

ÉTUDE DU MÉTABOLISME TERNAIRE DE *PENICILLIUM BREVI-COMPACTUM*

I. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DU MILIEU DE CULTURE

par

PAUL GODIN*

*Laboratoire de Microbiologie, Institut Agronomique,
Université de Louvain (Belgique)*

INTRODUCTION

Le *Penicillium brevi-compactum* a d'abord été étudié par DIERCKS¹, puis par BOURGE², ZALESKY³ et THOM⁴, pour ne citer que les principaux auteurs qui se sont cantonnés dans l'examen morphologique et le classement systématique de cette moisissure. Désignant initialement une espèce définie, le terme de *brevi-compactum* engloba bientôt tout un groupe de *Penicillium* dans lequel on distingua différentes espèces⁵. Les recherches relatées ici ont porté sur la souche Db182A de la mycothèque du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de LOUVAIN, souche cataloguée comme *Penicillium brevi-compactum*.

La biochimie de ce groupe de moisissures a été étudiée par RAISTRICK *et coll.* qui isolèrent du milieu de culture et identifièrent cinq substances phénoliques⁶⁻¹¹: l'acide mycophénolique: $C_{17}H_{20}O_8$, le 3,5-dihydroxy, 2-carboxybenzylméthylcétone: $C_{10}H_{10}O_5$, le 3,5-dihydroxy, 2-carboxyphénylacétylcarbinol: $C_{10}H_{10}O_6$, l'hydrate de 3,5-dihydroxy, 2-carboxybenzoylméthylcétone: $C_{10}H_{10}O_7$, ou $C_{10}H_8O_6-H_2O$, et l'acide 3,5-dihydroxy phtalique: $C_8H_8O_6$.

Ces mêmes auteurs ont encore extrait du mycélium de diverses espèces de ce groupe de moisissures, l'*i*-érythritol et le palmitate d'ergostéryle¹².

Nous nous sommes proposé dans ce travail, de déceler par la chromatographie de partage sur papier, les différentes substances ternaires produites par la moisissure et libérées dans le milieu de culture. Ces recherches sont le point de départ d'une étude approfondie du métabolisme ternaire de *Penicillium brevi-compactum*, étude susceptible de nous apporter des renseignements d'intérêt fort général, notamment à propos de la biosynthèse des composés benzéniques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Conditions culturelles

Le milieu de culture employé est le milieu CZAPEK-DOX dont la composition est la suivante: 50 g de glucose, 2 g de $NaNO_3$, 0.5 g de KCl, 1 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $MgSO_4-7 H_2O$, 0.02 g de $FeSO_4-7 H_2O$, 1000 g d'eau distillée.

* Chargé de Recherches du F.N.R.S.

La moisissure est ensemencée dans des erlenmeyers de 500 ml de capacité, renfermant dans le cas des cultures stationnaires 200 ml de milieu de culture et dans le cas des cultures immergées 50 ml de la même solution nutritive. L'incubation a lieu à la température optimum de développement du microbe (23–25° C). L'agitation des cultures immergées est obtenue en fixant les erlenmeyers de culture au plateau d'un agitateur animé d'une rotation plane horizontale d'environ 100 révolutions par minute.

Méthodes chromatographiques

Du fait de la présence de sels et d'autres composés assez concentrés dans le milieu de culture, il n'est pas possible, sans modifier le R_F de la plupart des substances, de concentrer le dépôt sur le papier au delà d'une certaine limite. Pour éviter "l'effet de sel", nous nous sommes donc limités au nombre de 20 microgouttes par essai, soit environ 7/100 de ml. Sauf mention spéciale, on ne fait subir aucun traitement préliminaire aux solutions à chromatographier; elles sont utilisées telles quelles, après une simple filtration. Pour toutes les analyses chromatographiques, nous avons employé la méthode ascendante¹³, sauf lors de l'utilisation du phénol comme solvant; dans ce cas seulement, nous appliquons la technique descendante. Le papier employé est le Whatman N° 4. L'identification des substances résulte de la comparaison des R_F avec ceux d'échantillons authentiques et, dans la mesure du possible, de l'emploi de révélateurs spécifiques.

Les systèmes de solvants utilisés sont les suivants:

- pour les sucres et leurs dérivés, le phénol saturé d'eau: Ph;
- pour les acides et substances cétoniques non volatils, un mélange de 2 volumes de *n*-butanol saturé d'eau et d'un volume d'acide formique à 90%: BF¹⁴;
- pour les substances phénoliques, les acides et composés cétoniques non volatils, la phase surnaissante d'un mélange de 4 volumes de *n*-butanol, de 5 volumes d'eau et d'un volume d'acide acétique: BAc¹⁵;

Les révélateurs employés sont:

- pour les sucres et leurs dérivés, soit l'oxalate acide d'aniline¹⁶, soit le réactif au naphtorésorcinol¹⁷, soit le dichlorhydrate de *o*-phénylènediamine¹⁸;
- pour les acides, le vert de bromocrésol à 0.05% dans l'éthanol et, pour les oxyacides, le chlorure ferrique à 0.5%;
- pour les composés cétoniques, le réactif de BRADY (2,4-DNP);
- pour les substances phénoliques, le chlorure ferrique à 0.5%.

Les résultats expérimentaux

Cultures stationnaires

La consommation totale du glucose du milieu de culture est réalisée en 25–27 jours (polarimétrie).

On décèle dans la solution de métabolisme, les substances suivantes synthétisées par la moisissure:

— *l'arabinose* décelable après cinq jours de culture, est toujours faiblement concentré. Caractérisation: spot rose à l'oxalate acide d'aniline. R_F dans Ph: 0.58–0.60.

— *le ribose* apparaît quelques jours après l'arabinose et sa concentration devient légèrement plus élevée que celle du premier pentose.

Caractérisation: spot rose à l'oxalate acide d'aniline. R_F : 0.66–0.68 dans Ph.

— *l'acide glucuronique*, en très minime quantité, se décèle à partir du cinquième jour de culture.

Caractérisation: spot jaune-brun à l'oxalate acide d'aniline, virant ultérieurement au rose brique; tache bleue avec le réactif au naphtorésorcinol, par chauffage en atmosphère humide. R_F dans Ph: 0.1–0.2.

— *l'acide 2-cétogluconique* mis en évidence en très faible quantité après 26–28 jours de culture, il disparaît 2–3 jours après consommation totale du glucose.

Caractérisation: spot rose à l'oxalate acide d'aniline; tache brun-doré au dichlorhydrate de *o*-phénylènediamine. R_F dans Ph: 0.19.

— *l'acide gluconique* est décelé en quantité notable dès le début de la culture et ne disparaît complètement que 2–3 jours après consommation totale du glucose.

Caractérisation: acide; spot jaune au FeCl_3 . R_F : 0.15 dans BF et 0.1 dans BAc.

— *l'acide citrique* est décelé après 15 jours de culture. Il reste faiblement concentré et disparaît avant le glucose.

Caractérisation: acide; spot jaune au FeCl_3 . R_F : 0.33 dans BF.

— *l'acide malique* accompagne l'acide citrique à aussi faible concentration que ce dernier.

Caractérisation: acide; tache jaune au FeCl_3 . R_F : 0.41 dans BF.

— *la dihydroxyacétone* faiblement concentrée disparaît en même temps que le glucose.

Caractérisation: spot jaune-brun, en traînée, à la 2,4-DNP. R_F : 0.27–0.35 dans BF, 0.30–0.33 dans BAc.

— *les substances phénoliques* $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_6$ et $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ne sont pas séparables par chromatographie. Elles donnent des spots qui se superposent et présentent les mêmes caractères d'identification. Ce sont les composés phénoliques les plus concentrés dans le milieu et les premiers décelés.

Caractérisation: acides; cétoniques (spot jaune canari à la 2,4-DNP); tache pourpre amarante au FeCl_3 . R_F dans BAc: 0.80 pour $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_6$ et 0.82 pour $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7$.

— *l'acide phénolique* $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$ est présent en très faible quantité et transitoirement.

Caractérisation: acide; pourpre-amarante au FeCl_3 ; teinte jaune-brun peu accusée à la 2,4-DNP. R_F dans BAc: 0.87.

— *l'acide 3,5-dihydroxyphthalique* n'est décelable, en très faible quantité, qu'après 15–20 jours de culture.

Caractérisation: acide; teinte pourpre-amarante au FeCl_3 . R_F dans BAc: 0.505.

— *l'acide mycophénolique* n'est décelable qu'après extraction par l'acétate d'éthyle du milieu de culture acidifié et concentration de l'extrait.

Caractérisation: spot violet-bleu au FeCl_3 . R_F dans BAc: 0.935.

La disparition de tous les corps trouvés sauf les substances phénoliques accompagne celle du glucose.

Cultures immergées

La consommation de tout le glucose du milieu de culture est réalisée en 7–8 jours.

On décèle par chromatographie les composés suivants formés par la moisissure:

— *l'arabinose* en très faible quantité.

— *l'acide gluconique* assez fortement concentré ne disparaît qu'après consommation totale du glucose.

— *l'acide citrique* est présent en quantité notable.

— *l'acide malique* est également présent en quantité notable.

— *l'acide α -cétooglutarique* est très faiblement concentré.

Caractérisation: acide; cétonique. R_F : 0.42 dans BAc, 0.57 dans BF.

— *l'acide succinique* est très faiblement concentré.

Caractérisation: acide. R_F dans BF: 0.67.

— *l'acide fumarique* est plus faiblement concentré encore que le précédent.

Caractérisation: acide. R_F dans BF: 0.82.

— *la dihydroxyacétone* est assez faiblement concentrée.

— *les substances phénoliques* $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_6$ et/ou $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_7$ sont présentes à l'état très dilué.

— *les autres substances phénoliques* ne sont décelables qu'après extraction par l'acétate d'éthyle du milieu de culture acidifié et concentration poussée de la solution d'extraction.

La disparition de tous les corps trouvés sauf les acides phénoliques va de pair avec celle du glucose.

Remarque. Dans les deux modes de culture dont il est question ici, aucun acide volatil n'a pu être décelé par chromatographie de la solution de métabolisme.

DISCUSSION

Grâce à l'analyse chromatographique, on a donc pu déceler dans la solution de métabolisme de *Penicillium brevi-compactum*, à côté des cinq substances phénoliques identifiées par RAISTRICK *et coll.*, les acides gluconique, glucuronique, 2-cétogluconique, citrique, malique, α -cétoglutarique, succinique et fumarique, l'arabinose, le ribose et la dihydroxyacétone.

Les résultats obtenus appellent deux genres de commentaires. Le premier est relatif à la différence existant entre le métabolisme d'une culture stationnaire et celui d'une culture immergée. Le second concerne le rôle joué par les différents composés trouvés, dans le métabolisme de *Penicillium brevi-compactum*.

L'accroissement de l'aération résultant de l'agitation des cultures est défavorable à la biosynthèse des substances phénoliques, quoique l'intensité du métabolisme s'en trouve accrue (vitesse de consommation du glucose accélérée). Ceci va de pair avec la mise en évidence dans la solution de métabolisme, des acides α -cétoglutarique, succinique et fumarique, corps non décelés dans le cas des cultures stationnaires, et avec une augmentation de la teneur de cette solution en acides citrique et malique. Par contre le ribose et les acides 2-cétogluconique et glucuronique n'y sont plus remarqués. Il semble donc que l'aération accrue dévie le métabolisme de la moisissure aux dépens des substances phénoliques, mais au profit des acides di- et tricarboxyliques. Peut-être existe-t-il un équilibre entre le schéma de transformation de ces derniers acides et le processus de biosynthèse des phénols, équilibre déplacé en faveur des premiers par une augmentation de l'aération.

La production d'acide gluconique par de nombreuses moisissures des genres *Penicillium* et *Aspergillus* est connue depuis longtemps¹⁹. Mais ce n'est que tout récemment que SIMONART ET GODIN²⁰ ont signalé la présence des acides glucuronique et 2-cétogluconique, du ribose et de l'arabinose dans la solution de métabolisme de *Penicillium brevi-compactum*. La production de ces substances de même que celle de l*i*-érythritol, résulte probablement de l'existence chez cette moisissure du schéma de dégradation du glucose appelé oxydation directe ou phosphorylation oxydative des glucides²¹.

La mise en évidence des acides citrique, α -cétoglutarique, succinique, fumarique et malique dans la solution de métabolisme de *Penicillium brevi-compactum*, porte à croire que le cycle des acides tricarboxyliques fait partie du métabolisme ternaire de cette moisissure. Les travaux de WALKER *et coll.*²²⁻²⁴ semblent d'ailleurs confirmer l'hypothèse suivant laquelle ce cycle existe bien chez les moisissures.

Les résultats de l'analyse chromatographique du milieu de culture nous permettent donc d'avancer trois hypothèses de travail sur lesquelles nous nous sommes basés dans nos recherches. On verra, dans diverses publications ultérieures, qu'il résulte de ces travaux une confirmation très nette des dites hypothèses.

REMERCIEMENTS

L'auteur exprime sa reconnaissance au Professeur PAUL SIMONART de l'Université de LOUVAIN pour tout l'intérêt qu'il a porté à ces recherches et pour la large hospitalité qu'il lui a accordée dans ses laboratoires.

Bibliographie p. 118.

RÉSUMÉ

L'analyse chromatographique de la solution de métabolisme de *Penicillium brevi-compactum* nous a permis de déceler différentes substances ternaires produites par cette moisissure. Les résultats obtenus font l'objet d'une discussion et de la présentation d'hypothèses de travail.

SUMMARY

Chromatographic analysis of *Penicillium brevi-compactum* metabolic solution has revealed different ternary substances produced by that mould. The results obtained are the object of a discussion and of the presentation of working hypotheses.

ZUSAMMENFASSUNG

Die chromatographische Analyse einer Metabolismenlösung von *Penicillium brevi-compactum* erlaubte uns verschiedene Ternärsubstanzen welche dieser Schimmel produziert, anzuzeigen. Die erhaltenen Resultate werden einer Diskussion unterzogen; auf Grund dieser Resultate werden Arbeitshypothesen vorgeschlagen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. DIERCK, *Essai sur la révision du genre Penicillium Link*, Soc. Sci., Bruxelles, 1901.
- ² P. BOURGE, *La Cellule*, 33 (1923) 331.
- ³ Z. ZALESKI, *Bull. intern. acad. polon. sci., Classe sci. math. nat. Sér. B*, (1927) 417, 459, 515.
- ⁴ C. THOM, *The Penicillia*, Baltimore, 1930.
- ⁵ J. C. GILMAN, *A Manual of Soil Fungi*, The Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1945.
- ⁶ P. W. CLUTTERBUCK, A. E. OXFORD, H. RAISTRICK ET G. SMITH, *Biochem. J.*, 26 (1932) 1441.
- ⁷ A. E. OXFORD ET H. RAISTRICK, *Biochem. J.*, 26 (1932) 1902.
- ⁸ A. E. OXFORD ET H. RAISTRICK, *Biochem. J.*, 27 (1933) 634.
- ⁹ P. W. CLUTTERBUCK ET H. RAISTRICK, *Biochem. J.*, 27 (1933) 654.
- ¹⁰ J. H. BIRKINSHAW, A. BRACKEN, E. N. MORGAN ET H. RAISTRICK, *Biochem. J.*, 43 (1948) 216.
- ¹¹ J. H. BIRKINSHAW, H. RAISTRICK ET D. J. ROSS, *Biochem. J.*, 50 (1952) 630.
- ¹² A. E. OXFORD ET H. RAISTRICK, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1176.
- ¹³ R. J. WILLIAMS ET H. KIRBY, *Science*, 107 (1948) 481.
- ¹⁴ K. Y. CHOW, *Mémoires de l'Institut Agronomique*, Univ. Louvain, 4 (1951).
- ¹⁵ E. C. BATE-SCHMITH, in *Partition Chromatography*, *Biochem. Soc. Symposia*, No. 3, édité par R. T. WILLIAMS ET R. L. M. SYNGE, Cambridge Univ. Press, 1950.
- ¹⁶ R. H. HORROCKS ET G. B. MANNING, *Lancet*, 256 (1949) 1042.
- ¹⁷ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- ¹⁸ M. C. LANNING ET S. T. COHEN, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 109.
- ¹⁹ J. W. FOSTER, *Chemical Activities of Fungi*, New York Acad. Press, 1949, p. 458.
- ²⁰ P. SIMONART ET P. GODIN, *Bull. soc. chim. Belg.*, 60 (1951) 446.
- ²¹ J. DE LEY, *Medel. Vlaamse Chem. Vereniging*, 1 (1952) 1.
- ²² T. K. WALKER, *Advances in Enzymol.*, 9 (1949) 545.
- ²³ M. I. D. GHUGHTAI, A. A. PEARCE ET T. K. WALKER, *Biochem. J.*, 47 (1950) 135.
- ²⁴ M. I. D. GHUGHTAI ET T. K. WALKER, *Biochem. J.*, 48 (1951) 524.

Reçu le 27 décembre 1952