

Э. О. САРДАРЯН

## О ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ *AZOTOBACTER CHROOCCUM*

В настоящее время большое внимание уделяется влиянию физиологически активных веществ на растения, продуцируемые микроорганизмами. Многочисленными исследованиями установлено, что азотобактер принадлежит к микроорганизмам, образующим значительные количества активных соединений, благоприятно действующих на растения [2, 17—21]. Среди указанных соединений в предварительных поисковых опытах с применением бумажной хроматографии марки «С» Ленинградской фабрики нами были выделены вещества, обладающие ингибиторным действием на колеоптили пшеницы. Эти исследования позволили также предположить, что данные вещества относятся к фенольным соединениям. В литературе существуют скудные данные о наличии вышеуказанных соединений, продуцируемых *Azotobacter chroococcum* [17].

В связи с этим настоящая работа посвящена изучению указанных физиологически активных веществ, синтезируемых *Azotobacter chroococcum*, полученных из музейных культур ВНИИ с/х микробиологии.

Для получения биомассы выращивание микроорганизмов проводилось на твердой среде Эшби-агар, так как при глубинной ферментации продуцента уменьшается выход биомассы и осложняется метод осаждения клеток. При поверхностной инкубации культуры продуцированные вещества дифундируются в агар в незначительном количестве, основная часть остается в биомассе продуцента. После шестисуточной инкубации штаммов азотобактера при 24°C выращенная биомасса экстрагировалась различными экстрагентами: серный эфир, 96% этиловый спирт, ацетон, бензол и этиловый эфир уксусной кислоты. Экстракция проводилась 3-кратно путем последовательного извлечения веществ вышеуказанными растворителями в течение 2 час. Результаты опытов показали, что наиболее эффективным экстрагентом для извлечения активного начала из культуры является этиловый эфир уксусной кислоты. Подобной экстракционной активностью обладает также ацетон. Однако в данном случае экстракт содержит различные неактивные примеси, освобождение от которых требует большого объема работ.

Следует отметить, что при кислом значении рН среды улучшается экстракционная активность растворителей. В наших опытах рН равняется 2.

Для разделения сложных смесей веществ, выделенных из разных штаммов азотобактера, применяли метод тонкослойной хроматографии, обладающий рядом преимуществ [1]. Хроматографию проводили на разных адсорбционных слоях при различных системах растворителей, отобранных из целого ряда смесей, рекомендованных в литературе для разделения ингибиторов роста фенольного характера методом хроматографии на бумаге и тонком слое [1, 3—6, 9—16]. В большинстве случаев для получения крепленного слоя рекомендуется смесь сорбентов с гипсом в разных соотношениях. В наших опытах для крепления хроматографического слоя применялся крахмал. Сравнительный анализ эффективности сорбентов показал, что в обоих случаях они практически одинаковы: применение крахмала в качестве крепителя в наших исследованиях оказа-

лось более удобным. Адсорбционные смеси наносили на пластинки ручным способом, толщина слоя для всех сорбентов составляла 150—200 мк. Образцы наносили в виде полосок.

Результаты опытов приведены в табл. 1. Из 13 выбранных нами систем растворителей 6 оказались эффективными для подвижной фазы. Следует отметить также, что в системах растворителей с аммиаком исследуемые соединения буреют, частично остаются на старте, дают искаженную картину. При высоких концентрациях кислот (как органических,

Таблица 1

Эффективность систем растворителей при разных адсорбционных слоях

Системы растворителей	Адсорбционный слой				
	окись алюминия	силикогель	кремневая кислота	полиамидный порошок капрон	целлюлоза
Уксусная к-та, соляная к-та, вода (30:3:10)	---	---	---	---	---
Уксусная к-та, вода (15:85)	---	---	---	---	---
Уксусная к-та, вода (30:70)	---	---	---	---	---
Изопропанол, уксусная к-та, вода (4:1:5)	-	+	+	+	+
N-бутанол, уксусная к-та, вода (4:1:5)	-	+	+	+	+
N-бутанол, уксусная к-та, вода (40:12:28)	-	+	+	+	-
Этилацетат, уксусная к-та, вода (10:2:3)	-	+	+	+	-
N-бутанол, бензол, уксусная к-та, вода (2:10:2:1)	-	+	+	+	-
N-бутанол, аммиак, вода (10:1:1)	-	+	+	+	-
Изопропанол, аммиак, вода (8:1:1)	-	+	+	+	-
Четыреххлористый углерод, уксусная к-та (100:2)	-	-	-	-	-
Четыреххлористый углерод, уксусная к-та (50:2)	-	-	-	-	-
Изопропанол, вода (3:2)	-	-	-	-	-

+ хорошее разделение, -- среднее разделение, - - плохое разделение.

так и неорганических) в подвижной фазе разделение веществ происходит неудовлетворительно, независимо от адсорбционного слоя неподвижной фазы, как, например, уксусная кислота, вода в соотношениях 15:85, 30:70, уксусная кислота, соляная кислота, вода—30:3:10. Нашими наблюдениями установлено также, что наиболее четкое и компактное разделение веществ во всех вышеуказанных системах растворителей происходит при адсорбционных слоях силикогель, кремневая кислота, полиамидный порошок капрон.

В дальнейших опытах мы использовали кремневую кислоту для неподвижной фазы в системе растворителей N-бутанол-уксусная кислота—вода (4:1:5).

В результате проведенных исследований обнаружено, что штаммы *Az. chroococcum* продуцируют вещества, ингибирующие рост coleoptiles пшеницы. Последние определяли методом Кефели и Турецкой [4].

В табл. 2 приведены физико-химические и биологические показатели веществ, выделенных из некоторых штаммов азотобактера.

Таблица 2

Природа биологической активности веществ, продуцируемых различными штаммами *Azotobacter chroococcum*

Варианты	Rf	Свечение при дневном свете	Свечение при УФ освещении	Средняя длина coleoptiles, мм	Ингибирование, %
2% сахара контроль	нет	нет	нет	98,2	100
Контроль*	нет	нет	нет	96,6	98,4
Штамм 55	0,83	желтое	поглощение	73,0	72,3
Штамм 56	0,88	желтое	голубое	79,3	80,7
Штамм 63	0,74	желтое	поглощение	76,2	77,6
Штамм 28	0,76	желтое	голубое	81,7	83,2
Штамм M <sub>1</sub>	0,85	желтое	голубое	72,6	73,9
Штамм 9	0,72	желтое	светло-голубое	71,2	72,5
Штамм 8	0,78	сильно-желтое	голубое	83,2	84,7

\* Спиртовой элюат из адсорбционного слоя кремневой кислоты, растворимой в 2% водном растворе сахара.

Таким образом, реакция биотестов указывает на то, что при выращивании на искусственной питательной среде Эшби-агар штаммы *Az. chroococcum* продуцируют физиологически активные вещества ингибиторной природы, расположенные на хроматограммах ближе к фронту.

Для определения химической природы вышеуказанных соединений применялись качественные специфические цветные реакции, известные в литературе при идентификации веществ фенольного характера [3, 5, 8, 15].

1. Азотнокислое серебро с NaOH—коричневое.
2. Азотнокислое серебро без NaOH—коричневое.
3. Смесь хлорного железа и красной кровяной соли (1:1)—голубое.
4. Ванилиновый реактив—серовато-розовое.
5. Диназотированная сульфаниловая кислота (реактив Паули)—оранжевое.
6. Бис-диназотированный—бензидин-красное.
7. Реактив Эрлиха—розовое.
8. Реактив Денниса-Фоллина—черно-голубое.

Специфические реактивы на производные индолы реактив Сальковского и реактив Прохазки дали отрицательную реакцию, что указывает на отсутствие индольных соединений в экстрактах из разных штаммов азотобактера (рис. 1).

Таким образом, в результате изучения экстрактов из разных штаммов *Azotobacter chroococcum* обнаружена на хроматограммах активная

зона ингибиторного характера. Идентификация этих веществ показала, что по физическим, химическим признакам они аналогичны фенольным соединениям. Наличие других физиологически активных веществ стиму-

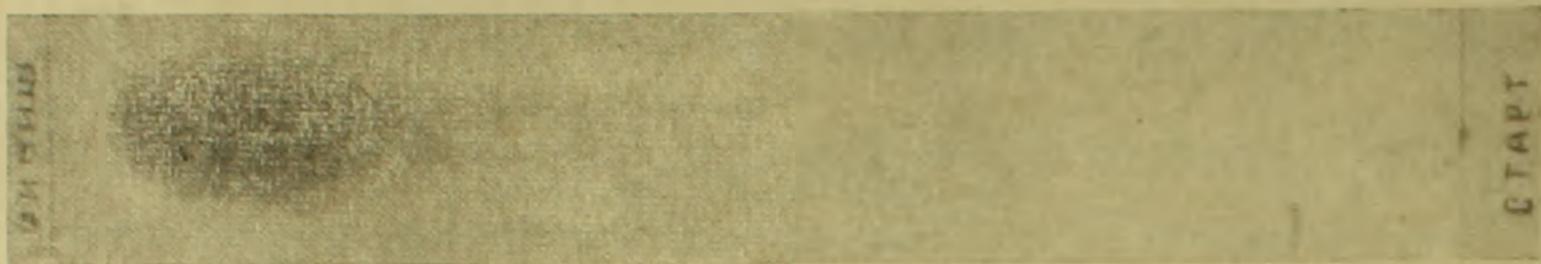


Рис. 1. Проявление фенольных соединений бис-диазотированным бензидином на адсорбционном слое кремневой кислоты в системе растворителя N-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5).

ляционного характера, как производных индолов, в экстрактах не обнаружено.

Институт ботаники  
АН АрмССР

Поступило 20.V.1971 г.

#### Է. Ն. ՍԱՐԴԱՐՅԱՆ

### AZOTOBACTER CHROOCOCCUM-ի ԿՈՂՄԻՑ ՍԻՆԹԵԶՎՈՂ ՖԵՆՈԼԱՅԻՆ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

#### Ա մ փ ո փ ու մ

*Azotobacter chroococcum* տարբեր շտամների բիոմասայից արտադատման եղանակով անջատվել են ինհիբիտոր նյութեր:

Արտադատման միջոցով անջատված նյութերի բաժանումը կատարվել է, ինչպես թղթի, այնպես էլ նրբաշերտ բրոմատոգրաֆիայի եղանակով:

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ *Azotobacter chroococcum*-ի տարբեր շտամներ իրենց աճման ընթացքում սինթեզում են ինհիբիտոր նյութեր, որոնց ըստ իրենց կենսաբանական, ֆիզիկական և քիմիական հատկանիշների կարելի է դասել ֆենոլային խմբի միացությունների շարքը:

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ахрем А. А., Кузнецова А. И. Тонкослойная хроматография. «Наука», М., 1964.
2. Гебгардт А. Г. Научн. докл. «Высшей школы» биол. наук, М., 1958.
3. Запромотов М. Н. Биохимия катехинов. «Наука», М., 1964.
4. Кефели В. И., Турецкая Р. Х. В сб. Методы определения регуляторов роста и гербицидов, М., 1966.
5. Кефели В. И., Турецкая Р. Х. В докл. «Физиологически активные вещества и их применение в растениеводстве», «Миитис», Вильнюс, 1965.
6. Колесников Д. Г., Максютин Н. П. и др. Исследования в области промышленного применения сорбентов, М., 1961.

7. Крупина Л. И. Бюлл. научно-технической информации по с/х микробиологии, 8 (11), 1960.
8. Метлицкий Л. В., Короблева Н. П. и др. Биохимия иммунитета и покоя растений. «Наука», М., 1969.
9. Николаева М. Г., Долецкая Т. В., Полякова Е. Н. Биохимия иммунитета и покоя растений. «Наука», М., 1969.
10. Прусакова Л. Д. В сб. Методы определения регуляторов роста и гербицидов. «Наука», М., 1966.
11. Сергеенко Т. А., Казарновский Л. С., Литвенко В. И. Химия природных соединений, 3, 1966.
12. Ольшанова К. М., Потапова М. А., Морозова Н. М. Практикум по хроматографическому анализу, М., 1970.
13. Чумбалов Т. К., Пашинина Л. Т. Уч. зап. Казахского ГУ, вып. 44, 1958.
14. Харборн Дж. Биохимия фенольных соединений. М., 1965.
15. Хайс и Мацек К. Хроматография на бумаге. М., 1962.
16. Шталь Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
17. Johns J. W. and Graves I. K. Soil sci 55, 1943.
18. Hennequin I. R. et Blachere H. Annales de l-Institute Pasteur. Supplement su n 3, t. 111, 1966.
19. Burger K. and Buchtach F. Sbl. bacterial parasitenkunde infecties ons krokh and Hyg. 2, 3, 1958.
20. Lee S. B. und Burris R. H. Industrial an England, Chen 35, 1943.
21. Vancura und Macura K. Folin Microbiologia 5, 1960.