

113. Obtention de Flavine à partir d'un ascomycète.

„*Eremothecium Ashbyii*“

par A. Mirimanoff et Mlle. A. Raffy.

(7. VII. 38.)

La première extraction de flavine à partir d'un végétal est due à *P. Karrer* et *K. Schöpp*¹⁾. Ces savants ont choisi successivement comme matériel de départ l'inflorescence de « *Taraxacum officinale* » et le malt. Peu après, *Kuhn* et *Kaltschmidt*²⁾ ont réussi à obtenir la vitamine B₂ à l'état de pureté à partir du foin. Alors que *P. Karrer* et *K. Schöpp* avaient entrepris leur travail surtout en vue d'identifier la flavine végétale et la flavine d'origine animale, *Kuhn* et *Kaltschmidt*, frappés par la présence constante de cette vitamine chez les végétaux autotrophes, s'étaient proposé l'extraction quantitative de ce pigment afin d'établir le rapport moléculaire flavine/chlorophylle et partant, de déterminer si la flavine pouvait être liée à l'assimilation de l'anhydride carbonique par le végétal chlorophyllien. Ces savants soulignaient ainsi l'intérêt qu'il y aurait à déterminer si la flavine appartenait au système vacuolaire ou au contraire aux chloroplastes.

A. Guilliermond, *M. Fontaine* et Mlle *Raffy*³⁾ ont pu observer avec certitude la présence de vitamine B₂ dans un ascomycète parasite des capsules d'un cotonnier africain, et localiser cette substance soit en dissolution soit à l'état cristallisé (aiguilles et sphérocristaux dans le vacuome).

La présence de vitamine B₂ dans la vacuole d'un végétal hétérotrophe constituait une réponse précise à la question posée par *Kuhn* et ses collaborateurs. Cependant, malgré une identification par photométrie de fluorescence⁴⁾ et un contrôle biologique positif (en tant que facteur de croissance⁵⁾) il nous a paru intéressant sur le préavis de M. le Prof. *Guilliermond*, de procéder à l'extraction de ce pigment à l'état cristallisé.

Mode opératoire.

Nous nous sommes inspirés en grande partie des méthodes élaborées par *P. Karrer* et ses collaborateurs, sur les détails desquelles nous ne reviendrons pas ici.

¹⁾ *P. Karrer* et *Schöpp*, *Helv.* **17**, 771 et 1013 (1934).

²⁾ *Kuhn* et *Kaltschmidt*, *B.* **68**, 128 (1935).

³⁾ *A. Guilliermond*, *M. Fontaine* et *A. Raffy*, *C. r.* **201**, 1077 (1935).

⁴⁾ *A. Gourévitch*, *Bull. Soc. Chim. biol.* **19**, 125 (1937).

⁵⁾ Mlle *A. Raffy*, *C. r. Soc. Biol.* **126**, 875 (1937).

Le milieu de culture gélosé (*Gorođkowa*), dans lequel la flavine a largement diffusé au bout de 15 jours, est extrait à deux reprises par de l'alcool méthylique à 50 % à 37° pendant 48 heures. Les filtrats sont purifiés par du chloroforme, et après élimination de ce solvant, la solution est concentrée sous pression réduite. Le résidu aqueux, rendu faiblement acétique, est traité par de la franconite en vue de l'adsorption de la flavine. Après avoir séparé par centrifugation la franconite du liquide devenu incolore, l'adsorbat est élué selon le procédé indiqué par *P. Karrer* (mélange pyridinique). Les éluats sont ensuite concentrés, et la flavine est alors adsorbée 4—5 fois de suite sur du sulfure de plomb. Les éluations se pratiquent à l'eau bouillante, toujours d'après le même procédé. Finalement, du dernier éluat, concentré, la flavine précipite sous forme de fines aiguilles orangé. Des eaux-mères, il a encore été obtenu une moindre quantité de pigment, par recristallisation dans l'eau chaude. P. d. f. corrigé du produit obtenu 283° C.

Le spectre de fluorescence du produit redissous dans le méthanol à 50 % présente les mêmes caractères que les solutions méthyliques des flavines synthétiques (*Roche*). Notons également que la flavine cristallisée ne donne pas la réaction colorée verte avec une solution iodo-iodurée, comme c'est le cas dans la vacuole du champignon (*Guilliermond*).

Rendement.

Le matériel de départ est constitué par 340 gr. de masse de culture gélosée contenant, d'après le dosage fluorimétrique, 15,8 mgr. de flavine. Nous avons obtenu 6 mgr. de flavine cristallisée. Le rendement est donc à peine de 38 %. Le contrôle analytique des diverses opérations, par voie fluorimétrique, permet d'attribuer une faible partie des pertes à la transformation en lumiflavine. Une autre cause réside dans la difficulté que nous avons éprouvée à l'éluition de la franconite (adsorption trop énergique).

Conclusions.

Malgré ce médiocre rendement, qu'il serait d'ailleurs possible d'améliorer, il n'en est pas moins évident que l'obtention de flavine à partir de «*Eremothecium Ashbyii*», à côté de son intérêt théorique, présente un intérêt pratique, vu la simplicité et l'économie qui président à la mise en œuvre du produit de départ. De plus, la flavine obtenue se montre d'une grande pureté, lors de la première cristallisation.

En outre, des essais complémentaires ont montré qu'il est possible, avec ce matériel, d'éviter complètement le traitement à la

franconite. Il est alors indispensable de multiplier les adsorptions par la méthode plombique, procédé qui ne présente, par ailleurs, aucune difficulté.

Paris, mai 1938.

Laboratoire de physiologie de M. le prof. *Portier*, Institut océanographique, et Laboratoire de Physiologie de la nutrition de l'Ecole des Hautes Etudes.

Genève, Laboratoires de Chimie technique, théorique et d'Electrochimie (Prof. *Briner*).

114. Phosphorylierung von Riboflavin durch Darmschleimhaut-extrakte und die Wirkung von Jodessigsäure darauf

von H. Hübner und F. Verzár.

(20. VII. 38.)

Untersuchungen dieses Institutes hatten seit 1933 betont, dass in der Darmschleimhaut Phosphorylierungen zustande kommen¹⁾. Das wurde für die Resorption von Glucose, ferner für die Fettsynthese gefolgert, aber es wurde auch schon 1935—36 für Lactoflavin angenommen²⁾. Diese Annahmen beruhten zum grössten Teil auf Resorptionsversuchen und auf Beobachtungen über die Wirkung von die Phosphorylierung hemmenden Giften. Schon 1934 wurde auch die Phosphorylierung von Zuckern mit Schleimhaut-extrakten versucht^{1) 3)} und ein Verschwinden von anorganischem Phosphat gesehen. Dann hat *Rudy*⁴⁾ in einer kurzen Mitteilung berichtet, dass ihm die Bildung von Flavin-phosphorsäure aus Lactoflavin mit Glycerin-Extrakten, welche nach der für die Phosphorylierung von Glucose bewährten Methode hergestellt wurden, gelungen sei. Der Befund konnte aber später weder von ihm⁵⁾ noch von *Emmerie* und *van Eekelen*⁶⁾ (1937) reproduziert werden.

Vor kurzem hat *Tauber* (1938)⁷⁾ mitgeteilt, dass er mit einem durch Extraktion mit Aceton gereinigten Trockenpulver der Darmschleimhaut regelmässig eine Phosphorylierung von Vitamin B₁ erhalten habe. Wir versuchten, ob 1. Darmschleimhaut-Trockenpulver Lactoflavin phosphoryliert und ob 2. jene Faktoren, welche im Lebenden diese Phosphorylierung hemmen, das auch in vitro können.

¹⁾ *W. Wilbrandt* und *L. Laszt*, *Bioch. Z.* **259**, 398 (1933).

²⁾ *F. Verzár* und *L. Laszt*, *Pflüger's Arch.* **236**, 693 (1935); **237**, 476 (1936).

³⁾ *L. Laszt*, *Bioch. Z.* **276**, 44 (1935).

⁴⁾ *H. Rudy*, *Naturwissenschaften* **23**, 286 (1935).

⁵⁾ Zitiert nach *Emmerie* und *van Eekelen*, l. c.

⁶⁾ *A. Emmerie* und *M. van Eekelen*, *Acta Brevia Neerlandica* **7**, 169 (1937).

⁷⁾ *H. Tauber*, *J. Biol. Chem.* **123**, 499 (1938).