place even in surface replacement cultures.

(3) The alkaloid production in surface replacement cultures is not so much affected by the natures of C- or N-sources as in the ordinary surface cultures, as long as the age of mycelium is not so young or so old and the depth of the culture liquid is not so high.

4) The surface mycelium of ergot fungus continues to produce the alkaloids with undiminished vigor through several successive replacement of culture liquids. The alkaloid production in this semi-continuous process fundamentally depends upon the surface mycelium first obtained.

(5) The ergot alkaloid production in surface replacement cultures is much affected by the age of mycelium or by the depth of the replacement liquid.

麦角菌に関する研究(第22報) 菌蓋培養における 麦角アルカロイドの生産について(その2)

阿部又三, 山野藤吾, 楠本 貢 (財団法人醸酵研究所)

昭和28年5月5日受理

Researches on Ergot Fungus. Part 22. Production of Ergot Alkaloids in Surface Replacement Cultures (II).

By Matazō ABE, Tōgo YAMANO and Mitsugi KUSUMOTO

(The Institute for Fermentation, Osaka)

著者等は前報で各種麦角菌の菌蓋培養で麦角アルカロイドを生産する状態を検討し、供試のどの菌株についてもほぼ同様の成績が得られたことから、特に応用上重視されているカモジグサ型菌株について得られたもののみを代表的にとりまとめて先ずその前半を報告した。本報告はその後半をなすものであつて、これには菌蓋培養における麦角アルカロイドの生産と培養液中の各種養分の濃度、培養液の最初の pH、培養温度等との関係について得られた実験成績を取り扱つた。もちろん菌蓋の洗浄法その他はすべて前報で述べた通りである。

実 験 の 部

[I] C-給源の濃度と麦角アルカロイドの生産との関係 前報の各実験ではどの種の C-給源もすべて 5% の濃度で用いた。通常の表面培養では N-給源を N_2 として 0.2% 前後の濃度で使用する限り C-給源をこれ以上の高濃度で使用してもアルカロイドはもはやそれ程多くは生産されない。すなわち C-給源のこの濃度は通常の表面培養ではいわば経済的濃度なのであるが、菌蓋培養でもこれと同様であるかどうかは不明である。この点に関して得られた実験成績の 1 つを表示すると Table 1 の如くである。本実験は次のようにして行つた。すなわち同一の培養条件の下で多数表面培養し、一定の時期にこれらのうちからアルカロイドの生産されている状態の全く一致するもののみを選択し、それぞれの培養液を供試の培養液(及び殺菌水)と取り換えて再び恒温器内に静置した。成績の比較には各菌蓋培養から時間の経過と共に培養液約 1 cc ずつを抜き取り、その pH とアルカロイド含量とを測定した。前報の各実験成績からも知られるように麦角菌の培養特に菌蓋培養でアルカロイドの生産されている状態はこの両測定値からはほぼ明確に知られる。Table 1 から菌蓋培養では C-給源のいわゆる経済的濃度が通常の表面培養の場合よりもかなり大であることが明らかに知られる。なお C-給源として葡萄糖を用いた場合も N-給源の濃度がこれよりも更に小であつたにもかかわらずほぼこれと同様の成績が得られた。

[II] N-給源の濃度と麦角アルカロイドの生産との関係 通常の表面培養では C-給源の濃度によつても異なるが、それぞれ一定の範囲までは N-給源の濃度が大きい程多量の麦角アルカロイドが生産される。この場合 N-給源の経済的濃度は前述のように C-給源を 5% の濃度で用いる時で通常 N_2 として約 0.2% 前後である。

次にこれが菌蓋培養ではどうであるかを前項の場合と全く同様の方法で検討し、たとえば C-給源として葡萄糖を用いた場合 Table 2 に示すような成績を得た。Table 2 から菌蓋培養では通常の表面培養の場合よりも N-給源のいわゆる経済的濃度が明らかに小さいことが分る。このことはたとえばクエン酸醗酵において見られる事実に類似しているが、これを前項の実験結果と総合するに、菌蓋培養法で麦角アルカロイドを多量に生産するためには培養液として通常の表面培養の場合よりも C-給源の濃度の N-給源の濃度に対する割合のやや大な

Table 1. Relation Between C-Source Concentration and Alkaloid Production in Surface Replacement Cultures by *Agropyrum*-Type Ergot Fungus.

Primary surface culture :— Culture liquid ; mannitol (5%), ammonium succinate, (0.8%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.2). Volume of liquid ; 30 cc. Culture vessel ; 100 cc. Erlenmeyer flask. Temperature ; 24~26°. Incubation time ; 25 days. Culture fluid obtained ; pH 6.0, residual mannitol (0.0%), alkaloid content* (22.0 mg. per 100 cc.).

Surface replacement culture :— Replacement liquid ; mannitol (1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7%), ammonium succinate (0.8%), about 0.15% as N_2 , KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.4). Volume of liquid or sterilized water ; 20 cc. Temperature ; 24~26°.

Mannitol concentration, per cent	Age of culture, days									
	Reaction and alkaloid content*, mg. per 100cc., of culture medium									
	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids
1	5.2	3.5	6.0	5.0	6.2	9.7	6.4	10.0	6.6	7.0
2	5.0	4.1	5.8	8.2	6.0	19.0	6.4	18.0	6.6	16.0
3	5.0	6.0	5.8	13.0	5.8	22.1	6.0	24.2	6.4	26.4
4	5.0	5.2	5.6	16.0	5.6	26.0	5.8	30.3	6.0	31.0
5	5.0	4.4	5.4	18.2	5.6	30.2	5.8	34.0	6.0	34.3
6	5.0	4.0	5.2	19.4	5.4	33.0	5.6	36.5	5.8	39.0
7	4.8	3.2	5.0	20.2	5.2	34.1	5.6	36.8	5.8	39.8
(Water)	5.8	1.0	6.0	2.5	6.0	3.5	6.2	3.5	6.4	1.5

* The alkaloids were determined as agroclavine. The same applies to the other determination.

Table 2. Relation Between N-Source Concentration and Alkaloid Production in Surface Replacement Cultures by *Agropyrum*-Type Ergot Fungus.

Primary surface culture :— Culture liquid ; mannitol (5%), ammonium succinate (0.8%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.2). Volume of liquid ; 30 cc. Culture vessel ; 100 cc. Erlenmeyer flask. Temperature ; 26°. Incubation time ; 28 days. Culture fluid obtained ; pH 6.0, residual mannitol (0.0%), alkaloid content (19.5 mg. per 100 cc.).

Surface replacement culture :— Replacement liquid ; glucose (3%), ammonium succinate (0.1, 0.3, 0.6, 0.8, and 1.2%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.6). Volume of liquid or sterilized water ; 20 cc. Temperature ; 26°.

Ammonium succinate concentration, per cent	Age of culture, days									
	Reaction and alkaloid content, mg. per 100 cc., of culture medium									
	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids
0.1	5.0	4.8	5.2	12.6	5.4	15.8	5.6	16.0	5.6	16.5
0.3	5.0	5.0	5.4	16.2	5.9	24.0	6.0	28.0	6.0	28.5
0.6	4.8	6.8	5.2	18.5	6.0	27.2	6.1	28.6	6.2	29.0
0.8	4.6	4.1	5.0	13.8	6.2	21.5	6.2	26.0	6.4	26.5
1.2	4.6	3.8	5.0	11.8	6.2	18.0	6.2	20.8	6.4	23.2
(Water)	5.8	0.5	6.0	1.0	6.2	2.0	6.2	2.0	6.2	2.5

Table 3. Relation Between Initial pH of Medium and Alkaloid Production in Surface Replacement Cultures by *Agropyrum*-Type Ergot Fungus.

Primary surface culture :— Culture liquid ; mannitol (5%), ammonium succinate (0.7%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.2). Volume of liquid ; 30 cc. Culture vessel ; 100 cc. Erlenmeyer flask. Temperature ; 26°. Incubation time ; 26 days. Culture fluid obtained ; pH 5.8, residual mannitol (trace), alkaloid content (12.5 mg. per 100 cc.).

Surface replacement culture :— Replacement liquid ; glucose (5%), ammonium succinate (0.6%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), (pH 4.8, 5.0, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, and 6.2). Volume of liquid or sterilized water ; 20 cc. Temperature ; 26°.

Initial pH of medium	Age of culture, days							
	Reaction and alkaloid content, mg. per 100 cc., of culture medium							
	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids
4.8	4.8	5.0	5.6	14.5	5.8	23.0	6.0	28.4
5.0	4.8	5.0	5.6	15.4	6.0	24.8	6.0	31.2
5.2	5.2	4.8	4.8	16.0	6.0	25.2	6.0	31.2
5.4	5.0	4.0	4.8	15.4	6.0	25.0	6.0	30.6
5.6	5.0	3.0	4.8	15.5	6.0	24.8	6.0	31.2
5.8	5.2	2.6	4.8	15.0	6.0	24.0	6.1	30.0
6.2	5.2	2.0	5.4	13.8	6.1	22.2	6.2	27.6
6.0 (Water)	5.8	1.0	5.8	3.0	6.1	4.5	6.2	5.0

るものを使用すべきであることが知られる。

〔III〕 培養液の最初の pH と麦角アルカロイドの生産との関係 通常の表面培養では培養液の組成, 培養温度その他の条件によつてそれぞれ異なるが, ある程度まで培養液の最初の pH が低い程多量のアルカロイドが

生産される。菌蓋培養ではこれがどうであるかを前諸項の場合と全く同様の方法で検討して Table 3 に示すような成績が得られた。すなわち培養液の最初の pH については菌蓋培養でも通常の表面培養の場合と同様のことがいえるが、菌蓋培養では通常の表面培養の場合と異なり、培養液の最初の pH のアルカロイドの生産に及ぼす影響は極めて小である。

[IV] 培養温度と麦角アルカロイドの生産との関係 通常の表面培養では培養液の組成、pH、液層の高さ等の如何によつてこの関係も一定しないが、一般には 26° 前後の温度の下で培養を行うことによつて最も良好な成績が収められる。次に菌蓋培養ではこの関係がどうであるかを前項の場合と同様の方法で検討して Table 4 に示す成績が得られた。Table 4 から菌蓋培養法で麦角アルカロイドを生産するためには通常の表面培養の場

Table 4. Relation Between Incubation Temperature and Alkaloid Production in Surface Replacement Cultures by *Agropyrum*-Type Ergot Fungus.

Primary surface culture :— Culture liquid; mannitol (5%), ammonium succinate (0.9%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.2). Volume of liquid; 30 cc. Culture vessel; 100 cc. Erlenmeyer flask. Temperature; 26°. Incubation time; 30 days. Culture fluid obtained; pH 6.0, residual mannitol (0.0%), alkaloid content (16.0 mg. per 100 cc.).

Surface replacement culture :— Replacement liquid; glucose (5%), ammonium succinate (0.5%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.6). Volume of liquid or sterilized water; 20 cc. Temperature; 15~17°, 20~22°, 24°, 26~28°, and 30~32°.

Temperature °C	Age of culture, days									
	3		5		8		10		14	
	Reaction and alkaloid content, mg. per 100 cc., of culture medium									
	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids	pH	Alkaloids
15~17	4.6	4.2	4.6	6.7	5.2	12.2	5.6	14.8	6.0	17.3
20~22	4.8	5.5	5.0	12.0	5.4	17.6	5.6	20.5	6.0	22.4
24	5.2	8.0	5.4	15.2	5.6	22.5	5.8	23.5	6.2	18.1
26~28	5.2	12.8	5.6	17.5	6.0	20.0	6.2	18.0	6.4	15.2
30~32	5.2	13.0	5.6	9.0	6.0	6.2	6.6	5.0	6.8	3.6
24(Water)	5.8	1.0	6.0	3.0	6.0	4.0	6.2	4.5	6.2	4.5
30~32(Water)	6.0	0.3	6.2	0.6	6.2	0.5	6.4	0.3	6.6	0.3

合よりもつと低温の下で、すなわち 24° 附近の温度で培養するのが合理的であることが分る。ただし培養液の種類によつてそれぞれ程度に差はあるが、液層が極めて高い場合はこのような温度の下では菌の発育がいたずらに遅れるので実際的ではない。

[V] 菌の発育を抑制する諸物質と麦角アルカロイドの生産との関係 アニリン、フェニールエチルアルコール、フェニール酢酸、ピリジン、インドール、インドール酢酸、フルフラール、ナフタリン、ナフタリン酢酸、 α -及び β -ナフトール、硫酸銅、青酸等諸種の物質の麦角アルカロイドの生産に及ぼす影響についてしらべた。

通常の表面培養では培養液中にこれらが養分の消費される速度の僅かに遅れる程度に溶存するとかえつて多量のアルカロイドが生産される。実験の結果菌蓋培養でも全く同様のことが認められたが、この培養ではいずれの物質も通常の表面培養の場合よりもかなり高い濃度で始めてその影響を与えることが分つた。そして供試の多くの物質中フェニール酢酸、安息香酸等若干の物質は他の諸物質と異なつて C-給源の消費速度の極めて僅かに遅れる程度の濃度で既にアルカロイドの生産を著しく阻害することが認められた。なおこの場合阻害の程度は Fig. 1 に示すように N-給源の種類によつて異なることも分つた。このことはこれらの物質を培養の途上で添加するも同様であるが、このようにしてアルカロイドの生産の阻害された培養では菌苔が僅かにしか増殖しない事実から見て、これらの物質は特に N-給源の代謝に著しい影響を及ぼすものと考えられる。

[VI] 液内培養における麦角アルカロイドの生産 既に述べたように液内培養では麦角アルカロイドは殆んど生産されない。しかし液内培養でも表面的に発育してアルカロイドを多量に生産する能力を持つに至つた菌蓋を inoculum として使用する場合はやや多量のアルカロイドの生産されることが今回始めて認められた。ここに 1 つの実験成績を図示すると Fig. 2 の如くである。本実験は次のようにして行つた。すなわち一定の条件下で多数表面培養し、それらから適当な時期に 1 個ずつ取り出し、各菌蓋を無菌的に洗浄したのち一定の培養基に投じ、おのおのを一定の条件下で振盪培養した。アルカロイドの測定法は前各項の場合と同様である。Fig. 2 から知られるようにこのような液内培養でも培養条件と麦角アルカロイドの生産との関係は表面培養の場合とほぼ同様であるが、アルカロイドの生産される量は通常の表面培養或いは菌蓋培養の場合にくらべて明らかに少い。

Fig. 1. Influence of Phenylacetic Acid on Alkaloid Production by Agropyrum-Type Ergot Fungus in Surface Replacement Cultures.

Primary surface culture:— Culture liquid; mannitol (5%), ammonium succinate (0.8%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), (pH 5.2). Volume of liquid; 30 cc. Culture vessel; 100 cc. Erlenmeyer flask. Temperature; 26°. Incubation time; 2, 7, 14, 18, 26, and 40 days. Culture fluid obtained; pH 6.0, residual mannitol (0.1%), alkaloid content (7.0 mg. per 100 cc.).

Surface replacement culture:— Replacement liquid; (1)—glucose (5%), asparagine (1.0%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), (pH 5.6), (2)—glucose (5%), peptone (1.5%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%) (pH 5.6), (3)—glucose (5%), ammonium succinate (0.6%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), (pH 5.6), (4)—(1)+phenylacetic acid (0.025%), (5)—(2)+phenylacetic acid (0.025%), and (6)—(3)+phenylacetic acid (0.025%). Volume of liquid or sterilized water; 20 cc. Temperature; 26°.

Fig. 2. Relation Between Age of Surface Mycelium and Alkaloid Production in Shake Cultures by Agropyrum-Type Ergot Fungus.

Surface culture:— Culture liquid; mannitol (5%), ammonium succinate (1.0%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05%) (pH 5.2). Volume of liquid; 30 cc. Culture vessel; 100 cc. Erlenmeyer flask. Temperature; 26~28°. Incubation time; 14, 18, 26, and 40 days. Culture fluid obtained; pH 5.2, 5.4, 6.0, and 6.4 and alkaloid content 2.5, 8.5, 15.0, and 19.0 mg. per 100 cc., respectively.

Shake culture:— Culture liquid; mannitol (3%), ammonium succinate (0.8%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), α -naphthaleneacetic acid (0.001%) (pH 5.2). Volume of liquid; 30 cc. Culture vessel; 300 cc. shake flask. Temperature; 24~26°. Strokes; 140 c.p.m. Amplitudes; 3 cm.

終りに臨み御懇篤な御指導と御鞭撻とを賜つた武田研究所長桑田智博士並びに当研究所長佐藤喜吉博士に謹謝する。また終始御懇篤な御指導を仰いだ朝比奈泰彦、中沢亮治の両先生及び坂口謹一郎先生に深甚の謝意を表する。なおまた本研究に御助力願つた高津嘉春氏に感謝する。

Summary

(1) In order to produce the ergot alkaloids by surface replacement cultures, it is reasonable to use such a culture medium which has rather high C/N ratio due to rather low nitrogen concentration.

(2) In order to produce the ergot alkaloids by surface replacement cultures, it is reasonable to carry out the cultivation at relatively low temperature. In general about 24° is preferable.

(3) The alkaloid production in surface replacement cultures is not so much affected by the initial pH of the culture media as in ordinary surface cultures. The alkaloid production in the former is not affected appreciably at the pH values between 5.0 and 6.0.

(4) The alkaloid production in surface replacement cultures is also enhanced by various growth inhibitory substances in the culture media. But in replacement cultures, unlike in ordinary surface cultures, the said effect can be seen for the first time when the concentration of the substances is fairly increased.

(5) The mycelium of ergot fungus grown on the surface of a suitable liquid medium produces the alkaloids rather excellently even in submerged cultures.