

pH 对麦角菌产麦角隐亭的影响

冯慧琴 钱秀萍 杨庆尧

提 要 在不同 pH(4.1~7.1)的种子培养基中培养的麦角菌(*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul) ATCC 20019 的菌丝体经发酵后,其发酵液中麦角隐亭的产量以种子培养基起始 pH5.2 时最高,为 44.85 μ g/mL,经方差分析,差异显著($P < 0.01$);菌丝体干重则没有明显差异. pH5.2 所得的种子菌丝体接入不同 pH(4.1~8.1)的发酵培养基,结果:菌丝体干重无差异,发酵液中麦角隐亭的产量以发酵培养基起始 pH5.2 时最高,达 51.31 μ g/mL,经方差分析,差异显著($P < 0.01$). 发酵过程中调节培养基的 pH,使 pH 稳定在 5.2,结果菌丝体干重从 57.31 增加到 83.28mg/mL,但麦角隐亭产量未见明显提高.

关键词 麦角菌; 麦角隐亭; pH; 培养基

中图法分类号 TQ920.1

0 引 言

麦角菌(*Claviceps purpurea*)能产生许多具有药用价值的麦角碱^[1,2],如麦角新碱(Ergometine)是分娩促进剂^[3],麦角隐亭(Ergocryptine)能有效地治疗高血压和外血管障碍^[4]. 在深层培养麦角菌产碱的研究中,岳德超(1973)^[5](1988)^[6],杨云鹏(1979)^[7],E Pertot(1984)^[8],Arcamone(1970)^[9]等发现培养基中的 pH 对麦角菌产生麦角新碱,麦角酸衍生物(LAD),麦角胺(Ergotamine)有很大的影响,且 E Pertot, L C Vining^[10]等研究者认为保持发酵培养时 pH 值恒定有利于菌丝生长和产碱. 麦角菌(*Claviceps purpurea*) ATCC 20019 在深层培养时能产生麦角隐亭^[4]. 本研究试图找出菌株 ATCC 20019 产麦角隐亭的最佳酸碱条件.

1 材料和方法

1.1 菌株

麦角菌(*Claviceps purpurea* (Fr.) Tul) ATCC 20019 由美国菌种保藏中心提供.

收稿日期: 1995-09-04

第一作者冯慧琴,女,助理研究员,上海师范大学生物系,上海,200234

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 PDA 培养基.

1.2.2 种子培养基^[4] 葡萄糖 100g, 柠檬酸 10g, 酵母膏 0.1g, 磷酸二氢钾 0.5g, 硫酸镁 0.3g, 硫酸亚铁 7mg, 硫酸锌 6mg, 蒸馏水 1000mL, 用氨水调节成所需的 pH.

1.2.3 发酵培养基^[4] 蔗糖 300g, 柠檬酸 15g, 酵母膏 0.1g, 氯化钾 0.125g, 磷酸二氢钾 0.5g, 硫酸镁 0.5g, 硫酸亚铁 7mg, 硫酸锌 6mg, 蒸馏水 1000mL, 氨水调节所需的 pH.

1.3 培养方法

1.3.1 23~25℃ 斜面培养 7 d 后, 分别接入 pH 不同的种子培养基中, 22~26℃, 160~180 r/min 振荡培养 6 d. 将在不同 pH 的种子培养基中生长的菌丝体分别接入 pH5.2 的发酵培养基中, 振荡培养 14 d, 测定菌丝体干重及发酵液中麦角隐亭的产量.

1.3.2 将 pH5.2 的种子培养基所培养的菌丝体分别以接种量 10% 接入 pH 不同的发酵培养基中, 22~26℃, 160~180r/min 振荡培养 14 d, 测定菌丝体干重及发酵液中麦角隐亭的产量.

1.3.3 将 pH5.2 的种子培养基所培养的菌丝体接入 pH5.2 的发酵培养基中, 发酵过程中每隔 24 h 用 0.1mol/L NaOH 调节 pH 至 5.2, 同上温度和转速培养 14 d, 测定菌丝体干重及发酵液中麦角隐亭的产量.

1.4 测定方法

1.4.1 菌丝体干重^[11] 100mL 培养物离心, 菌丝体用蒸馏水冲洗 3 次, 85℃ 烘至恒重.

1.4.2 pH 值 25 型酸度计测定发酵液 pH 值.

1.4.3 定量测定^[12] 发酵物离心, 取滤液 1mL 加 Van Urk's 试剂 2mL 混匀, 室温静放 2 h, 用 UV-754 分光光度计在 550nm 波长测吸收值(A), 按麦角隐亭标准曲线计算每毫升发酵液内所含的生物碱量.

2 结果与讨论

2.1 种子培养基的 pH 值对麦角隐亭产生的影响

将麦角菌 ATCC 20019 斜面菌种接入不同 pH (4.1, 4.6, 5.2, 5.7, 6.1, 6.5, 7.1) 的种子培养基中培养 6 d 后, 可以看到: 初始 pH5.2 的菌丝体为细密的菌球, 培养物稠, pH 4.6, 5.7 的菌球稍大, 培养物稍稀. 而其它 pH 时, 培养物很稀. 将不同 pH 的种子培养基中生长的菌丝体分别接入 pH5.2 的发酵培养基培养后, 结果如表 1 所示: 菌丝体干重分别为 48.60, 50.57, 58.50, 54.73, 47.73, 45.93, 45.00mg/mL, 无明显差异; 发酵液中麦角隐亭的产量分别为 21.83, 33.82, 44.85, 25.47, 32.01, 21.59, 9.44μg/mL, 以种子培养基起始 pH 5.2 时为最高, 经方差分析, 差异显著 $P < 0.01$ (见表 2).

由此可见, 菌丝生长以初始 pH 偏酸性为好, 种子培养基起始 pH5.2 有利于菌丝生长, 培养物稠密, 获得较好的生物量, 而过低, 过高的 pH 都会抑制菌丝生长^[8].

表1 种子培养基的 pH 值对麦角隐亭产生的影响

初始 pH	种子菌丝体生长情况	菌丝体干重(mg/mL)	麦角隐亭产量($\mu\text{g/mL}$)
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
4.1	菌球大, 培养物稀	48.60 \pm 1.20	21.83 \pm 1.73
4.6	菌球大, 培养物稍稀	50.57 \pm 1.60	33.32 \pm 2.71
5.2	菌球细密, 培养物稠	58.50 \pm 1.65	44.85 \pm 4.91
5.7	菌球大, 培养物稍稀	51.75 \pm 2.12	25.47 \pm 4.40
6.1	菌球大, 培养物稀	47.73 \pm 1.91	32.01 \pm 5.11
6.5	菌球大, 培养物稀	45.93 \pm 2.29	21.59 \pm 1.42
7.1	菌球大, 培养物稀	45.00 \pm 2.41	9.44 \pm 1.42

表2 麦角隐亭产量的方差分析

变异来源	SS	<i>v</i>	MS	<i>F</i>	<i>F</i> _{0.05}	<i>F</i> _{0.01}
总	1601.12	13				
组间	1498.87	6	249.81	17.10**	3.87	7.19
误差	102.25	7	14.61			

** $F > F(0.01)$ $P < 0.01$

2.2 发酵培养基 pH 值对麦角隐亭产生的影响

以 pH 5.2 的种子培养基生长所获得的菌丝体分别接入 pH 为 4.1, 5.2, 5.7, 6.1, 6.5, 7.2, 8.0 发酵培养基中, 经发酵培养后, 结果如表 3 所示: 培养基的终末 pH 都下降, 菌丝体都为细密的菌球, 培养物稠, 但菌丝体干重无统计上的差异; 发酵液中麦角隐亭的产量分别为 24.51, 48.49, 51.31, 31.00, 35.21, 34.87, 26.11, 25.55 $\mu\text{g/mL}$, 以发酵培养基起始 pH 为 5.2 时产量最高, 经方差分析, 差异显著 $P < 0.01$ (见表 4)。

表3 发酵培养基的 pH 值对麦角隐亭产生的影响

初始 pH	终末 pH	菌丝体干重(mg/mL)	麦角隐亭产量($\mu\text{g/mL}$)
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
4.1	3.2	54.07 \pm 1.35	24.51 \pm 1.69
4.6	3.3	57.73 \pm 1.56	48.49 \pm 4.02
5.2	3.5	58.20 \pm 1.81	51.31 \pm 1.55
5.7	3.8	55.63 \pm 2.46	31.00 \pm 0.80
6.1	3.9	54.47 \pm 2.50	35.21 \pm 2.45
6.5	4.0	54.40 \pm 2.17	34.87 \pm 6.03
7.2	4.1	53.30 \pm 1.87	26.11 \pm 1.49
8.0	4.1	51.93 \pm 1.82	25.55 \pm 2.36

表4 麦角隐亭产量的方差分析

变异来源	SS	<i>n</i>	MS	<i>F</i>	$F_{\alpha}^2(0.05)$	$F_{\alpha}^2(0.01)$
总	1554.79	15				
组间	1482.50	7	211.79	23.43**	3.50	6.19
误差	72.29	8	9.04			

** $F > F(0.01)$, $P < 0.01$

麦角菌产麦角碱的最适发酵培养基 pH 值各不相同, 根据文献报道 *Claviceps microcephala*^[5,7] 和 *Claviceps purpurea* cp2-2^[6] 产麦角新碱的最适 pH 分别为 7.5, 8.0; *Claviceps passpali* 产 LAD 的最适 pH 为 5.2^[8]. 我们发现 *Claviceps purpurea* ATCC 20019 产麦角隐亭的最适 pH 也为 5.2, 可见每一菌株产碱都有其特定的酸碱条件.

2.3 发酵过程中 pH 的调节对麦角隐亭产生的影响

发酵过程中每隔 24 h 用 0.1 mol/L NaOH 调 pH, 结果如表 5 所示: 菌丝体干重为 83.28 mg/mL, 与不调 pH 的菌丝体干重 (57.37 mg/mL) 比较, 差异极显著 $P < 0.001$, 这可能是不用 NaOH 调 pH, 发酵过程中 pH 会下降, 使较多的 H 离子进入细胞内, 改变胞内的 pH, 使麦角菌代谢活性和菌丝生长受到抑制, 从而减少了生物量^[8]; 调 pH 的发酵液中麦角隐亭产量为 35.12 μg/mL, 与不调 pH 的比较未见明显提高 ($P > 0.05$). 由于总的产碱是菌丝体和发酵液中麦角碱之和, 所以发酵培养基 pH 5.2, 并不断维持其恒定更有利于菌丝生长和产碱.

表5 发酵过程中 pH 的调节对麦角隐亭产生的影响

	菌丝体干重		麦角隐亭产量	
	mg/mL	$\bar{x} \pm s$	μg/mL	$\bar{x} \pm s$
不调 pH	56.4		31.14	
	58.2	57.37 ± 0.91	37.62	32.57 ± 4.51
	57.5		34.82	
调 pH	80.3		34.82	
	78.9	30.49		
	84.7	83.29 ± 2.95***	35.30	35.12 ± 5.03▲
	84.3		44.15	
	86.1		30.31	
	85.4		35.63	

*** 与不调 pH 比较 $P < 0.001$ ▲ 与不调 pH 比较 $P > 0.05$

种子及发酵培养基的起始 pH 均为 5.2, 且不断调节发酵液的 pH, 使其维持在 5.2, 是最适宜菌株 ATCC 20019 的菌丝生长和产麦角隐亭的酸碱条件.

参 考 文 献

- 1 刘立群. 毒物分析. 上海: 上海科学出版社, 1960
- 2 陆师义, 陈玉梅. 微生物的利用和防治实例——麦角菌, 玉米粉菌, 噬菌体及小麦锈病菌. 云南农业大学学报, 1989, 4(1): 17~26
- 3 李家藻. 微生物产生生物碱的进展和展望. 微生物学报, 1981, 8(1): 30~36
- 4 Amici A M, Minghetti A, Scotti T, et al. Fermentative process producing ergocryptine. U S Patent, 3485722, 1969-12-23
- 5 岳德超, 杨云鹏, 陆师义等. 麦角菌深层培养产生麦角新碱的研究. 微生物学报, 1973, 13(2): 157~161
- 6 岳德超, 何惠霞. 麦角碱的深层发酵优化条件的研究. 中草药, 1988, 19(7): 15~16
- 7 杨云鹏, 岳德超, 陆师义等. 鱼肝代替谷氨酸生产麦角新碱的研究. 药学学报, 1979, 14(5): 316~320
- 8 Petot E, Cadez J, Milicic S, et al. The effect of citric acid concentration and pH on the submerged production of lysergic acid derivatives. Appl Microbiol Biotechnol, 1984, 20: 29~32
- 9 Arcamone F, Casinelli G, Ferni G, et al. Ergotamine production and metabolism of *Claviceps purpurea* strain 275 FI in stirred fermentors. Can J Microbiol, 1970, 16: 923~931
- 10 Vining L C, Nair P M. Clavine alkaloids formation in submerged cultures of a *Claviceps* species. Can J Microbiol, 1966, 12: 915~931
- 11 Milicic S, Kremser M, Gaberc-Porekar V, et al. Correlation between growth and ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps purpurea* batch fermentation. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 27: 117~120
- 12 陈忠, 陈玉梅, 陆师义. 麦角菌株 ce-3-45 产碱期菌丝连续接种对形成麦角碱的影响. 微生物学论文集. 北京: 科学出版社, 1985, 167~173

The Influence of pH on the Ergocryptine Production by *Claviceps purpurea*

Feng Huiqin Qian Xiuping Yang Qinyao

(Department of biology)

Abstract The mycelia of *Claviceps purpurea* ATCC 20019 which cultured in seed medium of different pH (4.1~7.1) were fermentated. The results showed that the highest yield of alkaloid was 44.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pH 5.2 seed medium, and the dry weight of mycelia was not marked difference. The seed mycelia of pH 5.2 were inoculated in production medium of various pH (4.1~8.0). The results showed that dry weight of mycelia was not difference. The highest yield of alkaloid was 51.31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in the production medium of pH 5.2. Regulate the production medium at pH 5.2 during fermentation, the dry weight of mycelia increased from 57.31 to 83.28 mg/mL and yield of ergocryptine was not markedly raised as compared with that without pH regulation.

Key words *Claviceps purpurea*; ertocryptine; medium; pH