)
- Diekmann, H.: Siderochromes Iron(III)-trihydroxamate. In: CRC Handbook of Microbiology, A. I. Laskin, H. A. Lechevalier, eds., Vol. III, Microbial products, pp. 449–457. Cleveland: CRC Press 1973
- Diekmann, H., Zähler, H.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 59. Mitteilung. Konstitution von Fusigen und dessen Abbau zu Δ^2 -Anhydromevalonsäurelacton. *Europ. J. Biochem.* **3**, 213–218 (1967)
- Keller-Schierlein, W., Deér, A.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 44. Mitteilung. Zur Konstitution von Ferrichrysin und Ferricrocin. *Helv. chim. Acta* **46**, 1907–1920 (1963)
- Llinás, M., Neilands, J. B.: Structure of ferricrocin. *Bioinorg. Chem.* **2**, 159–165 (1972)
- Raper, K. B., Fennell, D. I.: The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams Wilkins 1965
- Sato, S., Tadenuma, M., Hasuo, T.: New ferrichrome-type siderochromes in saké and rice-koji. *Agr. Biol. Chem.* **35**, 950–952 (1971)
- Zähler, H., Keller-Schierlein, W., Hütter, R., Hess-Leisinger, K., Deér, A.: Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 40. Mitteilung. Sideramine aus Aspergillaceen. *Arch. Microbiol.* **45**, 119–135 (1963)

Prof. Dr. H. Diekmann
Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität
D-3000 Hannover 1, Schneiderberg 50, Bundesrepublik Deutschland