

# 放线菌五四〇六产生的植物生长刺激物质

辽宁省林业土壤研究所抗生菌肥组\*

(沈阳)

放线菌五四〇六能产生某些植物激素类物质。按本文拟定的发酵及分离、提取方法,从五四〇六发酵液中分离到两个已知的植物激素类物质——苯乙酸和琥珀酸,以及两个未知成分P-2和P-7。苯乙酸和琥珀酸在发酵液中的浓度分别约为50 ppm和30 ppm,随培养条件不同其浓度可能有较大的变化。

现在,利用放线菌五四〇六制成菌肥已广泛地应用于我国农业生产。以往的研究及生产实践证实,五四〇六能产生某种植物生长刺激物质。尹莘耘等<sup>[1]</sup>曾对五四〇六的发酵产物进行分离、提取,获得一种对植物具有刺激性的黄色粉末,10 ppm的水溶液可使大豆下胚轴向内弯曲,并通过各种显色反应和生物试验证明该黄色粉末不同于吲哚乙酸、赤霉素或激动素等植物激素,但未查明是那一些物质。

我们曾采用尹莘耘等所拟定的发酵提取方法,对“5406”产生的刺激物质进行了研究,证明用该法所获得的黄色粉末确具有明显的刺激活性,但用纸层析及其他方法进一步检查表明,该黄色粉末为多种物质的混合体。

为了系统分离研究五四〇六代谢产物中的刺激物质,我们拟定了另一套提取、分离程序,对获得的物质进行了鉴别和刺激活性测定。

## 一、菌种、培养基及发酵条件

### (一) 菌种

引自中国农林科学院。

### (二) 培养基

斜面菌种为高氏一号培养基。摇瓶及发酵罐培养基:黄豆饼粉2%,葡萄糖2%,碳酸钙0.4%,氯化钠0.3%。

### (三) 培养条件

于28—30℃培养,通气量为1:1.25。培养时间:摇瓶40—48小时,种子罐(100升)40—48小时,发酵罐(500升)60—70小时。

## 二、提取、分离程序

### (一) 粗提液

发酵液(300升)经板框过滤除去菌体后,加2%活性炭吸附12小时以上,然后过滤、压干得活性炭饼。滤过液用豆芽弯曲法测定无活性,弃去。用重蒸馏的工业酒精洗脱活性炭至洗脱液无色,减压蒸馏洗脱液至最后体积为1.5—2升左右,此时有

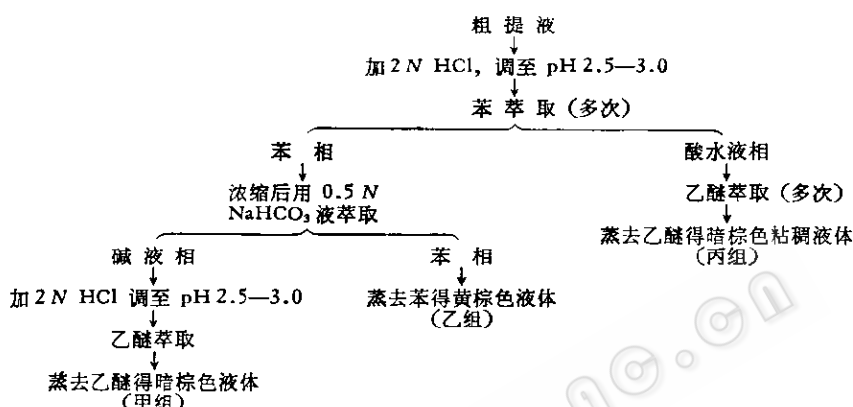
本文于1975年2月19日收到。

\* 本工作得到本所技术室及实验工厂大力协助,特此致谢。

沉淀物析出, 过滤除去沉淀物即可得暗棕色粗提液。

## (二) 溶媒萃取分离

粗提液进一步经溶媒萃取可分为四组。提取分离程序如下:



## (三) 柱层析分离及纯化

经由溶媒萃取分离得的几组提取物, 分别进行柱层析分离或直接浓缩令其析出结晶。

### 1. 甲组

硅胶吸附柱层析分离。

硅胶: 100—300 目, 150℃ 活化 3 小时, 用苯悬浮装柱。

洗脱: 苯—乙醚梯度洗脱, 按色带分段收集洗脱液。当用含少量乙醚的苯洗脱时 (洗脱第二段及第三段, 浅黄—黄色带), 可得成分 B-2 及 B-3, 蒸去溶媒后为浅黄色片状结晶, 在石油醚中重结晶后为无色片状结晶, 酸性, 1 ppm 水液即对豆芽有刺激活性。

### 2. 乙组

硅胶吸附柱层析分离。

硅胶: 100—300 目, 150℃ 活化 6 小时, 石油醚 (沸程 60—90℃) 悬浮装柱。

洗脱: 石油醚—苯—乙醚梯度洗脱,

另取粗提液直接用石油醚 (沸程 60—90℃) 萃取, 蒸去石油醚后可得黄色液体, 作为丁组。如继续同上用苯及乙醚萃取, 亦可得甲组及丙组。

甲、乙、丁组提取物用豆芽弯曲法试验均显示有刺激活性。

按色带分段收集洗脱液。当用苯洗脱时 (洗脱第四段, 浅橙黄色带) 可得成分 Br-4, 蒸去溶媒后为薑黄色液体, 有芳香味, 中性, 10 ppm 水液对豆芽有明显活性。

### 3. 丙组

蒸去乙醚后存放于干燥器中, 令其逐渐脱去水分, 几天后即有针状结晶析出, 捞出, 在乙醚中重结晶即可得成分 E, 为无色短针状结晶, 酸性, 豆芽对其水液无反应。

### 4. 丁组

硅胶吸附柱层析分离。

硅胶: 100—300 目, 170℃ 活化 7 小时, 石油醚悬浮装柱。

洗脱: 石油醚—苯—乙醚梯度洗脱, 按色带分段收集洗脱液。当用石油醚洗脱时可得成分 P-2, 蒸去石油醚后为浅黄色液体, 酸性, 易挥发, 难溶于水, 50 ppm 水液对豆芽有明显活性。

当用含少量乙醚的苯洗脱时 (第四段) 可得与 B-2 相同之片状结晶。

当用乙醚洗脱时 (第七段) 可得成分

P-7, 逐去乙醚后为黄色液体, 酸性, 有臭味, 50 ppm 水液对豆芽有明显活性。

### 三、成分鉴别

#### (一) 成分 B-2 和 B-3

无色片状结晶, 酸性, 红外吸收光谱(图 1) 两者相同并与苯乙酸完全一致。熔点  $75^{\circ}\text{C}$  (纯苯乙酸为  $76^{\circ}\text{C}$ )。由此可知 B-2 及 B-3 均为苯乙酸。

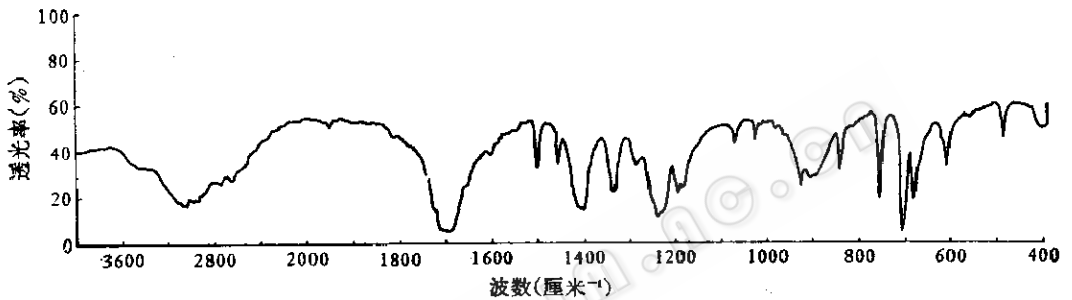


图 1 B-2, B-3——苯乙酸红外吸收光谱

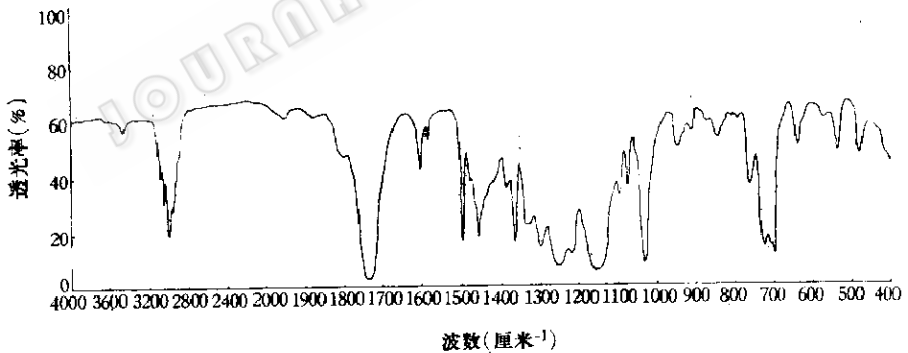


图 2 Br-4——苯乙酸乙酯红外吸收光谱

代谢产物还是提取过程中苯乙酸与乙醇酯化形成的中间产物呢?

为回答这个问题, “5406” 发酵液(2升)直接用乙醚萃取。从所得萃取物除去过量乙醚后, 用气相色谱仪检测乙醚萃取物中是否存在苯乙酸乙酯(以苯乙酸乙酯标准样作参比), 结果未获得苯乙酸乙酯峰。因此可以初步判断, “5406” 不产生苯乙酸乙

#### (二) 成分 Br-4

液体, 中性, 含少量杂质时为黄绿色, 有芳香味, 其红外吸收光谱(图 2) 与苯乙酸乙酯完全一致, 因而可判定 Br-4 为苯乙酸乙酯。苯乙酸乙酯在本试验中得量极少, 300 升发酵液通过上述提取过程所获得的量不超过 1 毫升。

由于在提取过程中曾使用乙醇洗脱活性炭, 因此所得苯乙酸乙酯是“5406”的代

酯。提取中所得少量苯乙酸乙酯可能是苯乙酸与乙醇酯化的结果。但由于所用发酵液量极少(仅 2 升), 因此也不排斥下述可能性, 苯乙酸乙酯在发酵液中含量过低, 以致用气相色谱也未能检出。

#### (三) 成分 E

无色短针状结晶, 酸性, 红外吸收光谱

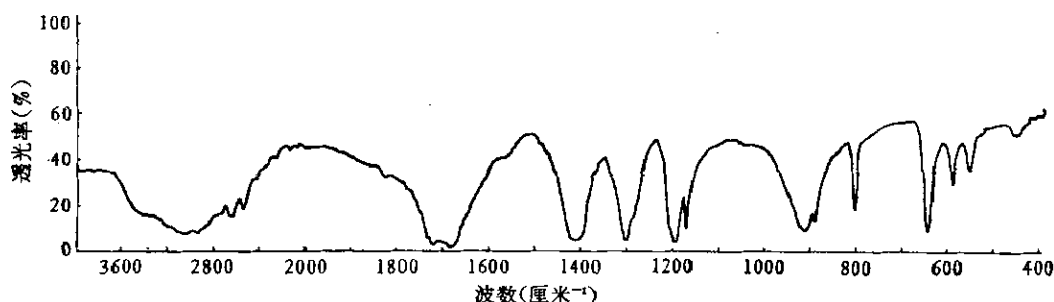


图3 E——琥珀酸红外吸收光谱

(图3)与琥珀酸完全一致,由此可判定成分E为琥珀酸。

#### (四) 成分 P-2, P-7

均为液体、酸性。P-2 挥发性较强,有刺鼻味, P-7 则有特殊臭味 (似洋薑味)。

根据它们的红外光谱(图4、5)及其酸性反应,可判断两者皆为羧酸。P-2 的红外光谱与2-乙基己酸相似,但存在若干微小差异,因而还不能肯定P-2即为2-乙基己酸。P-7 尚未找到与之相似的图谱,目前无法判断。因此这两种成分皆有待进一步研究。

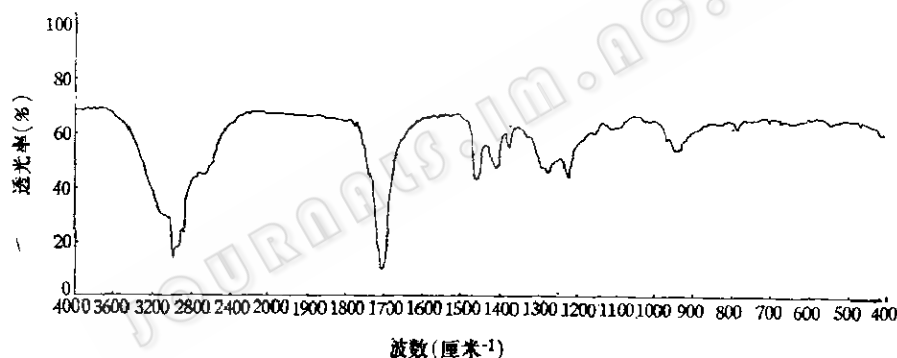


图4 P-2 的红外吸收光谱

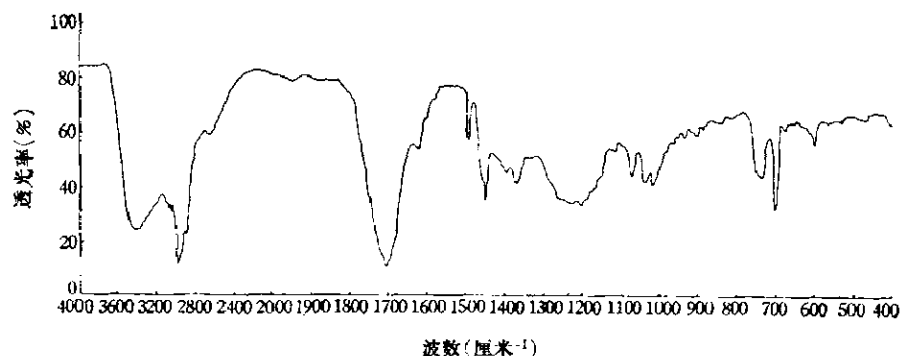


图5 P-7 的红外吸收光谱

#### 四、刺激活性测定

用豆芽弯曲法及小麦芽鞘伸长法测定

刺激活性,结果如图6及表1所示。

由照片及表1可知,苯乙酸1 ppm 浓度即对豆芽及小麦芽鞘有刺激反应,随浓

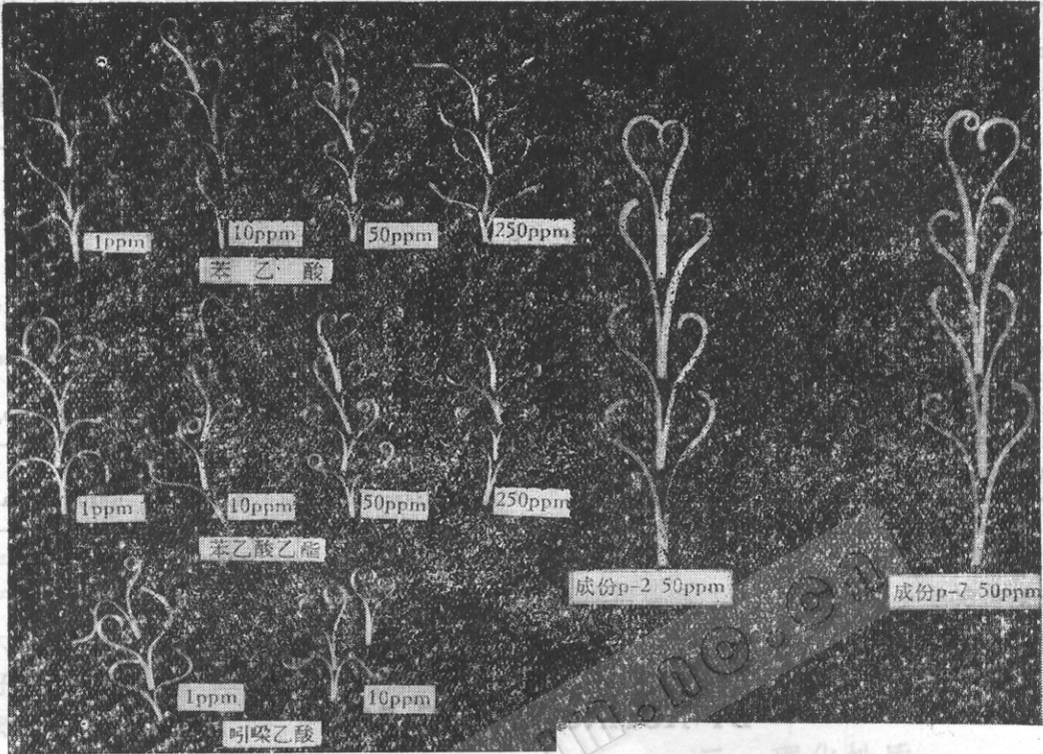


图 6 “5406”产生的刺激物质对豆芽弯曲的影响（与吲哚乙酸比较）

表 1 “5406”产生的刺激物质对小麦芽鞘伸长的影响  
(与吲哚乙酸比较)

*芽鞘长 (毫米)	浓度 (ppm)					
		50	25	5	1	0.1
物质						
吲 哚 乙 酸		9.5	9.0	9.1	7.0	6.6
苯 乙 酸		8.7	8.7	8.1	7.0	6.7
苯 乙 酸 乙 酯		8.2	8.0	7.4	7.0	6.3
P-2		7.8	7.3	6.8	6.5	6.3
P-7		7.9	7.3	7.0	6.5	6.3
对 照 (缓冲液)		6.3				

注：芽鞘切段长度为 5 毫米。

度增高活性相应提高，但浓度达 250 ppm 时则对豆芽有抑制。苯乙酸为人们所熟知的植物生长素类物质，低浓度时有促进生长作用，高浓度时则起抑制作用。通常把苯乙酸列入人工合成的植物生长素类物质中，但是某些植物及大麦芽浸出液中也存在这种物质<sup>[2]</sup>。

苯乙酸乙酯的刺激活性较之苯乙酸略低，比如 5—10 ppm 浓度时对豆芽才有较明显的刺激活性，但其抑制作用也相应减弱，250 ppm 浓度时对豆芽仍有明显刺激作用。

成分 P-2、P-7 刺激活性较弱，50 ppm 浓度方对豆芽有较明显作用。

琥珀酸对于豆芽弯曲几乎不起作用。据报导其稀水溶液对促进种子萌发、根系生长，增加叶绿素含量以及提高酶活性等方面均有一定作用<sup>[3,4]</sup>，故也是一种植物刺激素类物质。

五、苯乙酸及琥珀酸的纸层析

用纸层析法可检出“5406”发酵产物中苯乙酸及琥珀酸之存在。

用乙醚在酸性条件下(pH 2.5—3.0)萃取发酵液，所得萃取物除去乙醚后即可进

行纸层析。采用国产新华滤纸或 Whatman No. 1 层析纸。上行展层, 展层距离 25 厘米, 喷 0.5% 溴甲酚绿的乙醇液可显示黄色斑。

表 2 苯乙酸和琥珀酸在不同溶剂中的 Rf 值

展 层 溶 媒	Rf 值*	
	苯乙酸	琥珀酸
水饱和正丁醇:甲酸(100:5)	0.94	0.76
乙醇:氨水(25—27%):水(80:5:15)	0.66	0.25
正丁醇:吡啶:水(40:50:10)	0.86	0.55
甲酸饱和氯仿	0.90	0.14
苯酚:水(120:30)	0.84	0.51

\* 当样品中杂质含量较高时, Rf 值可能略低于上列数字。

苯乙酸及琥珀酸在不同展层溶剂中的 Rf 值列入表 2。

用尹莘耘等所拟定的提取方法所获得之黄色粉末, 经纸层析证实, 其中含有苯乙酸及琥珀酸等刺激物质。

### 参 考 资 料

- [1] 尹莘耘等: 微生物学报, 11 (2): 326—358, 1965.
- [2] Audus, L. J.: Plant Growth Substances L. Hill, London, 1959.
- [3] Благовещенский, А. В. и Петровичко, У. А.: Физиология Растений, 6(1): 53—60, 1959.
- [4] Благовещенский, А. В. и Кологривова, А. Ю.: Докл. АН СССР, XLVIII: 467—470, 1945.

## PLANT GROWTH PROMOTING SUBSTANCES PRODUCED BY ACTINOMYCETE 5406

ANTIBIOTIC FERTILIZER GROUP, LIAONING INSTITUTE OF FORESTRY AND PEDOLOGY  
(Shenyang)

Actinomycete 5406 is capable of producing certain plant growth promoting substances. According to the described methods for cultivation, isolation, purification and identification, two known growth promoting substances, phenylacetic acid and succinic acid, were isolated and identified and two

unknown components, P-2 and P-7, were isolated from the cultural broth of actinomycete 5406. The concentration of phenylacetic acid and succinic acid in the cultural liquor was about 50 ppm and 30 ppm respectively, and varied with cultural conditions obviously.