

28. Recherches sur la biochimie des champignons inférieurs III.

Sur le pigment de *Penicillium citreo-roseum* *Dierckx*¹⁾

par Théodore Posternak et Jean-Paul Jacob.

(31. I. 40.)

Le *Penicillium citreo-roseum* *Dierckx* a la propriété de produire sur certains milieux de culture un pigment jaune citron; lorsque la culture vieillit, on observe parfois un virage au rose ou même au rouge dû à un phénomène d'alcalinisation spontanée du milieu, d'où le nom de *citreo-roseum* par lequel on désigne ce micro-organisme.

Ayant entrepris des cultures dans le but d'isoler le pigment, nous avons adopté finalement le milieu synthétique de *Czapek-Dox* qui ne contient que du glucose comme matière organique. Sur ce milieu, le champignon manifeste une croissance relativement rapide et ses cultures sont bien pigmentées. Par une méthode décrite en détail dans la partie expérimentale, nous avons pu isoler à l'état cristallisé le pigment pour lequel nous proposons le nom de *citreo-roséine*.

Ce produit répond à la formule $C_{15}H_{10}O_6$. Il se présente sous forme d'aiguilles jaune orange solubles en rouge pourpre dans les carbonates alcalins et les alcalis caustiques. Il ne contient pas de groupe méthoxyle; il donne une forte réaction colorée en présence de chlorure ferrique.

La *citreo-roséine* contient 4 hydroxyles: nous en décrivons les dérivés tétra-acétylé, tétra-benzoylé et tétra-méthylé; tous ces produits sont insolubles dans les alcalis et ne donnent plus de réaction avec le chlorure ferrique.

Oxydé d'après la méthode de *Kuhn* et *Roth*, le pigment ne fournit pas d'acide acétique.

Par ses réactions colorées et par ses propriétés générales, le pigment semblait déjà appartenir à la série anthraquinonique; par distillation sur la poudre de zinc on obtient effectivement du β -méthyl-anthracène: la *citreo-roséine* apparaît ainsi comme une tétra-oxy- β -méthyl-anthraquinone. D'autre part, les faits suivants apportent quelques indications sur la position des groupes hydroxyles:

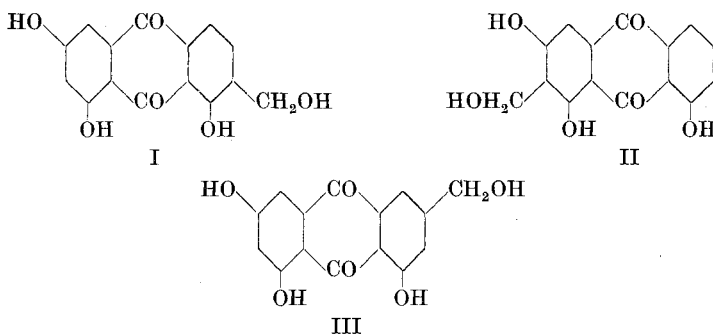
a) Le pigment est soluble dans les carbonates alcalins; il forme un sel avec *une* molécule de pyridine, ce qui indique la présence d'un hydroxyle nucléaire en β^2).

¹⁾ L'un de nous a publié la première description du pigment pur dans C. R. Soc. Phys. et Hist. Nat. de Genève, **56**, 29 (1939).

²⁾ *Pfeiffer*, A. **398**, 137 (1913); *Oesterle*, Arch. Pharm. **253**, 127 (1915).

b) Le pigment ne tire pas sur coton mordancé; d'après la règle de *Liebermann et Kostanecki*¹⁾ il est donc très probable que la citréo-roséine ne contienne pas d'hydroxyles vicinaux en α , β .

c) Par la couleur de ses solutions dans l'acide sulfurique concentré et dans l'eau à différents p_H et par ses domaines de virage, le pigment ressemble à s'y méprendre à l'émodine (4, 5, 7-tri-oxy-2-méthyl-anthraquinone); les spectres d'absorption des deux substances présentent également de grandes analogies. Comme la couleur des poly-oxy-anthraquinones dépend essentiellement du nombre et de la position des hydroxyles nucléaires, il devient très probable que la citréo-roséine, tout comme l'émodine, soit un dérivé de la 4,5,7-trioxy-anthraquinone, le quatrième hydroxyle faisant partie de la chaîne latérale. Nous attribuons ainsi à notre pigment la constitution d'une 4,5,7-trioxy- β -oxyméthyl-anthraquinone répondant à l'une des trois formules suivantes:



Nous poursuivons l'étude de la constitution du pigment.

Jusqu'à présent on ne connaissait, parmi les champignons inférieurs, que deux groupes dont certains représentants produisent des pigments anthraquinoniques:

a) Les helminthosporés, dont les pigments (helminthosporine, caténarine, cynodontine, tritisporine) sont des dérivés de la 1,4,8-trioxy-anthraquinone²⁾.

b) Certaines espèces d'*Aspergillus glaucus* qui, à côté de physcion (7-méthyl-émodine), produisent un pigment anthraquinonique de structure encore inconnue: l'érythroglaucine³⁾.

La citréo-roséine est donc le premier dérivé anthraquinonique qui ait été isolé d'une culture de *Penicillium*. Ajoutons que l'un de nous a retiré des cultures d'une autre espèce de *Penicillium* (*Penicillium roseo-purpureum Dierckx*) un pigment répondant à la formule $C_{16}H_{12}O_6$, qui représente un dérivé monométhylé de la citréo-roséine. Sa description fera l'objet d'une communication ultérieure.

¹⁾ A. **240**, 245 (1887).

²⁾ *Raistrick et coll.*, *Biochem. J.* **27**, 499 (1933); **28**, 559 (1934).

³⁾ *Ashley, Raistrick et Richards*, *Biochem. J.* **33**, 1291 (1939).

Partie expérimentale.

Préparation du pigment.

Cultures de P. citreo-roseum. — Ces cultures ont été effectuées sur milieu liquide (milieu de *Czapek-Dox*) ayant la composition suivante:

eau distillée 1000 parties;
NaNO₃ 2 parties;
KH₂PO₄ 1 partie;
KCl 0,5 partie;
MgSO₄·7 H₂O 0,5 partie;
FeSO₄·7 H₂O 0,02 partie;
glucose pur 50-parties.

Le liquide est réparti dans des fioles coniques et des ballons à fond plat, de manière à remplir les récipients au quart. Après stérilisation à l'autoclave et refroidissement, on ensemence au moyen d'une souche de *Penicillium citreo-roseum Dierckx* (souche sur moût agarisé du Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn). On laisse la croissance se poursuivre à 20°. En règle générale, au bout de huit jours, la surface du liquide est entièrement recouverte d'un tapis mycélien; il apparaît alors des spores bleu ciel, et, en même temps, le revers du mycélium se colore en jaune; le pigment diffuse ensuite petit à petit dans le liquide. Au bout de 20—30 jours, la pigmentation n'augmente plus. Le revers du mycélium est alors d'un orangé intense. Le liquide, de couleur plus faible, réduit encore la liqueur de *Fehling*; il contient encore 1,8 % environ de glucose.

Cultures sur d'autres milieux. — Si, dans le milieu de *Czapek-Dox*, on remplace le glucose par d'autres substances organiques, les composants minéraux du mélange restant les mêmes, on constate:

a) Une croissance et une sporulation normales du champignon, mais sans production de citréo-roséine, sur les sucres suivants: *l*-rhamnose, *d*-galactose, *d*-xylose, *d*-ribose, *l*-arabinose, *d*-sorbose, *d*-mannite, inosite.

b) Une croissance et une sporulation normales accompagnées de formation de citréo-roséine sur le *d*-fructose et le *d*-mannose.

La production de pigment ne s'observe donc que sur les trois hexoses fermentescibles: glucose, fructose et mannose.

La substitution du nitrate de sodium dans le milieu de *Czapek-Dox* par le tartrate d'ammonium ne semble pas influencer notablement sur la production du pigment.

Extraction du pigment. — Pour extraire le pigment du liquide, on introduit environ 25 % de sel marin et on agite dans un entonnoir à robinet avec de petites quantités d'alcool isobutylique. Les solutions iso-butyliques réunies sont ensuite agitées avec du carbonate de sodium à 2 % qui s'empare du pigment en se colorant en rouge pourpre.

Le mycélium contient la majeure partie du pigment. Après l'avoir haché à la machine et exprimé à la presse, on le fait macérer à froid dans du carbonate de sodium à 2 %; au bout de quelques heures, on exprime à la presse et on traite de nouveau par le carbonate de sodium.

Trois extractions successives suffisent en général. Le résidu mycélien provenant de 40 litres de cultures pèse 105 gr. après l'extraction et la dessiccation.

On réunit les extraits carbonato-sodiques provenant du mycélium et du liquide de culture et on les acidifie à l'acide chlorhydrique: il se produit un précipité qui entraîne la majeure partie du pigment. Il est essoré, séché et extrait à l'alcool bouillant qui dissout la citréo-roséine et laisse comme résidu une substance contenant du phosphore et de l'azote et représentant peut-être une nucléine. La solution alcoolique dépose, après concentration convenable, des cristaux de pigment qu'on presse sur une assiette poreuse; on les purifie par dissolution dans l'alcool en essorant, à chaud, les impuretés insolubles. Le pigment est ensuite redissous dans le carbonate de sodium à 2%; on filtre la solution sur une couche de norite et précipite par l'acide.

Pour la purification finale, il est indiqué de passer par l'intermédiaire du dérivé acétylé. Le produit brut, bien séché et finement pulvérisé, est traité par cinq fois son poids d'un mélange de 95 volumes d'anhydride acétique et de 5 volumes d'acide sulfurique concentré; on chauffe légèrement pour tout dissoudre. Après refroidissement, de fines aiguilles jaunes se séparent qu'on essore au bout de quelques heures et qu'on lave avec un peu d'anhydride acétique. Après recristallisation dans l'alcool, le dérivé acétylé fond à 187—188°. Pour le saponifier, on en suspend 1 gr. dans 20 cm³ d'alcool méthylique chaud et on ajoute 4 cm³ de potasse aqueuse à 50%. Après quelques minutes, on dilue de 4 volumes d'eau et acidifie par l'acide chlorhydrique concentré. On chauffe au bain-marie pour coaguler le précipité jaune, qu'on essore après refroidissement. Le produit est ensuite recristallisé dans 25 parties d'alcool absolu bouillant.

Suivant les cultures, la quantité obtenue de pigment pur varie considérablement: on en obtient de 15 à 80 mgr. par litre de culture.

Propriétés de la citréo-roséine.

Le pigment cristallise en aiguilles jaune orange, fondant en se décomposant (noircissement) vers 273—275° (chauffe lente).

2,785 mgr. subst. ont donné 6,415 mgr. CO₂ et 0,960 mgr. H₂O

C ₁₅ H ₁₀ O ₆	Calculé C	62,92	H	3,86%
	Trouvé ..	62,82	..	3,52%

Le produit se dissout en rouge pourpre dans les carbonates alcalins et les alcalis caustiques et en rouge orange dans l'acide sulfurique concentré. En solution alcoolique, il donne une coloration brun rouge avec le chlorure ferrique. Il est très peu soluble dans l'eau, l'éther, le benzène et le chloroforme, un peu plus dans l'alcool isobutylique. L'alcool et l'acide acétique le dissolvent assez bien à chaud, mais difficilement à froid.

En solution acétique, le pigment est légèrement fluorescent à la lumière ordinaire; il manifeste une forte fluorescence jaune vert sous l'action des rayons ultra-violetes.

Des essais de teinture sur coton mordancé à l'alumine ont été négatifs.

Couleurs et spectres d'absorption; comparaison avec l'émodine.

Les couleurs des solutions de citréo-roséine dans l'acide sulfurique concentré et dans l'eau, à différents p_H , ressemblent à s'y méprendre à celles de l'émodine. A des p_H inférieurs à 7,1, la solution aqueuse est jaune; à 7,1—8,2, on observe un virage au rouge orange; à p_H 9,7—10,9 il se produit un nouveau virage au rouge pourpre. Les domaines de virage correspondants de l'émodine sont respectivement 7,3—8,2 et 9,7—11,0.

Dans l'acide sulfurique concentré, la citréo-roséine présente deux bandes d'absorption de largeur inégale; le maximum d'absorption de la plus large est situé vers 491 $m\mu$; celui de la plus mince vers 528 $m\mu$ ¹⁾. En solution alcaline, on observe une très large bande à maximum situé vers 515 $m\mu$ ²⁾. Dans les mêmes dissolvants, les bandes de l'émodine ont exactement les mêmes caractères, mais sont déplacées d'environ 10 $m\mu$ vers les grandes longueurs d'onde³⁾.

Sel de pyridine: Il se sépare par refroidissement d'une solution chaude du pigment dans la pyridine anhydre. Avant l'analyse, il a été séché à température ordinaire sur l'anhydride phosphorique dans une atmosphère de pyridine.

35,7 mgr. subst. ont perdu à 105° 8,3 mgr. pyridine
 $C_{15}H_{10}O_6 \cdot C_5H_5N$ Calculé C_5H_5N 21,6 Trouvé C_5H_5N 23,2%

Dérivé tétra-acétylé.

On l'obtient, comme il a été dit plus haut, par l'action de l'anhydrique acétique en présence d'acide sulfurique concentré. Il forme de fines aiguilles jaunes qui fondent à 187—188° après recristallisation dans l'alcool. Le produit est insoluble dans les alcalis et ne donne pas de réaction colorée avec le chlorure ferrique.

5,088 mgr. subst. ont donné 11,345 mgr. CO_2 et 1,78 mgr. H_2O
 0,189 mgr. subst.: 1,882 mgr. camphre; $\Delta = 8,5^\circ$
 $C_{23}H_{18}O_{10}$ Calculé C 60,77 H 3,99% Poids mol. 454
 Trouvé „ 60,81 „ 3,92% „ „ 472

¹⁾ L'addition d'acide borique déplace les deux bandes d'environ 4 $m\mu$ vers les grandes ondes.

²⁾ Nous adressons tous nos remerciements à M. le Dr E. Perrotet qui a bien voulu effectuer ces mesures.

³⁾ Pour le spectre d'absorption de l'émodine, voir: Tschirch et Heuberger, Arch. Pharm. 240, 609 (1902).

Dérivé tétra-benzoylé.

30 mgr. de pigment sont dissous à chaud dans 0,5 cm³ de pyridine anhydre; on refroidit rapidement et ajoute 0,2 cm³ de chlorure de benzoyle. Le lendemain, on verse dans l'eau; le précipité est essoré, lavé à l'alcali, séché et extrait à l'alcool froid. Le résidu insoluble dans l'alcool est recristallisé finalement dans le benzène. Aiguilles jaune clair, groupées en houppettes fondant à 206—208°, puis se solidifiant de nouveau pour fondre à 223°.

4,058 mgr. subst. ont donné 10,959 mgr. CO₂ et 1,431 mgr. H₂O

C ₄₃ H ₂₆ O ₁₀	Calculé C	73,48	H	3,73%
	Trouvé „	73,65	„	3,95%

Dérivé tétra-méthylé.

La méthylation complète du pigment est assez difficile et se fait par agitations répétées en présence d'un grand excès de sulfate de méthyle. 50 mgr. de citréo-roséine dissous dans 6 cm³ de NaOH 2-n. sont agités en présence de 0,5 cm³ de sulfate neutre de méthyle jusqu'à disparition du réactif. On répète encore cinq fois la méthylation en introduisant à chaque reprise 2 cm³ de NaOH 2-n. et 0,5 cm³ de sulfate de méthyle. Le précipité formé est finalement essoré; on le traite à chaud par la soude caustique diluée pour le débarrasser des composés incomplètement méthylés et on le recristallise plusieurs fois dans l'alcool chaud. Le produit est dimorphe: il se sépare parfois de sa solution alcoolique en longues et fines aiguilles groupées en gerbes qui, au bout de quelques heures, se transforment en petits prismes rectangulaires. P. de f. 187—188°.

3,468 mgr. subst. ont donné 9,372 mgr. AgI

C ₁₉ H ₁₈ O ₆	Calculé OCH ₃	36,27	Trouvé OCH ₃	35,70%
--	--------------------------	-------	-------------------------	--------

Distillation sur la poudre de zinc.

Cette opération a été effectuée dans les petits tubes soudés fermés à une extrémité décrits par Kögl et Deijs¹⁾ (Knieröhrchen).

Le pigment (10 mgr.) mélangé intimement à 20 fois son poids de poudre de zinc est introduit dans le fond du tube; on recouvre encore de 200 mgr. de poudre de zinc; on chauffe ensuite le mélange, d'abord avec précaution, puis plus fortement. Des cristaux incolores se déposent, en formant un anneau, dans la partie non chauffée du tube. On coupe ensuite le tube de chaque côté de cet anneau. Les cristaux provenant de 10 opérations semblables sont réunis; on les lave à la soude, puis on les recristallise dans l'acide acétique. P. de f. 203°. Le mélange avec du β-méthyl-anthracène (p. de f. 205°) fond vers 204°.

Genève, Laboratoire de Chimie organique
et inorganique de l'Université.

¹⁾ A. 515, 20 (1935).