

麦角菌深层培养产生麦角新碱的研究

岳德超 杨云鹏 陆师义 孙庆民 霍泽民

(中国医学科学院药物研究所,北京)

为了利用深层培养技术生产麦角新碱,对拂子茅麦角菌 [*Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul.] Ce-3 菌株进行了发酵条件的研究。所得结果是:适宜接种菌龄为 72 小时,二级种龄 48—48 小时,接种量为 5%,最适 pH 值是 7.5,机械搅拌作用过大,损伤菌丝降低产量,加入 0.5% 豆油既能抑制泡沫,又利于提高产量。采用较适宜的发酵条件,经九天培养,其麦角总生物碱和麦角新碱的产率分别为 0.00936% 和 0.00579%,麦角新碱含量占二分之一以上。

麦角新碱是妇产科临床常用药物,主要用于产后止血和收缩子宫,与麦角毒碱等相比较具有作用快、毒性小的特点。许多国家都是以野生麦角或人工栽培麦角作为原料进行生产^[1-6],常受到地区及气候条件等限制,不能在短期内进行大量生产,并且需要大片农田,成本亦较高。采用发酵法生产麦角碱是克服这些困难和缺点的一种有希望的途径。

自 1948 年以来,对于利用麦角菌在深层发酵过程中生物合成麦角碱方面进行了许多研究,并取得一定结果。

阿部^[7-8]、斯托尔(Stoll)^[9]、霍夫曼(Hofmann)^[10]、泰伯(Taber)^[11]及格罗哥(Groger)^[12]等分别从湾穗鹑冠草 [*Agropyrum semicostatum* (Nees) Kitogawa], 滨草 (*Elymus mollis* Trin.), 狼尾草 (*Pennisetum typhoideum* Rith) 及三毛草 (*Trisetum bifidum* Chwi.) 等植物上寄生的菌核中分离到的某些菌系,在液体培养基中能产生少量的棒类(Clavine)麦角碱,但其生理活性远比麦角酸类生物碱低,并且到目前为止,在临床上尚未见应用。

阿卡莫(Arcamone)^[13]及帕西非西(Pacifici)^[14]等分别利用雀稗草麦角菌 (*Clavi-*

ceps paspali Stev. & Hall.) 的某些菌系经短期培养以后,在培养液中能产生麦角酰胺 0.5—1.0 毫克/毫升。此产物尚需水解成麦角酸,然后再由麦角酸合成有医疗价值的麦角碱。近年来,陆续有这方面的报道^[15-19]。

吉斯泰(Gjerstad)^[20]、泰伯^[21]、阿部^[7-8]以及山都氏(Sandoz)药厂^[22]等分别利用黑麦麦角菌 [*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul.] 在液体培养基中得到了少量的麦角酸类生物碱。其中只含有微量的麦角新碱。

1966—1970年间,阿密西(Amici)^[23-25]、阿卡莫^[26]等曾先后报道了黑麦麦角菌 275 Fi 菌株,在深层培养中可产生肽类麦角碱 1.1—1.5 毫克/毫升,其中麦角胺含量约占 80%,而不含有麦角新碱。

我国在 1957 年从拂子茅 [*Calamagrostis epigejos* (L.) Roth.] 上分离出拂子茅麦角菌 [*Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul.] Ce₃ 菌株,通过选育,在小麦培养基上麦角总碱及麦角新碱产量分别为 0.08—0.1% 及 0.02—0.03%^[27,28]。在固体发酵基础上,又进行了有关麦角菌在深层培养

本文 1973 年 2 月 7 日收到。

中产生麦角碱的研究。已选出适于深层培养的优良菌种和培养基^[29]。本文为麦角新碱深层发酵条件的研究报告。

材料和方法

一、供试菌种

拂子茅麦角菌 [*Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul.] Ce-3-3-45 菌株, 从拂子茅上分离得到。

二、培养基

1. 孢子培养基 蔗糖 10%, 天门冬素 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, KH_2PO_4 0.1%, 琼脂 2%, 蒸馏水, 以 5% NaOH 调 pH 至 6.0—6.2。

2. 种子培养基 蔗糖 6%, 谷氨酸 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, KH_2PO_4 0.1%, 自来水, 以 25—27% NH_4OH 调 pH 至 5.2。

3. 发酵培养基 蔗糖 10%, 谷氨酸 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03%, KH_2PO_4 0.1%, 豆油 0.5%, 自来水, 以 25—27% NH_4OH 调节 pH 至 5.2。

三、培养方法

1. 孢子培养 用斜面培养 15—20 天后, 放冰箱 (4℃) 内备用。

2. 种子培养 500 毫升锥形瓶内盛种子培养基 100 毫升, 于旋转式摇床上培养 72 小时。

3. 发酵培养 500 毫升锥形瓶内盛发酵培养基 75 毫升, 接种量为 10%, 于旋转式摇床上培养 7 或 9 天。

上述培养温度均在 24—26℃。

四、测定方法

1. 麦角总生物碱 用碳酸钠, 氯仿提取法^[30]。

2. 麦角新碱 薄层层离法^[31]。

结果及讨论

一、种龄对麦角菌产麦角碱的影响

阿卡莫等^[13]报道接种菌龄对麦角菌产麦角碱影响较大。为了寻找出适宜接种菌龄, 曾分别对 48, 60, 72 及 96 小时的不同接种菌龄进行了比较试验。从表 1 看出, 以 96 小时效果为最好, 72 小时稍次, 以 48 小时为最差。由于 72 小时接种菌龄产碱

量与 96 小时比较接近, 从生产角度考虑采用 72 小时较为恰当。

表 1 接种菌龄对麦角菌产麦角碱的影响

种龄 (小时)	7 天		9 天	
	pH 值	麦角总生物碱含量(%)	pH 值	麦角总生物碱含量(%)
48	4.22	0.00146	4.42	0.00181
60	4.11	0.00232	4.36	0.00277
72	4.42	0.00316	4.57	0.00345
96	4.44	0.00374	4.82	0.00385

二、二级种子的培养时间

为适应扩大生产需要, 比较了二级种子的种龄对麦角菌产麦角碱的影响。表 2 说明, 二级种子以 48—48 小时为最好; 48—24 小时次之; 以 48—12 小时为最差。从菌生长速度以及色素形成来看, 也是以 48—48 小时培养的二级种子较好。二级种子是否需要培养时间更长些, 有待于进一步试验证明。

表 2 二级种子对麦角菌产麦角碱的影响

二级种子 (小时)	7 天		9 天	
	pH 值	麦角总生物碱含量(%)	pH 值	麦角总生物碱含量(%)
48—12	3.83	0.00211	4.04	0.00306
48—24	3.84	0.00218	4.08	0.00337
48—48	3.73	0.00266	4.13	0.00461

三、接种量对麦角菌产麦角碱的影响

由于麦角菌生长缓慢, 培养时期较长, 为了缩短其生长周期, 分别对 5%, 10% 及 15% 的接种量进行了比较试验。表 3 结果说明, 无论是培养 7 天或 9 天其麦角碱的产率均以 5% 的接种量为高; 其次为 10%, 15% 最低。经 9 天培养后, 其麦角总生物碱含量分别为 0.00667%, 0.00601% 及 0.00541%。

表 3 接种量对麦角菌产麦角碱的影响

接种量 (%)	7 天		9 天	
	pH 值	麦角总生物碱含量 (%)	pH 值	麦角总生物碱含量 (%)
5	4.26	0.00515	4.50	0.00667
10	4.19	0.00472	4.53	0.00601
15	4.33	0.00448	4.55	0.00541

四、机械效应的试验

为了解搅拌发酵对麦角菌产麦角碱的影响, 在上发酵罐前曾于摇瓶内进行了机械效应的试验。表 4 表明, 机械效应对麦角菌产麦角碱影响极大, 尤以机械作用大者更为严重, 其产碱量与对照比几乎低 10 倍。由于机械作用损伤了菌丝体, 其菌丝体呈碎片状, 生长缓慢, 色素形成亦缓慢, 因而影响到麦角碱的形成与积累。

表 4 机械效应对麦角菌产麦角碱的影响

处 理	7 天		9 天	
	pH 值	麦角总生物碱含量 (%)	pH 值	麦角总生物碱含量 (%)
对 照	4.01	0.00492	4.04	0.00629
机 1*	4.72	0.00152	4.61	0.00181
机 2**	4.61	0.00064	4.78	0.00068

* 投入玻璃棒 1 条;

** 投入玻璃棒 3 条。玻璃棒大小为 0.2×1.8 公分。

五、消沫剂(豆油)的用量

在试验过程中, 我们采用豆油作消沫剂, 并对其加入量与麦角碱产率的关系进行了比较研究。经试验证明, 在一定条件下, 加入豆油比不加入豆油效果为好。无论是培养 7 天还是 9 天都以加入 1.0% 的豆油效果为最好, 0.5% 次之, 以 1.5% 为差。从生产角度看, 以选用 0.5% 为适宜(表 5)。

六、培养基 pH 值的选择

麦角菌产生麦角碱的适宜初 pH 范围, 据文献报道一般在 5.0—5.7 之间, 但更多

表 5 豆油加入量对麦角菌产麦角碱的影响

加入量 (%)	7 天		9 天	
	pH 值	麦角总生物碱含量 (%)	pH 值	麦角总生物碱含量 (%)
0	4.35	0.00410	4.37	0.00627
0.5	4.22	0.00612	4.43	0.00887
1.0	4.83	0.00682	4.45	0.00904
1.5	4.65	0.00584	4.67	0.00746

的研究者指出, 最适宜 pH 值为 5.2^[7,13]。约汉逊(Johansson)指出, 若碳源用蔗糖时, 高 pH 值对菌产麦角碱更为有利^[32]。我们比较 pH 5.2、6.0、6.5、7.0、7.5 及 8.0 的结果证明: 培养基的初 pH 值虽有不同, 但经过发酵培养以后其最终 pH 值都较接近; 从麦角菌的生长情况看, 开始 pH 以偏酸性为好, 但到后期对生长无甚差别, 从产碱情况看, 以 pH 值 7.5 效果为最好(表 6)。

表 6 培养基初 pH 值对麦角菌产麦角碱的影响

初 pH 值	以 NH ₄ OH 调初 pH 值		以 NaOH 调初 pH 值	
	最 终 pH 值	培养 9 天产碱量 (%)	最 终 pH 值	培养 9 天产碱量 (%)
5.2	4.71	0.00534	5.07	0.00118
6.0	4.63	0.00434	5.06	0.00108
6.5	4.76	0.00678	5.12	0.00123
7.0	4.81	0.00930	5.13	0.00156
7.5	4.49	0.00978	5.18	0.00159
8.0	4.64	0.00648	5.14	0.00102

发酵培养基 pH 值试验是分别以 5% NaOH 及 25—27% NH₄OH 溶液调节 pH 的。经试验证明以 NaOH 调节培养基 pH 值, 大大地抑制了麦角碱的产生。其麦角碱产量之所以降低, 可能是钠离子的影响所致, 因为用 NH₄OH 调节 pH 值时, 其麦角碱产量比前者高数倍(表 6)。

七、水质对麦角菌产麦角碱的影响

为了便利生产, 我们进一步比较了自

来水和蒸馏水对麦角菌产生麦角碱的影响。结果指出,制作培养基用自来水(北京)比用蒸馏水产碱量高(表7)。

表7 水质对麦角菌产麦角碱的影响

水质	7 天		9 天	
	pH 值	麦角总生物碱含量(%)	pH 值	麦角总生物碱含量(%)
蒸馏水	4.33	0.00377	4.49	0.00414
自来水	4.57	0.00497	4.97	0.00613

参 考 资 料

- [1] 陆师义,岳德超,孔显良,杨云鹏: 药学学报, 7: 90—98, 1959.
- [2] 杨云鹏,岳德超,陆师义: 药学学报, 11: 551—561, 1964.
- [3] 川谷丰彦: 医学のあゆみ, 17: 44—49, 1954.
- [4] 陆师义,杨云鹏,岳德超: 药学学报, 7: 31—42, 1959.
- [5] 陆师义,杨云鹏,岳德超: 卫生部庆祝建国十周年医学科学成就论文集, 人民卫生出版社, 594 页, 1959.
- [6] 杨云鹏,岳德超,陆师义: 药学学报, 11, 305—312; 345—350, 1964.
- [7] 阿部又三: 日本农艺化学会志, 21: 29, 1948.
- [8] 阿部又三等: 日本农艺化学会志, 34: 249, 360, 1960.
- [9] Stoll, A. Von, Brack, A., Kobel, H., Hofmann, A. and Brunner: *Helv. Chim. Acta*, 37:1815—1825, 1954.
- [10] Hofmann, A., Stoll, Brack, A., Brunner, R., Kobel, H.: Abstracts 14th Intern. Congr. Pure and Appl. Chem., p. 200, 1955.
- [11] Taber, W. and Vining, L. C.: *Can. J. Microbiol.*, 3:55—56, 1957.
- [12] Groger, D.: *Pharmazie*, 15:715—719, 1960.
- [13] Arcamone, F., Chain, E. B., Ferretti, A., Minghetti, A., Pennella, P., Tonolo, A. and Verò, L.: *Pro. Royal Soc. B*, 155: 26—54, 1961.
- [14] Pacifici, L. R., Kelleher, W. J. and Schwarting, A. E.: *Lloydia*, 26:176—191, 1962.
- [15] Groger, D. and Tyler, V. E.: *Lloydia*, 26: 174—191, 1963.
- [16] Rosazza, J. P., Kelleher, W. J. and Schwarting, A. E.: *Appl. Microbiol.*, 15: 1270—1283, 1967.
- [17] Kim, B. K., Kelleher, W. J. and Schwarting, A. E.: *Lloydia*, 31:422, 1968.
- [18] Mizrahi, A. and Miller, G.: *J. Bacteriol.*, 97:1155—1159, 1969.
- [19] Kelleher, W. J., Kruger, R. J. and Rosazza, J. P.: *Lloydia*, 34:188—194, 1971.
- [20] Gjerstad, G.: *Pharm. J.*, 17:379—381, 1959.
- [21] Taber, W. A. and Vining, L. C.: *Can. J. Microbiol.*, 4:611—626, 1958.
- [22] Sandoz, Ltd.: British Patent, No. 755,555 (August 22, 1956).
- [23] Amici, A. M., Minghetti, A., Scotti, T., Spalla, C. and Tognoli, L.: *Experientia*, 22:415—416, 1966.
- [24] Amici, A. M., Minghetti, A., Scotti, T., Spalla, C. and Tognoli, L.: *Appl. Microbiol.*, 15:597—602, 1967.
- [25] Amici, A. M., Scotti, T., Spalla, C. and Tognoli, L.: *Appl. Microbiol.*, 15:611—615, 1967.
- [26] Arcamone, F., Gassinelli, G., Ferni, G., Penco, S., Pennella, P. and Pol, C.: *Can. J. Microbiol.*, 16:923—931, 1970.
- [27] Yüeh Teh-chao (岳德超), Yang Yün-peng (杨云鹏), Liu Jin-ru (刘金茹), Lu Shih-I (陆师义), He Li-yi (何丽一), Liang Pin (梁彬), Chow Tung-whei (周同惠), Li Lian-niang (黎连娘), and Fang Qi-cheng (方起程): *Sci. Sinica*, 11:917—924, 1962.
- [28] 陆师义,孔显良,岳德超,杨云鹏: 微生物学报, 9:123—132, 1963.
- [29] 杨云鹏,岳德超,陆师义: 中国微生物学会 1963 年学术会议论文摘要集, 第 51—52 页, 1963.
- [30] Mukerji, B. and De, N. K.: *Current Sci.*, 13:128, 1944.
- [31] 黎连娘,方启程: 药学学报, 11: 189—193, 1964.
- [32] Johansson, M.: *Symb. Bot. Ups.*, 17:2, 1962.

STUDIES ON THE PRODUCTION OF ERGOMETRINE BY *CLAVICEPS MICROCEPHALA* IN SUBMERGED CULTURE

YUEH TEH-CHAO, YANG YUN-PENG, LU SHIH-I,
SUN QING-MIN AND HUO ZE-MIN

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking*)

In order to produce ergometrine by submerged-culture technique, a study has been made on the fermentation conditions of strain Ce-3 of *Claviceps microcephala* (Wallr.) Tul. The following optimal conditions were verified: The optimal age of inoculum being 72 hours, optimal age of secondary seed culture being 48—48 hours, optimal seed amount of inoculum being 5%, and optimal pH being 7.5. Drastic stirring tended to injure the mycelia and reduce the yield of ergot

alkaloid tremendously. It was also found that the addition of soybean oil into the medium during the course of fermentation can not only inhibit foaming, but also enhance the production of ergot alkaloid. By the adoption of favorable fermentation conditions, the total alkaloid and ergometrine production reached 0.00936% and 0.00579% respectively after 9 days culturing, with the yield of ergometrine well over 50% of the total alkaloid.