

## 121. Recherches sur la biochimie des champignons inférieurs IV.

### Sur le pigment de *Penicillium roseo-purpureum* *Dierckx*<sup>1)</sup>

par Théodore Posternak.

(13. VII. 40.)

Dans la III<sup>ème</sup> communication<sup>2)</sup> de cette série, nous avons décrit le pigment de *Penicillium citreo-roseum* *Dierckx* (*citréo-roséine*) auquel nous avons attribué la constitution d'une 4,5,7-trioxy- $\beta$ -oxyméthyl-anthraquinone. Dans le même mémoire, nous indiquions qu'une autre espèce de *Penicillium* (*P. roseo-purpureum* *Dierckx*) produit un pigment, répondant à la formule  $C_{16}H_{12}O_6$ , qui représente un dérivé monométhylé de la citréo-roséine. La présente communication a trait principalement à ce nouveau pigment que nous désignerons sous le nom de *roséo-purpurine*.

Le *Penicillium roseo-purpureum* a été cultivé sur le milieu de *Czapek-Dox* qui, dans ce cas encore, s'est montré favorable à une production relativement abondante de composés colorés. Le pigment isolé par une méthode pour laquelle nous renvoyons à la partie expérimentale cristallise en aiguilles jaunes, solubles en rouge brun dans les carbonates alcalins et en rouge pourpre dans les alcalis caustiques; il répond à la formule  $C_{16}H_{12}O_6$  et contient un groupe méthoxyle. Il donne une forte réaction colorée avec le chlorure ferrique. La présence de 3 hydroxyles dans la molécule de la roséo-purpurine a été démontrée par la formation d'un dérivé tri-acétylé insoluble dans les alcalis et ne donnant plus de réaction avec le chlorure ferrique.

L'appartenance du pigment à la série anthraquinonique a été établie par la distillation sur la poudre de zinc qui fournit du  $\beta$ -méthyl-anthracène: la roséo-purpurine apparaît ainsi comme l'éther mono-méthylique d'une tétra-oxy- $\beta$ -méthyl-anthraquinone.

Par méthylation énergique, on obtient le dérivé triméthylé, identique à la tétraméthyl-citréo-roséine décrite dans la communication précédente. La roséo-purpurine est ainsi un dérivé monométhylé du colorant de *Penicillium citreo-roseum*.

Quelle est alors la position du groupe méthoxyle? Le fait que le pigment est soluble dans les carbonates alcalins et qu'il forme un sel avec une molécule de pyridine indique la présence d'un hydroxyle nucléaire libre en  $\beta^3$ ): le groupe méthoxyle ne peut donc être en position 7. D'autre part, le pigment ressemble à la purpuroxanthine

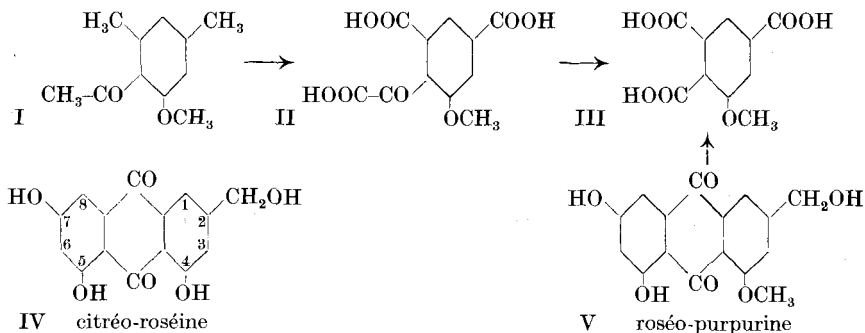
<sup>1)</sup> Communication préliminaire: C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève **57**, 139 (1940).

<sup>2)</sup> Th. Posternak et J. P. Jacob, Helv. **23**, 237 (1940).

<sup>3)</sup> Pfeiffer, A. **398**, 137 (1913); Oesterle, Arch. Pharm. **253**, 327 (1915).

(1,3-dioxy-anthraquinone) par la couleur de ses solutions aqueuses à différents  $p_H$  et par ses domaines de virage. Ces propriétés dépendant du nombre et de la position des hydroxyles nucléaires libres, il devient probable que la roséo-purpurine, de même que la purpuroxanthine, contienne deux hydroxyles libres dans le même noyau (en 5 et 7); le groupe méthoxyle serait alors situé en 4.

Cette position du groupe méthoxyle a été définitivement établie par l'étude d'un produit d'oxydation du pigment. La roséo-purpurine a été traitée énergiquement par le permanganate alcalin; le produit ainsi obtenu, qui semble consister essentiellement en acides  $\alpha$ -cétoniques dérivés de l'acide phtalonique, a été traité à son tour par le permanganate, cette fois en milieu acide. Il s'est transformé ainsi en un composé  $C_{10}H_8O_7$  contenant un groupe méthoxyle et ayant les propriétés d'un acide tribasique. Nous avons pu obtenir synthétiquement le même composé, de la manière suivante: Le 3-méthoxy-1,5-diméthyl-2-acétyl-benzène I, qui se prépare facilement, comme l'ont montré *v. Auwers* et *Borsche*<sup>1)</sup>, à partir du 1-oxy-3,5-diméthyl-benzène, a été oxydé par le permanganate alcalin avec un rendement de 70 % en acide 3-méthoxy-5-carboxy-phtalonique II. Ce dernier composé traité par le permanganate acide s'est transformé aisément en acide 3-méthoxy-benzène-1,2,5-tricarbonique  $C_{10}H_8O_7$  III identique au produit obtenu à partir de la roséo-purpurine.



La formation de la substance III par oxydation de la roséo-purpurine indique que dans ce pigment:

- a) le groupe méthoxyle est situé en 4,
- b) la chaîne latérale (groupe oxyméthyle) se trouve en 2.

La roséo-purpurine répond donc à la formule V; la citréo-roséine est alors représentée par la formule IV. On voit en effet que seule la formule V peut rendre compte de la formation du composé III qui résulte de la destruction du noyau de gauche et du noyau central et de l'oxydation de la chaîne latérale; en particulier toute autre position de cette dernière est exclue.

<sup>1)</sup> B. 48, 1706 (1915).

*H. Raistrick* a isolé récemment d'une variété de *Penicillium cyclopium Westling* un pigment dont, se basant sur notre communication du 15. II. 1939<sup>1)</sup>, il soupçonna l'identité avec le pigment de *P. citreo-roseum*. Ayant échangé des échantillons de nos substances et de leurs dérivés acétylés, nous avons effectivement constaté leur identité. Comme M. le Prof. *Raistrick* nous l'a communiqué ultérieurement, il a pu, par oxydation de la chaîne latérale du tétra-acétate, obtenir de l'acide tri-acétyl-émodinique (acide 4,5,7-tri-acétoxy-antraquinone-2-carbonique), réaction que, faute de quantité suffisante de substance, nous n'avions pu étudier en détail. Par réduction il a obtenu, d'autre part, de l'émodine. Les conclusions de *Raistrick* quant à la position de la chaîne latérale de la citréo-roséine sont donc en accord avec les nôtres<sup>2)</sup>.

La citréo-roséine est étroitement apparentée à l'émodine (4,5,7-trioxy-2-méthyl-antraquinone); elle peut en effet être considérée comme la  $\omega$ -oxy-émodine. Faisons remarquer qu'on a trouvé dans la nature un éther monométhylé de chacun des deux pigments; mais alors que dans celui de l'émodine, qui porte le nom de physcion, le groupe méthoxyle se trouve en 7<sup>3)</sup>, il est situé en 4, comme nous l'avons vu, dans la roséo-purpurine.

D'autre part, nous avons retiré des cultures de *P. roseo-purpureum Dierckx* une substance qui s'est trouvée être identique à l'acide benzoïque. La présence d'acide benzoïque a été souvent signalée chez les plantes supérieures; à notre connaissance, c'est la première fois qu'on le rencontre dans la culture d'un micro-organisme.

## Partie expérimentale.

### Préparation du pigment.

Cultures de *P. roseo-purpureum*. — Elles ont été effectuées à 20° sur le milieu liquide de *Czapek-Dox* dont nous rappelons la composition:

eau distillée 1000 parties;  
 NaNO<sub>3</sub> 2 parties;  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 partie;  
 KCl 0,5 partie;  
 MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,5 partie;  
 FeSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,01 partie;  
 glucose pur 50 parties.

Nous avons utilisé une souche du *Centralbureau voor Schimmelcultures*, Baarn. Pour obtenir une croissance rapide sur milieu de *Czapek-Dox*, il est nécessaire de laisser vieillir la culture-mère sur moût de bière agarisé jusqu'à apparition de spores et d'ensemencer

<sup>1)</sup> C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève **56**, 29 (1939).

<sup>2)</sup> Le mémoire de *Raistrick* et coll. a paru récemment: *Anslow, Breen et Raistrick*, *Biochem. J.* **34**, 159 (1940).

<sup>3)</sup> *Eder et Hauser*, *Helv.* **8**, 140 (1925).

au moyen de ces dernières, sinon le développement du micro-organisme peut être extrêmement lent. Lorsque les conditions sont favorables, la surface du milieu se recouvre entièrement d'un tapis mycélien au bout de 8 jours. Le revers du mycélium est d'abord jaune, puis, par suite d'un phénomène d'alcalinisation spontanée du milieu, la couleur passe à l'orangé et enfin au rouge-brun; en même temps une partie notable du pigment diffuse dans le milieu de culture. Au bout de 6 semaines, on peut procéder à l'extraction.

*Extraction du pigment et de l'acide benzoïque.* — L'extraction et la purification du pigment ont été effectuées par des méthodes analogues à celles que nous avons employées dans le cas de la citréoroséine.

Pour extraire le pigment contenu dans le *liquide*, on acidifie à l'acide chlorhydrique, on ajoute 25 % de sel marin et l'on agite plusieurs fois avec de petites quantités d'alcool iso-butylque.

Le *mycélium* a été haché à la machine et pressé. On peut en retirer le pigment au moyen du carbonate de sodium dilué, mais il est préférable d'effectuer une extraction au moyen de l'alcool iso-butylque, le produit obtenu par ce dernier procédé étant plus pur. On laisse donc macérer à froid dans l'alcool isobutylque; au bout de quelques heures, on exprime à la presse et répète l'opération jusqu'à ce que les extraits ne soient plus sensiblement colorés. On réunit les extraits isobutylques provenant du mycélium et du liquide de culture et on les agite avec de petites quantités de soude caustique à 2 % qui s'empare du pigment en se colorant en rouge pourpre. Les liqueurs alcalines réunies sont ensuite acidifiées à l'acide chlorhydrique; la majeure partie du pigment précipite alors sous forme de flocons bruns qu'on essore, lave et sèche. Le filtrat est agité ensuite avec du chloroforme qui s'empare entre autres des traces de roséo-purpurine restées en solution ainsi que de l'acide benzoïque.

La solution chloroformique est évaporée à sec; le résidu contient, à côté de grains de pigment, des longues aiguilles incolores; on les sépare en reprenant par l'éther qui ne dissout que les cristaux incolores. Le résidu obtenu par évaporation de la solution étherée fournit par recristallisation dans l'eau un produit ayant toutes les propriétés de l'acide benzoïque: en particulier il fond à 120°; son mélange avec un échantillon d'acide benzoïque authentique fond à la même température. Le rendement en acide benzoïque est d'environ 20 mgr. par litre de culture.

Dans certains essais, nous avons traité séparément le liquide de culture et le mycélium haché et pressé; nous avons constaté que la majeure partie de l'acide benzoïque se trouve contenue dans le mycélium, ce qui est assez suprenant, car, en raison de sa solubilité notable dans l'eau, on pouvait s'attendre à ce qu'il diffusât dans le liquide. L'acide benzoïque est peut-être en liaison lâche avec certains constituants insolubles du mycélium et ne se trouve libéré que lors de notre extraction par l'alcool isobutylque.

Le pigment brut est ensuite purifié par l'intermédiaire de son dérivé acétylé. 1 partie du produit bien séché et finement pulvérisé est traitée par 5 parties d'un mélange de 95 volumes d'anhydride acétique et de 5 volumes d'acide sulfurique concentré. On chauffe légèrement pour tout dissoudre et on abandonne 15 heures à température ordinaire. Les aiguilles jaunes sont essorées, lavées avec un peu d'anhydride acétique et recristallisées dans l'alcool absolu jusqu'à ce que leur point de fusion atteigne 210°. Pour saponifier le dérivé acétylé, on en suspend 1 gr. dans 30 cm<sup>3</sup> d'alcool méthylique chaud et on ajoute 4 cm<sup>3</sup> de potasse aqueuse à 50 %. On laisse 5 minutes à température ordinaire, puis on dilue de 4 volumes d'eau et on acidifie par l'acide chlorhydrique concentré. La roséo-purpurine précipite immédiatement en fines aiguilles; on la recristallise dans l'acide acétique.

A partir d'un litre de culture on obtient de 35 à 50 mgr. de pigment purifié.

*Propriétés de la roséo-purpurine.*

Le pigment cristallise en aiguilles jaunes qui, en tube capillaire, fondent en se décomposant vers 278—280° (chauffe lente). Si l'on chauffe rapidement, on observe un point de fusion plus élevé; au bloc *Maquenne* le point de fusion instantanée est de 285°.

3,637 mgr. subst. ont donné 8,490 mgr. CO<sub>2</sub> et 1,345 mgr. H<sub>2</sub>O

3,300 mgr. subst. ont donné 2,615 mgr. AgI

C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Calculé	C 63,98	H 4,03	OCH <sub>3</sub> 10,33%
	Trouvé	„ 63,67	„ 4,14	„ 10,47%

Le pigment est très peu soluble dans l'eau et peu soluble dans les dissolvants organiques non hydroxylés; il se dissout assez bien dans l'acide acétique chaud, moins bien dans les alcools méthylique, éthylique et iso-butylique. La solution acétique de roséo-purpurine manifeste une fluorescence rouge-orange sous l'action des rayons ultra-violet. En solution alcoolique, le pigment donne une coloration rouge-brun en présence de chlorure ferrique.

Le pigment se dissout en rouge orange dans l'acide sulfurique concentré. En solution aqueuse, on observe les colorations et les domaines de virage suivants: la couleur est jaune à des p<sub>H</sub> inférieurs à 5,6; à p<sub>H</sub> 5,6—7,5 il se produit un premier virage au rouge-brun; à p<sub>H</sub> 10,2—12,5 on observe un deuxième virage au rouge pourpre. Les couleurs et les domaines de virage des solutions de purpuroxanthine sont très voisins.

*Sel de pyridine.* — Le pigment se dissout facilement dans la pyridine anhydre. Si l'on concentre cette solution dans un dessiccateur sur l'anhydride phosphorique, il se sépare des aiguilles oranges que l'on presse sur une plaque poreuse. Pour l'analyse, on les sèche sur l'anhydride phosphorique dans une atmosphère de pyridine.

24,5 mgr. subst. ont perdu à 120° 4,9 mgr. pyridine

C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> ·C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	Calculé	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N 20,8	Trouvé	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N 20,0%
---	---------	--------------------------------------	--------	---------------------------------------

*Dérivé tri-acétylé.*

Il a été préparé, comme on l'a vu plus haut, par traitement du pigment au moyen d'anhydride acétique, en présence d'acide sulfurique concentré. Par recristallisation dans l'alcool, on obtient de fines aiguilles jaunes insolubles dans les alcalis froids et ne donnant pas de réaction colorée avec le chlorure ferrique. P. d. f. 210°.

3,842 mgr. subst. ont donné 8,720 mgr. CO<sub>2</sub> et 1,47 mgr. H<sub>2</sub>O

2,987 mgr. subst. ont donné 1,770 mgr. AgI

C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Calculé C	61,95	H	4,26	OCH <sub>3</sub>	7,28%
	Trouvé „	61,90	„	4,28	„	7,83%

*Distillation du pigment sur la poudre de zinc.*

Cette opération a été effectuée exactement de la même manière que dans le cas de la citréo-roséine<sup>1)</sup>. On a obtenu ainsi du β-méthyl-anthracène, fondant soit isolément, soit mélangé avec un échantillon authentique, vers 203°.

*Dérivé triméthylé.*

50 mgr. de pigment sont dissous dans 6 cm<sup>3</sup> NaOH 2-n. On méthyle à 5 reprises, chaque fois au moyen de 0,5 cm<sup>3</sup> de sulfate neutre de méthyle et de 2 cm<sup>3</sup> NaOH 2-n. Le précipité est essoré, traité à chaud par la soude caustique diluée, puis lavé à l'eau et séché. Ce produit brut (50 mgr.) est repris par 1 cm<sup>3</sup> d'alcool bouillant.

Une partie (15 mgr.) reste insoluble; on l'essore à chaud et on la recristallise dans 15 cm<sup>3</sup> d'alcool. Fines aiguilles, peu solubles, fondant à 222—224°. Le produit ne donne pas de réaction colorée en présence de chlorure ferrique. Il représente probablement la 4,5,7-triméthoxy-2-oxyméthyl-anthraquinone.

3,842 mgr. subst. ont donné 3,020 mgr. AgI

C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	Calculé OCH <sub>3</sub>	28,3	Trouvé OCH <sub>3</sub>	27,6%
--	--------------------------	------	-------------------------	-------

La fraction plus facilement soluble dans l'alcool chaud fond, après recristallisation dans l'alcool, à 187°. Son mélange avec le dérivé tétraméthylé de la citréo-roséine<sup>1)</sup> fond à la même température.

*Oxydation de la roséo-purpurine; isolement de l'acide 3-méthoxy-benzène-1,2,5-tricarbonique.*

100 mgr. de pigment sont suspendus dans 3 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute 1 cm<sup>3</sup> NaOH n., puis on introduit goutte à goutte en agitant continuellement 4 cm<sup>3</sup> de permanganate de potassium à 6%; la réduction s'effectue rapidement. On ajoute encore 7 cm<sup>3</sup> de permanganate et on chauffe durant 2 heures et demie au bain-marie. Après refroidissement, l'excès de permanganate est réduit par addition de bisulfite de sodium; on essore ensuite le bioxyde de manganèse qu'on lave soigneusement à l'eau. Le liquide est acidifié à l'acide

<sup>1)</sup> Helv. 23, 242 (1940).

chlorhydrique et extrait à l'éther dans un appareil à extraction continue. La solution étherée laisse, après évaporation, un résidu cristallisé (60 mgr.) peu soluble dans l'eau, fondant vers 230° et qui consiste probablement en acides  $\alpha$ -cétoniques dérivés de l'acide phtalonique. Sans chercher à purifier ce produit, on le soumet à une nouvelle oxydation permanganique, en milieu acide cette fois. La substance est dissoute dans 2 cm<sup>3</sup> NaOH 0,5-n.; on filtre de quelques flocons insolubles, puis on ajoute 2 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique à 10% et on introduit 0,3 cm<sup>3</sup> de permanganate de potassium à 6% qu'on laisse couler goutte à goutte en agitant continuellement. L'oxydation s'effectue rapidement; en même temps il se produit un fort dégagement de gaz carbonique. Le liquide se remplit finalement de fines aiguilles. On décolore l'excès de permanganate par addition de bisulfite de sodium. Après un séjour de quelques heures à 0°, on essore les cristaux, on les lave à l'eau glacée et on les recristallise dans l'eau chaude. Longues et fines aiguilles peu solubles dans l'eau froide, assez solubles dans l'eau chaude. Le produit fond à 251° avec dégagement gazeux; par refroidissement la substance fondue cristallise rapidement; elle fond alors à 250°, mais sans dégagement gazeux.

4,231 mgr. subst. ont donné 7,785 mgr. CO <sub>2</sub> et 1,28 mgr. H <sub>2</sub> O
5,835 mgr. subst. ont donné 5,96 mgr. AgI
12,00 mgr. subst. ont neutralisé (phénolphtaléine) 1,52 cm <sup>3</sup> NaOH 0,1-n.
C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> Calculé C 49,99    H 3,35    OCH <sub>3</sub> 12,92%    Pds. équiv. 80
Trouvé    ,, 50,18    ,, 3,38    ,, 13,50%    ,,    ,,    79

#### *Acide 3-méthoxy-5-carboxy-phtalonique.*

Le 3-méthoxy-1,5-diméthyl-2-acétyl-benzène a été préparé à partir de l'éther méthylique du 1,3,5-xylénol commercial (produit de la *Gesellschaft für Teerverwertung*, Duisburg-Meiderich) par traitement au moyen du chlorure d'acétyle en présence de chlorure d'aluminium. Contrairement aux indications de *v. Auwers* et *Borsche*<sup>1)</sup>, nous avons constaté que la majeure partie du produit de réaction est soluble dans les alcalis et consiste en 3-oxy-1,5-diméthyl-2-acétyl-benzène; il se produit donc une forte déméthylation sous l'action du chlorure d'aluminium. Par traitement subséquent au moyen du sulfate neutre de méthyle, il est d'ailleurs facile de transformer ce produit en son dérivé méthylé fondant à 48°.

1,8 gr. de 3-méthoxy-1,5-diméthyl-2-acétyl-benzène ont été suspendus dans 180 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute 10,7 gr. de permanganate de potassium (correspondant à 10 at. O actif) et l'on maintient 3 heures à l'ébullition à reflux. Le bioxyde de manganèse est essoré et lavé soigneusement. Le liquide alcalin est extrait à l'éther; on acidifie ensuite à l'acide chlorhydrique et l'on épuise de nouveau à l'éther. Le deuxième extrait étheré laisse, après évaporation, un résidu entièrement cristallisé (1,9 gr.) qu'on purifie par recristallisation

<sup>1)</sup> B. 48, 1706 (1915).

dans un mélange d'éther anhydre et d'éther de pétrole. Tablettes assez solubles dans l'eau, fondant en se décomposant vers 240°.

3,611 mgr. subst. ont donné 6,538 mgr. CO<sub>2</sub> et 0,880 mgr. H<sub>2</sub>O  
0,1034 gr. subst. ont neutralisé (phénolphtaléine) 11,8 cm<sup>3</sup> NaOH 0,1-n.

C <sub>11</sub> H <sub>8</sub> O <sub>8</sub>	Calculé C	49,24	H	3,00%	Pds. équiv.	89
	Trouvé „	49,38	„	2,73%	„	88

*Acide 3-méthoxy-benzène-1,2,5-tricarbonique.*

800 mgr. du composé précédent sont dissous dans 30 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique à 5%. On ajoute goutte à goutte 3,5 cm<sup>3</sup> de permanganate de potassium à 6%. Les premières gouttes se décolorent lentement, puis l'oxydation devient rapide. Il se produit un violent dégagement de gaz carbonique et des aiguilles blanches se séparent. Après addition d'un peu de bisulfite de sodium on essore le produit et on le recristallise dans l'eau chaude. P. d. f. 251°. Le produit a toutes les propriétés de l'acide C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> obtenu par oxydation de la roséo-purpurine; le mélange des substances des deux origines fond également à 251°.

Anhydride. — On peut le préparer en chauffant l'acide au-dessus de son point de fusion; il est préférable de procéder de la manière suivante:

60 mgr. d'acide tricarbonique sont chauffés deux heures à l'ébullition à reflux avec 0,5 cm<sup>3</sup> d'anhydride acétique. On évapore dans le vide; le résidu est débarrassé de son dissolvant de cristallisation par une heure de chauffe à 110°; on le recristallise ensuite dans le m-xylène. P. de f. 252°. Cet anhydride a été préparé également à partir de l'acide obtenu par dégradation de la roséo-purpurine.

4,082 mgr. subst. ont donné 8,061 mgr. CO<sub>2</sub> et 1,04 mgr. H<sub>2</sub>O

C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	Calculé C	54,04	H	2,72%
	Trouvé „	53,86	„	2,85%

RÉSUMÉ.

1) La roséo-purpurine, pigment de *Penicillium roseo-purpureum Dierckx*, est un dérivé mono-méthylé de la citréo-roséine, pigment de *Penicillium citreo-roseum Dierckx*. Elle représente la 4-méthoxy-5,7-dioxy-2-oxyméthyl-anthraquinone.

2) Cultivé sur le milieu de *Czapek-Dox*, le *Penicillium roseo-purpureum Dierckx* produit, d'autre part, de l'acide benzoïque.

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