

薯蓣皂苷元的制备方法研究进展

赵敏^{1,2}, 谭大维¹, 余河水^{1,2}, 康利平^{1,2}, 周文斌¹, 熊呈琦¹, 赵阳¹, 马百平^{1*}

1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目前薯蓣皂苷元的制备方法主要有酸水解法、微生物法、酶解法以及一些其他方法。传统的酸水解方法由于酸用量大, 酸降解有机质副产物多, 使污水排放量大, 环境污染严重, 限制了薯蓣皂苷元的产业化发展; 而利用微生物、酶等生物水解法, 具有反应条件温和、环境友好等特点, 连同诱导子激发植物组织细胞培养等相关技术, 受到研究人员的广泛关注, 已成为薯蓣皂苷元产业化制备的新的发展方向。

关键词: 薯蓣皂苷元; 制备方法; 微生物法; 酶解法; 诱导子

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)13-1860-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.029

Research progress in preparation of diosgenin

ZHAO Min^{1,2}, TAN Da-wei¹, YU He-shui^{1,2}, KANG Li-ping^{1,2}, ZHOU Wen-bin¹, XIONG Cheng-qi¹,
ZHAO Yang¹, MA Bai-ping¹

1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Key words: diosgenin; preparation method; microorganism method; enzymolysis method; elicitor

薯蓣皂苷元(俗称皂素, diosgenin), 为白色针状结晶或轻质粉末, 化学名为 Δ^5 -异螺旋甾烯- 3β -醇, 分子式为 $C_{27}H_{42}O_3$, 难溶于水, 可溶于甲醇、石油醚等有机溶剂。1935年 Fujii 和 Matsukawa 首次报道了薯蓣属植物中存在薯蓣皂苷元。在众多薯蓣属植物中, 盾叶薯蓣 *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright 与穿龙薯蓣 *D. nipponica* Makino 的品质最好, 而盾叶薯蓣为我国特有种, 也是薯蓣皂苷元含量最高的植物。1943年 Marker 研究证实了薯蓣皂苷元是合成甾体激素与甾体避孕药的重要原料^[1], 世界各国生产甾体激素类药物 60%以其为原料, 如环丙氯地孕酮醋酸酯(CPA)、非那雄胺(FDS)、康力龙、美雄诺龙、苯丙酸诺龙等。以薯蓣皂苷元为前体合成的衍生物具有舒张气管平滑肌、抗血栓、抗细胞毒等活性^[2-5], 化学工业上的一些重要化合物也是由薯蓣皂苷元合成的^[6-7]。薯蓣皂苷元自身也具有抗病毒等生理功能^[8-9]。由此可见, 薯蓣皂苷元无

论是作为药物合成前体还是其所具备的的药理活性都具有广泛的应用价值, 探索高效的制备薯蓣皂苷元的方法势在必行。目前薯蓣皂苷元的制备方法主要有酸水解法、微生物法、酶解法以及一些其他方法。

本文拟对薯蓣皂苷元的制备方法进行综述分析, 为继续研究制备薯蓣皂苷元的方法提供参考, 同时也为合理利用薯蓣资源, 高效、环境友好地制备薯蓣皂苷元提供新思路。

1 酸水解法

传统的工业生产中, 制备薯蓣皂苷元的方法主要分为两类^[10], 一类是以 Marker 和 Wall 为代表提出的先提取后水解工艺, 即先用甲醇、乙醇或异丙醇等中等极性的有机溶剂从植物材料中提取总皂苷, 然后将其进行酸水解得到薯蓣皂苷元; 另一类是以 Rothrok 提出的直接酸水解法, 目前工业上多采用此方法, 即先把原料浸泡粉碎, 用硫酸或者盐

收稿日期: 2013-03-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202417)

作者简介: 赵敏(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的结构修饰。Tel: (010)66932247 E-mail: zhao06min05@aliyun.com

*通信作者 马百平 Tel: (010)66930265 E-mail: mabaiping@sina.com

酸加热水解，水解物用水洗涤至中性，再用汽油或石油醚等有机溶剂提取薯蓣皂苷元。由于传统酸水解生产薯蓣皂苷元的方法存在诸多问题，如废酸、废水排放量大，副产物多，环境污染严重以及薯蓣皂苷元得率低等，导致了我国部分薯蓣皂苷元生产厂被迫关停。

目前，三大固体废物（纤维素、淀粉、木质素）及废水可以被利用^[11]，如纤维素可以将其用于制备微晶纤维素、羧甲基纤维素等^[12]，淀粉可用于加工粉丝^[13]，木质素可用于生产活性炭^[14]，酸解废水可用于提取鼠李糖^[15]。这样减少了化学需氧量(COD)、生物需氧量(BOD)和废酸、废水的排放量，同时

也减少了氨氮(NH₃-N)及总磷的排放^[11]。高压酸解制备薯蓣皂苷元的方法比传统的常压酸水解法缩短了提取时间，降低了酸用量，并且能够有效地提取组织内的薯蓣皂苷元^[16]。高压酸解法以常压酸水解为基础，在高压(1.05 kg/cm²)、121 °C条件下对药材进行酸水解：样品用量 25 mg/mL、硫酸浓度 0.5 mol/L、提取时间 2 h，此条件下薯蓣皂苷元的平均质量分数是 9.12 mg/g。通过 LC-MS 等方法追踪主要中间产物的浓度变化以及对中间产物进行结构鉴定^[17]，酸水解盾叶薯蓣(DZW)中主要皂苷制备薯蓣皂苷元的途径见图 1。

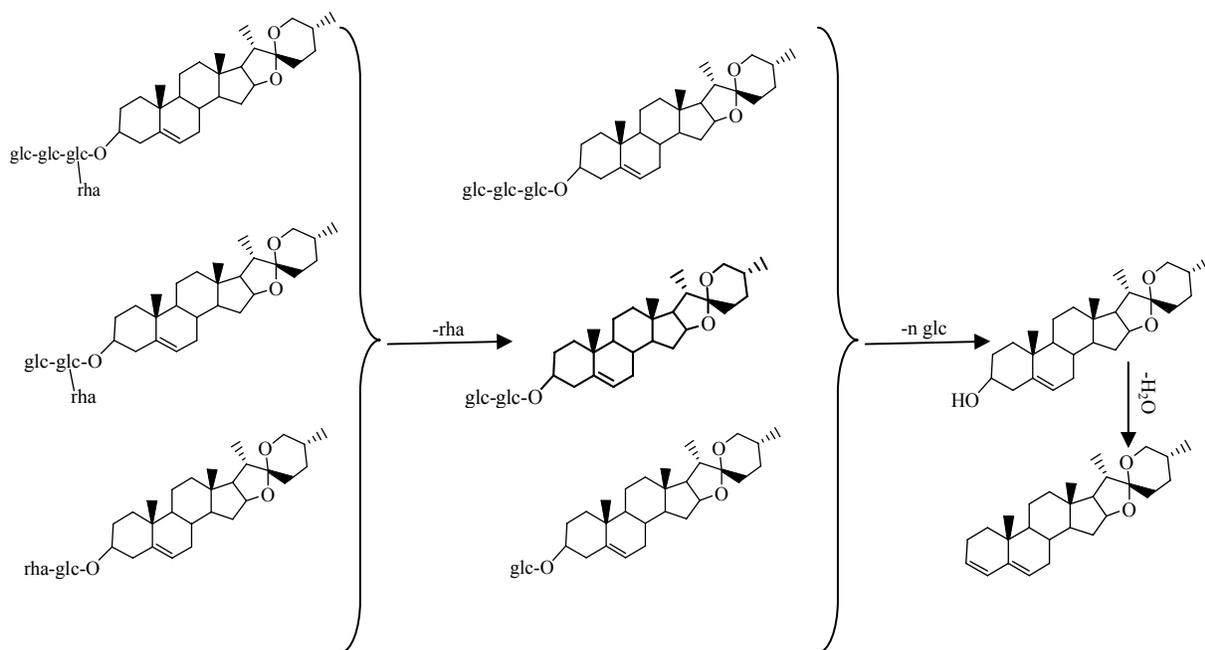


图 1 酸水解盾叶薯蓣中主要皂苷至薯蓣皂苷元的途径

Fig. 1 Pathways of saponins transformation to diosgenin during acid hydrolysis of *D. zingiberensis*

综合利用原料资源，不仅提高了原料的利用率，而且降低了废渣、废水对环境的污染。酸水解法制备薯蓣皂苷元的路径研究表明：强酸直接水解药材，在使药材中的皂苷发生脱糖基反应的同时，也使薯蓣皂苷元的 3-位羟基发生脱水反应生成副产物，使目标产物的量降低。因此，减少酸用量，降低环境污染，同时提高薯蓣皂苷元的得率是广大研究者的努力方向。

薯蓣皂苷元主要是以皂苷形式存在于植物根茎中，而植物根茎除含有皂苷外还含有大量的淀粉和纤维素等化学成分，这些成分将植物中的皂苷“包裹”与“屏蔽”起来，对皂苷的释放产生干扰作用。而植物自身含有一些水解酶，经过长时间的放置，水解酶能够将部分淀粉和纤维素水解释放出皂苷，

并且在自身酶解作用下部分转化成无糖基的薯蓣皂苷元或次皂苷。保存 30 d 的盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的得率是保存 15 d 的 2 倍，说明在其自身酶解作用下，随着保存时间的增长，皂苷转化为皂苷元的量增加^[18]。但这种自身酶解发酵方法耗时较长，而商业化的纤维素酶配合 40%硫酸水解盾叶薯蓣药材，能够有效地释放出甙体皂苷，并且能使薯蓣皂苷元的得率比传统的方法提高(15.4±2.7)%^[19]。植物原料细胞壁组成结构复杂，且薯蓣皂苷元作为配基的薯蓣类皂苷种类繁多，单一使用纤维素酶无法使植物中皂苷完全溶出。将纤维素酶和果胶酶复合酶制剂、淀粉酶以及糖化酶按顺序依次加入到反应液中对药材进行分步处理，然后再加入一定量 2.0 mol/L 的 H₂SO₄ 于 100 °C 酸水解 4.0 h，这种阶梯生

物催化协同提取薯蓣皂苷元的方法能够将植物中98%的薯蓣皂苷元提取出来^[20]。利用纤维素酶、淀粉酶、糖化酶以及复合酶等破坏植物的细胞壁,加快、加大了目标成分的溶出,且该方法减少了酸用量,提高了薯蓣皂苷元的得率。

在酸水解前对原料进行预发酵处理,可提高薯蓣皂苷元的得率。同时将分离所得纤维素和淀粉用于生产燃料乙醇及酿酒工业^[21-24],将酒糟用作农肥,支持农业,化废为宝。然而这些方法从根本讲,依然没有改变传统工艺的本质,即制备薯蓣皂苷元依然需要用大量酸进行水解。当今国际倡导以高产率、低消耗地提高生产效率已成为一种趋势,因此采用纯天然的生物技术代替传统的化学生产工艺,用生物方法制备薯蓣皂苷元是今后生产工艺的一个发展方向。

2 微生物法

微生物转化是利用微生物对外源性化合物进行结构修饰的化学反应。该技术已经广泛用于天然化合物的结构修饰和合成、药物前体物的转化和药物代谢研究等许多领域。微生物法直接利用药材中的淀粉和纤维素作为碳源,含氮的有机化合物为氮源,不需要添加额外的碳源和氮源,具有反应条件温和、成本低廉、无污染等特点。

微生物转化获得薯蓣皂苷元的研究报道较多,如利用米曲霉 *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn 和木霉 *Trichoderma harzianum* Rifai 发酵盾叶薯蓣药材制备薯蓣皂苷元^[25-26],并运用响应面法优化转化条件^[27-28],

优化后薯蓣皂苷元的得率是优化前的2~3倍。少根根霉原变种 *Rhizopus arrhizus* Fischer var. *arrhizus* 在发酵过程中能够分泌淀粉酶、蛋白酶、果胶酶,促进细胞壁的解离^[29]。利用该菌株发酵穿龙薯蓣生产薯蓣皂苷元,使薯蓣皂苷能更容易、更充分地从细胞中解离出来进而进入到下一步反应,该法制备薯蓣皂苷元的得率为3.0%,质量分数高达97%。微生物对药材中总皂苷转化是个复杂的过程,而通过酶促反应的动力学探讨酶促反应的各因素对生物转化反应速度的影响,对研究酶的作用机制具有重要意义。如通过对动力学数学模型的计算推测出菌株米曲霉(CICC 2436)生物转化盾叶薯蓣药材制备薯蓣皂苷元的3个主要酶^[30],即 α -L-rhamnosidase、exo-1,4- β -D-glucanase 和 β -D-glucosidase,整个转化过程是一个包含了3种酶、5个甾体皂苷和其皂苷元的多重酶与多重底物的反应体系,最终分析得出米曲霉生物转化盾叶薯蓣药材的主要途径见图2。哈茨木霉生物转化盾叶薯蓣药材生产薯蓣皂苷元的路径与米曲霉的转化途径不同^[31]:米曲霉转化过程中水解鼠李糖的反应速率常数明显大于葡萄糖的水解反应速率,这样造成了大量中间产物的堆积,使得薯蓣皂苷元的产量较低;而哈茨木霉转化过程中,涉及主要底物与中间产物的转化反应水解速率均较高,转化过程中中间产物的积累比较少,有利于反应向生成薯蓣皂苷元方向进行,使得薯蓣皂苷元的产量较高。

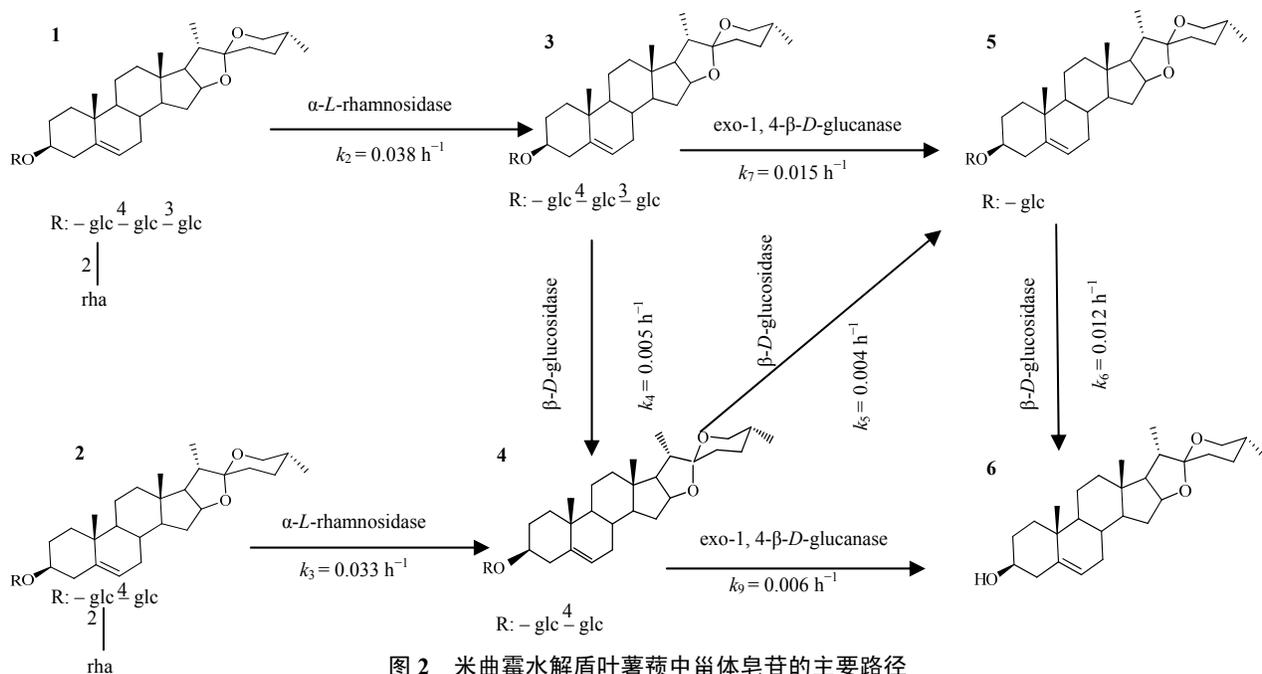


图2 米曲霉水解盾叶薯蓣中甾体皂苷的主要路径

Fig. 2 Main pathway of steroidal saponins transformation of *D. zingiberensis* by *A. oryzae*

微生物的代谢产物不同导致了米曲霉与哈茨木霉生物转化制备薯蓣皂苷元的途径不同。这些研究对进一步探讨生物转化中起关键作用的水解酶及其作用机制奠定了基础。

基于清洁生产和资源综合利用的理念, 清洁的皂素生产工艺研究取得进展^[32-33]。利用淀粉酶将盾叶薯蓣根茎中的淀粉以还原糖的形式回收, 避免了资源的浪费, 同时将皂苷从淀粉的包裹中释放出来, 里氏木霉 *Trichoderma reesi* E. G. Simmons 与皂苷接触, 使皂苷作为底物中较易利用的碳源参与反应, 提高了微生物的水解效率同时回收了 98% 淀粉。酶法结合微生物法从盾叶薯蓣中制备薯蓣皂苷元, 为薯蓣皂苷元的清洁生产提供了新方法。运用响应面法对上述转化过程进行优化, 使薯蓣皂苷元的得率高达 90.57%, 比优化前提高了 33.7%^[34]。双水相法和三液相法可被用于皂苷和皂苷元的提取分离。在乙醇-硫酸铵双水相体系中加入石油醚形成三液相, 上相中主要是薯蓣皂苷元 (回收率为 97.2%), 盾叶新苷、三角叶皂苷等未被转化的皂苷分配于中相, 微生物细胞、药渣和糖渣分配于下相, 实现了发酵液中薯蓣皂苷元、皂苷和葡萄糖、微生物细胞和药渣的有效分离。由于还有部分皂苷未被转化, 提取出的中相加适量硫酸回流水解生产薯蓣皂苷元, 此法获得的薯蓣皂苷元产量比传统酸水解增加了 38.5%, 而产生的 COD、还原糖仅为酸水解的 3.3% 和 0.3%。与传统的酸水解法相比, 这种生物转化耦合酸水解法具有更大的应用潜力。

虽然目前报道了许多关于微生物转化制备薯蓣皂苷元的研究, 但仍未应用到大规模制备薯蓣皂苷

元的工业生产中。若将两种或两种以上的微生物共同培养制备薯蓣皂苷元, 在混合发酵过程中, 一种微生物诱导另一种微生物产生自身酶系统, 从而更加全面地发挥生物转化作用, 可能有助于解决微生物发酵制备薯蓣皂苷元的产业化问题。

3 酶解法

随着科学技术的发展及对薯蓣皂苷元制备方法研究的不断深入, 不少学者从微生物及猪肝中分离纯化出关键的糖苷水解酶^[35-38], 这些糖苷水解酶能够特异性地水解皂苷的部分糖基生成次皂苷。从犁头霉菌 (*Absidia* sp.d38) 中分离纯化的薯蓣皂苷-糖苷酶^[39], 能够依次水解薯蓣皂苷 C-3 位连接的 α -L-鼠李糖 (与 β -D-葡萄糖 1,4 连接)、 α -L-鼠李糖 (与 β -D-葡萄糖 1,2 连接)、 β -D-葡萄糖至薯蓣皂苷元 (图 3), 其最适反应条件: 温度 40 °C, pH 5.0, 金属离子 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 明显抑制了该酶的活性, Na^+ 、 K^+ 和 Mg^{2+} 对该酶没有影响, 而 Ca^{2+} 对该酶活性有轻微的促进作用。来自烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* Fres. 的 β -葡萄糖苷酶, 能够水解盾叶薯蓣中多种螺甾烷型皂苷 (如延龄草苷、薯蓣皂苷元-双葡萄糖苷、薯蓣皂苷、三角叶皂苷和纤细薯蓣皂苷), 最终生成薯蓣皂苷元, 该研究为单一酶转化盾叶薯蓣总皂苷制备皂苷元奠定了理论基础^[40]。

由于酶的发酵、纯化过程较复杂、成本高等原因, 目前还没有完全通过酶促法实现薯蓣皂苷元的产业化生产。但是阐明生物转化制备薯蓣皂苷元的关键酶, 为利用分子生物学及蛋白质工程技术, 克隆表达关键酶, 最终实现生物转化制备薯蓣皂苷元奠定了基础。

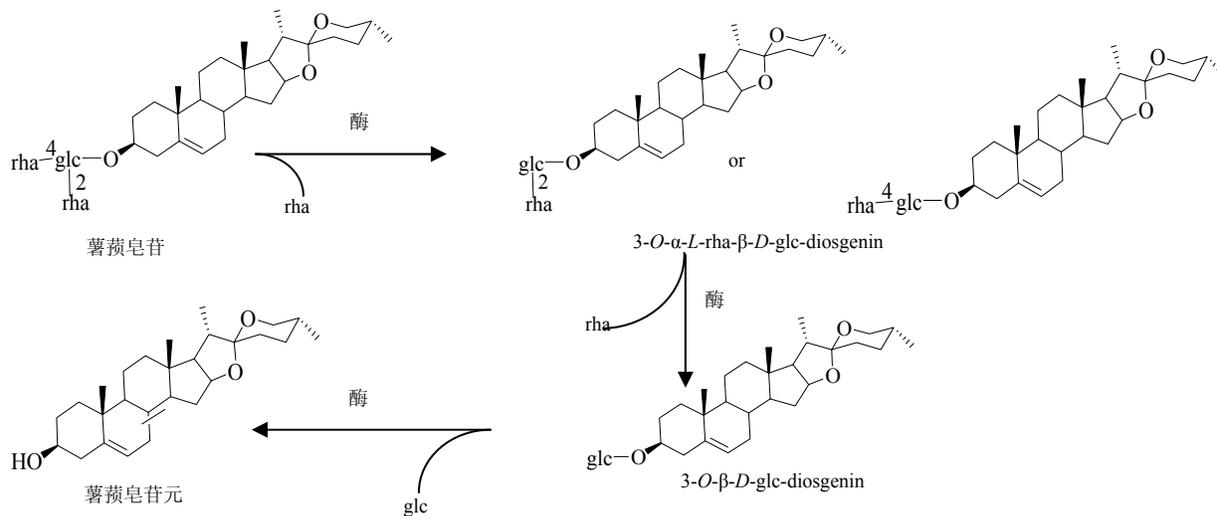


图3 薯蓣皂苷-糖苷酶水解薯蓣皂苷的途径

Fig. 3 Pathway of dioscin hydrolysis by novel dioscin-glycosidase

酶解法反应条件温和、操作简单、环境友好,但是由于生成的产物抑制酶解反应影响生物转化的进程,从而影响薯蓣皂苷元的得率。如利用聚乙二醇(PEG)对纤维素酶进行化学修饰,然后进行三液相萃取耦合纤维素酶催化盾叶薯蓣转化的方法制备薯蓣皂苷元,避免水解产物抑制纤维素酶对薯蓣皂苷的水解^[41],其技术的关键是底物与酶在三液相体系中的合理分配,经过一系列的条件筛选以及PEG对纤维素酶进行化学修饰(提高纤维素酶在三液相体系中的稳定性),得到了一个合理的三液相耦合体系,使得盾叶薯蓣中的几种甾体皂苷和PEG修饰纤维素酶主要分配在中相(1,4-二氧六环)中,75.8%水解的单糖分配于下相(硫酸铵相)中,92.1%的薯蓣皂苷元分配于上相(正己烷)中,有效地消除了产物对酶活力的抑制作用,使薯蓣皂苷元的得率为90%。这种将酶催化转化与盐析萃取耦合制备薯蓣皂苷元方法开辟了新路径,提供了新思路。

4 其他方法

盾叶薯蓣从播种到成熟需要3~4年时间,生长周期长,易受周围环境的影响,并且由于过度采伐导致野生资源严重短缺。近年来,采用植物组织细胞培养的方法对天然化合物进行结构修饰已经取得了可喜的进展。为了有效提高植物次生代谢产物的量,在栽培或组织培养过程中加入诱导子(elicitor)被认为是一种有效手段。加入诱导子的方法不仅缩短了细胞培养时间,还成为一种非常重要的在植物细胞培养中提高次级代谢产物的策略^[42-43]。诱导子主要来源于植物、真菌、细菌等,也可以是一些无机成分,其中真菌诱导子是最重要的一类。迄今已报道的真菌诱导子包括真菌菌体、菌体细胞内成分和分泌物、菌体降解产物等,由于其化学成分复杂,目前认为多糖、寡糖、肽类、金属离子等成分是活性诱导子^[44-46]。

植物内生菌产生诱导子可提高薯蓣皂苷元产量。从盾叶薯蓣根茎中分离出一种内生尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium* Dfz17),经过高压灭菌得到灭活菌丝,从菌丝中获得3种多糖:表多糖(EPS)、水提取多糖(WPS)、氢氧化钠提取多糖(SPS),这3种多糖作为诱导子,分别与盾叶薯蓣植物组织细胞共同培养,发现WPS可使培养物中薯蓣皂苷元的产量是对照组的3.83倍,是有效的多糖诱导子^[44]。该发现与从尖孢镰刀菌Dzf17菌细胞壁碎片中水解得到的寡糖能够促进植物细胞培养中薯蓣皂苷元合成的结果一

致,可能是多糖诱导子被分解成单糖后起促进作用的。随后又通过实验进一步得到证实^[45]。金属盐离子作为诱导子对细胞生长及薯蓣皂苷元得率也有影响,CdCl₂和CoCl₂可促进薯蓣皂苷元的合成,而K₂Cr₂O₇、NiCl₂则抑制了薯蓣皂苷元的合成^[46]。

在未来的研究中,植物细胞培养液中加入诱导子提高薯蓣皂苷元的产量已经成为其扩大生产的有效手段。但是,诱导子调控细胞生长以及激发植物次生代谢产物的合成机制有待继续深入研究。

5 结语

随着国内外对薯蓣皂苷元后续产品的开发和新药效、用途的发现,薯蓣皂苷元除用于合成药物,已经开始向保健品、化妆品等领域渗透,未来薯蓣皂苷元的国际市场需求仍然很大。因此高效环保地制备薯蓣皂苷元的方法更是受到广泛的关注。传统的酸水解方法由于环境污染严重,部分皂素生产厂家已经被迫关停。近年来,不断有新的制备薯蓣皂苷元方法的研究报道,微生物、酶等生物水解法以及诱导子激发植物组织细胞培养的方法,为高效、环保地制备薯蓣皂苷元开辟了新路径。但是由于目前这些方法处理量小、薯蓣皂苷元得率低、成本高等原因,都限制了其在工业上的大规模生产应用。应用新的科学技术,实现盾叶薯蓣的资源综合利用,高效、环保地产业化制备薯蓣皂苷元,将是薯蓣皂苷元制备研究的发展方向。

参考文献

- [1] 孙麒,巨勇,赵玉芬.具有生物活性的甾体皂苷[J].中草药,2002,33(3):276-280.
- [2] 刘超,王珍珍,郑微,等.薯蓣皂苷元衍生物的制备及对豚鼠离体气管平滑肌的作用[J].华西药学杂志,2009,24(5):483-486.
- [3] Matthew J K, Mary L T, Jiang Z H, et al. Synthesis and cytotoxic activity of diosgenyl saponins analogues [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 3209-3217.
- [4] 付晓丽,韩英梅,张士俊.薯蓣皂苷元衍生物的合成及其抗血栓形成活性[J].现代药物与临床,2011,26(1):46-49.
- [5] 付晓丽,韩英梅,张士俊.薯蓣皂苷元衍生物的合成及抗血栓形成活性研究II[J].中草药,2011,42(9):1683-1688.
- [6] Susana R, Rosa E R, Jesus S, et al. A new route for the preparation of the 22, 23-dioxocholestane side chain from diosgenin and its application to the stereocontrolled construction of the 22R, 23S-diol function [J].

- Tetrahedron*, 2006, 62: 2594-2602.
- [7] John R, Chai D P, Dominic W. Synthesis of (25R)-26-hydroxycholesterol [J]. *Steroids*, 2002, 67: 1041-1044.
- [8] Yayoi T, Naoko K, Akinori H, *et al.* Novel effects of diosgenin on skin aging [J]. *Steroids*, 2009, 74: 504-511.
- [9] Wang Y, Pan K, Chang T, *et al.* Diosgenin, a plant-derived saponin, exhibits antiviral activity *in vitro* against hepatitis C virus [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74: 580-584.
- [10] 李伯刚, 赵德华. 中国药用薯蓣资源植物研究与产业化开发 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [11] 肖芳, 郑小江, 谭远友, 等. 穿龙薯蓣制备皂素新工艺污染分析 [J]. 环境科学与技术, 2011, 34(3): 67-71.
- [12] 袁毅, 张黎明, 高文远. 穿龙薯蓣微晶纤维素的制备及其理化性质研究 [J]. 生物质化工程, 2007, 41(4): 22-26.
- [13] 袁毅, 张黎明, 王书军, 等. 穿龙薯蓣淀粉的理化性质研究 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1007-1010.
- [14] 蒋莉, 马飞, 梁国斌, 等. 木质素活性炭的制备及工艺优化 [J]. 新型炭材料, 2011, 26(5): 396-400.
- [15] 刘树兴, 侯屹, 李祥, 等. 盾叶薯蓣皂苷酸解液中鼠李糖的提取研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(9): 239-242.
- [16] 阴春晖, 李培琴, 赵江林, 等. 从盾叶薯蓣组培苗中高压酸解制备薯蓣皂苷元 [J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23: 114-117.
- [17] Peng Y E, Yang Z H, Wang Y X, *et al.* Pathways for the steroidal saponins conversion to diosgenin during acid hydrolysis of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *Chem Eng Res Des*, 2011, 89: 2620-2625.
- [18] 王颖, 富瑶瑶, 刘廷强, 等. 黄姜中自身转化薯蓣皂苷元提取的研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 3(3): 1616-1617.
- [19] Liu W, Huang W, Sun W L, *et al.* Production of diosgenin from yellow ginger (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) saponins by commercial cellulose [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26: 1171-1180.
- [20] 张裕卿, 王冬青, 李宾县, 等. 阶梯生物催化协同提取盾叶薯蓣中薯蓣皂苷元的研究 [J]. 中草药, 2006, 35(7): 688-691.
- [21] 胡徐腾. 纤维素乙醇研究开发进展 [J]. 化工进展, 2011, 30(1): 137-143.
- [22] 楚德强, 马晓建, 陈俊英. 盾叶薯蓣发酵生产酒精的研究 [J]. 酿酒科技, 2007(2): 25-28.
- [23] Cheng P, Zhao H Z, Zhao B, *et al.* Pilot treatment of waste water from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright production by anaerobic digestion combined with a biological aerated filter [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100: 2918-2925.
- [24] Li H, Ni J R. Treatment of wastewater from *Dioscorea zingiberensis* tubers used for producing steroid hormones in a microbial fuel cell [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102: 2731-2735.
- [25] 董悦生, 齐珊珊, 刘琳, 等. 米曲霉直接转化盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元 [J]. 过程工程学报, 2009, 9(5): 993-998.
- [26] Liu L, Dong Y S, Qi S S, *et al.* Biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 933-940.
- [27] 齐珊珊, 董悦生, 刘琳, 等. 米曲霉转化盾叶薯蓣中的甾体皂苷生成薯蓣皂苷元的工艺优化 [J]. 过程工程学报, 2009, 9(5): 1002-1009.
- [28] Qi S S, Dong Y S, Xiu Z L, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of microbial transformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Chromatographia*, 2009, 69: 865-870.
- [29] 李长田, 田风华, 李江南, 等. 少根根霉原变种发酵生产薯蓣皂苷元 [J]. 菌种学报, 2012, 31(5): 754-761.
- [30] Dong Y S, Teng H, Qi S S, *et al.* Pathways and kinetics analysis of biotransformation of *Dioscorea zingiberensis* by *Aspergillus oryzae* [J]. *Biochem Eng J*, 2010, 52: 123-130.
- [31] 刘琳. 哈茨木霉转化盾叶薯蓣中的皂苷及其产物的提取分离 [D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [32] 朱余玲, 黄文, 刘葳, 等. 利用里氏木霉生物转化制备黄姜薯蓣皂苷元的清洁新工艺 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2010, 46(4): 661-666.
- [33] Zhu Y L, Huang W, Ni J R, *et al.* Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers through enzymatic saccharification and microbial transformation [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 85: 1409-1416.
- [34] Zhu Y L, Ni J R, Huang W. Process optimization for the production of diosgenin with *Trichoderma reesei* [J]. *Bioprocess Biosust Eng*, 2010, 33: 647-655.
- [35] Feng B, Ma B P, Wang Y Z, *et al.* Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponins-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76: 1329-1338.
- [36] Feng B, Kang L P, Ma B P, *et al.* The substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponins-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata* [J]. *Tetrahedron*, 2007, 63: 6796-6812.
- [37] Qian S, Yu H S, Zhang C Z, *et al.* Purification and

- characterization of dioscin- α -L-rhamnosidase from pig liver [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53: 934-937.
- [38] 刘冰, 王元好, 胡湘春, 等. 微生物薯蓣皂苷糖苷酶的分选纯化研究 [J]. *微生物学杂志*, 2005, 25(6): 6-9.
- [39] Fu Y Y, Yu H S, Tang S H, *et al.* New dioscin-glycosidase hydrolyzing multi-glycosides of dioscin from *Absidia Strain* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2010, 20(6): 1011-1017.
- [40] Lei J, Niu H, Li T H, *et al.* A novel β -glucosidase from *Aspergillus fumigates* releases diosgenin from spirostanosides of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright (DZW) [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 1309-1314.
- [41] 魏夺. 纤维素酶催化与三液相萃取耦合制备薯蓣皂苷元 [D]. 大连: 大连理工大学, 2011.
- [42] 张瑞芬, 李培琴, 赵江林, 等. 盾叶薯蓣内生菌及其对宿主培养物生长和皂苷元生产的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2010, 22(1): 11-15.
- [43] Zhao J L, Zhou L Q, Wu J Y. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87: 137-144.
- [44] Li P Q, Mou Y, Shan T J, *et al.* Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporum* Dzf17 on growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Molecules*, 2011, 16: 9003-9016.
- [45] Li P Q, Mao Z L, Lou J F, *et al.* Enhancement of diosgenin production in *Dioscorea zingiberensis* cell cultures by oligosaccharides from its endophytic fungus *Fusarium oxysporum* Dzf17 [J]. *Molecules*, 2011, 16: 10631-10644.
- [46] Debjani D, Bratati D. Elicitation of diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum* L. seedlings by heavy metals and signaling molecules [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33: 1585-1590.