

· 专 论 ·

非水相生物转化体系的建立及其在中药废弃物资源化中的应用

吴薛明¹, 许婷婷¹, 何冰芳², 段金廛^{1*}

1. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023
2. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816

摘要: 中药废弃物的资源化利用是有效提升资源利用效率, 实现节约资源, 循环经济和友好型经济发展的重要举措。针对中药废弃物的转化增效资源化模式, 提出中药废弃物的非水相生物转化利用途径, 探讨适用于中药废弃物中潜在资源性物质的非水相生物转化体系, 介绍耐有机溶剂极端微生物及酶类的筛选与应用, 并指出融合非水相生物转化技术是中药废弃物资源化利用的一个重要突破点, 为中药废弃物资源化的高效利用提供借鉴和引导。

关键词: 中药废弃物; 转化增效; 生物转化; 非水相; 微生物

中图分类号: R282.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)03-0313-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.001

Establishment of non-aqueous biotransformation system and its application in castoff from Chinese materia medica industrialization

WU Xue-ming¹, XU Ting-ting¹, HE Bing-fang², DUAN Jin-ao¹

1. Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization of Jiangsu Province, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China

Abstract: The resource utilization of castoff from Chinese materia medica (CMM) industrialization is an important measure to effectively improve the efficiency of resource utilization, save resources, recycle economy, and develop environment-friendly economy. Based on the conversion efficiency of resource utilization model of castoff from CMM industrialization, this article mentions the non-aqueous biotransformation method of herb-medicine castoff, discusses the suited non-aqueous biotransformation systems, and introduces the screening and application of organic-solvent-tolerant extremophiles and enzymes. This article points out that non-aqueous biotransformation technology is a breakthrough in the resource utilization of castoff from CMM industrialization, and it would promote the realization of herb-medicine castoff resource utilization.

Key words: castoff from Chinese materia medica industrialization; conversion efficiency; biotransformation; non-aqueous; microorganism

中药资源的高效利用是实现资源节约、环境友好型经济, 保障中医药事业健康可持续发展的战略问题^[1-2]。然而, 在中药及天然药物资源产业化过程中不可避免地产生大量废弃物, 由此导致的我国中药资源利用效率低下和巨大浪费, 以及中药废弃物处理过程中造成的环境污染等, 已成为行业发展所面临的棘手问题, 引起社会各界的广泛关注。

中药废弃物的产生源于药材原料生产、药材初加工与饮片加工、中药制剂以及含中药的健康产品等资源性产品制造过程。目前, 中药废弃物的综合利用方法与技术尚处于探索性阶段。能否利用现代科学技术和集成技术, 促使中药废弃物中资源性物质的资源化, 并开发具有高利用率和高附加值的系列资源性产品, 进行中药废弃物的高值化利用是实现中药资源高

收稿日期: 2014-09-11

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目资助 (PAPD); 江苏省第四期“333”工程科研项目资助 (2013年); 江苏省高校自然科学研究项目资助 (14KJD530001); 南京中医药大学青年自然科学基金项目资助 (13XZR02, 12JCQN02)

作者简介: 吴薛明 (1979—), 南京中医药大学讲师。E-mail: wuxuemingbbz@sina.com

*通信作者 段金廛, 教授, 博士生导师。Tel/Fax: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

效综合利用、提升资源利用效率的关键^[3]。

本研究团队在前期研究和实践基础上, 提出中药废弃物的“三大利用策略”, 并在此基础上构建出中药废弃物的“三类资源化模式”^[4]。本文在非水相生物转化理论和中药资源化思路的指导下, 针对中药废弃物转化增效的资源化模式, 从非水相生物转化增效的原理、实现途径、适宜转化体系和应用实践等方面进行论述, 以期为中药废弃物的高效资源化利用, 逐步实现中药资源及其产业化领域的健康可持续发展提供借鉴和引导。

1 非水相生物转化体系的建立

生物转化一般是在以水为介质的系统中进行的, 但随着对生物转化的深入研究发现, 该反应也能在非水系统中进行。1984 年以来, 以 Klivanov 教授为首的研究小组, 一直从事非水系统的酶反应研究, 取得了显著的成果, 并由此产生了一个全新的分支学科——非水酶学^[5]。其研究发现, 一些在水中不能够被酶催化的反应可以在有机溶剂中完成, 并且在有机溶剂中酶的选择性可发生很大的改变, 甚至可调整酶催化反应的选择性。生物转化涉及糖基化、羟基化、加氢、脱氢、水解、酯化等多种类化学反应, 当生物催化剂处于非水系统时, 反应体系的选择对生物催化剂的活性影响是相当大的。目前非水相生物转化体系主要有 3 种: 水互溶有机溶剂单相体系、液-液两相体系和固-液两相体系^[6]。

1.1 水互溶有机溶剂单相体系

水互溶有机溶剂单相体系中 (图 1), 生物催化剂、底物和产物均能溶解于该体系中。常用的有机溶剂有甲醇、乙醇、二甲基亚砜 (DMSO)、二甲基甲酰胺 (DMF)、异丙醇等。这种反应体系中生物催化剂与底物充分接触, 属于均相反应, 反应效率高。

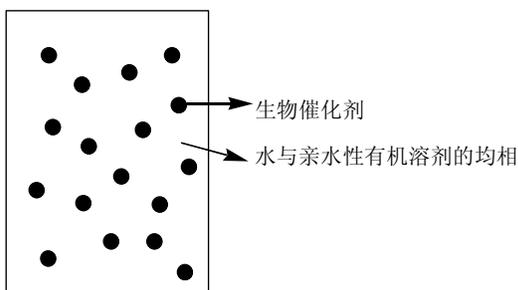


图 1 水互溶有机溶剂单相体系

Fig. 1 Water miscible organic solvent single phase system

Wang 等^[7]以灰色链霉菌对芦丁进行生物转化, 反应体系中加入 DMF 增加芦丁的溶解度, 转化过程中涉及糖苷键的水解、去羟基化和甲基化反应, 获得了槲皮素葡萄糖苷、山柰酚芸香糖苷、异鼠李素葡萄糖苷、山柰酚等药理活性更高的化合物。Li 等^[8]以来源于海栖热袍菌的麦芽糖基转移酶对大豆苷进行生物转化, 得到 4 种大豆苷糖苷: 大豆苷元 7-O-三葡萄糖苷、大豆苷元 7-O-五葡萄糖苷、大豆苷元 7-O-七葡萄糖苷和大豆苷元 7-O-九葡萄糖苷。该转化反应加入 30% DMSO 使大豆苷的溶解度提高了约 18 倍, 增加至 15 g/L, 总转化率为 45%, 获得的转化产物大豆苷元 7-O-三葡萄糖苷的溶解度比大豆苷提高了 75 000 倍。

1.2 液-液两相体系

水和疏水性有机溶剂组成的液-液两相体系 (图 2) 已成功用于生物转化反应, 水相中含有溶解的生物催化剂, 疏水性有机溶剂 (如醋酸乙酯、正丁醇、正己烷、苯等) 中含有溶解的脂溶性底物。在液-液两相体系中, 生物转化反应发生在界面, 底物或产物则溶解于有机相。

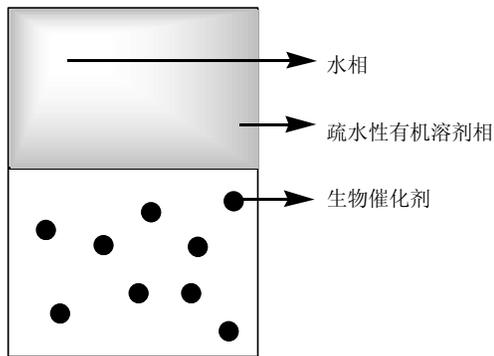


图 2 液-液两相体系

Fig. 2 Liquid-liquid two-phase system

Suzuki 等^[9]利用恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* ST-491 菌将石胆酸的侧链氧化切断, 经雄烯二酮等中间体, 最终形成固醇类激素的合成前体 1, 4-雄二烯二酮, 在 20%二苯基乙烷的双相体系中 1, 4-雄二烯二酮的产率比无溶剂添加体系增大了 9 倍。Gao 等^[10]报道了一株耐有机溶剂脂肪酶产生菌粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*, 该菌所产脂肪酶在有机溶剂中具有出色的稳定性, 该酶在缓冲液和甲苯的双相体系中, 对甘油丁酸酯、环戊烯酮乙酯、萘普生甲酯、3-(4'-甲氧苯基)甲氧苯基-缩水甘油酸甲酯具有良好的手性选择性^[11]。在非水体系中, 脂肪酶催化不对称酯化反应具有很大优势。由于酯化反应

过程中涉及的水分子生成是可逆反应，反应介质中含水量的控制是这类反应能否获得较高收率和光学纯度产物的关键。选择适当的酶和底物，通过酯化反应，可以得到光学活性的醇、酸及酯，该反应在生物转化的手性化合物制备中有着广泛的应用。BASF 公司使用丁二酸酐作为酰化剂，利用南极假丝酵母 *Candida antarctica* 脂肪酶 B (CAL-B) 为催化剂拆分 1-苯乙醇，该反应已实现工业级规模生产^[12] (图 3)。

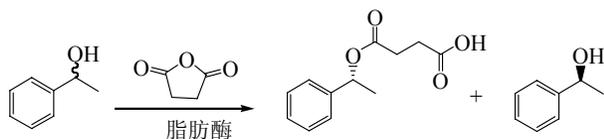


图 3 脂肪酶利用丁二酸酐酯化拆分 1-苯乙醇

Fig. 3 Esterification of (R, S)-1-phenylethanol catalyzed by lipase using succinic anhydride

1.3 固-液两相体系

目前，许多研究者通过包埋法、吸附法、交联法或共价结合等固定化技术将生物催化剂固定于支撑载体中，形成固-液两相体系 (图 4) 进行生物转化反应。由于避免了有机溶剂的直接接触，所以生物催化剂的稳定性比前面提及的 2 种体系有极大提高，同时易于生物催化剂的回收再利用以及产物的分离制备。然而，该体系的固相扩散限制及空间障碍增加会导致反应效率的下降。姜文勇等^[13]以海藻酸钠包埋法固定化啤酒酵母细胞催化有机硅酮不对称还原反应，水相中固定化细胞催化反应初速度较大，但是产物的光学纯度迅速减小，而在有机溶剂中产物的光学纯度要比水相高，选择正己烷作为最适有机溶剂时，反应最大产率和产物的光学纯度分别高达 96.8%和 95.7%。

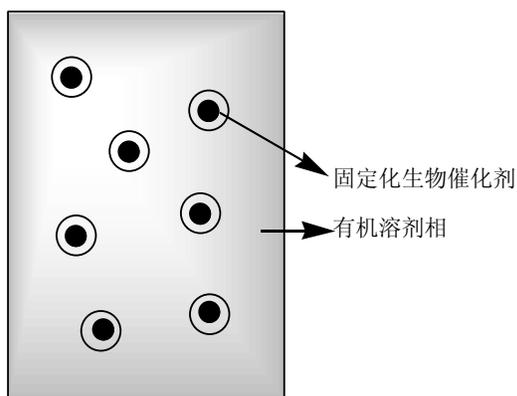


图 4 液-固两相体系

Fig. 4 Liquid-solid two-phase system

上述 3 种体系中的有机溶剂均对生物催化剂产生影响，易导致其变性失活。特别是水互溶有机溶剂单相体系，一般亲水有机溶剂的比例为 10%~30%，高于某阈值的亲水性有机溶剂就会夺去酶分子表面的结构水，而使酶失活^[14-15]。这是因为在作为润滑剂的水不存在的情况下，酶是具有刚性的，这种刚性结构也影响了酶与底物的诱导契合作用，而使酶处于低活性或失活状态。而水-亲水有机溶剂两相混合介质中，酶有足够柔性并易于表面的水化层使构象发生变化^[16]。

2 非水相酶的筛选与开发

非水相生物转化的诱人前景与生物催化剂易失活的矛盾推动了酶的改造与非水酶学的发展，过去 20 多年，研究者致力于通过固定化、大分子修饰或基因改造的方法提高酶在有机溶剂中的稳定性^[17-18]，然而这些方法只能在一定程度上改善酶在有机溶剂中的活性和稳定性。Zaks 等^[5]指出耐有机溶剂微生物和其所产耐有机溶剂酶类的出现，为解决酶在非水相生物转化反应中的核心问题提供了新的途经。因此出发菌株对有机溶剂的高度稳定性是非水相酶生物转化与生物催化高效率的基础。

自然界的驯化赋予微生物以多样性，耐有机溶剂极端微生物由于能适应有机溶剂对细胞的毒性或结构破坏而具有独特的抵抗恶劣环境的多种能力。由此产生的酶，尤其是胞外酶多数具有较强的耐有机溶剂的特性。国内外已有耐有机溶剂微生物筛选的报道，Trivedi 等^[19]筛选到一株在有机溶剂中稳定的纤维素酶，该酶在 20% 体积的苯、甲醇或丙酮中活性稳定。Doukyu 等^[20]将胆固醇溶于二苯基甲烷和对二甲苯，进行转化菌筛选，分离得到有机溶剂存在下能高效氧化胆固醇的细菌 *Burkholderia cepacia* ST-200。研究还发现，将胆固醇溶于不同有机溶剂能转化得到不同的主产物，并且从 ST-200 菌株分离得到的胆固醇氧化酶在有机溶剂存在下的胆固醇转化速度比胆固醇水悬浮液中的速度要快 2~4 倍^[21]。目前国内外研究的产耐有机溶剂酶的极端微生物开发情况见表 1。

本研究团队在前期工作基础上，建立了耐有机溶剂极端微生物菌库，获得高产蛋白酶、脂肪酶、糖苷酶的耐有机溶剂极端微生物。这些极端微生物所分泌的相关酶类在多种疏水性有机溶剂或亲水性有机溶剂中显示了很高的活力，有望在中药废弃物非水相生物转化反应中发挥重要的作用。

表 1 产耐有机溶剂酶的极端微生物开发情况

Table 1 Exploitation of organic-solvent-tolerant extremophiles

微生物	耐有机溶剂酶	有机溶剂	参考文献
短小芽孢杆菌	蛋白酶	25%苯、甲苯、正十二烷	22
节杆菌 Rü61a	细胞质羧酸酯酶	30% DMSO、甲醇、乙腈、丙酮	23
绿脓杆菌 PST-01	蛋白酶	50% DMF	24
伯克霍尔德菌 ST-200	胆甾醇酯酶	5%~20%亲水性有机溶剂	25
腐生葡萄球菌 CQ16	糖苷酶	15% DMSO	26
芽孢杆菌 205y	脂肪酶	25%正己烷、二甲苯	27
烟管菌 UAMH 8258	锰过氧化物酶	乙腈、DMF、四氢呋喃、甲醇	28
产酸克雷伯菌	水解酶	85%辛烷	29
无色嗜盐菌	蛋白酶	丙三醇、DMSO、DMF、丙烯乙二醇	30
地衣芽孢杆菌 RSP-09-37	蛋白酶	10%~90%乙腈	31

3 非水相生物转化在中药废弃物资源化中的应用

转化增效资源化模式是针对具有一定资源化潜力的中药废弃物，其本身可能属于粗放低值化利用类型，但可通过物理、化学或生物转化技术使其转化为价值较高的资源性物质，以提高产品附加值，充分挖掘中药废弃物的资源化潜力。在中药废弃物的转化增效利用途径中，因生物转化技术具有反应选择性强、条件温和、环保及后处理过程简单等优点，在中药废弃物转化为高值化的资源性产品中起着重要作用。但是，中药废弃物中存在的如黄酮类、生物碱类、萜类、甾体和皂苷类等具有潜在利用价值的资源性物质，其水溶性较差，难以在水相体系中进行有效的生物转化。如果在转化体系中加入有机溶剂，将有利于中药废弃物中资源性物质的溶解，提高生物转化效率。

中药废渣是中药废弃物的主要组成之一，其产生源于中药提取物、中药制剂、中药配方颗粒以及其他含中药的资源性产品等的制造过程。据统计^[32]，济川制药集团因蒲地兰口服液、三拗片生产过程产生的固体废弃物，全年高达 1×10^4 t 左右。苏中制药集团每年生产脉注射剂产生的药渣和精制过程产生的固体沉淀物约为 300 t；因生产黄葵胶囊年产生药渣达 1 000 t 左右。可见，全国范围内中药制药企业产生的中药废渣量是一个惊人的数字。如何充分利用这些固体废弃物中的资源性化学物质，是急需解决的重大问题。

有些单味中药渣，如甘草药渣、黄芩药渣、淫羊藿药渣、沙棘叶残渣、佛手药渣和甜叶菊药渣等含有大量黄酮类物质，这些药渣经适当处理就可在

水互溶有机溶剂单相体系中进行非水相生物转化，将废弃药渣中的资源性化学物质，如黄酮类物质经糖基化、羟基化等反应，转化为利用价值更高的资源性物质。

本课题组前期建立了兼具有目标底物特异性和有机溶剂耐受性的糖苷酶产生菌筛选方法，以 20% DMSO 为筛选压力、20 g/L 葛根素为目标底物，从 600 多份油污土样中筛选到多株菌株，其中 *Arthrobacter nicotianae* XM6 菌株所产 β -糖苷酶在 25% DMSO 转化体系中，可将葛根中黄酮类物质葛根素转化为果糖基- $\beta(2,6)$ -葛根素^[33]。与现有报道相比，因本研究采用了非水相生物转化体系（图 5），葛根素浓度可增加 11 倍以上，且产率高达 91%，这种高底物浓度和高转化率将有利于转化产物的分离制备。同时，初步药理活性研究表明，果糖基- $\beta(2,6)$ -葛根素的清除半衰期 ($t_{1/2}$)、平均滞留时间 (MRT) 值均明显高于葛根素，表明其在体内有更长的作用时间，且果糖基- $\beta(2,6)$ -葛根素的药-时曲线下总面积 (AUC) 值高于葛根素，表明其具有更高的生物利用度。

对于树脂类中药成分，如树脂烃类、树脂醇类、树脂酸类和树脂酯类，这些树脂类成分难溶于水，可采用液-液两相或固-液两相体系进行非水相生物转化，树脂类中药成分经水解、选择性酯化或酯交换反应，也可转化为生物活性更高的资源性物质。目前，国内外利用非水相生物转化体系对中药废弃物中资源性物质进行生物转化的情况见表 2。

4 中药废弃物非水相生物转化的展望

生物催化剂在有机溶剂中的不稳定性是阻碍其

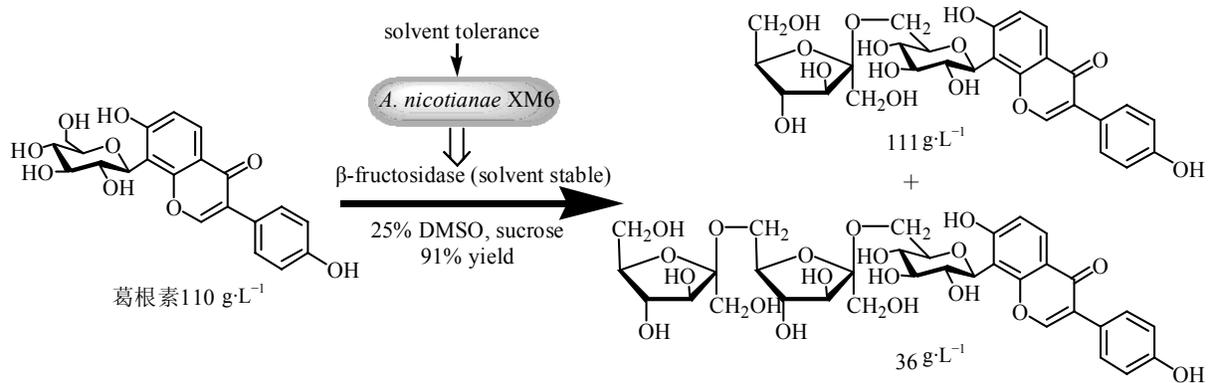


图 5 25% DMSO 体系中 β-糖苷酶生物转化葛根素合成葛根素糖苷

Fig. 5 Biotransformation of puerarin to puerarin glycosides by β-fructosidase in 25% DMSO system

表 2 中药废弃物中资源性物质的非水相生物转化

Table 2 Non-aqueous biotransformation of potential resources from castoff of CMM

中药废弃物中资源性物质	微生物/酶	转化产物	非水相体系	参考文献
沙棘黄酮糖苷	α-鼠李糖苷酶	槲皮素、异鼠李素等	水-乙醇	34
大豆苷	麦芽糖基转移酶	大豆苷糖苷	水-DMSO	35
葛根素	约氏不动杆菌	葛根素糖苷	水-DMSO	36
芒果苷	烟草节杆菌	芒果苷果糖苷	水-DMSO	37
大豆苷元	腐生葡萄球菌	大豆苷	水-DMSO	26
芹菜素	腐生葡萄球菌	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	水-DMSO	26
槲皮素	腐生葡萄球菌	槲皮素-7-O-葡萄糖苷	水-DMSO	26
木犀草素	腐生葡萄球菌	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	水-DMSO	26
黄芩素	腐生葡萄球菌	黄芩素-7-O-葡萄糖苷	水-DMSO	26
柚皮素	腐生葡萄球菌	柚皮素-7-O-葡萄糖苷	水-DMSO	26
染料木素	腐生葡萄球菌	染料木素-7-O-葡萄糖苷	水-DMSO	26
酪醇	β-葡萄糖苷酶	红景天苷	水-乙腈	38
单萜柠檬烯	创伤弧菌	倍半萜、二萜等萜类化合物	水-DMSO	39
阿魏酸	苦瓜过氧化物酶	阿魏酸脱氢多聚体	水-丙酮	40
香叶醇	Baker's 酵母	香茅醇	水-正己烷	41
儿茶素	葡萄糖基转移酶	儿茶素葡萄糖苷	水-双(2-甲氧基乙基)醚	42

在中药废弃物及有效成分高效转化领域推广应用的主要因素，大量的耐有机溶剂极端微生物及耐有机溶剂酶类的发现将扩大反应底物的范围，提高催化反应的选择性，并极大程度地提高反应效率与实际运用价值。与传统方式相比较，应用耐有机溶剂酶或微生物进行中药废弃物的非水相生物转化有以下几个优点：(1) 提高非极性底物的溶解度；(2) 废弃物中资源性成分的转化条件可人为控制，极大提高了转化效率；(3) 转化体系不易染杂菌，可严格控制转化产物质量；(4) 若废弃物中资源性成分或产物易溶于有机相，可采用双相体系达到转化与分

离耦合的目的；(5) 通过溶剂体系调节进行资源性成分的定向转化或修饰，以获得更具药用价值的资源性物质。

中药资源化研究策略与非水相酶生物转化技术相结合，将极大地提高中药废弃物转化增效资源化模式的利用效率，高效地将中药废弃物转化为利用价值较高的资源性物质，以提高产品附加值，充分挖掘出中药废弃物的资源化潜力。同时，中药废弃物的非水相生物转化也将有效地解决长期制约中药资源产业健康发展的瓶颈问题，并在中药资源循环利用与开发领域取得重要的进步。

参考文献

- [1] 段金廛, 周荣汉, 宿树兰, 等. 我国中药资源科学发展现状及展望 [J]. 自然资源学报, 2009, 24(3): 378-396.
- [2] 段金廛, 吴启南, 宿树兰, 等. 中药资源化学学科的建立与发展 [J]. 中草药, 2012, 43(9): 1665-1671.
- [3] 段金廛, 宿树兰, 吕洁丽, 等. 药材产地加工传统经验与现代科学认知 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3151-3157.
- [4] 段金廛, 宿树兰, 郭盛, 等. 中药资源产业化过程废弃物的产生及其利用策略与资源化模式 [J]. 中草药, 2013, 44(20): 2787-2797.
- [5] Zaks A, Klivanov A M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents [J]. *Biol Chem*, 1988, 263(7): 3194-3201.
- [6] 宋欣. 微生物酶转化技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [7] Wang Y Y, Yu B Y, Li X, *et al.* Biotransformation of rutin by streptomyces griseus and antioxidation of Metabolites [J]. *Chin J Nat Med*, 2006, 14(1): 66-70.
- [8] Li D, Pake J H, Pake J T, *et al.* Biotechnological production of highly soluble daidzein glycosides using *Thermotoga maritima* Maltosyltransferase [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(9): 2561-2567.
- [9] Suzuki Y, Doukyu N, Aono R. Lithocholic acid side-chain cleavage to produce 17-keto or 22-aldehyde steroids by *Pseudomonas putida* strain ST-491 grown in the presence of an organic solvent, diphenyl ether [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(11): 2182-2188.
- [10] Gao L, Xu J H, Li X J, *et al.* Optimization of *Serratia marcescens* lipase production for enantioselective hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester [J]. *J Ind Microbial Biotechnol*, 2004, 31(11): 525-530.
- [11] Zhao L L, Xu J H, Zhao J, *et al.* Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010 [J]. *Process Biochem*, 2008, 43(6): 626-633.
- [12] Schmid A, Dordick S J, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow [J]. *Nature*, 2001, 409(6187): 258-268.
- [13] 娄文勇, 宗敏华, 范晓丹, 等. 水/有机溶剂双相中固定化啤酒酵母细胞催化有机硅酮不对称还原 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(2): 297-301.
- [14] Klivanov A M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water [J]. *Trends Biotech*, 1997, 15(3): 97-101.
- [15] Halling P. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media [J]. *Phil Trans Roy Soc London B*, 2004, 359(1448): 1287-1297.
- [16] Klivanov A M. Improving enzymes by using them in organic solvents [J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 241-245.
- [17] Ogino H, Ishikawa H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents [J]. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91(2): 109-116.
- [18] Mitchinson C, Wells J A. Protein engineering of disulfide bonds in subtilisin BPN' [J]. *Biochemistry-USA*, 1989, 28(11): 4807-4815.
- [19] Trivedi N, Gupta V, Kumar M, *et al.* Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase [J]. *Chemosphere*, 2011, 83(5): 706-712.
- [20] Doukyu N, Kobayashi H, Nakajima H, *et al.* Control with organic solvents of efficiency of persolvent cholesterol fermentation by *Pseudomonas* sp. strain ST-200 [J]. *Bioc Biotechnol Biochem*, 1996, 60(10): 1612-1616.
- [21] Doukyu N, Aono R. Purification of Extracellular cholesterol oxidase with high activity in the presence of organic solvents from *Pseudomonas* sp. strain ST-200 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(5): 1929-1932.
- [22] Raja N, Shalihah M, Abu B, *et al.* A new organic solvent tolerant protease from *Bacillus pumilus* 115b [J]. *J Ind Microbial Biotechnol*, 2007, 34(7): 507-517.
- [23] Marcus S, Susanne F. EstA from arthrobacter nitroguajacolicus rü61a, a thermo-and solvent-tolerant carboxylesterase related to class C β -lactamases [J]. *Curr Microbiol*, 2007, 54(3): 230-236.
- [24] Ogino H, Yamada M, Watanabe F, *et al.* Peptide synthesis catalyzed by organic solvent-stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in monophasic aqueous-organic solvent systems [J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 88(5): 513-518.
- [25] Yasuhiko T, Rikizo A, Noriyuki D. Purification, characterization, and molecular cloning of organic-solvent-tolerant cholesterol esterase from cyclohexane-tolerant *Burkholderia cepacia* strain ST-200 [J]. *Extremophiles*, 2006, 10(4): 269-277.
- [26] Chu J L, Wu X M, Li B, *et al.* Efficient glucosylation of flavonoids by organic solvent-tolerant *Staphylococcus saprophyticus* CQ16 in aqueous hydrophilic media [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2014, 99: 8-13.
- [27] Rahman R, Chin J, Salleh A, *et al.* Cloning and expression of a novel lipase gene from *Bacillus sphaericus* 205y [J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269(2): 252-260.
- [28] Yuxin W, Rafael V, Michael A, *et al.* Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258 [J].

- Curr Microbiol*, 2002, 45(2): 77-87.
- [29] Wang P Y, Tsai S W. Hydrolytic resolution of (*R*, *S*)-ethyl mandelate in biphasic media via *Klebsiella oxytoca* hydrolase [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2005, 37(2): 266-271.
- [30] Diego M, Rosana E. Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34(2): 111-115.
- [31] Sareen R, Bornscheuer U T, Mishra P. Synthesis of kyotorphin precursor by an organic solvent-stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37 [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2004, 32(1/2): 1-5.
- [32] 段金殿. 中药废弃物的资源化利用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2013.
- [33] Wu X M, Chu J L, Wu B, *et al.* An efficient novel glycosylation of flavonoid by β -fructosidase resistant to hydrophilic organic solvents [J]. *Bioresource Technol*, 2013, 129: 659-662.
- [34] Liu P, Zheng Y A, Wang Y S, *et al.* Bioconversion of flavonoidal glycosides in the leaves of *hippophae rhamnoides* into aglycones [J]. *J Chem Eng Chin Univ*, 2006, 6(20): 998-1002.
- [35] Li D, Pake J H, Pake J T, *et al.* Biotechnological production of highly soluble daidzein glycosides using *Thermotoga maritima* maltosyltransferase [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(9): 2561-2567.
- [36] 吴薛明, 许婷婷, 潘 扬, 等. 葛根素糖苷生物合成及对乳腺癌细胞增殖抑制的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2013, 29(6): 558-560.
- [37] Wu X M, Chu J L, Liang J Y, *et al.* Efficient enzymatic synthesis of mangiferin glycosides in hydrophilic organic solvents [J]. *RSC Adv*, 2013, 41(3): 19027-19032.
- [38] 王梦亮, 张瑞芳, 任振兴. 非水相介质中 β -葡萄糖苷酶催化合成红景天甙的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(6): 1072-1074.
- [39] 蓝文健, 李厚金, 蔡创华, 等. 海洋细菌 *Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio vulnificus* 对单萜柠檬烯的生物转化产物分析 [J]. 中山大学学报, 2006, 45(3): 126-128.
- [40] Liu H L, Kong L Y. Isolation and identification of ferulic acid dehydrotrimers and dehydrodimers catalysed by *momordica charantia* peroxidase [J]. *Chin J Nat Med*, 2006, 4(2): 146-150.
- [41] 詹 喜, 王庆利, 邹慧熙, 等. 有机溶剂中固定化酵母细胞催化香叶醇还原生物转化的研究 [J]. 浙江大学学报, 2006, 32(4): 391-395.
- [42] Meulenbeld G H, Hartmans S. Transglucosylation by *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: acceptor specificity and engineering of reaction conditions [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70(4): 363-369.