

福林试剂法快速检测藤仓赤霉发酵液中赤霉酸含量

周圣骄^{1,2}, 宋志远¹, 聂志奎^{1,2,*}

(1. 江西新瑞丰生化有限公司, 江西新干 331300; 2. 江西省植物生长调节剂工程研究中心, 江西新干 331300)

摘要 [目的]优化福林试剂法的反应条件。[方法]以从紫外诱变样品中筛选获得的1株高产藤仓赤霉菌(*G. fujikuroi*) F12为研究对象,采用福林试剂法,通过溶液吸光值的变化定量检测藤仓赤霉菌发酵液中赤霉酸(GA₃)的产量。[结果]当福林试剂的用量为1.5 mL、盐酸用量为3.0 mL、加热时间为20 min时,所得溶液吸光值稳定性最好,在4 h以内基本保持不变。[结论]福林试剂法操作简便、检测快速准确,可用于藤仓赤霉菌发酵液中GA₃的快速检测。

关键词 赤霉酸;福林试剂;快速检测法;藤仓赤霉菌;吸光值

中图分类号 S13 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)28-0017-02

Quick Detection of Gibberellins in *Gibberella fujikuroi* Fermentation Broth Using Folin-Ciocalteu's Phenol Reagent

ZHOU Sheng-jiao^{1,2}, SONG Zhi-yuan¹, NIE Zhi-kui^{1,2,*} (1. Jiangxi New Reypnon Biochemical Co. Ltd., Xingan, Jiangxi 331300; 2. Jiangxi Plant Growth Regulator Engineering Research Center, Xingan, Jiangxi 331300)

Abstract [Objective] The aim was to optimize reaction conditions of Folin-Ciocalteu's phenol reagent. [Method] With high-yield *Gibberella fujikuroi* F12 as the research strain which was isolated from large quantities of UV mutation samples, Folin-Ciocalteu's phenol reagent method was used to quickly detect the gibberellin acid (GA₃) yield in *Gibberella fujikuroi* fermentation broth by the change of absorbance. [Result] When 1.5 mL Folin-Ciocalteu's phenol reagent, 3.0 mL hydrochloric acid as well as 20 min heating time was selected, the final solution absorbance had the best stability and still remained basically unchanged within 4 h. [Conclusion] The optimized method can quickly and accurately detect the GA₃ yield in *Gibberella fujikuroi* fermentation broth.

Key words GA₃; Folin's reagent; Quick detection; *Gibberella fujikuroi*; Absorbance

赤霉酸(GA₃)属于生物体内的一类四环二萜类化合物,是一种天然的植物生长调节剂,与生长素、细胞分裂素、脱落酸、乙烯共称为植物的五大内源激素^[1-2]。由于GA₃在植物生长周期全过程中可促进与调节各种发育过程,如种子萌发、茎的伸长、性别表达和果实形成等^[3-6],它被广泛应用于农业、林业、酿造业等各个行业,具有很大的经济效益和市场前景。

GA₃的化学结构复杂,虽然利用化学合成法也能生产GA₃,但是存在步骤繁琐、副产物多、分离困难等问题,导致GA₃价格非常高^[7]。目前,GA₃的工业化生产还是依赖于高产藤仓赤霉菌(*G. fujikuroi*)作为发酵菌种的液体深层发酵法^[8]。但GA₃的工业化发酵产量较低,导致GA₃一直无法进行大规模应用。为了进一步提高GA₃产量,大量的研究工作都围绕着赤霉菌的诱变和筛选进行。但是诱变筛选操作繁琐,诱变得到的菌株数量非常多,如果仅仅依靠液相色谱法进行含量测定,每天只能测定70多个菌,工作量极大^[9-10]。目前,关于福林试剂法快速检测GA₃含量的研究已有报道^[11-13],而且效果较好,可以对赤霉菌发酵液中的GA₃进行较精确的测量。该方法比较简单,在酶标仪的操作下1 d可对上千个样品进行快速测定,从而节省大量时间。由于福林试剂与浓盐酸的用量以及加热时间不仅影响反应后的吸光值,同时还影响吸光值的稳定性,笔者采用福林试剂法快速检测藤仓赤霉菌发酵液中GA₃含量,对该方法进行了进一步优化,旨在为突变菌株的大规模筛选奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株。藤仓赤霉菌F12,为江西新瑞丰生化有限公司实验室紫外诱变筛选获得。

1.1.2 试剂。GA₃标准品、福林试剂、无水乙醇(分析纯)、37%浓盐酸均购自Sigma试剂公司。

1.1.3 培养基。种子培养基:30.00 g/L葡萄糖,5.50 g/L酵母粉,0.20 g/L磷酸二氢钾,0.20 g/L硫酸镁,pH自然,115℃下灭菌30 min。发酵培养基:60.00 g/L葡萄糖,5.50 g/L酵母粉,0.20 g/L磷酸二氢钾,0.20 g/L硫酸镁,100 μL微量元素(0.10 g/L CaCl₂, 0.10 g/L FeCl₃, 0.05 g/L MnCl₂),pH自然,115℃下灭菌30 min。

1.2 方法

1.2.1 发酵样品处理。取3.0 mL发酵后菌液,先用滤纸过滤得到较澄清的滤液,然后用0.22 μm滤头对滤液进行过膜处理,得到澄清样品,再进行高效液相色谱(HPLC)分析。

1.2.2 HPLC测定GA₃含量。标准C₁₈液相色谱柱250.0 mm×4.6 mm;紫外检测波长210 nm;流速1 mL/min;进样量10 μL;流动相为100%甲醇与0.05%磷酸;柱温28℃。

1.2.3 标准曲线的建立。将GA₃标准品溶解于色谱纯乙醇,配制成0.20 g/L的标准液,分别取0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL的标准液于玻璃试管中,蒸发乙醇溶剂,再加入1.5 mL福林试剂与3.0 mL盐酸,沸水浴反应20 min,冷却,定容至10.0 mL,680 nm波长处比色。

1.2.4 赤霉素发酵液的测定。过膜样品稀释一定倍数后,取2.0 mL置于玻璃试管中,滴入0.5 mol的盐酸调节pH为1~2,再加入2.0 mL乙酸乙酯,充分振荡后静置分层,取上

作者简介 周圣骄(1979-),男,湖北京山人,工程师,从事微生物代谢工程研究。*通讯作者,工程师,博士,从事微生物代谢工程研究。

收稿日期 2016-08-10

层乙酸乙酯萃取液 0.5 mL,加入试管中,先蒸去溶剂,再加入 1.5 mL 福林试剂与 3.0 mL 浓盐酸,沸水浴 20 min,冷却,定容至 10.0 mL,680 nm 波长处比色,根据标准曲线查出相应 GA_3 微克数(G)。

1.2.5 发酵液 GA_3 含量测定计算方法。

$$\text{赤霉素含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{2G \times \text{稀释倍数}}{0.5 \times 0.88}$$

式中,0.88 表示水、乙酸乙酯比例为 1:2 时乙酸乙酯对赤霉素的抽提率。

1.2.6 不同批次的 GA_3 发酵液福林试剂法与 HPLC 检测对比分析。对不同批次的 GA_3 发酵液进行处理后,分别采用福林试剂法和 HPLC 检测,对 2 种检测方法进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 福林试剂用量对吸光值的影响 取 0.5 mL GA_3 标准品,分别加入 3.0 mL 浓盐酸与不同量福林试剂,反应后测量吸光值。由表 1 可知,溶液反应后,吸光值随着福林试剂用量的增大先变大后变小,颜色先加深后变浅,推测原因是福林试剂把 GA_3 降解物反应完全后,剩余的福林试剂稀释了反应溶液,从而导致吸光值的降低、颜色的变浅。当福林试剂的添加量为 1.5 mL 时吸光值最大,因此,福林试剂的用量选择 1.5 mL。

表 1 福林试剂用量对吸光值的影响

Table 1 Effect of amount of Folin-Ciocalteu's phenol reagent on absorbance

福林试剂用量 Dosage of Folin-Ciocalteu's phenol reagent//mL	吸光值 Absorbance	颜色变化 Change in color
1.0	0.783 2	黄色转为浅绿色
1.5	0.942 3	黄色转为墨绿色
2.0	0.877 7	黄色转为墨绿色
2.5	0.745 8	黄色转为浅绿色
3.0	0.725 1	黄色转为浅绿色
3.5	0.690 5	黄色转为浅绿色

2.2 盐酸用量对吸光值的影响 取 0.5 mL GA_3 标准品,分别加入不同量浓盐酸与 1.5 mL 福林试剂,反应后测量吸光值。由表 2 可知,随着浓盐酸加入量的增大,吸光值先增加后不变,颜色变化由浅到深。推测原因是盐酸的量比较少时未和 GA_3 完全反应,随着浓盐酸用量的增大, GA_3 逐渐被降解,吸光值逐渐增大,当 GA_3 全部被盐酸降解后吸光值基本

表 2 盐酸用量对吸光值的影响

Table 2 Effect of amount of hydrochloric acid on absorbance

浓盐酸用量 Concentrated hydrochloric acid//mL	吸光值 Absorbance	颜色变化 Change in color
1.0	0.164 2	黄色转为浅绿色
1.5	0.248 6	黄色转为浅绿色
2.0	0.393 1	黄色转为浅绿色
2.5	0.957 0	黄色转为墨绿色
3.0	1.006 1	黄色转为墨绿色
3.5	1.046 2	黄色转为墨绿色

保持不变。当浓盐酸用量增加到 3.0 mL 左右,吸光值变化非常缓慢,所以浓盐酸的用量选择 3.0 mL。

2.3 加热时间对吸光值的影响 0.4 mL GA_3 标准样品加入 1.5 mL 福林试剂和 3.0 mL 浓盐酸后,必须经过沸水浴才能使反应完全进行,因此,确定最佳的反应时间对体系的稳定性非常重要。由图 1 可知,吸光值随着加热时间的延长先变大后保持不变,推测原因,溶液反应是在 20 min 时才基本结束,此时吸光值保持不变,所以选择加热时间为 20 min。

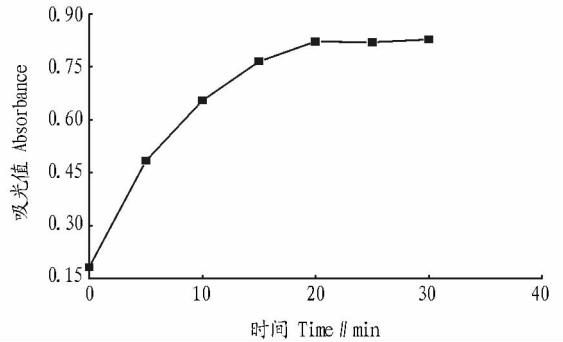


图 1 加热时间对吸光值的影响

Fig. 1 Effect of heating time on absorbance

2.4 稳定性验证 确定了最佳盐酸与福林试剂的添加量以及加热时间后,对溶液的吸光值的稳定性进行考察。0.4 与 0.6 mL 标准品经过显色反应后,在室温下放置,每隔一段时间测量吸光值,发现当取 1.5 mL 福林试剂与 3.0 mL 浓盐酸时,溶液的稳定性在 4 h 以内较好,吸光值基本保持不变(表 3)。

表 3 稳定性测试结果

Table 3 Stability test results

放置时间 Storage period//h	吸光值 Absorbance(0.4 mL)	吸光值 Absorbance(0.6 mL)
1	0.828	0.968
2	0.827	0.966
4	0.826	0.967
8	0.813	0.937
16	0.765	0.854
24	0.741	0.811

2.5 标准曲线 由图 2 可知,当 GA_3 质量在 40 ~ 240 μg 时,

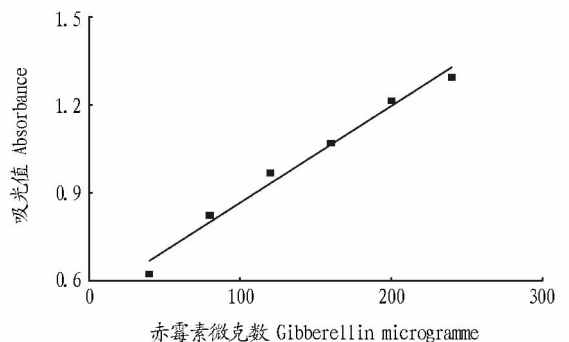


图 2 GA_3 标准曲线

Fig. 2 The standard curve of GA_3

的有机质,十分适宜作为蔬菜栽培基质的原料;泥炭疏松多孔,适宜作为改良基质疏松程度的配料。

(2)猪粪垫料的添加可提高基质养分含量,但随着猪粪垫料添加量的增加,基质电导率会升高,植株中硝态氮的含量也会增加,因此过量添加猪粪垫料会抑制植物生长。

(3)该研究中,猪粪垫料:原土:蛭石:蚯蚓粪=5:2:2:1为最佳配比,该配比基质养分含量最高,最适宜作为栽培基质种植蔬菜。

参考文献

- [1] 孙向丽,张启翔.混配基质在一品红无土栽培中的应用[J].园艺学报,2008(12):1831-1836.
- [2] 王运琦,张燕,刘建宁,等.地毯式草皮无土栽培基质的筛选试验[J].中国农学通报,2005(10):269-270,310.
- [3] 朱洪,常志州,叶小梅,等.基于畜禽废弃物管理的发酵床技术研究:Ⅲ高湿热季节养殖效果评价[J].农业环境科学学报,2008(1):354-358.
- [4] 蓝江林,刘波,宋泽琼,等.微生物发酵床养猪技术研究进展[J].生物技术进展,2012(6):411-416.
- [5] 常志州,掌子凯.发酵床垫料的再生与堆肥[J].农家致富,2009(1):38.
- [6] 郑社会.千岛湖利用生态猪场发酵床垫料废渣栽培鸡腿菇[J].浙江食用菌,2010(5):46.
- [7] 魏云霞,鲁剑巍,李小坤,等.秸秆及绿肥浸提液对莴苣种子的化感作用[J].中国蔬菜,2013(4):60-64.
- [8] 于建光,顾元,常志州,等.小麦秸秆浸提液和腐解液对水稻的化感效应[J].土壤学报,2013(2):349-356.
- [9] 杜林峰,孙向阳,沈彦.泥炭作为园艺基质的研究进展[J].北方园艺,2007(10):68-70.
- [10] 周美荣,孙振江,申晓强.蚯蚓粪的研究及应用[J].山西农业科学,2012,40(8):921-924.

- [11] 柏彦超,周雄飞,汪孙军,等.牛粪经蚯蚓消解前后理化性质的比较研究[J].江西农业学报,2010,22(10):135-137.
- [12] 宋忠俭,赵海涛,钱晓晴.蚯蚓消解禽粪便生态资源化利用探析[J].现代农业科技,2012(23):228,230.
- [13] 邓惠,陈森,刁晓平,等.蚯蚓处理甘蔗渣和牛粪混合废弃物的初步研究[J].江苏农业科学,2013,41(9):329-331.
- [14] 王凤艳.蚯蚓粪对土壤的影响[J].吉林农业,2005(10):25.
- [15] 斐庆海.蚯蚓粪的优点、作用和对土壤的影响[J].农村实用科技信息,2005(10):18.
- [16] 张永平,乔永旭,赵绪明,等.蚯蚓粪作基肥对夏播花生生长与产量的影响[J].江苏农业科学,2014,42(8):97-99.
- [17] 袁颖辉,束胜,袁凌云.外源精胺对盐胁迫下黄瓜幼苗生长和光合作用的影响[J].江苏农业学报,2012,28(4):835-840.
- [18] 王广龙,夏冬,杨泽恩,等.幼苗质量对番茄植株生长发育和产量品质的影响[J].江苏农业科学,2014,42(5):140-144.
- [19] 王得元,张菊平,张兴志,等.辣椒壮苗指数与苗期性状的因素分析[J].洛阳农专学报,1993,13(2):24-28.
- [20] 任杰.不同配比基质及微生物菌剂对黄瓜穴盘育苗及生长发育的影响[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2013:10.
- [21] 李天林,沈兵.无土栽培基质选料的参考因素与发展趋势[J].石河子大学学报,1999,3(3):9-13.
- [22] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:科学出版社,2000:299-300.
- [23] 游莹卓.黄瓜育苗基质理化性状指标及功能型基质组配研究[D].泰安:山东农业大学,2013:13.
- [24] 黎咏蜀.饲用油菜栽培技术及营养价值研究[D].重庆:西南大学,2014:14.
- [25] 刘斌.桑树菌根化容器苗应用技术研究[D].重庆:西南大学,2014:22.
- [26] 车玲.蚓粪基质对番茄幼苗生长的影响研究[D].扬州:扬州大学,2014:24.

(上接第18页)

吸光值基本上呈线性关系,在该浓度范围内得到吸光值与 GA_3 的线性方程为: $y=0.00323x+0.55022$, $R=0.9901$ 。

2.6 福林试剂法与HPLC检测结果比较 由表4可知,福林试剂法与HPLC测试结果比较相似,说明福林试剂法可用于发酵液中 GA_3 的检测。

表4 福林试剂法与HPLC测试结果比较

Table 4 The comparison of determination results by Folin-ciocalteu's phenol reagent method and HPLC

样品 Samples	GA_3 含量 GA_3 content // mol/L	
	福林试剂法 Folin-ciocalteu's phenol reagent method	液相色谱法 HPLC
1	420	398
2	443	415
3	473	454
4	498	489
5	556	521

3 结论

通过对福林试剂法快速检测藤仓赤霉菌发酵液中 GA_3 进行探讨,优化了影响吸光值的3个因素,提高了系统的稳定性,并在此基础上对福林试剂法和HPLC进行了对比分析,从实践上验证了福林试剂法检测 GA_3 的可行性。与HPLC相比,福林试剂法操作简单、检测快速准确,大大降低了筛菌过程的工作量,对赤霉菌诱变育种工作中高产菌株的快速检测以及 GA_3 发酵过程的简易监测有重要作用。

参考文献

- [1] MUGE G, SELMA A T. Extractive fermentation of gibberellic acid with free and immobilized *Gibberella fujikuroi* [J]. Prep Biochem Biotechnol, 2014, 44(1):80-89.
- [2] BALLINGLL A M. The use of hormone herbicides for resistance management and control of difficult weeds in cereal crops in the UK (with special reference to Scotland) [J]. Julius Kühn Archiv, 2014, 443:268-272.
- [3] BÖMKE C, TUDZYNSKI B, BRAKHAGE A, et al. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria [J]. Phytochemistry, 2009, 70(15/16):1876-1893.
- [4] MCSTEEN P, ZHAO Y. Plant hormones and signaling: Common themes and new developments [J]. Dev Cell, 2008, 14:467-473.
- [5] ARSHAD M, FRANKENBERGER W T. Microbial production of plant hormones [J]. Plant & soil, 1991, 133(1):1-8.
- [6] LU Q, ZHANG W, JIA G, et al. Simultaneous determination of plant hormones in peach based on dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-ion trap mass spectrometry [J]. Journal of chromatography B: Analytical technologies in the biomedical & life sciences, 2015, 992:8-13.
- [7] MANDER L N. Twenty years of gibberellin research [J]. Nat Prod Rep, 2003, 20(1):49-69.
- [8] ELEAZAR M E S, DENDOOVEN L, MAGANA I P, et al. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi*, mycelium in fluidized bioreactors [J]. Journal of biotechnology, 2000, 76:147-155.
- [9] TORRES K B, BRÜCKNER B, MEIER B. Obtaining mutants for protoplast fusion of gibberellin-forming *Gibberella fujikuroi* strains [J]. Applied biochemistry & biotechnology, 1992, 33(2):83-95.
- [10] 王卫,黎继烈,黄卫文,等.利用特比萘芬抗性筛选赤霉素高产菌株及相关发酵特性的研究[J].微生物学通报,2014,41(9):1837-1842.
- [11] 印天寿,陈世勇,于群英,等.赤霉素的快速分光光度测定法的研究[J].分析化学,1990,18(10):966-969.
- [12] 陈玉鑫,王占文,孙思洋.赤霉素的磷钼杂多酸光度测定法研究[J].南京化工学院学报,1993,15(1):51-54.
- [13] 罗国安,顾觉奋.荧光分光光度法测定赤霉素的含量[D].上海:复旦大学出版社,1984:187-188.