

86. A. TONOLO, G. C. CASINOVI e G. B. MARINI BETTÒLO. — Sul pigmento di uno *Streptomyces* sp. - Nota I. Produzione ed isolamento di un nuovo pigmento da microorganismi: la Streptocianina. (*)

Riassunto. — Vengono descritti alcuni metodi per la produzione in coltura sommersa di un pigmento diffusibile prodotto da uno *Streptomyces* sp. non identificato ma appartenente con molta probabilità alla specie descritta da WAKSMAN come *S. coelicor*.

Sono stati inoltre studiati i mezzi colturali più idonei per la produzione del pigmento in relazione anche alla struttura del micelio. Sono stati ottenuti mutanti, con l'impiego di raggi U.V., che sono stati adoperati per lo studio della biosintesi del pigmento.

Il pigmento, solubile nel terreno di coltura a pH 7,5 con colorazione azzurra, presenta invece in ambiente acido colorazione rossa che vira all'azzurro per aggiunta di alcali.

Per le sue proprietà generali questo pigmento rientra in quel gruppo di pigmenti degli Actinomiceti, studiati da diversi Autori ed in particolare da MULLER, WAKSMAN, GAUSE, CONN e CONN, ROBINSON e collaboratori e anche da Oxford, ma dei quali ancora non si conosce la struttura, e si riavvicina anche alla Actinorodina di PLOTHO, PINI e BROCKMANN sebbene non sia identificabile con nessuno di questi.

Di questo pigmento che proponiamo di chiamare Streptocianina sono riportati numerosi dati analitici e chimico-fisici insieme ai primi risultati dello studio della sua costituzione che permettono di attribuirgli una struttura chinonica.

Résumé. — On décrit certains procédés pour la production en culture submergée d'un pigment diffusible produit par un *Streptomyces* sp. qui n'est pas identifié mais qui appartient très probablement à l'espèce décrite par Waksman comme *S. coelicor*.

On a en outre étudié les milieux de culture plus propices à la production du pigment par rapport aussi à la structure du mycélium. On a obtenu des mutants, avec l'emploi des rayons U. V., qui ont été utilisés pour l'étude de la biosynthèse du pigment.

Le pigment, soluble dans le terrain de culture à pH 7,5 avec une coloration bleue, se présente au contraire dans un milieu acide avec une coloration rouge qui tourne au bleu quand on ajoute des substances alcalines.

Par ses propriétés générales ce pigment appartient à ce groupe de

(*) Comunicazione tenuta al VI Congresso Internazionale di microbiologia - Roma, 6-12 sett. 1953.

pigments des Actinomycètes, étudiés par différents auteurs et en particulier par Muller, Waksman, Gause, Conn et Conn, Robinson et Collaborateurs et aussi par Oxford, mais desquels on ne connaît pas encore la structure, et il se rapproche aussi à l'Actinorodine de Plotho, Pini et Brockmann bien qu'il ne puisse être identifié avec aucun de ceux-ci.

De ce pigment que nous proposons d'appeler Streptocyanine on reporte de nombreuses données analytiques et chimico-physiques avec en outre les premiers résultats de l'étude de sa constitution qui permettent de lui attribuer une structure quinonique.

Summary. — Several methods are described for the production in submerged culture of a diffusible pigment from a *Streptomyces* sp.

The mould is not identified but is thought to belong to the species described by Waksman such as *S. coelicolor*.

We have also studied the best conditions for the production of the pigment in relation also to the structure of the mould. By the use of U. V. light we have obtained mutants which have been used for the study of biosyntheses of the pigment.

We propose to call the pigment Streptocyanin and we report analytical, physico-chemical data together with the first results of the study of its constitution, which together permit us to postulate a quinoid structure.

Zusammenfassung. — Es werden einige Methoden zur Erzeugung auf untertauchter Kulturen eines diffusierbaren Pigmentes aus *Streptomyces* sp. beschrieben.

Der Schimmel wurde nicht identifiziert, doch dürfte er zu den von Waksman beschriebenen Arten, so wie zu *S. coelicolor* gehören.

Es wurden auch die günstigsten Bedingungen zur Produktion des Pigmentes in Bezug auf die Morphologie des Schimmels geprüft.

Wenn mit U. V. Licht gearbeitet wird erhält man Mutanten die zum Studium der Biosynthese des Pigmentes verwendet werden.

Es wird vorgeschlagen das Pigment Streptocyanin zu benennen es werden analytische, sowie physikalisch-chemische Daten wiedergegeben sowie die Ergebnisse der Ermittlung der Konstitution, die gemeinsam auf eine chinoiden Struktur hinweisen.

E' noto che numerose specie di *Streptomyces* sono capaci di produrre pigmenti di diversi colori localizzati nel micelio vegetativo o diffusi nel terreno di coltura.

Tra queste specie, particolarmente interessanti sono quelle caratterizzate da un pigmento diffusibile, azzurro in ambiente alcalino e rosso in ambiente acido.

Di essi si sono occupati fino dal 1908 il MULLER ⁽¹⁾ che ha stabilito le condizioni di sviluppo dell'*A. coelicolor*, in seguito dal BEIJERINCK ⁽²⁾ che ha studiato la produzione di un pigmento azzurro dello *Actinococcus cyaneus* (*Proactinomyces cyaneus*).

Successivamente il WAKSMAN ha passato in rassegna numerosi pigmenti di questo tipo prodotti dagli Attinomiceti ⁽³⁾.

Fino al 1936 nessuna ipotesi era stata avanzata sulla natura chimica di questi pigmenti. Sono appunto di questo periodo le ricerche del KRISS ⁽⁴⁾ sull'*A. coelicolor*, che lo portano ad ammettere che si tratta di una antocianina.

Di opinione contraria sono stati ERIKSON, OXFORD e ROBINSON ⁽⁵⁾ che dimostrano la poca probabilità di questa tesi e che, in base al contenuto di azoto di questi pigmenti, avanzano l'ipotesi che si tratti di poliossifenzine, come ad esempio la iodinina ⁽⁶⁾.

Altra tesi non suffragata da una profonda indagine chimica è quella di J. H. CONN e di J. CONN ^(7, 8) che avendo studiato i pigmenti di alcuni Attinomiceti di questo tipo (*A. violaceus-ruber*), ammettono si tratti di prodotto del tipo della azolitmina.

GAUSE ⁽⁹⁾ e BRAZNIKOVA ⁽¹⁰⁾ avendo isolato da un *Proactinomyces cyaneus antibioticus* un pigmento, la litmocidina, dotato di elevate proprietà antibiotiche, sostengono, secondo l'opinione di KRISS, che si tratti di un antociano, senza però dare nessuna dimostrazione, così che OXFORD, riprendendo nel 1946 lo studio di questi pigmenti ed in particolare quello dell'*A. coelicolor*, sostiene che tutte le precedenti ipotesi chimiche sono senza fondamento e vanno rivedute ab initio ⁽¹¹⁾.

In seguito, nel 1949, BROCKMANN, PINI e PLOTTO ⁽¹²⁾ hanno isolato da un *Actinomyces* non classificato, denominato *Actinomyces* ceppo 100, un pigmento, l'Actinorodina, per la quale gli studi prima effettuati fanno ammettere con molta probabilità la costituzione di un poliossichinone.

⁽¹⁾ Zentr. Bakt. Parasit., 46: 195 (1908).

⁽²⁾ Folia Micr. Delft, (1913); C. 1916 I, 768.

⁽³⁾ J. Bact., 39: 549 (1940).

⁽⁴⁾ C. R. Ac. Sc. URSS, 4: 274 (1936); C. A., 31: 2638 (1937).

⁽⁵⁾ Nature, 142: 211 (1938).

⁽⁶⁾ CLEMO e Mc ILVAIN - Soc., 479 (1938).

⁽⁷⁾ J. Bact., 42: 791 (1941).

⁽⁸⁾ J. Bact., 46: 133 (1943).

⁽⁹⁾ J. Bact., 51: 649 (1946).

⁽¹⁰⁾ J. Bact., 51: 633 (1946).

⁽¹¹⁾ OXFORD - J. Bact., 51: 267 (1946).

⁽¹²⁾ Ber., 83: 161 (1930).

Dato che la questione si presentava ancora insoluta, benchè affrontata da numerosi studiosi, e per l'importanza sempre crescente dello studio degli *Streptomyces* e del loro metabolismo, ci è sembrato interessante, avendo avuto a disposizione dal Prof. Rita nel 1952 un ceppo di *Streptomyces* che produce un'intensa pigmentazione azzurra, di effettuarne lo studio microbiologico e chimico.

Tale studio, del quale qui riportiamo i risultati preliminari, è stato affrontato in maniera completamente diversa da quella seguita dagli Autori che finora si sono occupati del problema e cioè è stato studiato lo sviluppo in terreno sintetico (KH_2PO_4 g. 1; MgSO_4 g. 0,5; KCl g. 0,5; FeSO_4 g. 0,01; glicerina g. 30; NaNO_3 g. 2; H_2O distillata cc. 1000), sia su agar che in cultura sommersa.

In tali condizioni, che sono state realizzate dopo un accurato studio preliminare, è possibile far sviluppare lo *Streptomyces* in culture di

TABELLA N. 4

Utilizzazione di varie fonti di Carbonio dopo 12 giorni di sviluppo in culture su agar

Ceppi	SC	SC R ₁	SC R ₄	SC B ₂	SC B ₃	SC B ₆
Glucosio	++ B	++ Rm	++ R	++ N	++ N	++ N
Glicerina	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	++ N
Saccarosio	---	---	---	---+ N	---+ N	---
Destrina	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	+ N
Amido	+ B	+ Rm	+ Rm	++ N	++ N	++ N
Ac. citrico	---	---	---	+ N	+ N	---
Lattosio	++ B	++ Rm	++ Rm	+ N	---+ N	---
Galattosio	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	++ N
Xilosio	+ N	+ Rm	+ N	+ N	+ N	+ N
Sorbito	---	---+ N	---	---	---	---
Inosite	++ B	++	+ N	---	---	---
Raffinosio	++ B	++ N	+ N	++ N	---+ N	---
Cellobiosio	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	++ N
Inulina	---	---	---	---	---	--- N
Dulcite	---	---	---	---	---	---
Mannite	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	++ N
Arabinosio	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	---
Mannosio	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	++ N
Maltosio	++ B	++ Rm	++ Rm	++ N	++ N	++ N
Controllo	---	---	---	---	---	---

Leggenda:

++ : crescita ottima; + : crescita discreta; ---+ : crescita scarsa --- : crescita nulla; B : pigmentazione azzurra; Rm : pigmentazione rossa limitata al micelio vegetativo; N : pigmentazione assente; SC : *Streptomyces* S.C.; SC R₁, SC R₄ : Mutanti rossi; SC B₂, SC B₃, SC B₆ : Mutanti bianchi.

circa 200 litri, facendo uso di speciali fermentatori studiati da CHAIN e PALADINO (13), ottenendo una notevolissima produzione di pigmento diffusibile, pari a circa un quarto del peso secco del micelio, ed un prodotto abbastanza omogeneo ed abbondante per poter iniziarne lo studio chimico.

La possibilità di far sviluppare il microrganismo in assenza di agar consente di poter seguire con maggior facilità i prodotti del metabolismo.

Da un punto di vista microbiologico, oltre che l'adattamento del ceppo alla cultura sommersa, sono state studiate le caratteristiche morfologiche e di sviluppo del ceppo stesso su diversi terreni. Ciò ha portato a concludere che lo *Streptomyces (S.C.)* seppure si differenzi dallo *S. coelicolor* per la maggiore intensità di pigmentazione, non si può in base

TABELLA N. 2

Utilizzazione di varie fonti di Carbonio dopo 12 giorni in cultura sommersa (*)

Ceppi	SC	SC R ₁	SC B ₆
Glucosio	++ B	++ R	++ N
Glicerina	++ B	++ R	++ N
Saccarosio	+— N	+— N	+— N
Destrina	++ V	++ R	+ N
Amido	++	+ R	++ N
Acido citrico	— —	— —	— —
Lattosio	+ B	+ R	+— N
Galattosio	++ B	++ R	++ N
Xilosio	+ B	+ R	+ N
Sorbite	— N	+ R	+ N
Inosite	+ B	+ R	+ N
Raffinosio	+ B	+ R	— —
Cellobiosio	++ BV	++ R	++ N
Inulina	+ N	+ R	+ N
Dulcite	+ N	+— N	+— N
Mannite	++ B	++ R	— —
Arabinosio	++ V	++ R	++ N
Mannosio	++ B	++ R	+ N
Maltosio	+ B	+ R	+ N
Controllo	+—	+—	+—

Leggenda :

++ : crescita ottima; + : crescita discreta; +— : crescita scarsa; — — : crescita nulla; B : pigmentazione azzurra; R : pigmentazione rossa; BV : pigmentazione violacea; N : pigmentazione assente.

(*) Sono state usate heute da 300 cc. con 50 cc. di terreno sintetico prima descritto contenente i vari zuccheri alla concentrazione dell'1%, ed agitate su shaker traslatorio.
 (13) PALADINO, UGOLINI, CHAIN: Rend. Ist. Sup. Sanità - English Edition, 17: 87 (1954).

alle altre proprietà morfologiche (cfr. parte sperimentale) classificare come una « species nova », almeno per ora.

Per cercare di chiarire la biosintesi del pigmento, che data la sua elevata percentuale costituisce certamente il principale prodotto del ricambio di questo microrganismo, abbiamo ottenuto dei mutanti per trattamento con raggi U.V.

In questo modo sarebbe stato possibile indagare quali alterazioni essi abbiano subito nel metabolismo e a quale precursore si può arrestare la sintesi in questi mutanti.

Si sono così isolati ceppi violacei, ceppi rossi e ceppi incolori. Mentre i ceppi violacei non sono stabili e dopo due passaggi cominciano a pig-

TABELLA N. 3 (*)

Utilizzazione di aminoacidi e di altri composti come unica fonte di carbonio in terreno sintetico agarizzato.

Ceppi	SC	SC R ₁	SC B ₆
Leucina	+ B	+— R	---
Asparagina	+ R	+— R	---
Glicocola	+ R	++ R	---
Glutazione	+— R	---	---
Valina	---	---	---
Norleucina	---	---	---
Cistina	---	+	---
Serina	+ R	+— R	---
Ac. aspartico	---	---	---
Triptofano	---	---	---
Ossiprolina	+— R	---	---
Tirosina	+	---	---
Acido glutammico	---	---	---
Fenilalanina	+— N	---	---
Arginina	---	---	---
Alanina	---	---	---
Isoleucina	---	---	---
Cinurenina	---	---	---
Prolina	---	+— R	---
Treonina	+— N	---	---
Metionina	+— N	---	---
Timina	---	---	---
Xantina	+— N	+	---
Ac. Nicotinico	+—	---	---
Ac. folico	---	---	---
Acido p. ammino benzoico	+—	---	---
Uracile	---	---	---
Adenosina	+— N	+—	---
Guanosina	+ B	+	---

(*) Per le abbreviazioni cfr. tab. 2.

mentare, i ceppi bianchi e rossi sono stabili fino al momento attuale.

Evidentemente l'isolamento di questi nuovi ceppi potrà facilitare molto il futuro lavoro.

A questo scopo sono stati utilizzati diversi idrati di carbonio aggiunti al terreno sintetico prima descritto, al posto della glicerina, sia per il ceppo originale, sia per i mutanti

Nelle tabelle 1 e 2 sono riassunti i risultati dai quali si deduce che:

1) L'utilizzazione delle varie fonti di carbonio è identica nei ceppi rossi e azzurri.

2) Nessuna delle sostanze sperimentate determina la formazione di pigmento azzurro nei mutanti rossi e bianchi.

Inoltre sono state impiegate anche numerose sostanze azotate quali fonti di Carbonio al posto della glicerina.

I risultati riportati nella Tabella 3 stanno a dimostrare che nessuno degli amino-acidi impiegati riesce a far pigmentare in azzurro il ceppo rosso o bianco e che solo pochi amino-acidi e basi pirimidiniche possono far pigmentare il ceppo azzurro e rosso.

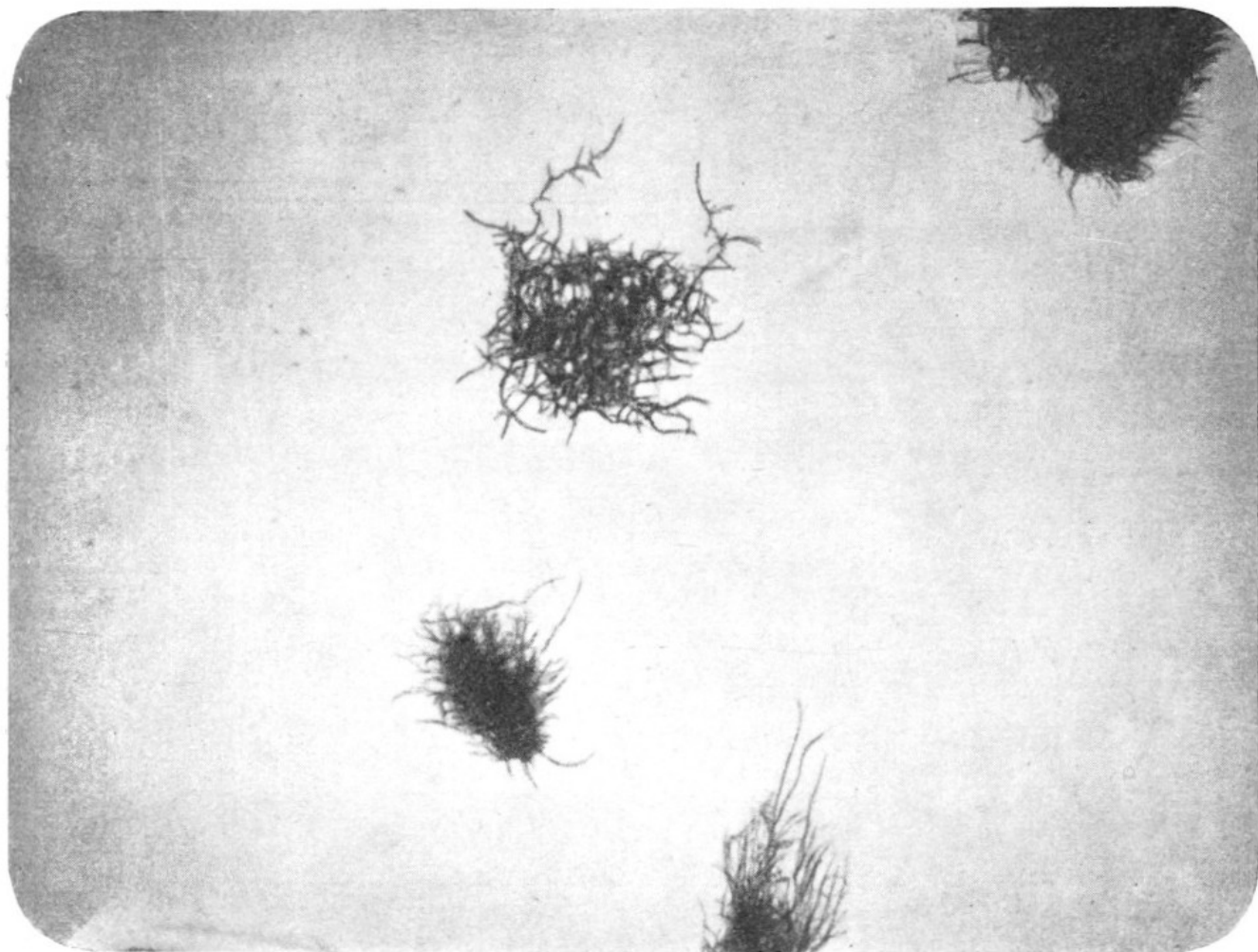


Fig. 1. - Micelio a palette di *Streptomyces S.C.* in cultura sommersa (x 150).

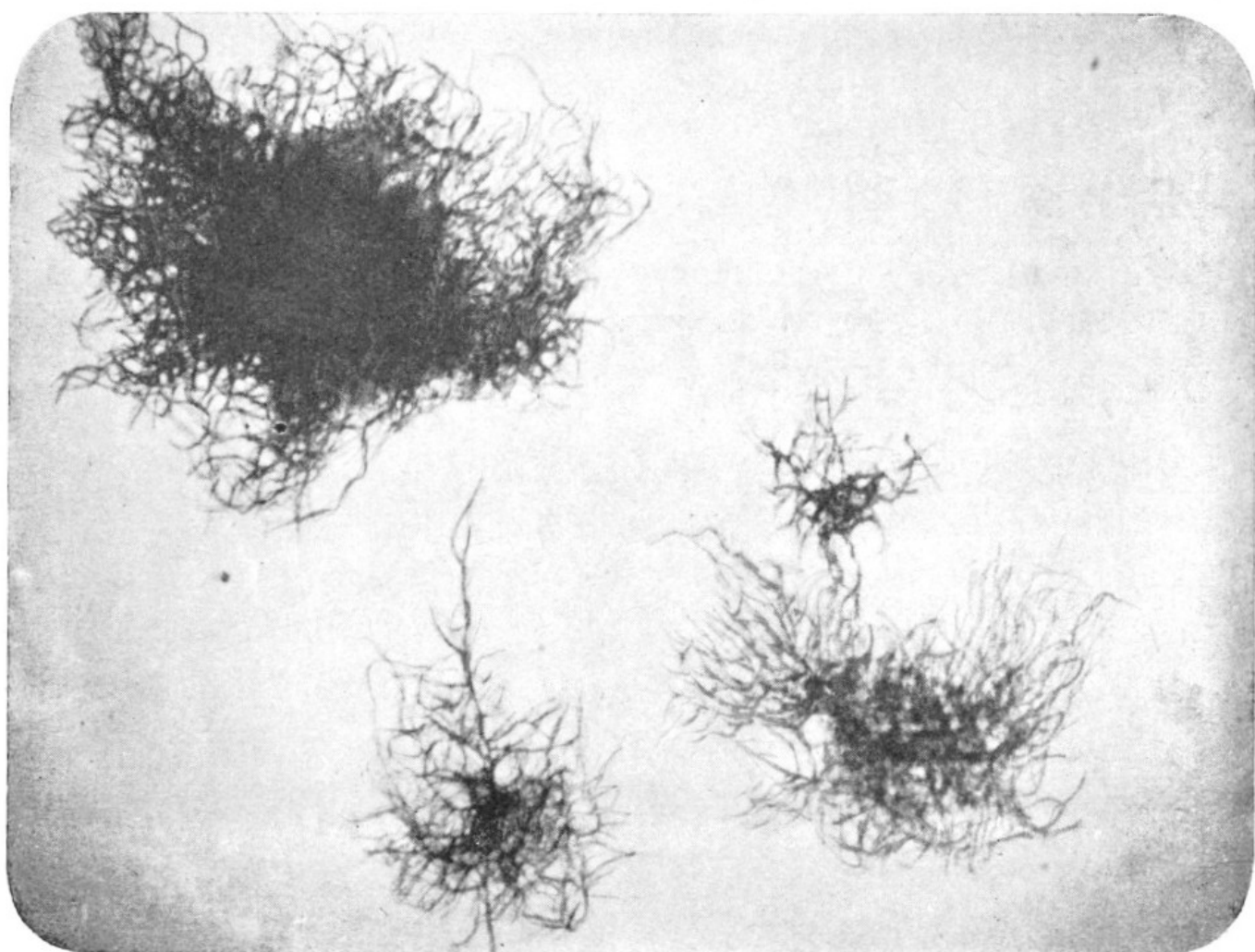


Fig. 2. - Micelio a palette di *Streptomyces S.C.* in coltura sommersa (x 300).

Accanto allo studio dei mutanti, si è cercato di studiare la biosintesi del pigmento, cercando dei terreni culturali capaci di sostenere la crescita miceliale e non la pigmentazione, ma senza alcun successo.

Al fine di ottenere una certa quantità di pigmento per studiarlo chimicamente, dato che la sua produzione e la successiva estrazione da terreni contenenti agar risultava difficoltosa, abbiamo preferito, come si è detto, produrre il pigmento in coltura sommersa agitata in beute o fermentatori.

E' stato adoperato il terreno sintetico precedentemente descritto e l'inoculo è stato eseguito con spore o con micelio vegetativo.

Nelle beute si ottiene in tal modo, fin dall'inizio, un ottimo sviluppo miceliale che si organizza in forma di palette (Figg. 1 e 2); la pigmentazione nel mezzo inizia dopo 2 giorni e raggiunge il suo massimo dopo 7 giorni (Fig. 3).

Successivamente abbiamo eseguito delle culture in tankini da 5 e da 200 litri, agitati con il sistema vortex (*) (CHAIN, PALADINO e coll.) (14).

(*) In modo da avere una aerazione di 220 ml O_2 /100 ml di cultura/h.

(14) CHAIN, PALADINO, CALLOW, UGOLINI e VAN DER SLUIS - Bull. World. Helth. Org., 6: 73 (1952).

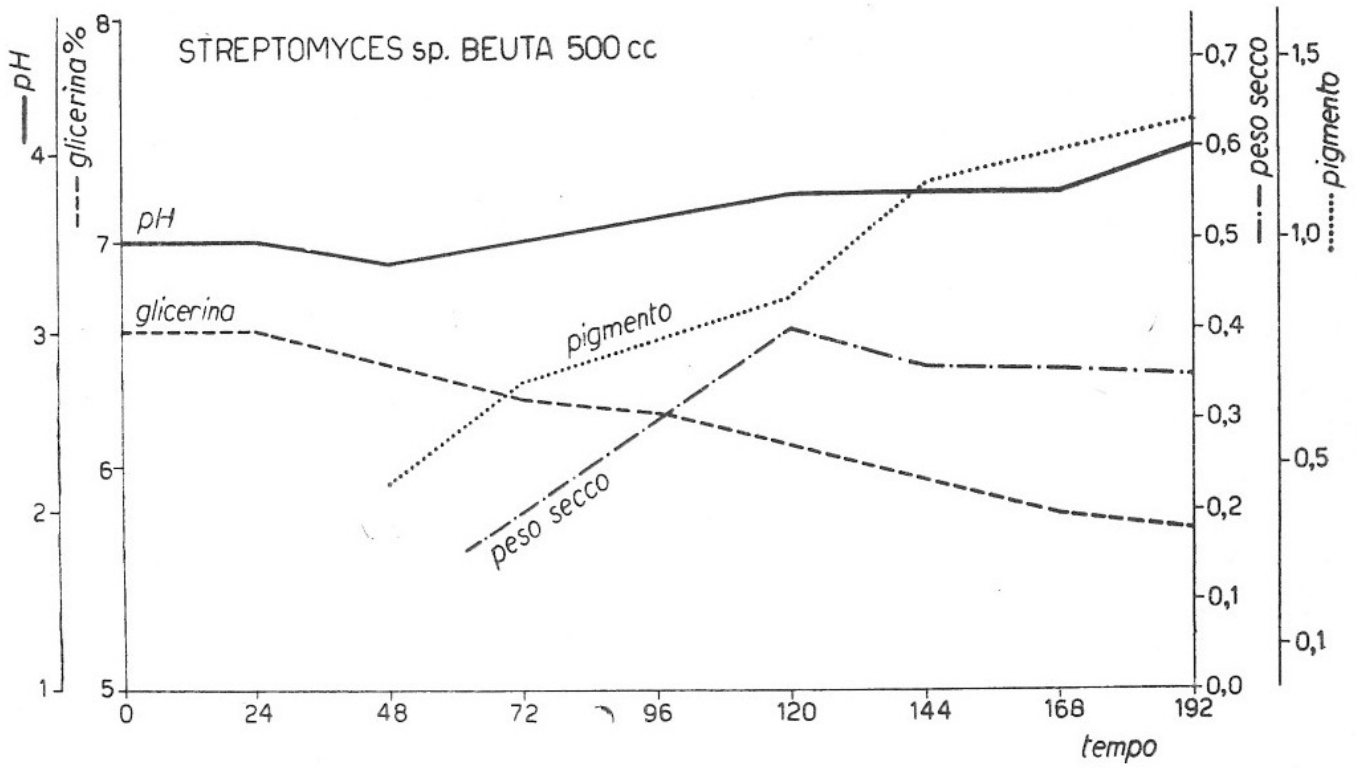


Fig. 3. - Diagramma di fermentazione del *Streptomyces S.C.* in beuta agitata.

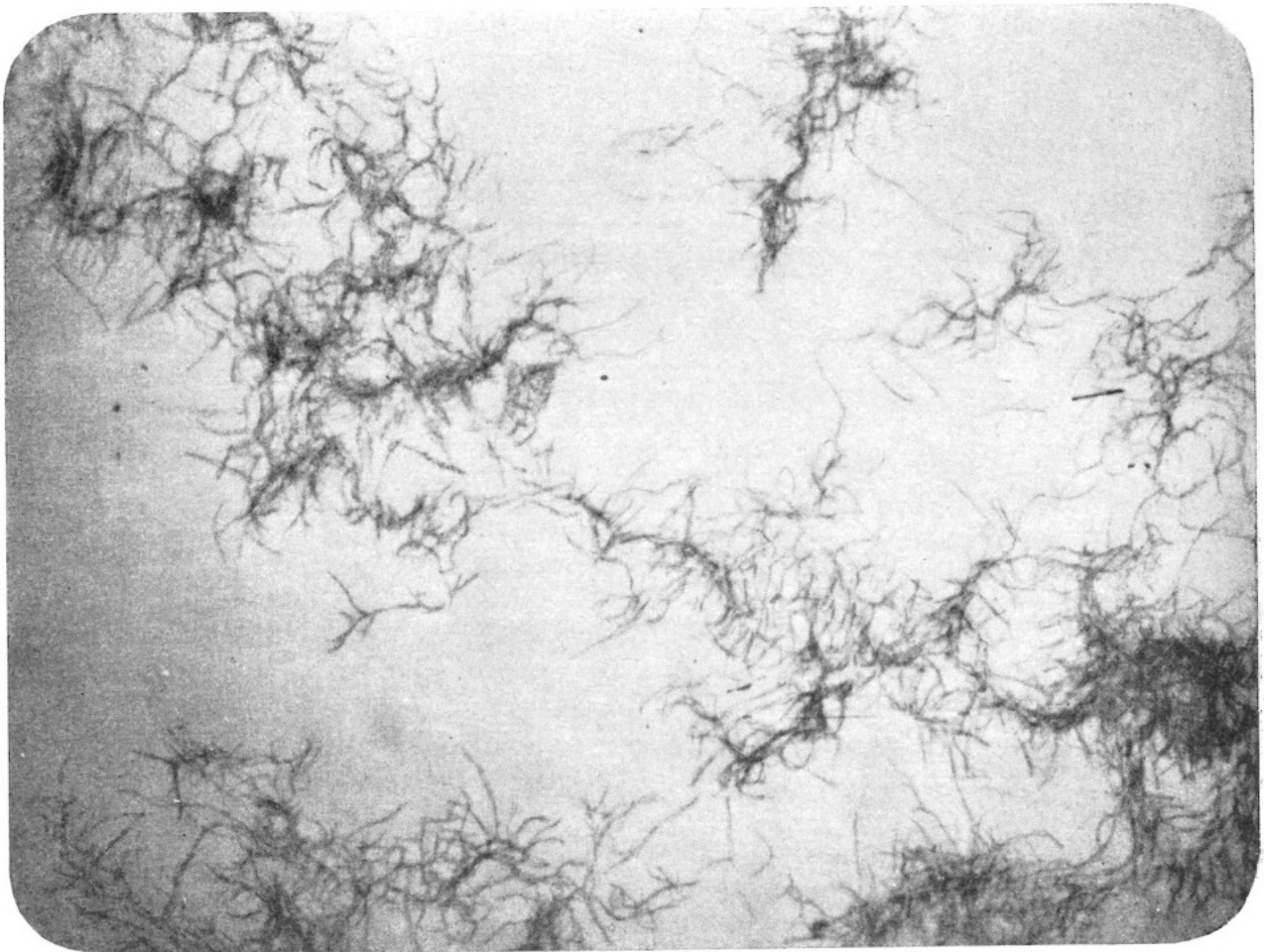


Fig. 4. - Micelio filamentoso di *Streptomyces S.C.* in coltura sommersa (x 300).

Si ottiene in tal caso un micelio filamentoso (Fig. 4). Si notano differenze nella produzione del pigmento, nella crescita ed utilizzazione della glicerina nei due diversi tipi di fermentazione (Fig. 5).

Al termine della fermentazione, cioè dopo circa otto giorni, si separa il micelio dal terreno di cultura per centrifugazione; portando poi con HCl il pH a 3 si ha un abbondante precipitato rosso violaceo (160 g. da 180 litri di terreno di cultura). Poichè oltre che per acidificazione dal brodo di cultura si può provocare la precipitazione di materiale colorato per trattamento con diversi sali, mentre se si sottopone il brodo stesso a dialisi contro tamponi od acqua distillata non si ha passaggio di pigmento attraverso la membrana, ci sembra attendibile supporre che nel mezzo di cultura il pigmento sia legato ad una proteina.

Tracce o frammenti di questa proteina coprecipitati assieme al pigmento giustificerebbero il contenuto in azoto del prodotto grezzo.

Nel filtrato rimangono piccole quantità di un altro pigmento che vira al giallo per alcalinizzazione.

Il pigmento grezzo viene abbondantemente lavato con acqua e poi seccato nel vuoto. Esso si presenta come una polvere amorfa di colore rosso-violaceo solubile completamente in alcali con colorazione azzurra intensa. Non ha un punto di fusione ben definito e contiene una piccola percentuale di azoto (4%). E' solo parzialmente solubile nei comuni solventi organici: il diossano e l'acido acetico ne sciolgono circa il 60%,

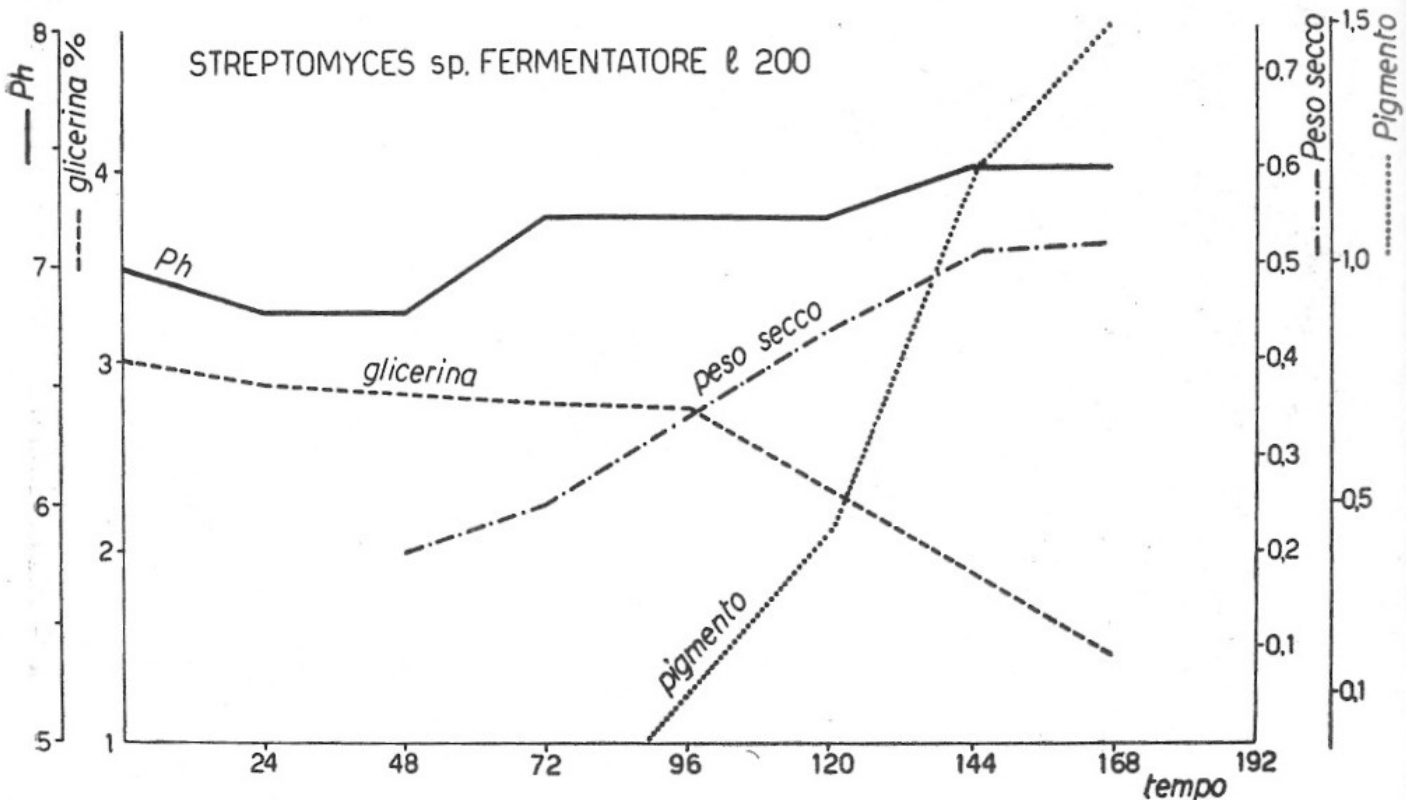


Fig. 5. - Diagramma di fermentazione del *Streptomyces* S.C. in tank da 200 l.

Bibl.	Ceppo	Nome	p. f.	Solventi	Reazioni	Osservazioni
1)	Act. coelicolor	Amilocianina			Sol. H ₂ SO ₄ N/10	Cultura bleu. Coloraz. verde con alcali
4)	Act. violaceus ruber					2 bande tra 623 e 643 mμ in alcool
8)	Act. coelicolor			Metanolo. Acetone. Diossano. Formaldeide	Solub. in H ₂ SO ₄ 10 N	λ max 530 e 560 mμ a pH 8
9).10)	Protoact. cyaneus anti-bioticus	Litmocidina	144-6°	Alcool. Etere	Si decolora con NaHSO ₃	
11)	Act. coelicolor			Acetone. Acido acetico	Porpora con H ₂ SO ₄ conc.	
12)	Act. species	Actinorodina	Decomp. a 270°	Acetone. Diossano. Tetraidrofurano. Piridina	Colorazione bleu con H ₂ SO ₄	Due bande distinte nel visibile. Attività antibiotica
	Strept. species	Streptocianina	Dec. 290-300°	Acetone. Diossano. Piridina	Colorazione bleu-violetta con H ₂ SO ₄	Una banda nel visibile. Attività antibiotica

l'acetone solo il 30%. Sottoposto alla distribuzione in controcorrente, impiegando come fase fissa un tampone di carbonato potassico e come fase mobile l'acetone, si rivela la presenza di tre componenti, due rossi che virano all'azzurro ed uno che vira al giallo per alcalinizzazione.

La frazione solubile in acetone del pigmento dello *Streptomyces S. C.*, che chiamiamo con il nome di *streptocianina* e che costituisce, come si è detto, circa il 30% della sostanza colorata diffusibile nel mezzo prodotta da questo micete, è stata oggetto di uno studio più approfondito.

La streptocianina si purifica abbastanza bene per successive dissoluzioni e precipitazioni in diversi solventi. Si decompone tra 290° e 300°. I dati analitici e determinazioni di peso molecolare ottenuti su campioni ripetutamente purificati e che contengono solo tracce di azoto portano ad ammettere una formula grezza di $(C_2H_2O)_6$.

	C %	H %	P.M.
	57,30	4,56	248
Per $(C_2H_2O)_6$ calc.	57,14	4,76	252

La sua facile riducibilità con idrosolfito di sodio in ambiente alcalino, con zinco ed acido acetico, o anche con zinco e anidride acetica, portano ad ammettere che si tratti di un composto di natura chinonica.

La riduzione catalitica con idrogeno in presenza di diversi catalizzatori (Pd e PtO_2) conferma quanto sopra.

La presenza di ossidrili è anche messa in rilievo dalla formazione di eteri metilici col diazometano e con solfato dimetilico.

Per distillazione con polvere di zinco o anche per fusione con polvere di zinco e cloruro di zinco, secondo CLAR, si hanno solo piccole quantità di sostanze fluorescenti, che si formano anche quando si effettui la semplice pirolisi del prodotto.

Questo comportamento è in accordo con quello dei poliossichinoni, come è stato anche recentemente messo in rilievo per la demolizione della terramicina, ed è del tutto analogo a quello della Attinorodina di Brockman.

Nella Tab. 4 sono riassunte le proprietà dei principali pigmenti azzurro-rossi degli *Actinomyces* dalle quali si deduce che la Streptocianina, seppure simile, si differenzia nettamente sia dalla litmocidina che dalla actinorodina.

Per concludere si può dire che lo *Streptomyces S.C.* produce un pigmento diffusibile con resa molto elevata (Fig. 1). Tale pigmento è costituito da diverse frazioni: di queste una solubile in acetone, la strepto-

cianina, ha rivelato la struttura di un poliossichinone. Sono in corso gli studi per determinare sia la costituzione della streptocianina che per isolare e caratterizzare gli altri componenti colorati del pigmento.

La conoscenza della struttura di queste sostanze potrà essere di grande interesse nell'interpretazione della loro funzione nella biologia degli Attinomiceti e in relazione con l'importanza pratica di quanto è stato trovato per alcuni pigmenti chinonici oggi impiegati come antibiotici.

Roma — Istituto Superiore di Sanità - Centro internazionale di chimica microbiologica e Laboratorio di chimica terapeutica.
