

天然低共熔溶剂促进纤维素酶水解橄榄苦苷的研究

王明明^{1,2}, 陈根振^{1,2}, 胡锦涛^{2,3},
曾韦丹⁴, 王 晗^{2,3}, 裴 栋^{2,3}, 曲清莉^{2,3}, 邸多隆^{1,2,3*}¹甘肃中医药大学药学院; ²中国科学院兰州化学物理研究所

中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室和甘肃省天然药物重点实验室, 兰州 730000;

³青岛市资源化学与新材料研究中心, 青岛 266000; ⁴云南油橄榄大健康产业创新研究发展有限公司, 丽江 674100

摘要: 橄榄苦苷酶水解产物具有良好的生物活性, 为了促进纤维素酶水解橄榄苦苷, 本研究通过天然低共熔溶剂 (natural deep eutectic solvent, NADES) 对纤维素酶稳定性的促进作用, 形成 NADES-纤维素酶溶剂系统促进橄榄苦苷的酶水解。以橄榄苦苷酶水解率为指标, 考察温度、pH 和 DES 种类及浓度对纤维素酶水解橄榄苦苷的影响。结果表明: 在 50 °C, pH=5 时水解 3 h, 以 10% (V/V) DES-5 (甜菜碱: 1,4-丁二醇 = 1:2, n/n) 为溶剂系统的橄榄苦苷酶水解率是缓冲液的 1.7 倍; 证明以氯化胆碱或甜菜碱为氢键受体 (hydrogen bond acceptor, HBA), 多元醇为氢键供体 (hydrogen bond donor, HBD) 的 NADES 对增强纤维素酶稳定性、促进橄榄苦苷酶水解具有良好的效果, 为高效制备橄榄苦苷酶水解产物提供了科学依据。

关键词: 低共熔溶剂; 橄榄苦苷; 纤维素酶; 酶水解

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2024) 2-0314-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.2.014

Study on the promoting effect of natural deep eutectic solvent on cellulase hydrolysis of oleuropein

WANG Ming-ming^{1,2}, CHEN Gen-zhen^{1,2}, HU Jin-xia^{2,3},
ZENG Wei-dan⁴, WANG Han^{2,3}, PEI Dong^{2,3}, QU Qing-li^{2,3}, DI Duo-long^{1,2,3*}

¹College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine; ²CAS Key Laboratory of Chemistry of Northwestern Plant Resources and Key Laboratory for Natural Medicine of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; ³Qingdao Center of Resource Chemistry and New Materials, Qingdao 266000, China; ⁴Yunnan Olive Health Industry Innovation Research and Development Co., Ltd., Lijiang 674100, China

Abstract: Oleuropein hydrolyzed products exhibit potent biological activities. To enhance oleuropein hydrolysis by cellulase, a natural deep eutectic solvent (NADES) was utilized to stabilize the cellulase enzyme. The DES-cellulase solvent system effectively promoted enzymatic hydrolysis of oleuropein. Factors such as temperature, pH, DES type and concentration were studied to determine their impact on the hydrolysis rate. Results showed that at 50 °C and pH = 5, the hydrolysis rate of oleuropein was 1.7 times higher than that of buffer solution when using 10% (V/V) DES-5 (betaine: 1,4-butanediol = 1:2, n/n) as solvent for 3 h. This study confirms that NADESs with choline chloride or betaine as hydrogen bond acceptor (HBA) and polyols as hydrogen bond donor (HBD) effectively enhance cellulase stability and promote oleuropein hydrolysis. These findings provide a scientific basis for the efficiently producing oleuropein enzyme hydrolyzed products.

Key words: deep eutectic solvent; oleuropein; cellulase; enzymatic hydrolysis

收稿日期: 2023-04-06 接受日期: 2023-08-25

基金项目: 甘肃省科技重大专项 (22ZD6FA021); 兰州市科技计划 (2022-2-2); 甘肃省重点研发计划 (22YF7NA027); 云南省重点研发计划 (202203AD150012)

* 通信作者 Tel: 86-931-4968248; E-mail: didl@licp.cas.cn

油橄榄 (*Olea europaea* L.) 为木犀科木犀榄属植物,是地中海地区重要的油料作物^[1],甘肃、云南是我国油橄榄主要的种植地。油橄榄叶是油橄榄树种植过程中廉价的副产品。每年每棵油橄榄树大约需要修剪掉 25 kg 叶子,每年收获叶子的总重量占油橄榄总重量的 10%。油橄榄叶中含有多种生物活性化合物。如齐墩果酸、山楂酸、熊果酸、橄榄苦苷、羟基酪醇等^[2]。

研究表明,橄榄苦苷在油橄榄树中的所有部位中均有分布,其中油橄榄叶中橄榄苦苷的含量最高。在干燥的油橄榄叶中,橄榄苦苷的含量可以达到 10%~17%。如图 1 所示,橄榄苦苷水解后生成羟基酪醇、葡萄糖和橄榄烯酸^[3]。其中羟基酪醇表现出比橄榄苦苷更好的生物活性。目前橄榄苦苷的水解方法主要包括酸水解、碱水解和酶水解。酸水解和碱水解需要强酸强碱和高温环境,反应条件苛刻^[4]。近年来,以酶作为催化剂来实现副产物的生物转化受到了重视。与传统的酸碱水解方法相比,酶水解橄榄苦苷具有反应条件温和、环境污染少等优点^[5]。Liu 等^[3]通过纤维素酶作为食品添加剂断裂糖苷键,酶水解橄榄苦苷得到羟基酪醇。由于纤维素酶的热不稳定性^[6],在酶最适温度下无法持续保持高活性,导致酶水解效率低下。因此,尝试寻找一种新的绿色溶剂代替缓冲液,在提高橄榄苦苷溶

解度的基础上,增强纤维素酶在长时间反应中的稳定性,从而提高橄榄苦苷的酶水解效率。

低共熔溶剂 (deep eutectic solvent, DES) 是氢键受体 (hydrogen bond acceptor, HBA) 和氢键供体 (hydrogen bond donor, HBD) 经高温搅拌形成的均一透明的混合物,与单个组分相比具有更低的熔点^[7]。由于 DES 具有良好的物理化学性质,包括可燃性低、不易挥发、易制备、高溶解性和与酶的高度相容性,因此 DES 作为无毒提取剂和增溶剂的应用日益广泛^[8]。最重要的是,酶在有机溶剂中易失活^[9],DES 作为溶剂可以防止这一现象发生。这也使 DES 代替有机溶剂,孵育纤维素酶成为可能。由天然 HBA 和 HBD 组成的 DES 被称为 NADES,比常规 DES 更安全,更绿色。在酶催化反应领域 NADES 作为绿色溶剂受到了广泛关注^[10]。NADES 已成功应用于特定的酶促反应中,对酶的活性和稳定性均产生有利影响^[11]。上述研究结果证明,NADES 具有成为纤维素酶水解橄榄苦苷良好溶剂的可能。

本研究制备了以氯化胆碱或甜菜碱作为 HBA,不同种类的多元醇作为 HBD 的 6 种 NADES,考察对纤维素酶水解橄榄苦苷的影响。通过探究不同种类、不同浓度的 NADES 及其单体对酶水解速率的影响,构建一种高效、绿色的纤维素酶水解橄榄苦苷的新方法。

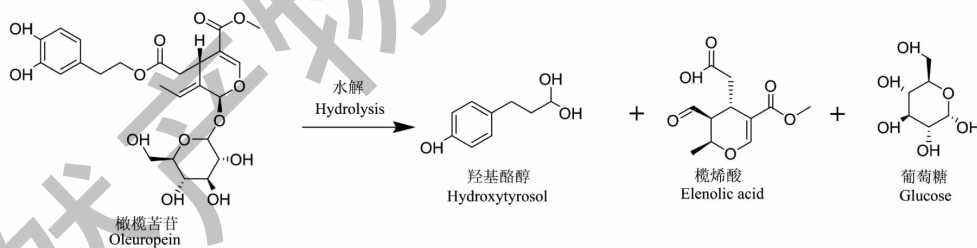


图 1 橄榄苦苷酶水解示意图

Fig. 1 The schematic diagram of oleuropein degradation by enzymatic hydrolysis

1 材料和方法

1.1 原料与试剂

干燥油橄榄叶、BMKX-4 大孔树脂和橄榄苦苷标标准品 (纯度 $\geq 98.89\%$, 批号: GSB 11-3936-2021) 均由中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室提供;纤维素酶 (李氏木霉, 酶活 10 000 U/g, 批号: C12894980)、氯化胆碱 (批号: C13490561)、甜菜碱 (批号: B802317) 和柠檬酸三钠盐 (批号: C14003149) (均为分析纯, 纯度 98%) (上海麦克林生化科技股份有限公司); 1, 4-丁二醇 (批号:

20201210, 纯度 $\geq 99.0\%$)、1, 2-丙二醇 (批号: 20130604, 纯度 $\geq 99.5\%$)、丙三醇 (批号: 20190815, 纯度 $\geq 99.0\%$)、乙二醇 (批号 20221207, 纯度 $\geq 99.5\%$) 和一水合柠檬酸 (批号: 20180706, 纯度 $\geq 99.8\%$) (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 北京迈瑞达科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 型高效液相色谱仪配 DAD 检测器 (安捷伦科技有限公司, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 橄榄苦苷提取物的制备

称取干燥油橄榄叶 200 g, 分别加入 12 倍量 (m/V) 和 10 倍量 (m/V) 60% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并提取液, 55 °C 减压回收乙醇至 2 L, 放冷过滤, 得提取液。将提取液流过 BMKX-4 树脂富集橄榄苦苷, 用 1:9 (V/V) 的正己烷: 乙酸乙酯为洗

脱液, 洗脱树脂柱。回收洗脱液, 干燥。得到干燥的橄榄苦苷提取物, 置于干燥器中保存。

1.3.2 低共熔溶剂的制备

将不同的 HBA 和 HBD 置于具塞锥形瓶中, 并在 80 °C 的条件下, 搅拌 2 h, 直至形成均匀透明液体。表 1 为本研究制备的不同类型 DES 的组分和摩尔比。表 2 为 HBA 和 HBD 的结构。

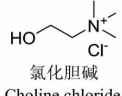
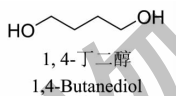
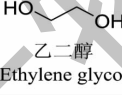
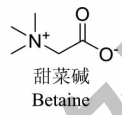
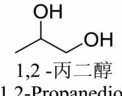
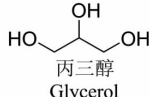
表 1 低共熔溶剂的组成

Table 1 Composition of deep eutectic solvents

DES 编号 DES Number	氢键受体 HBA	氢键供体 HBD	摩尔比 Mole ratio
DES-1	氯化胆碱 Choline chloride	1,4-丁二醇 1,4-Butanediol	1:2
DES-2	氯化胆碱 Choline chloride	乙二醇 Ethylene glycol	1:2
DES-3	氯化胆碱 Choline chloride	1,2-丙二醇 1,2-Propanediol	1:2
DES-4	氯化胆碱 Choline chloride	丙三醇 Glycerol	1:2
DES-5	甜菜碱 Betaine	1,4-丁二醇 1,4-Butanediol	1:2
DES-6	甜菜碱 Betaine	1,2-丙二醇 1,2-Propanediol	1:2

表 2 HBA 和 HBD 的结构

Table 2 Molecular structures of HBA and HBD

氢键受体 HBA	氢键供体 HBD
 <p>氯化胆碱 Choline chloride</p>	 <p>1,4-丁二醇 1,4-Butanediol</p>
	 <p>乙二醇 Ethylene glycol</p>
 <p>甜菜碱 Betaine</p>	 <p>1,2-丙二醇 1,2-Propanediol</p>
	 <p>丙三醇 Glycerol</p>

1.3.3 酶水解

考察温度、时间和 pH 对橄榄苦苷酶水解率的影响。酶水解实验在 100 mL 锥形瓶中进行, 水浴加热, 磁力搅拌转速为 150 r/min。橄榄苦苷提取物作为底物。将产物在 4 000 r/min 条件下离心 5 min, 去除不溶性残留物。HPLC 检测橄榄苦苷的浓度。

1.3.4 纤维素酶水解橄榄苦苷最适温度和 pH 的研究

取橄榄苦苷提取物 100 mg 和纤维素酶 10 mg

加入 40 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH = 5), 分别在温度为 40、45、50、55、60 °C 的水浴条件下, 反应 24 h。

取橄榄苦苷提取物 100 mg 和纤维素酶 10 mg 用 0.5 mol/L 的 HCl 和 0.2 mol/L 的 NaOH 调节柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的 pH。分别在 pH 为 3、4、5、6、7, 温度为 50 °C 的条件下, 反应 24 h。

1.3.5 不同种类 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响

取橄榄苦苷提取物 100 mg 和纤维素酶 7 mg 加入 36 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液与 4 mL 的 DES 形成 40 mL 的 10% DES-纤维素酶缓冲液系统。50 °C 水浴搅拌 36 h, 每 3 h 取样, HPLC 检测橄榄苦苷浓度。

1.3.6 不同浓度 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响

取橄榄苦苷提取物 100 mg 和纤维素酶 7 mg 加入不同比例的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 DES-1, 形成 10%、20%、30% 的 DES-纤维素酶缓冲液溶剂系统。50 °C 水浴搅拌 36 h, 每 3 h 取样, HPLC 检测橄榄苦苷浓度。

1.3.7 DES 单体对橄榄苦苷酶水解率的影响

取橄榄苦苷提取物 100 mg 和纤维素酶 7 mg 分别向纤维素酶缓冲液系统中加入相应量的 HBA 和 HBD。50 °C 水浴搅拌 36 h, 每 3 h 取样, HPLC 检测橄榄苦苷浓度。

1.3.8 橄榄苦苷的 HPLC 分析

采用 ZORBAX SB-Aq-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6

mm, 5 μm); 流动相为 0.3% 乙酸水溶液 (A) 和乙腈 (B); 梯度洗脱: 0 ~ 30 min, 14% \rightarrow 27%; 30 ~ 35 min, 27% \rightarrow 31% B。流速为 1 mL/min; 进样量为 20 μL ; 检测波长为 232 nm。

分别制备浓度为 0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.025 mg/mL 橄榄苦苷对照品, 进样量 20 μL , 每个样品重复进样三次, 取其峰面积平均值。如图 2 所示, 以标准溶液中橄榄苦苷的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得标准曲线方程为 $y = 49\ 371\ 370x + 41\ 083$, $R^2 = 0.999\ 4$ (y 为峰面积; x 为橄榄苦苷浓度, mg/mL)。

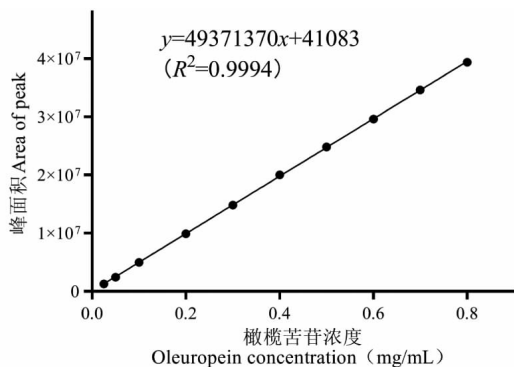


图 2 橄榄苦苷标准曲线

Fig. 2 Standard curve for oleuropein

1.3.9 橄榄苦苷酶水解率的计算

根据公式(1)计算橄榄苦苷的酶水解率。

$$R = [1 - (W/W_0)] \times 100\% \quad (1)$$

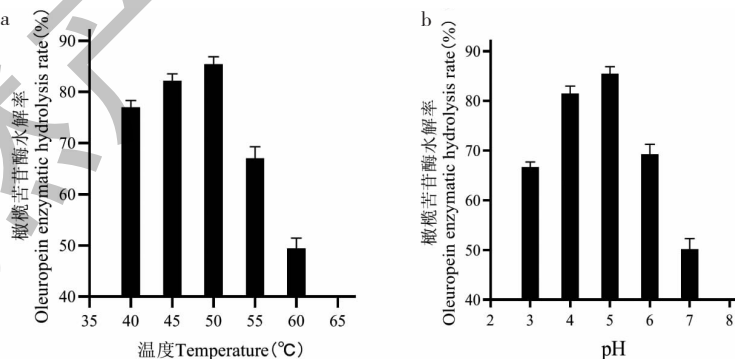


图 3 温度、pH 对橄榄苦苷酶水解率的影响

Fig. 3 Temperature and pH effects on oleuropein enzymatic hydrolysis rate

2.2 不同种类 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响

本研究筛选了 6 种以氯化胆碱或甜菜碱为 HBA, 不同多元醇为 HBD 组成的 NADES (10%, V/V) 对纤维素酶水解橄榄苦苷速率的影响进行了研究。图 4、图 5 分别表示在缓冲液和 10% DES-1 为

式中, R 为橄榄苦苷酶水解率; W_1 为水解后橄榄苦苷的质量 (mg); W_0 为水解前橄榄苦苷的质量 (mg)。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶水解橄榄苦苷最适温度与 pH 的考察

反应温度是影响纤维素酶活性、反应速率以及橄榄苦苷及其产物溶解度的重要因素, 图 3a 显示了反应温度对橄榄苦苷酶水解率的影响。随着温度从 40 $^{\circ}\text{C}$ 升高到 50 $^{\circ}\text{C}$, 橄榄苦苷的酶水解率从 77.48% 升高到 84.54%。温度的升高有利于橄榄苦苷溶解度的增加, 也加快了底物与纤维素酶之间的传质速度, 促进了橄榄苦苷的酶水解。温度高于 50 $^{\circ}\text{C}$ 时, 橄榄苦苷酶水解率急剧下降, 这是由于过高的温度, 会导致纤维素酶失活^[12], 因此 50 $^{\circ}\text{C}$ 是纤维素酶水解橄榄苦苷最适温度。

pH 对橄榄苦苷酶水解率的影响如图 3b 所示, pH 是影响酶活性的关键因素, pH 由 3 增加到 5 时, 橄榄苦苷酶水解率从 67.42% 迅速增加到 84.54%。当 pH 高于 5 时, 橄榄苦苷的酶水解率急剧下降。这是由于纤维素酶是一种弱酸性的酶, 并且 pH 的任何变化都可能改变蛋白质中氨基酸的电离态。因此, 酶的形态甚至底物的电荷性质都会受到 pH 的影响, 从而影响底物与酶的结合, 最终影响反应速率^[13]。当 pH 为中性或者弱碱性时, 纤维素酶很容易失活。因此纤维素酶水解橄榄苦苷的最适 pH 为 5。

溶剂系统下橄榄苦苷酶水解前后的 HPLC 色谱图 (温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, pH = 5), 色谱图右侧为对应的水解时间。色谱图中 1 号峰为羟基酪醇, 2 号峰为橄榄苦苷。由图 6 可以看出, 本研究筛选的 6 种 NADES 对纤维素酶水解橄榄苦苷都具有一定的促进作用。

由图 6 可以看出,多元醇为氢键供体的 DES 对橄榄苦苷的酶水解都具有一定的促进作用,但不同的 DES 之间对橄榄苦苷酶水解速率也存在着差异。如图 7 所示,在水解 3 h 时,多数 DES 对橄榄苦苷酶水解速率影响很小。通过显著性分析发现,DES-1、2、6 相比于缓冲液系统,并没有显著性($P > 0.05$);而 DES-3、4、5 为极显著($P < 0.01$)。且 DES-5 在水解 3 h 后,其对橄榄苦苷酶水解率是缓冲液的 1.7 倍,其橄榄苦苷酶水解率远高于其他 DES 和缓冲液;在水解 18 h 后,由氯化胆碱和丙三醇组成的 DES 表现出最好的酶解效果,这可能是由于 DES-4 能更好增

加纤维素酶的稳定性,使其长时间保持良好活性。

多元醇作为氢键供体在生物催化方面的应用有许多报道,其在提高多种酶的活性和稳定性方面表现出广泛的适应性。Jeng 等^[14]研究表明,基于氯化胆碱和丙三醇组成的 DES 延长了脂肪酶的半衰期,增加了脂肪酶在 40 °C 时的稳定性,在最佳的 HBA/HBD 比例下使得脂肪酶的半衰期增加了 9.2 倍。基于甜菜碱和木糖醇组成的 25% NADES (V/V) 提高了漆酶的热稳定性,使其在 70 °C 的条件下,仍然保持较高的活性^[15]。据报道,多元醇可以稳定蛋白质三级结构,从而提高酶的稳定性^[16]。为了更好地

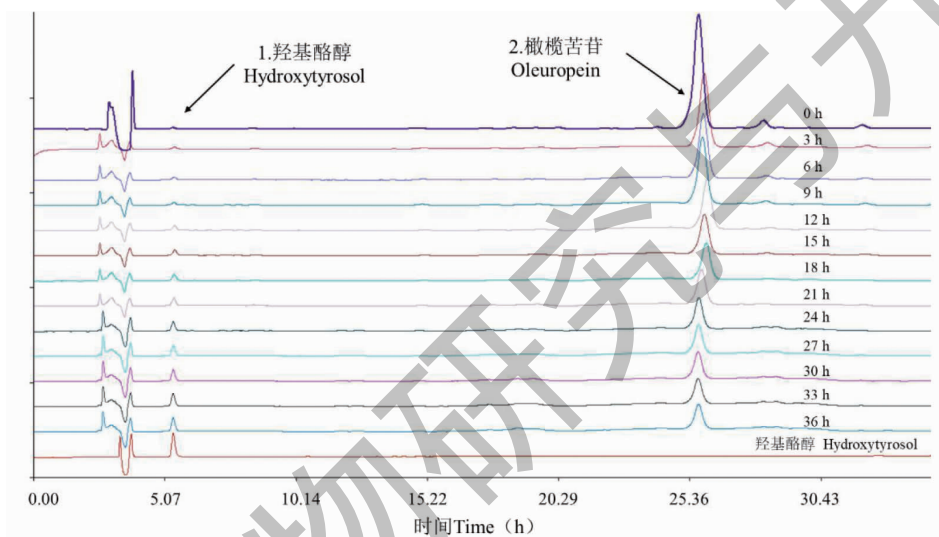


图 4 橄榄苦苷在缓冲液中不同酶水解时间的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of oleuropein with different enzymatic hydrolysis time in buffer solution

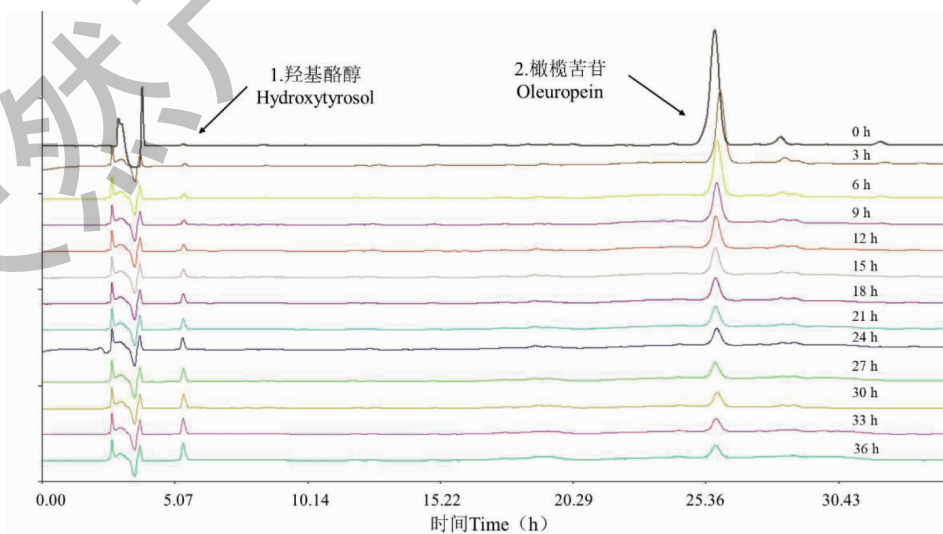


图 5 橄榄苦苷在 10% DES-1 中不同酶水解时间的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of oleuropein with different enzymatic hydrolysis time in 10% DES-1

了解多元醇在分子水平上对酶活性和稳定性的影响,Varriale 等^[15]采用分子对接模拟了多元醇与漆酶的活性位点间的相互作用。结果表明,多元醇的羟基与漆酶活性氨基酸形成氢键相互作用,这些氢键相互作用是促进漆酶活性及其稳定性的重要因素。Sanchez 等^[17]通过分子动力学模拟也证明了丙三醇为 HBD 的 DES 对 α -胰凝乳蛋白酶和溶菌酶均

能提高其稳定性,并且由氯化胆碱和丙三醇组成的 DES 可以阻碍蛋白质结构的波动。在长时间水解后(36 h),DES-5 具有最好的橄榄苦苷酶水解效率,这表明基于甜菜碱与 1,4-丁二醇组成的 DES 能长时间保持纤维素酶的稳定性,促进了橄榄苦苷的酶水解效率^[18]。

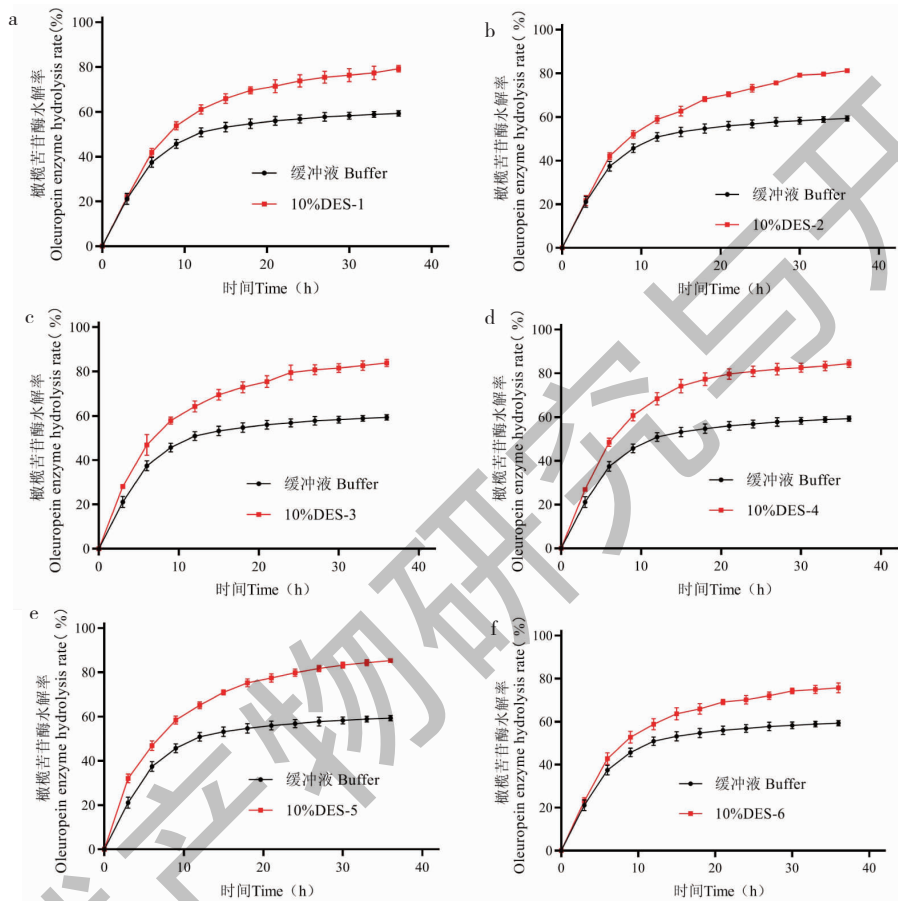


图6 缓冲液与不同种类 DES 橄榄苦苷酶水解率曲线

Fig. 6 Oleuropein enzymes hydrolysis rate curves of buffer solutions with various DES

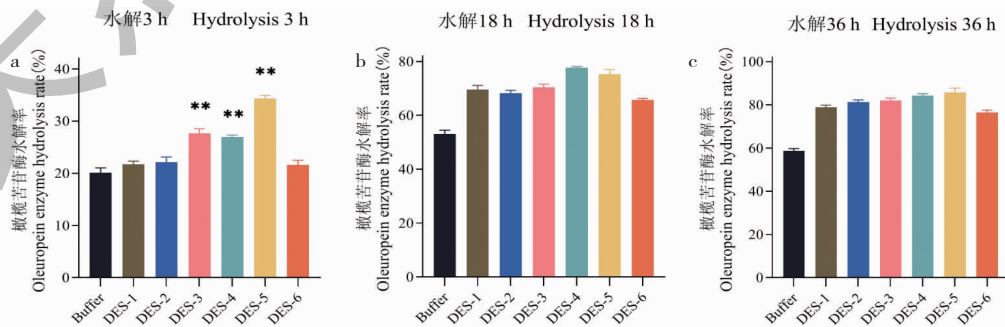


图7 不同种类 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响

Fig. 7 Effects of different kinds of DES on oleuropein enzymes hydrolysis rate

注:与缓冲液组比较, ** $P < 0.01$. Note: Compared with buffer, ** $P < 0.01$.

2.3 不同浓度的 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响

DES 的高粘度是 DES 作为溶剂十分重要的物理性质,因为高粘度会影响催化转化过程中酶与底物之间的传质^[19]。大多数 DES 的粘度较高,通常向 DES 中加入水来克服这一问题^[20]。寻找合适的 DES 浓度对酶促反应极为重要。因此,我们讨论了不同浓度的 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响。

由图 8 可知,20% 和 30% DES-1 的酶水解率低于缓冲液,而 10% DES-1 的酶水解率高于缓冲液。这说明 20% 和 30% 的 DES-1 对酶水解反应具有一定的抑制作用。而 10% 的 DES-1 对酶水解反应具有一定的促进作用。这可能是因为水含量的增高,降低了 DES-1 的粘度,增加了纤维素酶与橄榄苦苷提取物之间的传质作用^[21]。

在含有酶、水和非水溶剂的溶剂系统中,混合物

中水分子将分布在酶的表面而形成酶的结合水,或分布在溶剂相中成为自由水^[22]。而这两个区域的水分子在酶的表面时刻进行着水分子的交换。为了维持酶的活性,就需要满足存在一定量的结合水来维持酶的活性^[23]。当 DES 浓度过大时,一方面,高浓度 DES 会在酶表面形成氢键网络,阻碍底物与酶的中心位点结合^[24];另一方面,高浓度 DES 会与酶竞争结合水,使维持酶活性的结合水减少,降低酶的活性^[25]。

由图 8 可以看出,在 10% DES-1 溶剂系统下,随着时间的推移其促进酶水解的效果更加显著。这也表示,随着反应时间的延长,缓冲液中纤维素酶的活力下降速率远快于 10% DES-1 中的下降速率。因此,10% DES-1 能促进纤维素酶水解橄榄苦苷的原因之一是低浓度的 DES 可以促进纤维素酶的稳定性^[18]。

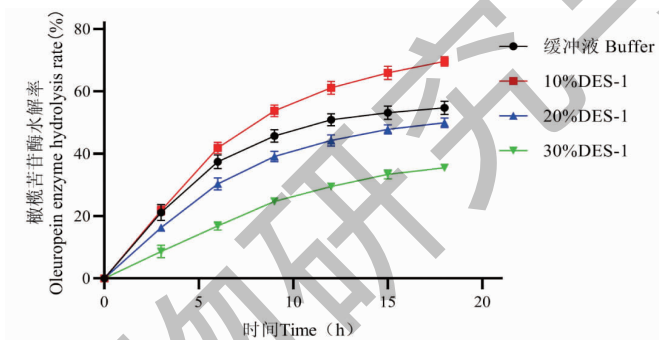


图 8 不同浓度 DES 对橄榄苦苷酶水解率的影响

Fig. 8 Effect of DES concentration on oleuropein enzymatic hydrolysis rate

2.4 DES 单组分对橄榄苦苷酶水解率的影响

过量的水会导致 HBA 与 HBD 之间强的氢键作用逐渐衰弱,最终 DES 组分之间的氢键相互作用完全消失^[26]。Varriale 等^[15]通过计算不同浓度下 DES 组分之间的吉布斯自由能,证明了 10% ~ 20% (V/V)DES 在缓冲液中其 HBA 和 HBD 是以分离的

形式存在的。然而,也有许多报道证明了 10% ~ 20% (V/V)DES 相比于其单个组分更有利于维持缓冲液中对酶的稳定性^[17]。为了研究 NADES 和纤维素酶之间的相互作用,本研究通过 DES-1 讨论了单个组分对酶水解率的影响。由图 9 可以看出,DES 单组分在缓冲液中对酶水解率有一定的提升,

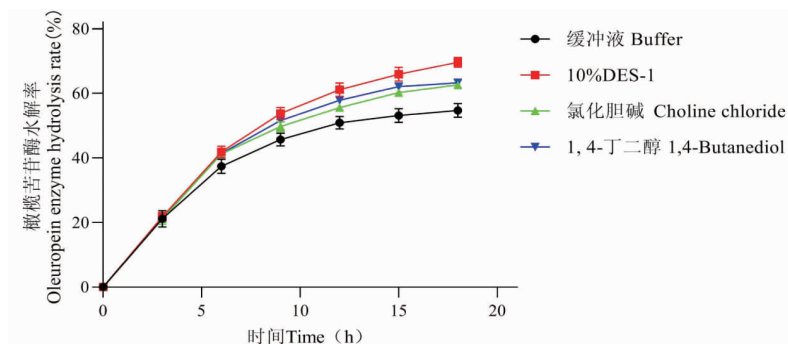


图 9 DES 单组分对橄榄苦苷酶水解率的影响

Fig. 9 Effect of DES components on oleuropein enzymatic hydrolysis rate

但是只有在 10% DES-1 的情况下,酶水解效率获得了最高的增益。因此,这也证明了 DES 中的 HBA 和 HBD 对促进酶水解率不是单个组分的单独作用,而是 HBA 和 HBD 之间的联合作用来促进酶水解率。

3 结论

本研究通过在缓冲液中加入不同种类和浓度的 NADES,研究 NADES 对橄榄苦苷酶水解率的影响。结果发现选择合适的种类和浓度的 NADES,可以增加纤维素酶的稳定性,促进橄榄苦苷酶水解。在温度为 50 ℃, pH = 5 的条件下水解 3 h, 10% DES-5 (V/V) 为溶剂系统的橄榄苦苷酶水解率是缓冲液的 1.7 倍;水解 36 h 的酶水解率是缓冲液的 1.5 倍;该方法在酶水解条件温和、高效和环保等优点的基础上,使纤维素酶长时间高效水解橄榄苦苷成为可能。本研究以氯化胆碱或甜菜碱为 HBA,多元醇为 HBD 的 NADES 对增强纤维素酶稳定性,促进橄榄苦苷酶水解具有良好的效果,为高效制备橄榄苦苷酶水解产物提供科学依据。

参考文献

- 1 Abaza L, Taamalli A, Nsir H, et al. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: importance and advances in the analysis of phenolic compounds [J]. *Antioxidants*, 2015, 4: 682-698.
- 2 Taamalli A, Arráziz-Román D, Barrajón-Catalán E, et al. Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 1817-1825.
- 3 Liu M, Yong Q, Yu S. Efficient bioconversion of oleuropein from olive leaf extract to antioxidant hydroxytyrosol by enzymatic hydrolysis and high-temperature degradation [J]. *Biotechnol Appl Bioc*, 2018, 65: 680-689.
- 4 Briante R, La Cara F, Tonziello MP, et al. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic β -glycosidase [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 3198-3203.
- 5 Chatzikonstantinou AV, Gkantzou E, Thomou E, et al. Enzymatic conversion of oleuropein to hydroxytyrosol using immobilized β -glucosidase on porous carbon cuboids [J]. *Nanomaterials*, 2019, 9: 1166.
- 6 Saragai S, Kudo S, Sperry J, et al. Catalytic deep eutectic solvent for levoglucosenone production by pyrolysis of cellulose [J]. *Bioresource Technol*, 2022, 344: 126323.
- 7 Atilhan M, Aparicio S. Review and perspectives for effective

- solutions to grand challenges of energy and fuels technologies via novel deep eutectic solvents [J]. *Energy Fuels*, 2021, 35: 6402-6419.
- 8 Huang L, Domínguez de Marfá P, Kara S. The 'water challenge': opportunities and challenges of using oxidoreductases in non-conventional media [J]. *Chim Oggi-Chem Today*, 2018, 36: 48-56.
- 9 Yang Z. Natural deep eutectic solvents and their applications in biotechnology [J]. *Adv Biochem Eng Biot*, 2019, 168: 31-59.
- 10 Huang H, Ge B, Sun C, et al. Membrane curvature affects the stability and folding kinetics of bacteriorhodopsin [J]. *Process Biochem*, 2019, 76: 111-117.
- 11 Moghimi M, Roosta A. Physical properties of aqueous mixtures of (choline chloride + glucose) deep eutectic solvents [J]. *J Chem Thermodyn*, 2019, 129: 159-165.
- 12 Bubalo MC, Tušek AJ, Vinković M, et al. Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate [J]. *J Mol Catal B-Enzym*, 2015, 122: 188-198.
- 13 Bilgin R, Yalcin MS, Yildirim D. Optimization of covalent immobilization of *Trichoderma reesei* cellulase onto modified ReliZyme HA403 and Sepabeads EC-EP supports for cellulose hydrolysis, in buffer and ionic liquids/buffer media [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2016, 44: 1276-1284.
- 14 Jeng WY, Wang NC, Lin MH, et al. Structural and functional analysis of three β -glucosidases from bacterium *Clostridium cellulovorans*, fungus *Trichoderma reesei* and termite *Neotermes kosshunensis* [J]. *J Struct Biol*, 2011, 173: 46-56.
- 15 Varriale S, Delorme AE, Andanson JM, et al. Enhancing the thermostability of engineered laccases in aqueous betaine-based natural deep eutectic solvents [J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2021, 10: 572-581.
- 16 Payne CM, Knott BC, Mayes HB, et al. Fungal cellulases [J]. *Chem Rev*, 2015, 115: 1308-1448.
- 17 Sanchez-Fernandez A, Basic M, Xiang J, et al. Hydration in deep eutectic solvents induces non-monotonic changes in the conformation and stability of proteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 23657-23667.
- 18 Yao J, Li C, Xiao L, et al. Influence of natural deep eutectic solvents on stability and structure of cellulase [J]. *J Mol Liq*, 2022, 346: 118238.
- 19 Khandelwal S, Tailor YK, Kumar M. Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations [J]. *J Mol Liq*, 2016, 215: 345-386.