

米曲霉直接转化盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元

董悦生, 齐珊珊, 刘琳, 修志龙

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要: 利用米曲霉直接转化盾叶薯蓣制备了薯蓣皂苷元, 转化中最重要的影响因素是 pH、接种量和培养温度. 在 pH 6.0 的 66.7 mmol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中, 8% 接种量、37 °C 培养 84 h 后提温至 50 °C 继续转化 8 h 的条件下, 薯蓣皂苷元得率可达 17.06 mg/g, 是粗酶液转化的 6.77 倍. 转化过程中甾体的总摩尔数分别是微波辅助提取和酸水解的 1.73 和 1.47 倍. 转化产物经质谱和核磁共振鉴定与薯蓣皂苷元同质. 直接微生物转化法优于酶解法.

关键词: 米曲霉; 盾叶薯蓣; 生物转化; 甾体皂苷; 薯蓣皂苷元

中图分类号: Q939.97 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2009)05-0993-06

1 前言

薯蓣皂苷元(Diosgenin)是合成甾体激素和甾体避孕药的一种重要原料^[1], 其本身也具有抗肿瘤等生理功能^[2,3], 它在植物中以甾体皂苷的形式存在. 盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright)为我国特有种, 是我国用于生产薯蓣皂苷元的主要药用植物. 薯蓣皂苷元的传统生产方法是直接酸水解法, 该方法成本低、操作简便, 但收率不高, 排出的废水酸浓度高, 污染较为严重^[4]. 近年来研究人员进行了一系列的技术改进, 如采用预发酵法、淀粉-纤维素分离法、酶解发酵法、阶梯生物催化协同提取法、糖化-膜回收法、酶解与二氧化碳超临界萃取偶联法等^[4-9], 但由于无法摆脱酸水解或成本高, 影响在生产中的应用.

微生物转化法是改造、修饰化合物结构的一种重要方法, 微生物转化过程中产生的酶通常具有一定的专一

性和特异性, 所以该方法主要应用于单一底物的简单体系. 盾叶薯蓣中甾体皂苷的糖链结构不同, 涉及到多种糖苷键及不同的连接方式, 其微生物转化生成薯蓣皂苷元的过程及机理很复杂. 有研究^[10,11]表明, 利用微紫青霉和曲霉对黄山药和盾叶薯蓣皂苷提取物进行生物转化可得到薯蓣皂苷元, 但收率低或有副产物产生.

本实验的前期工作^[12]确定了盾叶薯蓣药材及其转化产物中甾体皂苷及苷元的结构(图 1), 建立了定量分析方法, 筛选得到了能将盾叶薯蓣中多种皂苷成分转化为薯蓣皂苷元的食品级微生物米曲霉(*Aspergillus oryzae*)CICC 2436. 本工作在此基础上考察影响微生物培养与酶生成的几个重要方面, 以提高转化率, 并与酶液转化进行对比, 鉴定转化产物的化学结构, 考察转化过程中甾体成分总摩尔数的变化.

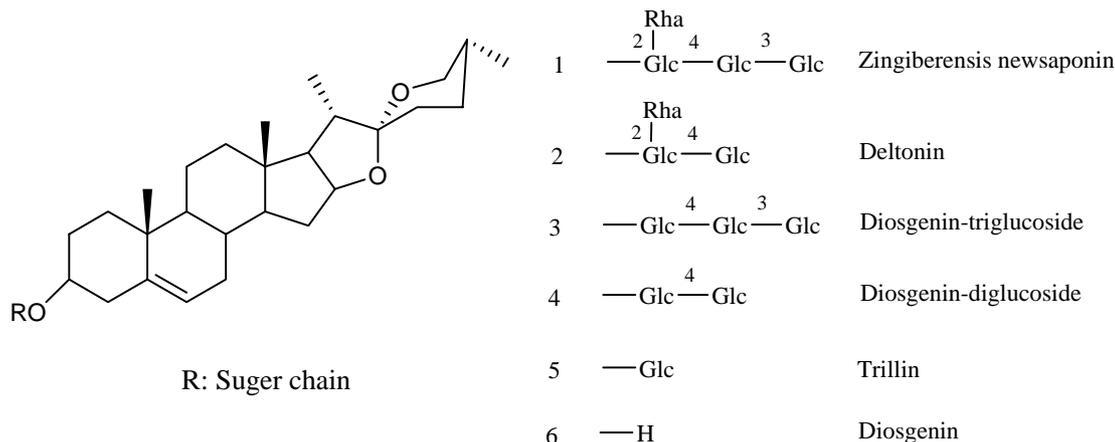


图 1 盾叶薯蓣及米曲霉转化产物中甾体成分的化学结构^[12]

Fig.1 Chemical structures of steroidal constituent in *D. zingiberensis* and its transformed production by *Aspergillus oryzae*^[12]

2 实验

2.1 材料和仪器

2.1.1 材料

菌株米曲霉 CICC 2436 购自中国工业微生物菌种保藏中心, 盾叶薯蓣药材购自陕西省宝鸡市[粉碎成粒径 ≥ 50 目(270 μm)的粉末], 经微波辅助提取得薯蓣皂苷元量为 0.72 mg/g, 甙体总摩尔数为 67.98 $\mu\text{mol/g}$.

2.1.2 仪器

Varian INOVA 400 型超导核磁共振仪(美国 Narian 公司), LC-MS 系统包括 Waters 2690 色谱系统(美国 Waters 公司)和 Finnigan TSQ 质谱仪(美国热电公司), ZHWY-2102C 立式双层恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司).

2.2 实验方法

2.2.1 培养方法

将在 PDA 斜面培养的米曲霉 CICC 2436 接种于种子培养基, 培养 24 h 后接种于发酵培养基. 种子培养基为 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣的自来水, 发酵培养基为 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣的缓冲液或自来水, 摇床转速 150 r/min. 每 12 h 取 3 个平行样, 用乙醇静置提取 12 h, 经 0.45 μm 膜过滤后, HPLC 测定甙体皂苷和薯蓣皂苷元含量, 以甙体成分(皂苷+苷元)的摩尔数之和为甙体的总摩尔数, 薯蓣皂苷元摩尔数与甙体总摩尔数的比值为转化率.

2.2.2 缓冲体系影响实验

种子培养和发酵培养在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 发酵接种量为 8%, 培养时间为 84 h. 发酵培养基为 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣和不同 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(缓冲液 a, pH 3.0~8.0)、柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液(缓冲液 b, pH 3.0~6.0)、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(缓冲液 c, pH 5.0~8.0), 用 TLC 法分析其转化效果. HPLC 分析 pH 为 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的 66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中皂苷和薯蓣皂苷元的含量, 以 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣的自来水培养基(CK)作为对照, 另取一个样品用 pH 计测定发酵液 pH 随时间的变化.

2.2.3 种子液接种量实验

种子培养和发酵培养在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 发酵培养基为 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣的 66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 6.0), 培养时间 84 h, 分别考察种子液接种量 2%, 4%, 6%, 8%, 10% 对薯蓣皂苷元、甙体成分总摩尔数和转化率的影响.

2.2.4 培养温度实验

分别在 25, 30 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行转化培养, 发酵培养

基为 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣的 66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 6.0), 每 12 h 取 3 个平行样, 测定薯蓣皂苷元得率随时间的变化.

2.2.5 提温发酵实验

在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行转化, 种子液接种量为 8%, 发酵培养基为 30 mL 含 1.0 g 盾叶薯蓣的 66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 6.0), 培养 84 h 后将温度提高至 50 $^{\circ}\text{C}$, 提温前每 12 h、提温后每 4 h 取 3 个平行样, 考察提温对薯蓣皂苷元产量和转化率的影响, 并以一组 84 h 后不提温样品作对照.

2.2.6 分析方法

TLC 分析选用硅胶板 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂), 展开剂为氯仿/甲醇/水(7:3:0.5), 显色剂为 5% 的磷钼酸乙醇溶液, 加热显色. HPLC 分析采用前期工作确立的方法^[12], 色谱柱为 Waters Sunfire C₁₈ 反相柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-水(B), 流动相梯度为 0~14 min 44%~75% A, 14~15 min 75%~91% A, 15.1~32 min 91% A, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 203 nm, 进样量 20 μL . 盾叶新苷(*Zingiberensis newsaponin*)、三角叶薯蓣皂苷(Deltonin)、薯蓣皂苷元-葡萄糖三糖苷(*Diosgenin-triglucoside*)、薯蓣皂苷元-葡萄糖二糖苷(*Diosgenin-diglucoside*)、延龄草次苷(Trillin)和薯蓣皂苷元的保留时间分别为 7.3, 9.0, 10.2, 11.8, 15.5, 29.7 min.

2.2.7 转化产物分离与鉴定

将 2.2.5 节制备的发酵液 400 mL 离心后得菌体, 加入 400 mL 石油醚浸泡过夜, 离心后取石油醚相, 室温静置结晶, 对结晶产物进行质谱和核磁共振分析.

2.2.8 米曲霉的酶液转化盾叶薯蓣实验

采用 2.2.5 节的方法培养 84 h 后, 将发酵液离心, 得到的上清液定容至 30 mL, 即得胞外粗酶液. 沉淀用去离子水洗 2 次, 离心, 加入 10 mL 50.0 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 6.0), 进行超声破碎(变幅杆末端直径 6.0 mm, 工作时间 2 s, 间隔时间 4 s, 输出功率 400 W, 总净超声时间 10 min), 破碎后离心, 上清定容至 30 mL, 即得胞内粗酶液. 取 15 mL 胞内外酶液各 2 份, 分别于 37 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 进行酶解反应 8 h, 提取及测定方法同 2.2.1 节. 比较不同酶解温度对薯蓣皂苷元产量的影响.

2.2.9 酸水解实验

根据文献[13], 称取 10.0 g 盾叶薯蓣, 加入 2.0 mol/L 硫酸 200 mL, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 4 h, 冷却后用 NaOH 中和, HPLC 测定甙体皂苷和薯蓣皂苷元的含量.

2.2.10 索式提取和微波辅助提取实验

称取 1.0 g 盾叶薯蓣, 加入 100 mL 70% 乙醇, 微波

加热至沸腾后冷却，反复 5 次；另称取 1.0 g 盾叶薯蓣，加入 100 mL 70% 乙醇，索氏提取 4 h。每种方法均取 3 个平行样品，提取结束离心取上清，经 0.45 μm 膜过滤后，HPLC 测定甾体皂苷和薯蓣皂苷元的含量。

3 结果与讨论

3.1 米曲霉转化盾叶薯蓣的转化条件

3.1.1 缓冲体系对转化的影响

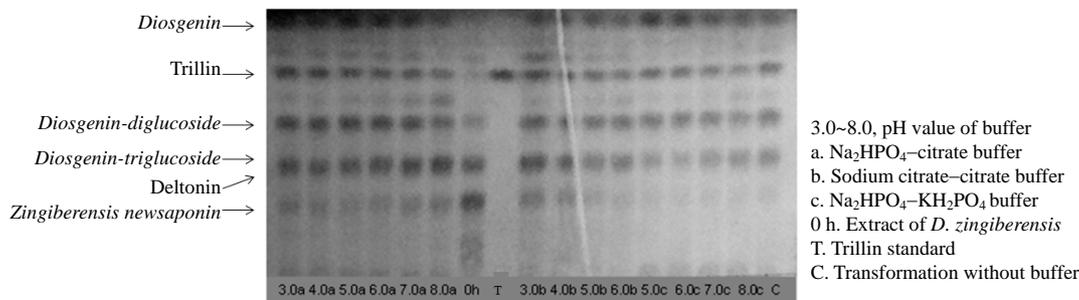


图 2 米曲霉转化盾叶薯蓣缓冲体系的筛选

Fig.2 Screening of buffer system for biotransformation of *D. zingiberensis* by *A. oryzae*

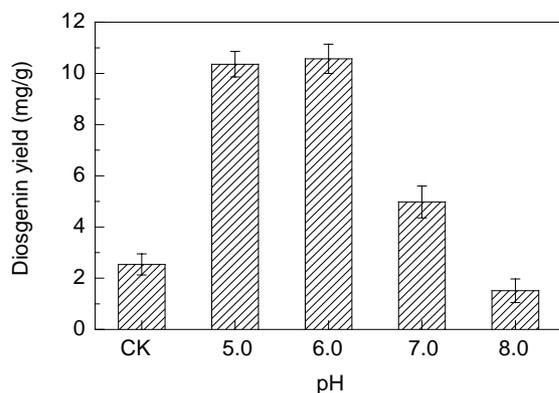


图 3 不同 pH 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液体系对薯蓣皂苷元得率的影响

Fig.3 Effect of pH of Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer on yield of diosgenin

对不同 pH 值的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲体系进行 HPLC 复筛，结果(图 3)显示，pH 6.0 的 66.7 mmol/L 磷酸缓冲体系对转化有明显促进作用，薯蓣皂苷元得率提高到对照的 4.16 倍。进一步考察发酵过程中发酵液 pH 随时间的变化，结果如图 4 所示，可见不存在该缓冲体系时，发酵液 pH 在 5.7~8.3 间较大幅度地变化；而使用 pH 6.0 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲体系时，发酵液的 pH 可稳定在 6.0 左右，为微生物生长提供稳定的偏酸环境，更适于霉菌的生长、产酶，对糖苷酶的酶解作用较有利。

3.1.2 接种量对米曲霉转化的影响

由表 1 可知，随接种量提高，薯蓣皂苷元得率和转化率有提高的趋势，原因是接种量对米曲霉生长有影

响。缓冲体系筛选的结果(图 2)表明，在偏酸性的 pH 5.0 或 6.0 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液中，米曲霉能将极性较大的皂苷(盾叶新苷、三角叶薯蓣皂苷和葡萄糖三糖苷)较完全地转化为极性较小的皂苷，对转化有促进作用。而 pH 5.0 或 6.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸和柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液都没有明显的促进作用，原因可能是其中的柠檬酸(盐)影响了米曲霉的代谢，没有显示出 pH 值的缓冲作用。

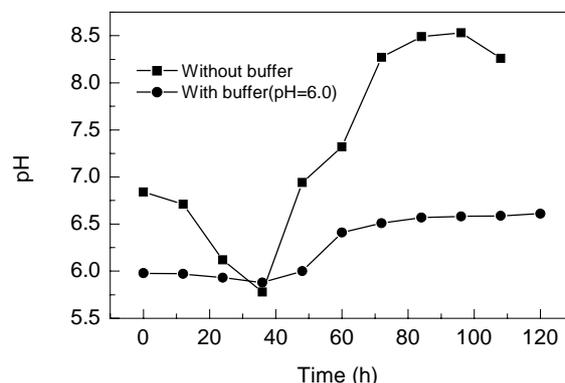


图 4 pH=6 的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲体系中发酵液 pH 的变化

Fig.4 Changes of broth pH during fermentation with or without Na₂HPO₄-KH₂PO₄ buffer

响，其次接入的种子液中已含有一定量诱导的水解酶，增大接种量增加了反应体系中酶浓度，提高了转化率，但在接种量达到 8% 后，增加趋缓。

表 1 接种量对米曲霉转化的影响
Table 1 Influence of inoculum volume on biotransformation by *A. oryzae*

Inoculum volume (%)	Yield of diosgenin (mg/g)	Total moles of steroidal constituent (μmol/g)	Conversion rate (%)
2	9.96±0.85	83.91±4.24	28.7±0.9
4	10.79±0.83	85.84±3.60	30.3±0.8
6	11.37±0.38	88.20±3.64	31.1±0.4
8	13.53±0.22	89.45±2.24	36.5±2.1
10	14.28±0.10	89.89±1.33	38.4±1.0

3.1.3 培养温度对薯蓣皂苷元生成的影响

由图5可知, 30和37℃时产物皂苷元的得率高于25℃, 表明30~37℃更适于米曲霉在该培养基中的快速生长, 且更接近其所产糖苷酶的最适作用温度, 因此后续实验主要在此温度范围内进行。

3.1.4 转化后期提温对转化的影响

糖苷酶的最适温度通常在42~60℃之间^[14,15], 但该温度区间不利于微生物生长。将微生物在其适宜生长的温度下培养, 产酶量达到一定程度后提高温度, 使之接近其最适温度, 可以在短时间迅速提高转化率。但若温

度过高, 则会影响酶的稳定性、损失酶活。本课题组使用米曲霉 CICC2436 转化虎杖生产白藜芦醇的研究^[16]中, 进行了糖苷酶的最适温度和稳定性实验, 发现米曲霉 CICC2436 中的糖苷酶在45~50℃时活性最高, 温度高于55℃时, 酶稳定性较差, 在发酵后期提高转化温度至50℃可明显提高转化效率。

本研究尝试以50℃作为提温后的温度, 结果显示, 提温8h后皂苷元得率达到了17.06 mg/g, 比提温前(84h)提高了38.1%。若不提温, 该时间段内皂苷元含量没有显著上升(图6)。

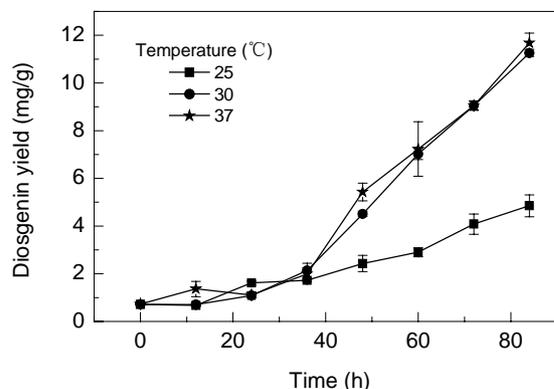


图5 培养温度对薯蓣皂苷元得率的影响

Fig.5 Effect of culture temperature on yield of diosgenin

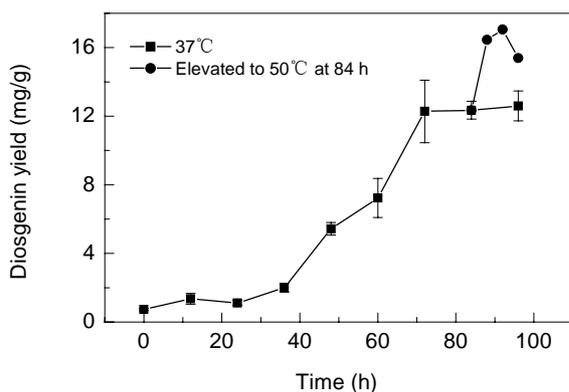


图7 盾叶薯蓣提取液和生物转化后高效液相色谱

Fig.7 HPLC chromatographs of extract of *D. zingiberensis* and post-transformation

药材提取液和米曲霉转化-提温实验的HPLC分析图谱(图7)显示, 经过米曲霉转化, 极性较大的皂苷已经基本水解完全, 生成了极性较小的皂苷(即甾体皂苷的糖基侧链逐渐水解), 进而生成皂苷元。

根据以上对转化缓冲体系的接种量、转化温度优化和提温实验, 确定了最终的培养条件为: 培养基为含1.0 g 盾叶薯蓣的66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH 6.0), 接种量为8%, 在37℃下培养84h后升温至50℃转化8h, 在此条件下薯蓣皂苷元得率为17.06 mg/g,

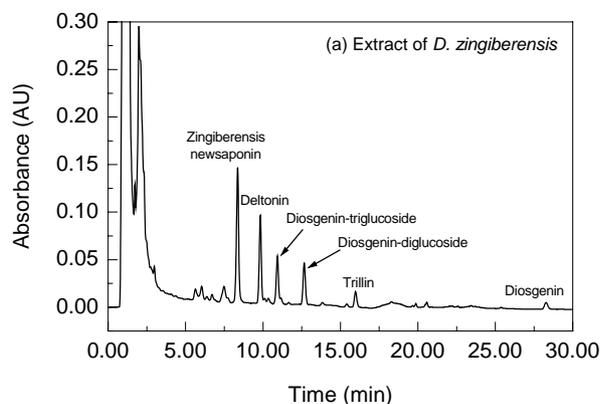
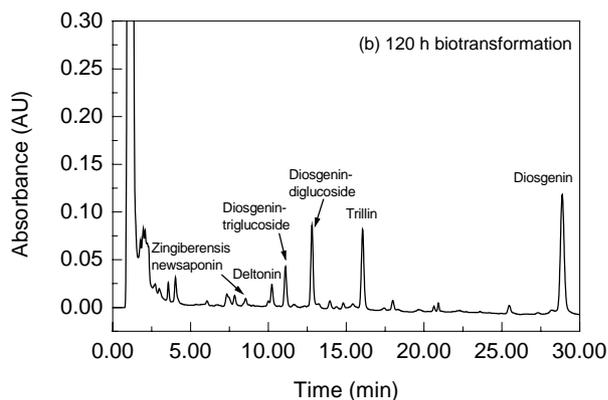


图6 转化后期提温对薯蓣皂苷元得率的影响

Fig.6 Effect of temperature elevation on yield of diosgenin



薯蓣皂苷元的摩尔转化率为35.1%。

3.2 转化产物的分离和结构鉴定

升温至50℃后的发酵液经石油醚提取、结晶得到针状结晶210.5 mg。LC-MS分析显示该化合物的分子量为414($[\text{M}-\text{H}]^-$ 413), 核磁共振的结果为: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 0.68(3H, d, $J=5.6$ Hz, H-27), 0.85(3H, s, H-18), 1.03(3H, s, H-19), 1.14(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-21), 5.39(1H, d, $J=5.2$ Hz, H-6)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 141.8 (C-5), 120.9(C-6), 109.2(C-22), 81.1(C-16),

78.2(C-3), 66.7(C-26), 62.8(C-17), 56.6(C-14), 50.2(C-9), 41.9(C-20), 40.4(C-13), 39.8(C-12), 39.1(C-4), 37.3(C-1), 36.9(C-10), 32.3(C-7), 32.1(C-15), 31.7(C-2), 31.5(C-23), 30.5(C-8), 30.4(C-25), 29.1(C-24), 21.1(C-11), 19.5(C-19), 17.2(C-27), 16.3(C-18), 14.9(C-21). 该化合物与薯蓣皂苷元同质^[17].

3.3 米曲霉粗酶液转化盾叶薯蓣

米曲霉的粗酶液对盾叶薯蓣也有一定的转化效果, 其中胞内粗酶液在 37 和 50℃ 下酶解 8 h 后, 薯蓣皂苷元的得率分别是 0.31 和 1.35 mg/g, 胞外粗酶液在 37 和 50℃ 下酶解 8 h 后, 薯蓣皂苷元的得率分别是 0.68 和 2.52 mg/g. 胞内和胞外粗酶液 50℃ 下酶解得到的薯蓣皂苷元分别是 37℃ 时的 4.35 和 3.71 倍, 即 50℃ 时的酶活明显高于 37℃, 这也进一步验证了发酵后期提温实验的结果.

与微生物直接转化相比, 37 和 50℃ 粗酶液转化的薯蓣皂苷元得率较低, 主要是因为在使用粗酶液转化药材

时, 药材中淀粉成分对底物有包裹作用, 使酶液无法与底物有效接触. 而微生物直接转化, 在微生物生长过程中利用了淀粉、纤维素等成分, 使转化底物有效释放, 与水解酶有效接触, 提高了转化效率. 通过粗酶液水解的方式, 50℃ 下用胞外酶水解 8 h, 1 g 药材得到的薯蓣皂苷元仅为米曲霉直接转化盾叶薯蓣的 14.7%, 且需要进行复杂的酶液制备过程. 米曲霉直接转化盾叶薯蓣的方法转化率高、成本低、操作简便, 优于酶解法.

3.4 米曲霉转化对总皂甙体成分溶出的影响

不同处理方法盾叶薯蓣的甙体总摩尔数及薯蓣皂苷元得率见表 2, 经米曲霉转化及升温后, 总甙体成分的溶出显著增加, 尤其是升温后, 达到微波辅助提取的 1.73 倍、酸水解法的 1.47 倍. 这是因为米曲霉生长过程中利用了药材中的淀粉和纤维素作为碳源, 增加了甙体成分的溶出; 而酸水解法中总甙体含量介于微波辅助提取和微生物转化法之间, 证明酸水解法具有增加皂甙成分溶出和破坏薯蓣皂苷元母核的双重作用.

表2 不同处理方法对甙体成分总摩尔数的影响

Table 2 Effect of different treatment methods on total moles of steroidal constituent

Method	Total moles of steroidal constituent ($\mu\text{mol/g}$)	Yield of diosgenin (mg/g)
Soxhlet extraction	63.18 \pm 2.21	1.61
Microwave assistant extraction	67.98 \pm 0.47	0.72
Acidic hydrolysis	79.55 \pm 3.93	29.57
92 h transformation by <i>A. oryzae</i> at 37℃	94.95 \pm 2.74	12.35
84 h transformation by <i>A. oryzae</i> at 37℃, then 50℃ for 8 h	117.29 \pm 2.43	17.06

微生物直接对药材进行转化, 利用药材中的淀粉和纤维素作为碳源, 不需要添加额外的碳源、氮源, 具有条件温和、成本低廉、可控性强的特点. 与其他工艺相比, 操作简便、设备投资小, 且经转化后药材中的淀粉和部分纤维素被水解为还原糖进而作为碳源被利用, 极大地降低了固体废弃物的产生量. 从米曲霉转化后的 HPLC 分析可以看出, 尚有一定量的甙体皂甙成分未被转化, 对菌种诱变和培养工艺进一步优化后, 有望使薯蓣皂苷元得率高于酸水解法, 成为生产薯蓣皂苷元的新方法.

4 结论

采用米曲霉直接转化盾叶薯蓣制备了薯蓣皂苷元, 并对培养条件进行了优化. 转化中最重要的影响因素是 pH、微生物接种量、培养温度. 在 pH 6.0 的 66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液中, 米曲霉接种量 8%, 37℃ 培养 84 h 后提温至 50℃ 再继续转化 8 h, 盾叶薯蓣药材经米曲霉转化薯蓣皂苷元的得率为 17.06 mg/g, 是粗酶液转化的 6.77 倍. 转化过程中甙体的总摩尔数分别是微波辅助提取和酸水解的 1.73 和 1.47 倍. 转化产物经质谱

和核磁共振鉴定为薯蓣皂苷元. 直接微生物转化法具有成本低廉、有利于药材有效成分溶出等特点, 优于酶解法.

参考文献:

- [1] Fernandes P, Cruz A, Angelova B, et al. Microbial Conversion of Steroid Compounds: Recent Developments [J]. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2003, 32(6): 688–705.
- [2] Corbiere C, Liagre B, Bianchi A, et al. Different Contribution of Apoptosis to the Antiproliferative Effects of Diosgenin and Other Plant Steroids, Hecogenin and Tigogenin, on Human 1547 Osteosarcoma Cells [J]. *Int. J. Oncol.*, 2003, 22(4): 899–905.
- [3] Raju J, Bird R P. Diosgenin, a Naturally Occurring Furostanol Saponin Suppresses 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reductase Expression and Induces Apoptosis in HCT-116 Human Colon Carcinoma Cells [J]. *Cancer Lett.*, 2007, 255(2): 194–204.
- [4] Wang Y, Liu H, Bao J, et al. The Saccharification–Membrane Retrieval–Hydrolysis (SMRH) Process: A Novel Approach for Cleaner Production of Diosgenin Derived from *Dioscorea zingiberensis* [J]. *J. Clean. Prod.*, 2008, 16(10): 1133–1137.
- [5] Zhang Y Q, Liang J H, Fu E H, et al. Effect of Modified Enzymatic Catalysis on the Extraction of Diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright [J]. *Chem. Eng. Technol.*, 2007, 30(11): 1488–1494.
- [6] 韩凤梅, 姚向阳, 陈勇. 盾叶薯蓣纤维素酶酶解工艺研究 [J]. *化学与生物工程*, 2004, 21(6): 26–27.

- [7] 刘国梁, 刘峥. 盾叶薯蓣提取皂甙元副产淀粉的研究 [J]. 山西化工, 2003, 23(1): 6-7.
- [8] 汤兴利, 徐增莱, 夏冰, 等. 用盾叶薯蓣生产薯蓣皂苷元预发酵与水解条件优化 [J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(3): 35-37.
- [9] Huang W, Zhao H, Ni J, et al. The Best Utilization of *D. zingiberensis* C.H. Wright by an Eco-friendly Process [J]. *Bioresour. Technol.*, 2008, 99: 7407-7411.
- [10] 张传会, 陈有为, 郑毅, 等. 菌株 YM32139 转化黄山药生产薯蓣皂苷元的研究 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(6): 31-34.
- [11] 赵玉婷, 徐增莱, 戴传超, 等. 薯蓣皂苷水解酶的发酵及粗酶的性质研究 [J]. 食品科学, 2007, 27(8): 269-272.
- [12] Qi S S, Dong Y S, Zhao Y K, et al. Qualitative and Quantitative Analysis of Microbial Transformation of Steroidal Saponins in *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Chromatographia*, 2009, 69(9/10): 865-870.
- [13] 谢彩侠, 高山林, 朱丹妮, 等. 盾叶薯蓣中薯蓣皂甙元不同提取方法的比较 [J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(1): 23-25.
- [14] 张涛, 黄哲, 林章凛. 固定化 β -葡萄糖苷酶双相体系中水解大豆异黄酮 [J]. 化工学报, 2008, 59(2): 387-392.
- [15] 童星, 唐秋嵩, 吴玉飞, 等. 黑曲霉 α -葡萄糖苷酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达 [J]. 微生物学报, 2009, 49(2): 262-268.
- [16] Wang H, Liu L, Guo Y X, et al. Biotransformation of Piceid in *Polygonum cuspidatum* to Resveratrol by *Aspergillus oryzae* [J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007, 75(4): 763-768.
- [17] Agrawal P K, Jain D C, Gupta R K, et al. Carbon-¹³NMR Spectroscopy of Steroidal Saponins and Steroidal Saponins [J]. *Phytochemistry*, 1985, 24(11): 2479-2496.

Direct Biotransformation of *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright by *Aspergillus oryzae* to Produce Diosgenin

DONG Yue-sheng, QI Shan-shan, LIU Lin, XIU Zhi-long

(Department Biological Science & Technology, School Environment & Biological Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China)

Abstract: The pH, biomass inoculation, and culture temperature were proved to be the main factors in direct biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright by *Aspergillus oryzae* to produce diosgenin. Under the transformation conditions of 66.7 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ buffer with pH 6.0, 8% biomass inoculation, culturing at 37 °C for 84 h, then 50 °C for 8 h, the highest yield of diosgenin was 17.06 mg/g, which was 6.77 times to that of crude enzyme transformation. Biotransformation of *D. zingiberensis* by *A. oryzae* could raise total moles of steroidal constituent 1.73 times to that of extract of *D. zingiberensis* and 1.47 times to that of acid hydrolysis, respectively. The biotransformation product was identified as diosgenin by MS and NMR. Direct biotransformation of *Dioscorea zingiberensis* raw herb by *Aspergillus oryzae* was demonstrated to be superior to enzymolysis method.

Key words: *Aspergillus oryzae*; *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright; biotransformation; steroidal saponin; diosgenin