



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106967775 A

(43)申请公布日 2017.07.21

(21)申请号 201710220575.8

C12R 1/77(2006.01)

(22)申请日 2017.04.05

C12R 1/645(2006.01)

(71)申请人 中国医学科学院医药生物技术研究所

地址 100050 北京市东城区天坛西里1号中国医学科学院医药生物技术研究所

(72)发明人 余利岩 向海波 刘万仓 张涛  
庞旭 刘红宇 苏静

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51)Int. Cl.

C12P 39/00(2006.01)

C12P 33/20(2006.01)

C12N 1/14(2006.01)

权利要求书3页 说明书13页 附图3页

(54)发明名称

生物催化制备薯蓣皂苷元的方法及其所用菌剂

(57)摘要

本发明公开了生物催化制备薯蓣皂苷元的方法及其所用菌剂。该制备薯蓣皂苷元的方法,为M1)所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和弯孢霉属真菌,得到薯蓣皂苷元;M2)所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元;M3)所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌,得到薯蓣皂苷元。新月弯孢霉和镰孢属真菌联合发酵含有盾叶薯蓣的培养基的薯蓣皂苷元的得率比新月弯孢霉单独发酵含有盾叶薯蓣的培养基与镰孢属真菌单独发酵含有盾叶薯蓣的培养基二者的薯蓣皂苷元的得率之和还要高,新月弯孢霉和镰孢属真菌在发酵含有盾叶薯蓣的培养基产薯蓣皂苷元方面产生了协同作用。

1. 制备薯蓣皂苷元的方法,为M1)至M3)中的任一种:

M1) 所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和弯孢霉属真菌,得到薯蓣皂苷元;

M2) 所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元;

M3) 所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌,得到薯蓣皂苷元。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述M1)至M3)中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709、镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400712中的至少一种;所述弯孢霉属真菌为新月弯孢霉;所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述M1)和M3)中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709;

所述M2)为M21)、M22)或M23);

所述M21)为所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元;所述M21)中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709;所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718;

所述M22)为所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元;所述M22)中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226;所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718;

所述M23)为所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元;所述M23)中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709、镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400712;所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述M1)中,用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和弯孢霉属真菌为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入所述镰孢属真菌进行培养后再接入所述弯孢霉属真菌进行培养;

所述M21)中,用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入所述镰孢属真菌进行培养后再接入所述砖格孢属真菌进行培养;

所述M22)中,用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709进行培养后再接入砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718进行培养再接入镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226进行培养;

所述M23)中,用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709进行培养后再接入砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718进行培养再接入镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226进行培养再接入镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400712进行培养。

5. 用于制备薯蓣皂苷元的菌剂,其特征在于:所述菌剂为C1至C4中任一种:

所述C1为由镰孢属真菌菌剂和弯孢霉属真菌菌剂构成的用于制备薯蓣皂苷元的成套

菌剂,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分含有权利要求1至3中任一所述的镰孢属真菌,所述弯孢霉属真菌菌剂的活性成分含有权利要求1至3中任一所述的弯孢霉属真菌;

所述C2为活性成分含有权利要求1至3中任一所述的镰孢属真菌和权利要求1至3中任一所述的弯孢霉属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂;

所述C3为由镰孢属真菌菌剂和砖格孢属真菌菌剂构成的用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分含有权利要求1至3中任一所述的镰孢属真菌,所述砖格孢属真菌菌剂的活性成分含有权利要求1至3中任一所述的砖格孢属真菌;

所述C4为活性成分含有权利要求1至3中任一所述的镰孢属真菌和权利要求1至3中任一所述的砖格孢属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂。

6. 根据权利要求5所述的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂,其特征在于:所述C1和所述C2中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709;所述弯孢霉属真菌为新月弯孢霉;

所述C3为C31、C32或C33;所述C31、C32和C33均为由镰孢属真菌菌剂和砖格孢属真菌菌剂构成的用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分含有权利要求1至3中任一所述的镰孢属真菌,所述砖格孢属真菌菌剂的活性成分含有权利要求1至3中任一所述的砖格孢属真菌;所述C31、C32和C33中,所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718;

所述C31中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709;

所述C32中,所述镰孢属真菌菌剂为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂;所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂的活性成分含有镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709;所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂的活性成分含有镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226;

所述C33中,所述镰孢属真菌菌剂为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC400712菌剂;所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂的活性成分含有镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709;所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂的活性成分含有镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226;所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712菌剂的活性成分含有镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC400712;

所述C4为C41、C42或C43;所述C41、C42和C43均为活性成分含有权利要求1至3中任一所述的镰孢属真菌和权利要求1至3中任一所述的砖格孢属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂;所述C41、C42和C43中,所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718;

所述C41中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709;

所述C42中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226;

所述C43中,所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712。

7. P1) 至P3) 中的任一种应用:

P1) 镰孢属真菌和弯孢霉属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用或权利要求5或6中所述C1

或所述C2在制备薯蓣皂苷元中的应用；

P2) 镰孢属真菌和砖格孢属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用或权利要求5或6中所述C3或所述C4在制备薯蓣皂苷元中的应用；

P3) 镰孢属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用。

8. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于: 所述P1) 至P3) 中, 所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC400226和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712中的至少一种; 所述弯孢霉属真菌为新月弯孢霉; 所述砖格孢属真菌为砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718。

9. 根据权利要求7或8所述的应用, 其特征在于: 所述P2) 为P21)、P22) 或P23); 所述P21)、P22) 或P23) 均为镰孢属真菌和砖格孢属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用;

所述P21) 中的所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709;

所述P22) 中, 所述镰孢属真菌为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226;

所述P23) 中, 所述镰孢属真菌菌剂为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712。

10. 根据权利要求1-4中任一所述的方法、权利要求5或6所述的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂或权利要求7-9中任一所述的应用, 其特征在于: 所述新月弯孢霉为 *Curvularia lunata* 3.4381。

## 生物催化制备薯蓣皂苷元的方法及其所用菌剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物催化制备薯蓣皂苷元的方法及其所用菌剂。

### 背景技术

[0002] 薯蓣皂苷元(diosgenin),工业上称之为薯蓣皂素,是薯蓣属(Dioscorea L.)植物中的重要活性成分,作为合成甾体激素药物重要的医药中间体,被称为“药用黄金”。世界各国生产的60%以上甾体激素以薯蓣皂苷元为原料,市场需求巨大。目前,生产薯蓣皂苷元的方法是基于Rothrock等人1957年提出的化学酸水解法,该工艺存在诸多问题。如何从源头根治污染是薯蓣皂苷元产业化持续发展亟待解决的问题。利用微生物发酵制备薯蓣皂苷元或者用生物酶制备薯蓣皂苷元,是无酸化生产薯蓣皂苷元的一个发展方向。

### 发明内容

[0003] 本发明所要解决的一个技术问题是如何高效地制备薯蓣皂苷元。

[0004] 为了解决以上技术问题,本发明提供了P1)至P3)的应用:

[0005] P1) 镰孢属真菌和弯孢霉属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用或下述C1或下述C2在制备薯蓣皂苷元中的应用;

[0006] P2) 镰孢属真菌和砖格孢属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用或下述C3或下述C4在制备薯蓣皂苷元中的应用;

[0007] P3) 镰孢属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用。

[0008] 为了解决以上技术问题,本发明提供了M1)至M3)的制备薯蓣皂苷元的方法:

[0009] M1) 所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和弯孢霉属真菌,得到薯蓣皂苷元;

[0010] M2) 所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元;

[0011] M3) 所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌,得到薯蓣皂苷元。

[0012] 上述方法或应用中,M1)至M3)和P1)至P3)中,所述镰孢属真菌可为镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400709、镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400226和镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400712中的至少一种;所述弯孢霉属真菌可为新月弯孢霉;所述砖格孢属真菌可为砖格孢属菌种(*Dictyosporium* sp.)CPCC 400718。

[0013] 上述方法或应用中,M1)、M3)、P1)和P3)中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400709;M2)和P2)中,所述镰孢属真菌可为镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400709;M2)和P2)中,所述镰孢属真菌还可为镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400709和镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400226;M2)和P2)中,所述镰孢属真菌还可为镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400709、镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400226和镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400712。

[0014] 上述方法或应用中,M1)和P1)中,所述新月弯孢霉可为*Curvularia*

lunata3.4381。

[0015] 上述应用中,所述制备薯蓣皂苷元包括用含有盾叶薯蓣的培养基进行发酵。

[0016] 上述方法或应用中,所述含有盾叶薯蓣的培养基可为固体培养基或液体培养基。

[0017] 上述方法或应用中,所述盾叶薯蓣可为盾叶薯蓣的根状茎。

[0018] 上述方法或应用中,M1)和P1)中,所述镰孢属真菌和所述弯孢霉属真菌的菌落形成单位(cfu)数目比可为1:(0.5-4),如1:2。

[0019] 上述应用中,上述P2)具体可为P21)、P22)或P23);所述P21)、P22)或P23)均为镰孢属真菌和砖格孢属真菌在制备薯蓣皂苷元中的应用。

[0020] 所述P21)中的所述镰孢属真菌可为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709;所述P21)中,所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌的菌落形成单位(cfu)数目比可为1:(0.5-4),如1:2。

[0021] 所述P22)中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400226。所述P22)中,镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709、镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400226和砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPC 400718的菌落形成单位(cfu)数目比可为1:(0.5-4):(0.5-4),如1:1:1。

[0022] 所述P23)中,所述镰孢属真菌菌剂具体可为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC400709、镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400226和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC400712。所述P23)中,镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709、镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400226、镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400712和砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPC 400718的菌落形成单位(cfu)数目比可为1:(0.5-4):(0.5-4):(0.5-4),如1:1:1:1。

[0023] 上述方法中,上述M1)中,用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和弯孢霉属真菌具体可为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入所述镰孢属真菌进行培养后再接入所述弯孢霉属真菌进行培养。如向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入所述镰孢属真菌在20-30℃(如28℃)培养15-25天(如22天)后再接入所述弯孢霉属真菌在20-30℃(如28℃)培养5-10天(如7天)。

[0024] 上述M2)具体可为M21)、M22)或M23)。

[0025] 所述M21)为所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元。所述M21)中,所述镰孢属真菌可为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709;所述砖格孢属真菌可为砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPC 400718。所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌的菌落形成单位(cfu)数目比可为1:(0.5-4),如1:2。其中,用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌具体可为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入所述镰孢属真菌进行培养后再接入所述砖格孢属真菌进行培养。如向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入所述镰孢属真菌在20-30℃(如28℃)培养15-25天(如22天)后再接入所述砖格孢属真菌在20-30℃(如28℃)培养5-10天(如7天)。

[0026] 所述M22)为所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌,得到薯蓣皂苷元。所述M22)中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400226;所述砖格孢属真菌可为砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPC 400718。所述M22)中,镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC

400709、镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226和砖格孢属菌种 (*Dictyosporium* sp.) CPCC 400718的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1: (0.5-4) : (0.5-4), 如1:1:1。其中, 用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌具体可为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC400709进行培养后再接入所述砖格孢属真菌进行培养再接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226进行培养。如向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400709在20-30℃ (如28℃) 培养15-25天 (如22天) 后再接入砖格孢属菌种 (*Dictyosporium* sp.) CPCC 400718在20-30℃ (如28℃) 培养5-10天 (如7天) 后再接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226在20-30℃ (如28℃) 培养5-10天 (如7天)。

[0027] 所述M23) 为所述方法包括用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌, 得到薯蓣皂苷元。所述M23) 中, 所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226和镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400712; 所述砖格孢属真菌可为砖格孢属菌种 (*Dictyosporium* sp.) CPCC 400718。所述M23) 中, 镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226、镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400712和砖格孢属菌种 (*Dictyosporium* sp.) CPCC 400718的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1: (0.5-4) : (0.5-4) : (0.5-4), 如1:1:1:1。其中, 用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和砖格孢属真菌具体可为向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400709进行培养后再接入砖格孢属菌种 (*Dictyosporium* sp.) CPCC 400718进行培养再接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226进行培养再接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400712进行培养。如向含有盾叶薯蓣的培养基中先接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400709在20-30℃ (如28℃) 培养15-25天 (如22天) 后再接入砖格孢属菌种 (*Dictyosporium* sp.) CPCC 400718在20-30℃ (如28℃) 培养5-10天 (如7天) 后再接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400226在20-30℃ (如28℃) 培养5-10天 (如7天) 后再接入镰孢属菌种 (*Fusarium* sp.) CPCC 400712在20-30℃ (如28℃) 培养7-15天 (如10天)。

[0028] 上述M3) 中, 用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌具体可为向含有盾叶薯蓣的培养基中接入所述镰孢属真菌在20-30℃ (如28℃) 培养15-25天 (如22天)。

[0029] 为了解决以上技术问题, 本发明提供了用于制备薯蓣皂苷元的菌剂。

[0030] 本发明所提供的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂为C1至C4中任一种:

[0031] 所述C1为由镰孢属真菌菌剂和弯孢霉属真菌菌剂构成的用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂, 所述镰孢属真菌菌剂的活性成分含有所述镰孢属真菌, 所述弯孢霉属真菌菌剂的活性成分含有所述弯孢霉属真菌;

[0032] 所述C2为活性成分含有所述镰孢属真菌和所述弯孢霉属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂;

[0033] 所述C3为由镰孢属真菌菌剂和砖格孢属真菌菌剂构成的用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂, 所述镰孢属真菌菌剂的活性成分含有所述镰孢属真菌, 所述砖格孢属真菌菌剂的活性成分含有所述砖格孢属真菌;

[0034] 所述C4为活性成分含有所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂。

[0035] 上述用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂中,所述C1中,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分可为所述镰孢属真菌,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C1中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709。所述C1中,所述弯孢霉属真菌可为新月弯孢霉;所述新月弯孢霉具体可为 *Curvularia lunata* 3.4381。所述C1中,所述弯孢霉属真菌菌剂的活性成分可为所述弯孢霉属真菌,所述弯孢霉属真菌菌剂的活性成分还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C1中所述镰孢属真菌菌剂和弯孢霉属真菌菌剂均单独包装。所述C1中,所述镰孢属真菌和所述弯孢霉属真菌的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1:(0.5-4),如1:2。

[0036] 上述用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂中,所述C2具体可为活性成分为所述镰孢属真菌和所述弯孢霉属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂;所述C2的活性成分还可含有其他生物成分或非生物成分,所述C2的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C2中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709。所述C2中,所述弯孢霉属真菌可为新月弯孢霉;所述新月弯孢霉具体可为 *Curvularia lunata* 3.4381。所述C2中,所述镰孢属真菌和所述弯孢霉属真菌的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1:(0.5-4),如1:2。

[0037] 上述用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂中,所述C3具体可为C31、C32或C33。所述C31、C32和C33均为由镰孢属真菌菌剂和砖格孢属真菌菌剂构成的用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分含有所述镰孢属真菌,所述砖格孢属真菌菌剂的活性成分含有所述砖格孢属真菌。所述C31、C32和C33中,所述砖格孢属真菌可为砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718。所述C31、C32和C33中,所述砖格孢属真菌菌剂的活性成分可为所述砖格孢属真菌,所述砖格孢属真菌菌剂的活性成分还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。

[0038] 所述C31中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709。所述镰孢属真菌菌剂的活性成分可为所述镰孢属真菌,所述镰孢属真菌菌剂的活性成分还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C31中,各菌剂均独立包装。所述C31中,所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1:(0.5-4),如1:2。

[0039] 所述C32中,所述镰孢属真菌菌剂具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂。所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂的活性成分可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709,还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂的活性成分可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226,还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C32中,各菌剂均独立包装。所述C32中,镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226和砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC400718的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1:(0.5-

4) : (0.5-4), 如1:1:1。

[0040] 所述C33中,所述镰孢属真菌菌剂具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712菌剂。所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709菌剂的活性成分可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709,还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226菌剂的活性成分可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226,还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712菌剂的活性成分可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712,还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C33中,各菌剂均独立包装。所述C33中,镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712和砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1: (0.5-4) : (0.5-4) : (0.5-4), 如1:1:1:1。

[0041] 上述用于制备薯蓣皂苷元的成套菌剂中,所述C4具体可为C41、C42或C43。所述C41、C42和C43均为活性成分含有所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌的用于制备薯蓣皂苷元的菌剂。所述C41、C42和C43的活性成分可为所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌,还可含有其他生物成分或非生物成分,该菌剂的其它活性成分本领域技术人员可根据薯蓣皂苷元的产率确定。所述C41、C42和C43中,所述砖格孢属真菌可为砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718。

[0042] 所述C41中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709。所述C41中,所述镰孢属真菌和所述砖格孢属真菌的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1: (0.5-4), 如1:2。

[0043] 所述C42中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226。所述C42中,镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226和砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1: (0.5-4) : (0.5-4), 如1:1:1。

[0044] 所述C43中,所述镰孢属真菌具体可为镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712。所述C43中,镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712和砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718的菌落形成单位 (cfu) 数目比可为1: (0.5-4) : (0.5-4) : (0.5-4), 如1:1:1:1。

[0045] 上述菌剂除活性成分外,还可包括辅料,如水、碳源和/或氮源等。碳源是微生物生长一类营养物,是含碳化合物,包括糖类、油脂、有机酸及有机酸酯和小分子醇等速效、迟效碳源。氮源是指提供微生物营养所需氮元素的物质,包括花生饼粉、黄豆饼粉、酵母粉、蛋白胨、氨水、铵盐和硝酸盐等速效、迟效氮源。

[0046] 所述菌剂中,各种真菌可以被培养的活细胞、活细胞的发酵液的形式存在。所述菌剂的剂型可为多种剂型,如液剂、粉剂或颗粒剂等。

[0047] 实验证明,新月弯孢霉和镰孢属真菌联合发酵含有盾叶薯蓣的培养基的薯蓣皂苷

元的得率比新月弯孢霉单独发酵含有盾叶薯蓣的培养基与镰孢属真菌单独发酵含有盾叶薯蓣的培养基二者的薯蓣皂苷元的得率之和还要高,新月弯孢霉和镰孢属真菌在发酵含有盾叶薯蓣的培养基产薯蓣皂苷元方面产生了协同作用(表1)。在薯蓣皂苷元的得率上,CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂处理比镰孢属真菌菌剂处理提高了9%,CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂处理比镰孢属真菌菌剂处理提高了16%,CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂处理比镰孢属真菌菌剂处理提高了14%。

#### 附图说明

[0048] 图1为HPLC鉴定薯蓣皂苷元的图谱。

[0049] 图中,(A)为薯蓣皂苷元标准品图谱,(B)为3.3的新月弯孢霉菌剂发酵产物的HPLC图谱,(C)为3.4的镰孢属真菌菌剂发酵产物的HPLC图谱,(D)为3.1的镰+新发酵产物的HPLC图谱,(E)为3.2的新+镰发酵产物,其中,薯蓣皂苷元的色谱峰如箭头所示。

#### 具体实施方式

[0050] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0051] 下述实施例中的新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381(Bing Feng,etal.The microbiological transformation of steroidal saponins by *Curvularia lunata*.Tetrahedron 61(2005)11758-11763.25October 2005)公众可从申请人获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0052] 下述实施例中的镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400709已于2015年7月6日收藏于中国医学科学院医药生物技术研究所的中国药学微生物菌种保藏管理中心(China Pharmaceutical Culture Collection,简称CPCC,地址:北京天坛西里1号,中国医学科学院医药生物技术研究所,邮政编码:100050),自该收藏日起公众可从CPCC获得该菌株。

[0053] 下述实施例中的镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400712已于2015年7月6日收藏于中国医学科学院医药生物技术研究所的中国药学微生物菌种保藏管理中心(China Pharmaceutical Culture Collection,简称CPCC,地址:北京天坛西里1号,中国医学科学院医药生物技术研究所,邮政编码:100050),自该收藏日起公众可从CPCC获得该菌株。

[0054] 砖格孢属菌种(*Dictyosporium* sp.)CPCC 400718已于2015年7月6日收藏于中国医学科学院医药生物技术研究所的中国药学微生物菌种保藏管理中心(China Pharmaceutical Culture Collection,简称CPCC,地址:北京天坛西里1号,中国医学科学院医药生物技术研究所,邮政编码:100050),自该收藏日起公众可从CPCC获得该菌株。

[0055] 下述实施例中的黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792(A.flavus 3.2792)(Hongzhi Huang,etal.Pathways of biotransformation of zingiberen newsaponin from *Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright to diosgenin.Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic 98(2013)1-7)公众可从申请人获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0056] 下述实施例中的镰孢属菌种(*Fusarium* sp.)CPCC 400226已于2007年2月1日收藏

于中国医学科学院医药生物技术研究所的中国药学微生物菌种保藏管理中心(China Pharmaceutical Culture Collection,简称CPCC,地址:北京天坛西里1号,中国医学科学院医药生物技术研究所,邮政编码:100050),自该收藏日起公众可从CPCC获得该菌株。

[0057] 下述实施例中的黑曲霉(*Aspergillus niger*) CPCC 400524已于2015年7月6日收藏于中国医学科学院医药生物技术研究所的中国药学微生物菌种保藏管理中心(China Pharmaceutical Culture Collection,简称CPCC,地址:北京天坛西里1号,中国医学科学院医药生物技术研究所,邮政编码:100050),自该收藏日起公众可从CPCC获得该菌株。

[0058] 实施例1、用含有盾叶薯蓣的培养基培养镰孢属真菌和弯孢霉或镰孢属真菌制备薯蓣皂苷元

[0059] 1、本实施例所用的培养基的配制

[0060] 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯去皮,200g切成小块,加水煮沸30min,4层纱布过滤,加20g葡萄糖,琼脂17g,蒸馏水定容到1000mL,煮沸混匀,121℃条件下灭菌20分钟,得到PDA培养基。

[0061] 种子培养基:葡萄糖2g,蔗糖1g,黄豆粉0.2g,蛋白胨1g,磷酸氢二钾0.03g,聚乙二醇0.25g,硝酸钠0.3g,硫酸铵0.3g,用水定容至100mL,pH 6.0。121℃灭菌20分钟,得到种子培养基。

[0062] 固态发酵培养基(含有盾叶薯蓣的培养基):将1g葡萄糖,1g酵母提取物,20g稻壳,10g麸皮,1g  $K_2HPO_4$ ,0.5g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,5g干盾叶薯蓣根状茎粉,加入21mL去离子水浸泡,调pH 6.0。121℃灭菌20分钟,得到固态发酵培养基。

[0063] 2、产薯蓣皂苷元的菌剂的制备

[0064] 2.1、新月弯孢霉菌剂的制备

[0065] 将新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381发酵液。该新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381发酵液即为新月弯孢霉菌剂。

[0066] 2.2、镰孢属真菌菌剂的制备

[0067] 将镰孢属菌种(*Fusarium sp.*) CPCC 400709在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到镰孢属菌种(*Fusarium sp.*) CPCC 400709发酵液。该镰孢属菌种(*Fusarium sp.*) CPCC 400709发酵液即为镰孢属真菌菌剂。

[0068] 2.3产薯蓣皂苷元的成套菌剂的制备

[0069] 将2.1的新月弯孢霉菌剂和2.2的镰孢属真菌菌剂分别单独包装后,按照新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*) CPCC 400709的菌落形成单位(cfu)数目比为2:1的比例装在一个大包装中,得到产薯蓣皂苷元的成套菌剂,将其命名为新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂。

[0070] 2.4黄曲霉菌剂的制备

[0071] 将黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792发酵液。该黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792发酵液即为黄

曲霉菌剂。

[0072] 2.5黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂的制备

[0073] 将2.4的黄曲霉菌剂和2.2的镰孢属真菌菌剂分别单独包装后,按照黄曲霉 *Aspergillus flavus* 3.2792和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709的菌落形成单位 (cfu) 数目比为2:1的比例装在一个大包装中,得到黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂。

[0074] 2.6黑曲霉菌剂的制备

[0075] 将黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CPCC 400524在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CPCC 400524发酵液。该黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CPCC 400524发酵液即为黑曲霉菌剂。

[0076] 2.7黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂的制备

[0077] 将2.6的黑曲霉菌剂和2.2的镰孢属真菌菌剂分别单独包装后,按照黑曲霉 (*Aspergillus niger*) CPCC 400524和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709的菌落形成单位 (cfu) 数目比为2:1的比例装在一个大包装中,得到黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂。

[0078] 2.8 CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂的制备

[0079] 将砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718发酵液。该砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718发酵液即为CPCC 400718菌剂。

[0080] 将CPCC 400718菌剂和2.2的镰孢属真菌菌剂分别单独包装后,按照砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709的菌落形成单位 (cfu) 数目比为2:1的比例装在一个大包装中,得到CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂。

[0081] 2.9 CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂的制备

[0082] 将镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226发酵液。该镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226发酵液即为CPCC 400226菌剂。

[0083] 将该CPCC 400226菌剂、2.8的CPCC 400718菌剂和2.2的镰孢属真菌菌剂分别单独包装后,按照镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226、砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709的菌落形成单位 (cfu) 数目比为1:1:1的比例装在一个大包装中,得到CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂。

[0084] 2.10CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂的制备

[0085] 将镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712在PDA培养基斜面28℃培养5天,然后挑取菌丝块接种于装有100mL种子培养基的500mL三角瓶中,28℃震荡培养2天得到镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712发酵液。该镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712发酵液即为CPCC 400712菌剂。

[0086] 将该CPCC 400712菌剂、2.9的CPCC 400226菌剂、2.8的CPCC 400718菌剂和2.2的

镰孢属真菌菌剂分别单独包装后,按照镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400712、镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400226、砖格孢属菌种 (*Dictyosporium sp.*) CPCC 400718和镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709的菌落形成单位 (cfu) 数目比为1:1:1:1的比例装在一个大包装中,得到CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂。

[0087] 3、制备薯蓣皂苷元

[0088] 本发明的发明人在实验过程中发现同时接种两种真菌会出现两种真菌均无法正常生长的现象。因此,本实验采取的是联合顺序发酵,即先接种一种真菌进行发酵,发酵一定时间后再接入第二种真菌进行发酵。这种方法在操作上比联合同步发酵复杂,但可使每种菌均得到良好的增殖,从而提高薯蓣皂苷元的得率。本发明的发明人在实验过程中发现,一种真菌单独发酵22天薯蓣皂苷元的得率最高,所以下述处理中,一种真菌单独发酵的时间均设为22天。

[0089] 实验设13个处理,具体如下:

[0090] 3.1新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+新处理

[0091] 用2.3的产薯蓣皂苷元的成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0092] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$  cfu镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.1的新月弯孢霉菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$  cfu新月弯孢霉 *Curvularia lunata* 3.4381,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到镰+新发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0093] 3.2新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂新+镰处理

[0094] 用2.3的产薯蓣皂苷元的成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0095] 将2.1的新月弯孢霉菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$  cfu新月弯孢霉 *Curvularia lunata* 3.4381,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.2的镰孢属真菌菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$  cfu镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到新+镰发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0096] 3.3新月弯孢霉菌剂处理

[0097] 用2.1的新月弯孢霉菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0098] 将2.1的新月弯孢霉菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $3 \times 10^7$  cfu新月弯孢霉 *Curvularia lunata* 3.4381,混匀,28℃培养22天,收集培养容器内的所有物质,得到新月弯孢霉菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0099] 3.4镰孢属真菌菌剂处理

[0100] 用镰孢属真菌菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0101] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $3 \times 10^7$  cfu镰孢属菌种 (*Fusarium sp.*) CPCC 400709,混匀,28℃培养22天,收集培养容器内的所有物质,得到镰孢属真菌菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0102] 3.5黄曲霉菌剂处理

[0103] 用2.4的黄曲霉菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0104] 将2.4的黄曲霉菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $3 \times 10^7$ cfu黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792,混匀,28℃培养22天,收集培养容器内的所有物质,得到黄曲霉菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0105] 3.6黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂黄+镰处理

[0106] 用2.5的黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0107] 将2.4的黄曲霉菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$ cfu黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.2的镰孢属真菌菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到黄+镰发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0108] 3.7黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+黄处理

[0109] 用2.5的黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0110] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.4的黄曲霉菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$ cfu黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.2792,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到镰+黄发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0111] 3.8黑曲霉菌剂处理

[0112] 用2.6的黑曲霉菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0113] 将2.6的黑曲霉菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $3 \times 10^7$ cfu黑曲霉(*Aspergillus niger*)CPC 400524,混匀,28℃培养22天,收集培养容器内的所有物质,得到黑曲霉菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0114] 3.9黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂黑+镰处理

[0115] 用2.7的黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0116] 将2.6的黑曲霉菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$ cfu黑曲霉(*Aspergillus niger*)CPC 400524,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.2的镰孢属真菌菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到黑+镰发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0117] 3.10黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+黑处理

[0118] 用2.7的黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0119] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.6的黑曲霉菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$ cfu黑曲霉(*Aspergillus niger*)CPC 400524,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到镰+黑发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0120] 3.11 CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂处理

[0121] 用2.8的CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0122] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.8的CPCC 400718菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $2 \times 10^7$ cfu砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0123] 3.12 CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂处理

[0124] 用2.9的CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0125] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.8的CPCC 400718菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718,混匀,继续28℃培养7天,在第30天再接入2.9的CPCC 400226菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226,混匀,继续28℃培养7天,收集培养容器内的所有物质,得到CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0126] 3.13 CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂处理

[0127] 用2.10的CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂制备薯蓣皂苷元,具体方法如下:

[0128] 将2.2的镰孢属真菌菌剂接入装有50g固态发酵培养基的500mL锥形瓶中,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400709,混匀,28℃培养22天,在第23天再接入2.8的CPCC 400718菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu砖格孢属菌种(*Dictyosporium sp.*)CPCC 400718,混匀,继续28℃培养7天,在第30天再接入2.9的CPCC 400226菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400226,混匀,继续28℃培养7天,在第37天再接入2.10的CPCC 400712菌剂,每克固态发酵培养基接入了 $1 \times 10^7$ cfu镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPCC 400712,混匀,继续28℃培养10天,收集培养容器内的所有物质,得到CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂发酵产物。实验重复三次,每次重复设10个锥形瓶。

[0129] 4、薯蓣皂苷元的得率

[0130] 将3.1的镰+新发酵产物、3.2的新+镰发酵产物、3.3的新月弯孢霉菌剂发酵产物、3.4的镰孢属真菌菌剂发酵产物、3.5的黄曲霉菌剂发酵产物、3.6的黄+镰发酵产物、3.7的镰+黄发酵产物、3.8的黑曲霉菌剂发酵产物、3.9的黑+镰发酵产物、3.10的镰+黑发酵产物、3.11的CPCC 400709+CPCC 400718成套菌剂发酵产物、3.12的CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226成套菌剂发酵产物和3.13的CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712成套菌剂发酵产物分别烘干后研磨成粗粉状,10倍体积的乙酸乙酯回流提取1h,再重复提取2次,将得到的提取液合并蒸干,甲醇溶解后过0.22 $\mu$ m滤膜,进行HPLC分析,计算薯蓣皂苷元的得率:薯蓣皂苷元质量(mg)/盾叶薯蓣药材质量(mg) $\times 100\%$ 。取薯蓣皂苷元标

准品,用甲醇溶解定容,进行HPLC制作标准曲线。HPLC色谱条件如下:Agilent 1100,配有ELSD检测器和Chemstation色谱工作站;XDB-C18色谱柱(250×4.6mm,5μm);用90%乙腈-水溶液(由乙腈和水按照9:1的体积比混合得到的液体)进行洗脱,流速1mL/min;柱温30℃;进样量10μL。

[0131] 结果表明,所有的13个处理中均有薯蓣皂苷元的产生(图1和表1):

[0132] 1、新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+新处理比新月弯孢霉菌剂处理和镰孢属真菌菌剂处理的薯蓣皂苷元的得率之和还要高,说明在新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+新处理中,新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709在发酵含有盾叶薯蓣的培养基产薯蓣皂苷元方面产生了协同作用;而新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂新+镰处理比镰孢属真菌菌剂处理的薯蓣皂苷元的得率还要低,说明在新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂新+镰处理中,新月弯孢霉*Curvularia lunata* 3.4381和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709在发酵含有盾叶薯蓣的培养基产薯蓣皂苷元方面并未产生协同作用。

[0133] 2、在薯蓣皂苷元的得率上,无论是黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂黄+镰处理还是黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+黄处理均比镰孢属真菌菌剂处理和黄曲霉菌剂处理都低,说明黄曲霉*Aspergillus flavus* 3.279和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709在发酵含有盾叶薯蓣的培养基产薯蓣皂苷元方面产生了拮抗作用。

[0134] 3、在薯蓣皂苷元的得率上,无论是黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂黑+镰处理还是黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+黑处理均比镰孢属真菌菌剂处理低,说明黑曲霉(*Aspergillus niger*)CPC 400524和镰孢属菌种(*Fusarium sp.*)CPC 400709在发酵含有盾叶薯蓣的培养基产薯蓣皂苷元方面产生了拮抗作用。

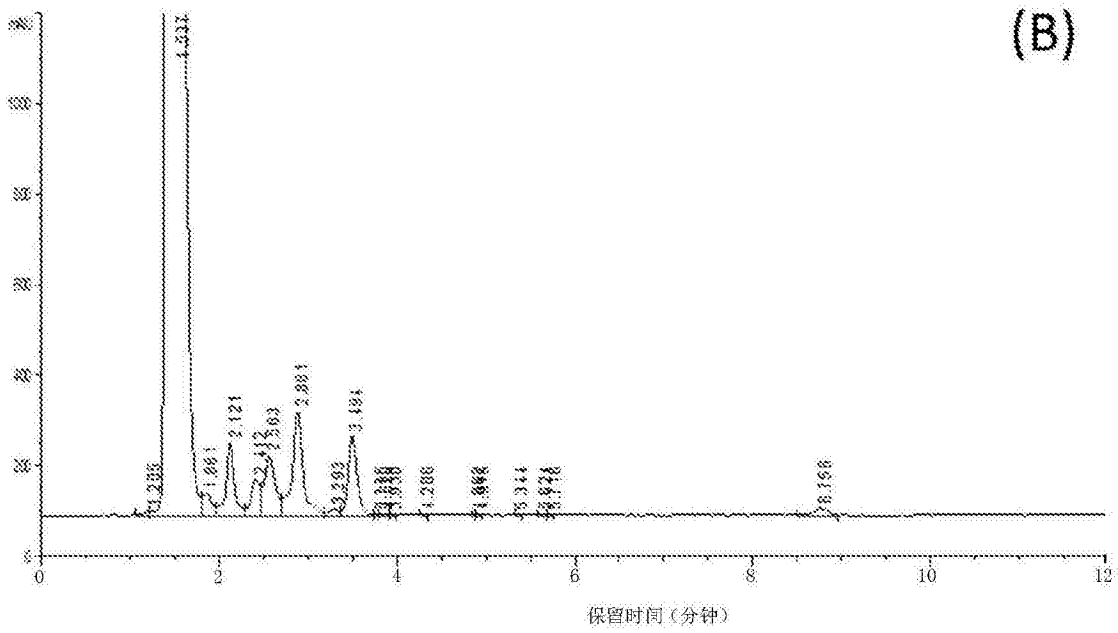
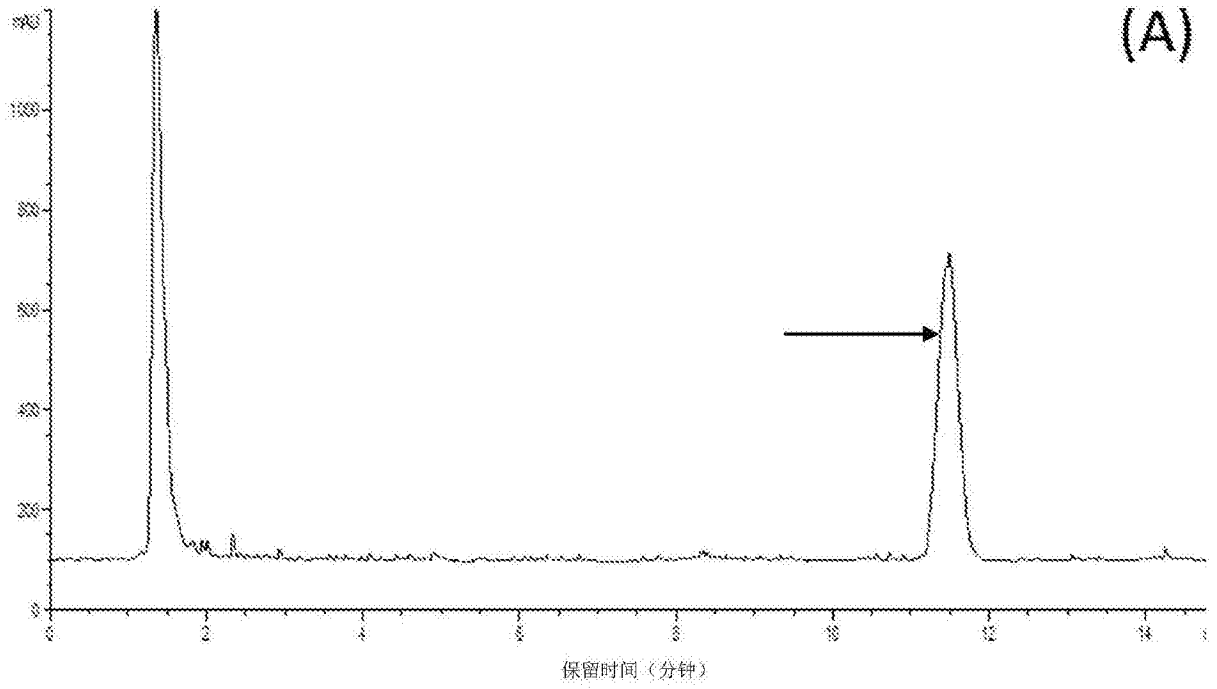
[0135] 4、在薯蓣皂苷元的得率上,CPC 400709+CPC 400718成套菌剂处理比镰孢属真菌菌剂处理提高了9%,CPC 400709+CPC 400718+CPC 400226成套菌剂处理比镰孢属真菌菌剂处理提高了16%,CPC 400709+CPC 400718+CPC 400226+CPC 400712成套菌剂处理比镰孢属真菌菌剂处理提高了14%。

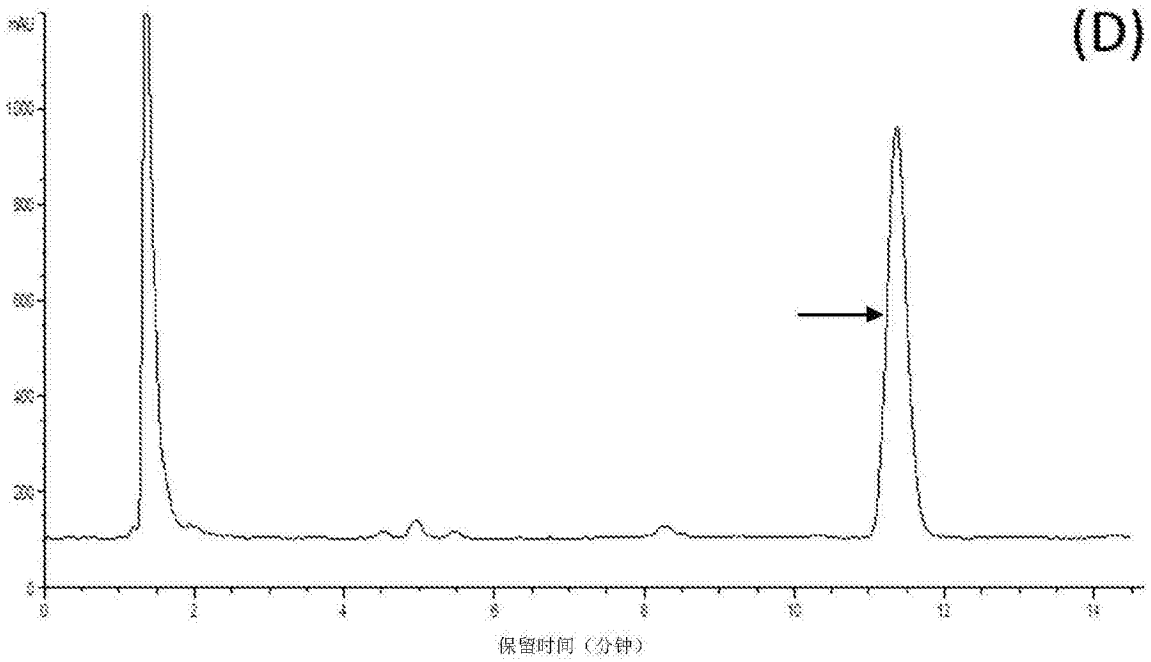
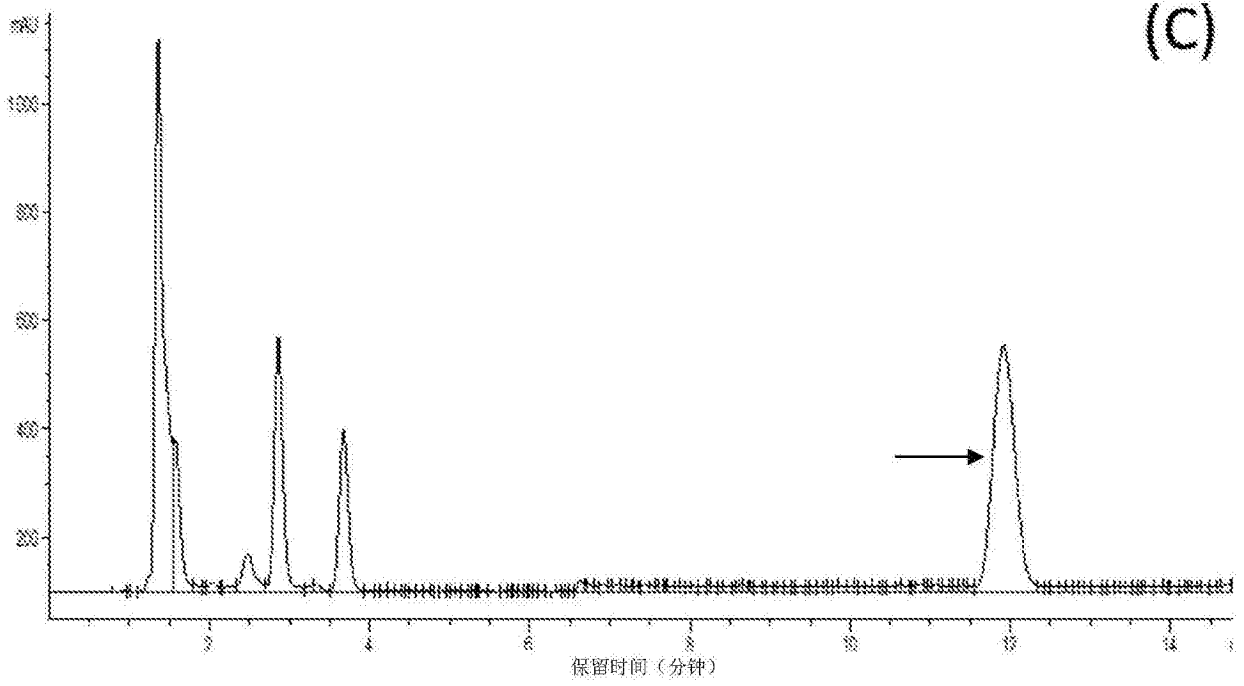
[0136] 表1、各处理薯蓣皂苷元的产量和得率

[0137]

处理	每克盾叶薯蓣根状茎粉的 蒺皂苷元的产量 (mg)	薯蓣皂苷元的 得率 (%)
新月弯孢霉菌剂处理	3.7±1.1	0.37±0.11
镰孢属真菌菌剂处理	21.6±2.8	2.16±0.28
新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+新处理	27.9±2.7	2.79±0.27
新月弯孢霉+镰孢属真菌成套菌剂新+镰处理	21.0±2.5	2.1±0.25
黄曲霉菌剂处理	13.6±2.7	1.36±0.27
黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂黄+镰处理	5.7±1.6	0.57±0.16
黄曲霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+黄处理	9.2±3.0	0.92±0.30
黑曲霉菌剂处理	16.3±2.8	1.63±0.28
黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂黑+镰处理	12.4±3.1	1.24±0.31
黑曲霉+镰孢属真菌成套菌剂镰+黑处理	19.4±3.1	1.94±0.31
CPCC 400709+CPCC 400718 成套菌剂处理	23.5±1.7	2.35±0.17
CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226 成套菌剂处理	25.1±3.6	2.51±0.36
CPCC 400709+CPCC 400718+CPCC 400226+CPCC 400712 成套菌剂处理	24.6±4.7	2.46±0.47

[0138] 注：每克盾叶薯蓣根状茎粉的蒺皂苷元的产量 (mg) 是以干重计。





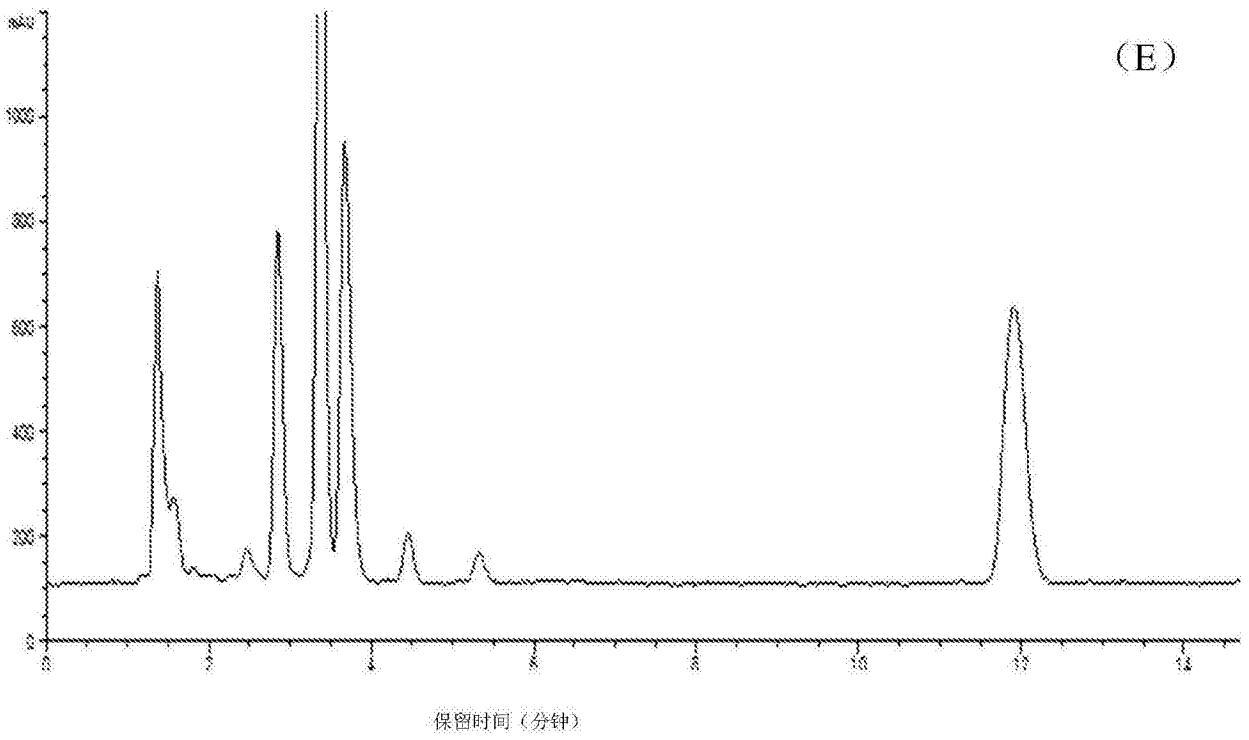


图1