



UNIWERSYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU

Jakub Hoppe

Rozprawa doktorska

**MIESZANINY EUTEKTYCZNE ZAWIERAJĄCE
SOLE CHOLINY JAKO MODYFIKATORY
ŚRODOWISKA ENZYMATYCZNYCH REAKCJI
HYDROLIZY**

**Eutectic mixtures containing choline salts
as modifiers of the environment for
enzymatic hydrolysis reactions**

Promotor: dr hab. inż. Marcin Śmiglak

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Radosław Drozd

Zakład Chemii i Technologii Związków Krzemu

Wydział Chemii UAM

Poznań 2024



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Badania zawarte w pracy doktorskiej były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektów:

- 1.** Nietoksyczne mieszaniny eutektyczne jako alternatywne środowisko dla reakcji z udziałem enzymów i mikroorganizmów
(OPUS 2015/19/B/NZ9/03711)

Podziękowania

Panu dr hab. inż. Marcinowi Śmigłakowi

Za opiekę merytoryczną, za cenne uwagi i sugestie, za zaangażowanie, dzięki któremu możliwe było napisanie tej pracy.

Panu dr hab. inż. Radosławowi Drozdowi

Za nieustanne wsparcie, wiarę i zaufanie, za wyjątkowe możliwości rozwoju i cierpliwość.

Dr Patrykowi Bieleckiemu, dr Magdalenie Szymańskiej oraz dr Ewie Byzia

Za współpracę nad badaniami.

Dr Andrei Szpecht, dr Adrianowi Zajączowi, dr Rafałowi Kukawce oraz Dawidowi Zielińskiemu

Jak również całemu Zespołowi Syntez Materiałowych oraz Inkubatora Technologii Chemicznych Poznańskiego Parku Naukowo-Technologicznego za stworzenie niesamowitych warunków i atmosfery pracy.

Żonie

Za nieustającą wiarę w moje możliwości, wsparcie i wszystkie wyrzeczenia, jakie po drodze do tego momentu poniosła.

DZIĘKUJĘ

Spis treści

Spis treści.....	7
Wykaz skrótów.....	8
Streszczenie w języku polskim.....	9
Streszczenie w języku angielskim.....	10
Ankieta dorobku naukowego.....	11
I. Wprowadzenie.....	16
I.1 Biokataliza z udziałem enzymów.....	24
II Cel pracy.....	31
III Omówienie wyników badań.....	31
III.1 Selekcja oraz preparatyka wybranych soli choliny oraz ich mieszanin.....	35
III.2 Gęstość.....	45
III.3 Lepkość.....	49
III.4 Przewodnictwo.....	54
III.5 Stabilność termiczna soli choliny i ich mieszanin.....	56
III.6 Przemiany fazowe soli choliny i ich mieszanin.....	59
III.7 Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR).....	61
III.8 Hydroliza enzymatyczna.....	63
III.8.1 Stabilność wybranych enzymów z grupy hydrolaz.....	69
IV Wnioski.....	81
Literatura.....	85
V. Kopie cyklu publikacji.....	102
VI. Oświadczenia współautorów.....	150

Wykaz skrótów

Ch[Cl] - Chlorek choliny

Ch[Lac] - Mleczan choliny

Ch[OAc] - Octan choliny

Ch[Lev] - Lewulinian choliny

U – mocznik

GLY – glycerol

ETH GLY – glikol etylenowy

DES - Deep Eutectic Solvents

IL - Ionic Liquids

HBD - Hydrogen Bond Donor

HBA - Hydrogen Bond Acceptor

T_m - Temperatura topnienia

T_{eut} - Temperatura topnienia w punkcie eutektycznym

PBS - Phosphate-Buffered Saline

LTTM - Low-Transition-Temperature Mixtures

EC - Electrochemical

BMIM⁺ - 1-Butyl-3-methylimidazolium

EMIM⁺ - 1-Ethyl-3-methylimidazolium

NMR - Nuclear Magnetic Resonance – spektroskopia NMR

RCSB - Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

DMSO - Dimethyl sulfoxide

DMF – Dimethylformamid

ONPG - O-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd

ATP - Adenosine Triphosphate

ADP - Adenosine Diphosphate

CALB - Candida antarctica Lipase B

Streszczenie w języku polskim

Mieszaniny eutektyczne chlorku choliny typu DES oraz LTTM z roku na rok stają się coraz bardziej atrakcyjną grupą związków chemicznych. Wynika to z faktu ich unikalnych właściwości, takich jak niska prężność par, niepalność czy wysoka stabilność termiczna. Dodatkowo, fakt, że można je łatwo przygotować, bez udziału reakcji chemicznej sensu stricto, oraz stosunkowo łatwo modyfikować ich właściwości fizykochemiczne (np. wymieniając związek HBD, dodając odpowiednią ilość wody), sprawia, iż stają się poważną konkurencją zarówno dla cieczy jonowych, jak i tradycyjnych rozpuszczalników organicznych. Zastąpienie anionu chlorkowego anionami organicznymi nadaje tym związkom nowy wymiar, mianowicie pozwala modyfikować siłę wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie. Efektem są znaczne zmiany we właściwościach fizykochemicznych, co wraz z szeroką gamą dostępnych związków typu HBD powoduje, iż mieszaniny soli choliny znajdują zastosowanie w praktycznie każdej gałęzi chemii. Na szczególne wyróżnienie zasługuje jednak biokataliza prowadzona w środowisku lub przy udziale mieszanin soli choliny, która stwarza coraz większe możliwości przemian z udziałem enzymów, nieosiągalnych obecnie w tradycyjnych rozpuszczalnikach organicznych bądź cieczach jonowych.

Hipoteza proponowanych badań zakłada, że mieszaniny eutektyczne zawierające sole choliny mogą znacząco wpływać na efektywność i specyficzność enzymatycznych reakcji hydrolizy. Hipoteza ta opiera się na założeniu, że sole choliny mogą tworzyć unikalne środowiska, które wpływają na strukturę i funkcję enzymów, a tym samym na przebieg reakcji hydrolizy. W szczególności, sole choliny mogą wpływać na stabilność enzymów, ich aktywność katalityczną oraz selektywność wobec substratów. Dodatkowo, hipoteza ta sugeruje, że w zależności od anionu obecnego w soli choliny można zaobserwować różny wpływ na enzymatyczne reakcje hydrolizy, co otwiera możliwość optymalizacji tych reakcji poprzez dobór odpowiedniej soli choliny. Hipoteza proponowanych badań zakłada, że zróżnicowany skład mieszanin eutektycznych może mieć wpływ na parametry operacyjne badanych enzymów, a oddziaływania pomiędzy mieszaninami soli choliny a strukturą enzymu mogą dostarczyć podstawowej wiedzy na temat użyteczności mieszanin soli choliny w enzymatycznych reakcjach hydrolizy z udziałem enzymów z grupy hydrolaz. Wszystkie wykorzystane wyniki badań zostały przedstawione w cyklu trzech publikacji [P1] – [P3].

Streszczenie w języku angielskim

Eutectic mixtures of choline chloride, classified as DES and LTTM, are becoming increasingly attractive year by year as a group of chemical compounds. This is due to their unique properties, such as low vapor pressure, non-flammability, and high thermal stability. Additionally, the fact that they can be easily prepared without the involvement of chemical reactions in the strict sense, and their physicochemical properties can be easily modified (e.g., by replacing the HBD compound, adding an amount of water), makes them serious competitors to both ionic liquids and traditional organic solvents. Replacing the chloride anion with organic anions gives these compounds a new dimension, namely allowing the modification of the strength of hydrogen bonds present in the mixture. The result is significant changes in physicochemical properties, which, along with the wide range of available HBD-type compounds, means that choline salt mixtures find applications in every branch of chemistry. However, special mention should be made of biocatalysis conducted in the environment or with the participation of choline salt mixtures, which creates increasing possibilities for enzyme-catalyzed transformations that are currently unattainable in traditional organic solvents or ionic liquids.

The hypothesis of the proposed research assumes that eutectic mixtures containing choline salts can significantly influence the efficiency and specificity of enzymatic hydrolysis reactions. This hypothesis assumes that choline salts can create unique microenvironments that affect the structure and function of enzymes, and thus the course of hydrolysis reactions. In particular, choline salts may influence the stability of enzymes, their catalytic activity, and substrate selectivity. Additionally, this hypothesis suggests that, depending on the anion present in the choline salt, a different impact on enzymatic hydrolysis reactions can be observed, opening the possibility of optimizing these reactions by selecting the appropriate choline salt. The hypothesis of the proposed research assumes that the diverse composition of eutectic mixtures may influence the operational parameters of the studied enzymes, and the interactions between choline salt mixtures and enzyme structure may provide fundamental knowledge about the usefulness of choline salt mixtures in enzymatic hydrolysis reactions involving hydrolase enzymes. All the utilized research results have been presented in a series of three publications [P1] – [P3].

Ankieta dorobku naukowego

Mgr inż. Jakub Hoppe

Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki.

A. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcia naukowe, o których mowa w art. 13 ust. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, rozprawę doktorską pt. „Enzymatyczne reakcje hydrolizy w środowisku zawierającym sole choline i ich mieszaniny eutektyczne”

- 1. Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase, International Journal of Biological Macromolecules, 136, 2019, 296-304 (IF = 5,482; MNiSW = 100).**

Wkład procentowy doktoranta szacuje się na 60%, obejmował on syntezę cieczy jonowej, preparatykę mieszanin eutektycznych, charakterystykę spektroskopową FT-IR wszystkich mieszanin eutektycznych, przeprowadzenie pomiarów gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej, pisanie publikacji, omówienie wyników w ujęciu całościowym oraz dyskusja z recenzentami.

Udział procentowy pozostałych współautorów wynosi: Byzia E. (10%); Smiglak, M. (20%); Drozd, R. (10%).

- 2. Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents, Food Chemistry, 384, 2022, 132498 (IF = 7,512; MNiSW = 200).**

Wkład procentowy doktoranta szacuje się na 50%, obejmował on syntezę cieczy jonowej, preparatykę mieszanin eutektycznych, charakterystykę spektroskopową FT-IR

wszystkich mieszanin eutektycznych, przeprowadzenie pomiarów gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej, pisanie publikacji, omówienie wyników w ujęciu całościowym oraz dyskusja z recenzentami.

Udział procentowy pozostałych współautorów wynosi: Byzia E. (15%); Szymańska M. (5%); Smiglak, M. (20%); Drozd, R. (10%).

3. An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties, 216, 2022, 112518 (IF = 5,268 ; MNiSW = 100).

Wkład procentowy doktoranta szacuje się na 50%, obejmował on syntezę cieczy jonowej, preparatykę mieszanin eutektycznych, charakterystykę spektroskopową FT-IR wszystkich mieszanin eutektycznych, przeprowadzenie pomiarów gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej, pisanie publikacji, omówienie wyników w ujęciu całościowym oraz dyskusja z recenzentami.

Udział procentowy pozostałych współautorów wynosi: Byzia E. (10%); Szymańska M. (5%); Bielecki P. (10%); Drozd, R. (10%); Smiglak M. (15%);

B. Sumaryczny Impact Factor według listy Journal Citation Reports (JRC) na rok wydania publikacji wynosi: 18.262

C. Indeks Hirscha według bazy Web of Science oraz Scopus dla wszystkich publikacji Doktoranta: 6.

D. Zgłoszenia patentowe

1. Szymańska M., Drozd R., Hoppe J., Dutkiewicz M. *Sposób modyfikacji procesu produkcji celulozy bakteryjnej w obecności surfaktantów polisiloksanowych*, P.428721, 30.01.2019r.

E. Publikacje

1. Hoppe J., Byzia E., Drozd R., M., Smiglak M., *Int J Biol Macromol.*, **2019**, 136, 296-304.
2. Zajac A., Szpecht A., Zielinski D., Rola K., Hoppe J., Komorowska K., Smiglak M., *J. Mol. Liq.*, **2019**, 283, 427-439.
3. Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Drozd R., Śmiglak M., *Food Chem* **2022** 384 132498
4. Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., Śmiglak M., *Col Surf B* **2022** 217 112590
5. Czajkowska J., Junka A., Hoppe J., Toporkiewicz M., Pawlak A., Migdał P., Oleksy-Wawrzyniak M., Fijałkowski K., Smiglak M., Markowska-Szczupak A. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 5826
6. Drozd R., Szymańska M., Przygodzka K., Hoppe J., Leniec G., Kowalska U, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 8563
7. Szymańska M., Hoppe J., Dutkiewicz M., Sobolewski P., Palacz M., Janus E., Zielińska B., Drozd.R *Int J Biol Macromol.*, **2022**, 208, 642-653

F. Udział w konferencjach

Prezentacje posterowe

1. **60. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, Wrocław, Polska, 17-21.09.2017, *Aktywność β -galaktozydazy w roztworach zawierających eutektyczne ciecze jonowe na bazie choliny.* J.Strakowska, J.Hoppe, M.Śmiglak
2. **2nd Advances in Green Chemistry Conference**, Poznań, Polska, 16-19.04.2018, *Effect of choline-based deep eutectic solvents on catalytic properties of β -galactosidase from Kluyveromyces lactis* J.Strakowska, R.Drozd, J.Hoppe, K.Adamczyk, L.Broniarek, M.Hoppe, M.Śmiglak

3. **2nd Advances in Green Chemistry Conference**, Poznań, Polska, 16-19.04.2018, *The influence of selected choline-based DES on growth and survival abilities of Bacillus licheniformis and Kluyveromyces lactis* K.Adamczyk, J.Strakowska, L.Broniarek, M.Hoppe, J.Hoppe, Marcin Śmiglak,
4. **2nd Advances in Green Chemistry Conference, Poznan, Poland**, 16-19.04.2018, *Deep eutectic solvents as a suitable medium for enzymatic reactions*, J.Hoppe, M.Śmiglak,
5. **3rd Green & Sustainable Chemistry Conference**, Berlin, Niemcy, 13-16.05.2018, *The activity of β -galactosidase in solutions containing ionic liquids based on the choline cation* A.Pawłowska-Zygarowicz, J.Strakowska, J.Hoppe, M.Smiglak
6. **"X Poznańska Konferencja Naukowa "Chemia - nauka i przemysł"**, Poznań, Polska, 30.11.2018, *Wybrane właściwości fizykochemiczne mieszanin eutektycznych soli choliny oraz związków HBD* Hoppe J., Śmiglak M.
7. **62. Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego**, Warszawa, Polska, 2-6.09.2019, *Nowe inicjatory sieciowania żywic i biożywic epoksydowych na bazie soli organicznych urotropiny z kwasami naturalnymi*, Zieliński D., Szpecht A., Szymkowiak J., Działkowska J., Hoppe J., Śmiglak M., Maciejewski H.
8. **The 4th ILSEPT**, Sitges, Hiszpania, 8-11.09.2019 *Deep Eutectic Solvents based on choline cation - Physicochemical Properties and Influence on enzymatic reaction with β -galactosidase* Hoppe J., Śmiglak M.

G. Udział w projektach badawczych

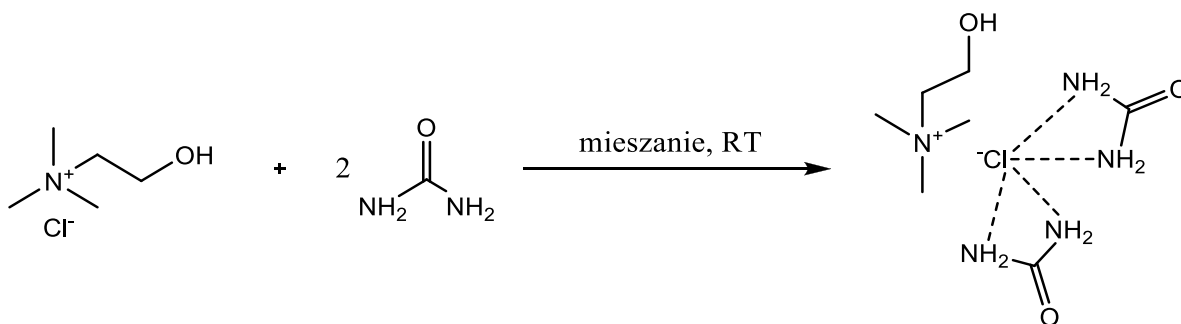
1. Stypendysta w projekcie „Nietoksyczne mieszaniny eutektyczne jako alternatywne środowisko dla reakcji z udziałem enzymów i mikroorganizmów (OPUS 2015/19/B/NZ9/03711)

H. Współorganizacja konferencji międzynarodowej

1. Współorganizator międzynarodowej konferencji *2nd Advances in Green Chemistry*, 16-19.04.2018, Poznań, Polska.

I. Wprowadzenie

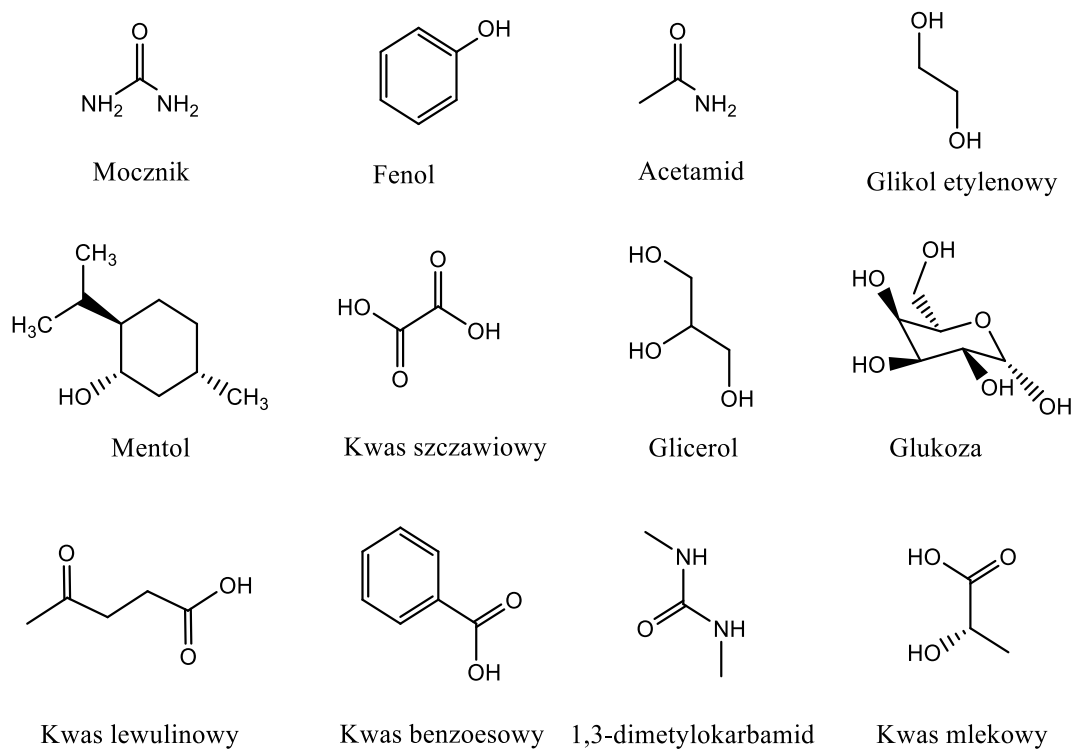
Mieszanki głęboko eutektyczne – (eng. Deep Eutectic Solvents - DES), stanowią nowatorski obszar badań w dziedzinie zielonej chemii. Są to mieszanki blisko związane z cieczami jonowymi (IL), jednakże są całkiem nową klasą "zielonych" rozpuszczalników, które zyskały na popularności w ciągu ostatnich lat. Rozkwit popularności zawdzięczają badaniom przeprowadzonym przez Abbott i współpracowników, [1] którzy zauważyli niezwykle niską temperaturę topnienia przy eutektycznym składzie donorów wiązań wodorowych (HBD) i akceptorów wiązań wodorowych (HBA). Zaobserwowane po raz pierwszy zjawisko, dotyczyło kombinacji ułamków molowych 1:2 (mol:mol) chlorku choliny [(chlorurek (2-hydroksyetylo)-trimetyloamoniowy)]; temperatura topnienia $-T_m \approx 302 \text{ }^\circ\text{C}$] z mocznikiem [$T_m \approx 133 \text{ }^\circ\text{C}$]. Mieszanka ta jest cieczą w temperaturze pokojowej (temperatura topnienia mieszaniny w punkcie eutektycznym, $T_{eut} = 12 \text{ }^\circ\text{C}$). Rys.1



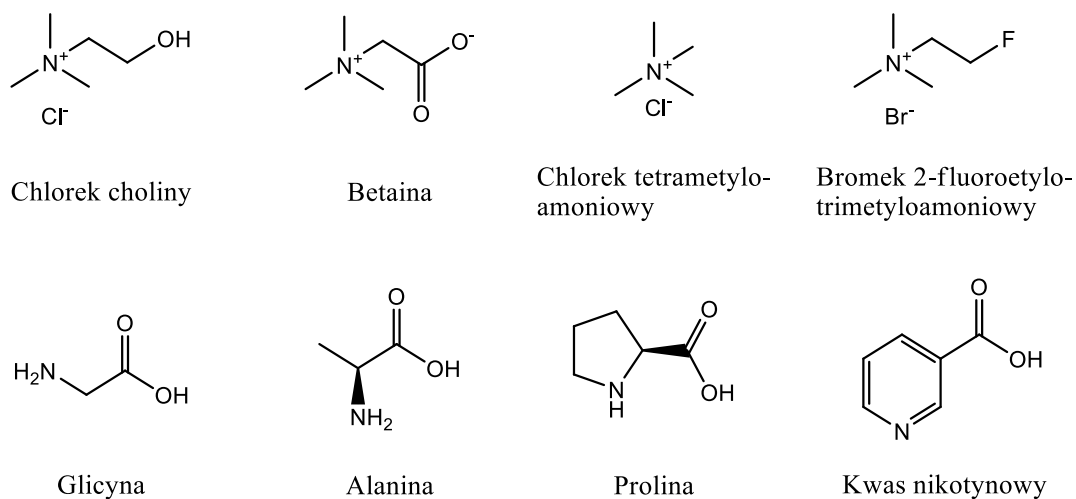
Rysunek 1 Schemat preparatyki mieszaniny eutektycznej chlorek choliny:mocznik (Ch[Cl]:U); stosunek molowy 1:2; wiązania wodorowe zaznaczone linią przerywaną.

Powstałe w powyższy sposób mieszanki eutektyczne, to wyjątkowo interesujące ciecze, które poprzez połączenie dwóch substancji stałych w temperaturze pokojowej tworzą ciecz, o temperaturze topnienia znacznie niższej niż każdy z pojedynczych składników, jednocześnie posiadając wiele unikalnych właściwości [2]. Powstanie mieszanin eutektycznych typu DES jest możliwe dzięki interakcjom między związkiem będącym akceptorem wiązań wodorowych

(związkiem typu HBA – Hydrogen Bond Acceptor – rys.2). i związkiem będącym donorem wiązań wodorowych (związkiem typu HBD – rys.3)



Rys. 1 Przykładowe akceptory wiązań wodorowych (HBA) stosowane do otrzymywania mieszanin DES.



Rys. 2 Przykładowe związki będące donorami wiązań wodorowych (HBD) stos. do otrzymywania mieszanin DES

Związki typu HBD, są związkami które mają zdolność do dostarczania wiązań wodorowych, (atomów wodoru biorących udział w tworzeniu wiązań wodorowych), ze związkiem typu HBA (rys.1). Przykładowo, w najpopularniejszej literaturowo mieszaninie eutektycznej chlorek choliny jest związkiem typu HBA, podczas gdy mocznik jest związkiem typu HBD. W wyniku interakcji, pomiędzy atomami wodoru w grupach $-NH_2$ w moczniku oraz anionem chlorkowym w chlorku choliny, powstaje sieć wiązań wodorowych, która stabilizuje mieszaninę i obniża jej temperaturę topnienia (rys.1) [2].

Jako rozpuszczalniki, mieszaniny głęboko eutektyczne często są uznawane za klasę cieczy jonowych (IL), ponieważ mają wiele wspólnych cech, takich jak wysoka stabilność termiczna, niska lotność, niskie ciśnienie pary i regulowana polarność. [3] Dzięki tym właściwościom, mieszaniny eutektyczne stanowią obiecujące kandydaty na potencjalne zamienniki dla blisko 600 istniejących lotnych związków organicznych, powszechnie stosowanych w badaniach i przemyśle. Ponadto, ciecze jonowe mają tendencję do bycia drogimi, często nie biodegradowalnymi rozpuszczalnikami o różnym poziomie toksyczności, podczas gdy mieszaniny eutektyczne są zazwyczaj tanie, biodegradowalne, nietoksyczne i zdecydowanie łatwiejsze do przygotowania niż ciecze jonowe [2–4].

Większość dotychczas przebadanych i opisanych w literaturze mieszanin eutektycznych klasyfikuje się w obrębie następujących grup:

1. Typ I, który łączy czwartorzędową sól amoniową i chlorek metalu,
2. Typ II, składający się z czwartorzędowej soli amoniowej i hydratu chlorku metalu,
3. Typ III, składający się z soli czwartorzędowej i HBD (zazwyczaj organicznego składnika molekularnego, takiego jak amid, kwas karboksylowy lub alkohol wielowodorotlenowy),
4. Typ IV, składający się z hydratu chlorku metalu i HBD,
5. Typ V, który jest stosunkowo nową klasą składającą się wyłącznie z niejonowych związków HBA i HBD.

Ponieważ mieszaniny eutektyczne zawarte w grupie V, powstają z niejonowych związków HBA i HBD, a mimo to nadal wykazują charakterystyki punktu topnienia mieszanin głęboko eutektycznych, uważa się, że wiązania wodorowe są nie tylko szczególnie powszechne w mieszaninach typu V, ale również są podstawowym źródłem ich powstawania [5,6]. Inne rodzaje mieszanin, które trudno przyporządkować do tych kategorii, ale również wykazały znaczne obniżenie temperatury topnienia w punkcie eutektycznym, takie jak między niektórymi kwasami i zasadami Brønsteda-Lowry'ego sugerują, iż inne typy mieszanin eutektycznych nie zostały jeszcze odkryte – np. mieszaniny typu LTTM (low temperature transition mixtures [7,8]) – które posiadają swój punkt eutektyczny (jednakże nie tak „głęboki” jak mieszaniny typu deep eutectic solvents) również powstający na skutek oddziaływania wiązań wodorowych. Przygotowanie każdego z wyżej wymienionych typów mieszanin eutektycznych jest stosunkowo łatwe. Najczęściej stosowaną metodą przygotowania jest podgrzewanie i mieszanie składników DES w atmosferze obojętnej, aż do uzyskania jednorodnej cieczy. Nie jest w tym przypadku potrzebny dodatkowy rozpuszczalnik ani nie zachodzi żadna reakcja, rozumiana w tradycyjnym sensie. W rezultacie nie są wymagane żadne dodatkowe etapy mające na celu oczyszczenie DES. Przyczynia się to do wzrostu potencjału mieszanin eutektycznych jako ekonomicznie opłacalnych alternatyw dla konwencjonalnych rozpuszczalników organicznych i cieczy jonowych [9–12]. W metodzie odparowywania składniki są rozpuszczane w minimalnej ilości wody, po czym większość wody jest odparowywana w próżni w temperaturze 323K. Następnie, końcowa mieszanina jest umieszczana w komorze z żelazem krzemionkowym, do czasu stabilizacji swojej masy [13,14]. W metodzie opartej o ucieranie, oba składniki stałe są dodawane do młynka, a następnie mielone, aż powstanie przezroczysta, jednorodna ciecz, zwykle również w atmosferze gazu obojętnej. W metodzie liofilizacji zarówno HBD, jak i HBA są rozpuszczane w około 5% wagowych wody. Te dwa roztwory są mieszane, zamrażane, a następnie liofilizowane, aby utworzyć przezroczystą, jednorodną [9,15] ciecz.

Pod względem cech fizykochemicznych DES są zwykle lepкими, transparentnymi cieczami o różnobarwnych odcieniach, od białego do bursztynowego koloru, lub nieprzezroczystymi ciałami stałymi poniżej temperatury punktu eutektycznego T_{eut} [16,17]. Charakterystyczną cechą rozpuszczalników eutektycznych jest również ich tendencja do witrifikacji [18,19]. Występowanie witrifikacji zależne jest zarówno od składu mieszaniny jak również od szybkości chłodzenia. Dla przykładu, mieszanina chlorek choliny:mocznik (Ch [Cl]:U) ulega procesowi witrifikacji przy chłodzeniu, w tempie poniżej $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Częste występowanie zjawiska witrifikacji wśród wielu mieszanin eutektycznych sugeruje powiązanie między obserwowanymi właściwościami materiałowymi, fundamentalną dynamiką molekularną i interakcjami, które mogą odpowiadać za tak duży spadek temperatury topnienia mieszaniny „głęboko” eutektycznej w porównaniu do standardowych mieszanin eutektycznych. W literaturze przedmiotu dominuje przekonanie, że mieszaniny eutektyczne powstają poprzez samorzutne interakcje międzycząsteczkowe [20], które są spowodowane entropią mieszania, oddziaływaniami van der Waalsa, wiązaniami wodorowymi i/lub wiązaniami jonowymi. Wiedza na temat tego, jak poszczególne czynniki współdziałają, nie została jednak jeszcze opisana. Obecnie szacuje się, że ilość mieszanin eutektycznych może wynosić od 10^6 - 10^8 tylko dla kombinacji binarnych, jednakże już wiadomo, że istnieją mieszaniny eutektyczne trójskładnikowe (np. chlorek choliny:mocznik:glicerol) – Ch[Cl]:U:Gly w stosunku molowym 1:1:1).

Ze względu na swoje modyfikowalne właściwości, mieszaniny eutektyczne są obiecującą alternatywą dla istniejących rozpuszczalników molekularnych, umożliwiając ich dostosowanie do optymalizacji wydajności, selektywności, rozpuszczalności, lepkości, kosztów lub dowolnej innej właściwości fizykochemicznej interesującej w danym przypadku [2,6,21–23]. Zważywszy na wspomnianą powyżej, ogromną liczbę kombinacji akceptorów oraz donorów wiązań wodorowych (HBA i HBD), znalezienie "optymalnych" mieszanin dla danej aplikacji jest dość trudne. Niemniej jednak, już dzisiaj mieszaniny eutektyczne, mają wiele potencjalnych zastosowań, a trwające badania często się na siebie nakładają w wielu obszarach. Ze względu na oferowane

zalety, takie jak niska toksyczność, biodegradowalność, niski koszt i łatwość preparatyki, rozpuszczalniki te, znalazły już potencjalne zastosowanie w gałęziach przemysłu takich jak:

Metalurgia i elektroliza – metale i sole metaliczne wykazują wysoką rozpuszczalność i przewodnictwo elektryczne w mieszaninach eutektycznych, co czyni je pożądanymi rozpuszczalnikami w procesach ekstrakcji i odzysku metali w roztworze, rafinacji rudy, oraz procesów galwanicznych. Abbot i wsp. [13] opracowali preparatykę mieszanin eutektycznych (DES) składających się z chlorku choliny jako akceptora wiązań wodorowych (HBA) i różnych kwasów karboksylowych jako donorów wiązań wodorowych (HBD), wykazującymi dobre właściwości do rozpuszczania tlenków metali (ZnO , CuO i Fe_3O_4), z potencjalnym zastosowaniem w procesie ekstrakcji metali, potwierdzając również, że rozpuszczalność każdego tlenku metalu jak np., TiO_2 , V_2O_5 , Cr_2O_3 , MnO , Fe_2O_3 , ZnO , Cu_2O itp. zależy od użytego DES, co może być wykorzystane do selektywnego ługowania metali [24]. Ta sama grupa badawcza Abbot i wsp. [25] opisała proces umożliwiający ługowanie metali (Zn , Pb , Cd itp.) z pyłów powstających podczas produkcji stali w piecu łukowym elektrycznym. Zawarte w tego rodzaju pyłach toksyczne metale (Zn , Pb , Cd itp.), obecne są jako tlenki. Autorzy pracy wykazali możliwość ługowania tych metali z pyłów za pomocą DES składających się z 1M chlorku choliny, 0.5M mocznika + 2M glikolu etylenowego. Wydajność ekstrakcji cynku (Zn) wyniosła w tym eksperymencie 70% (wag.). Odzyskiwany metal wytrącano w postaci chlorku cynku, poprzez dodanie amoniaku do mieszaniny eutektycznej. Podobne wyniki badań przedstawiono w pracy Topçu i wsp. [26]. Opisany proces ekstrakcji metali z żużla z konwertora miedzi, za pomocą mieszaniny eutektycznej (chlorek choliny mocznik w stosunku molowym 1:2), stosowanej jako środka do ługowania miedzi i cynku. Zoptymalizowane warunki (368 K, 48 h) dla procesu ługowania, pozwoliły uzyskać ekstrakcję na poziomie 89,9% Cu (wag) i 65,3% Zn (wag).

1. Separacja – mieszaniny eutektyczne mogą być stosowane w zakresie różnych procesów separacyjnych [27–29], obejmujących fizyczną separację dwóch lub więcej składników od siebie. Jednym z przykładów jest badanie mieszanin eutektycznych w celu ekstrakcji ciecz-

ciecz mieszanin azeotropowych. W badaniu przeprowadzonym przez Oliveirę i wsp. mieszaniny eutektyczne na bazie chlorku choliny zostały zbadane pod kątem zdolności do separacji mieszaniny azeotropowej etanol-heptan, umożliwiając całkowity rozdział azeotropu [30]. W innych badaniach, hydrofobowe mieszaniny eutektyczne wykazały szczególnie obiecujące wyniki separacji różnych substancji, w tym kwasów tłuszczowych lotnych, jonów metali przejściowych i jonów promieniotwórczych z rozcieńczonych roztworów wodnych, w układach ciecz-ciecz. [27,31]. Ponadto, mieszaniny eutektyczne oparte na chlorku choliny, stanowią podstawę wielu badań z zakresu pochłaniania CO₂ oraz SO₂. Powodem tego są modyfikowalne właściwości mieszaniny, które można optymalizować w celu poprawy rozpuszczalności separowanych gazów [27].

2. Systemy energetyczne i technologie baterii – powszechność stosowania baterii wielokrotnego ładowania w komputerach i smartfonach, powoduje duże zapotrzebowanie na materiały umożliwiające poprawę technologii magazynowania i przetwarzania energii, przy jednoczesnym zachowaniu funkcjonalności i bezpieczeństwa [32]. Mieszaniny głęboko eutektyczne są rozważane jako potencjalne elektrolity [33] dla baterii litowo-jonowych [34,35], właśnie ze względu na swoją niską palność, szeroki zakres temperatury topnienia oraz wysokie przewodnictwo. Przykładowo, mieszanina eutektyczna acetamid:LiNO₃ jako elektrolit, w obecności katody LiFePO₄, pozwoliła stworzyć baterię o pojemności 150 mAh/g z wydajnością ładowania/rozładowania wynoszącą 99%. Szczególną zaletą mieszanin eutektycznych dla systemów magazynowania energii jest fakt, iż w przeciwieństwie do obecnie stosowanych elektrolitów, rozpuszczalniki te, są jednocześnie łatwe w przygotowaniu, tanie i bezpieczne dla środowiska. [21,36]

Wśród moich zainteresowań, najciekawsze jednak zastosowanie mieszanin eutektycznych znajduje się w obszarze biokatalizy. Biokataliza jest dynamicznie rozwijającym się działem chemii organicznej, w którym wykorzystuje się enzymy lub odpowiednio zmodyfikowane mikroorganizmy jako biokatalizatory [37]. Znajdują one zastosowanie m.in. w reakcjach takich jak, epoksydacja, transestryfikacja, amidacja, hydroliza, czy reakcja tworzenia wiązań typu C-C (węgiel-

węgiel) [38,39]. Biokataliza obejmuje również badanie naturalnych systemów, w których zachodzą te procesy, oraz próby odkrycia nowych reakcji, które mogą być katalizowane przez enzymy. Procesy te zwykle prowadzone są w roztworze wodnym, dlatego też ostrożny wybór zarówno enzymu, jak i rozpuszczalnika, jest kluczowy, aby wytworzyć przydatne produkty. Ponownie, również w tym aspekcie, mieszaniny eutektyczne wydają się być bardzo obiecującymi rozpuszczalnikami [38,40]. Posiadają one kilka kluczowych cech, które wskazują na duży potencjał w kreowaniu nowych właściwości biokatalitycznych enzymów [41,42]. Właściwości mieszanin eutektycznych, umożliwiające rozpuszczanie szerokiej gamy zwykle hydrofobowych substratów [43], enzymów, oraz innych rozpuszczalników bioaktywnych, czynią je potencjalnymi kandydatami do zastąpienia obecnie stosowanych rozpuszczalników organicznych czy też cieczy jonowych. Mimo iż biokataliza zwykle jest prowadzona w roztworze wodnym, mieszaniny eutektyczne, można również z powodzeniem wykorzystać jako alternatywne środowisko reakcji, jako rozpuszczalniki do trudno rozpuszczalnych w wodzie substratów czy też jako współrozpuszczalniki w środowisku reakcji [44]. Badania przeprowadzone przez Patzolda i in. [38] wykazały, iż możliwe jest również tworzenie mieszanin eutektycznych z substratów, będących jednocześnie substratami docelowej reakcji enzymatycznej. Odkrycie to podkreśla aspekt wspomnianych mieszanin jako potencjalnych "niestandardowych mediów reakcyjnych". Przy odpowiednim wyborze składników, mieszaniny eutektyczne mogą służyć zarówno jako medium reakcji (dla substancji trudno rozpuszczalnych w wodzie), jak również jako mieszanina substratów, ułatwiają w ten sposób reakcje, które nie mogą być przeprowadzone w roztworze wodnym.

Biokataliza jest obecnie postrzegana jako alternatywa zawierająca się w tzw. zielonych technologiach, mogąca z powodzeniem zastąpić wiele procesów w chemii organicznej. Stosowane dotychczas jako medium reakcji enzymatycznych układy woda : systemy buforowe (składające się z soli kwasów organicznych i nieorganicznych) mają bardzo często liczne ograniczenia, związane z niską rozpuszczalnością niektórych substratów reakcji, co poważnie ogranicza zastosowania enzymów w syntezie organicznej, w skali istotnej przemysłowo [45]. W przypadku reakcji katalizowanych przez enzymy, idealny rozpuszczalnik powinien być nietoksyczny i łatwo

biodegradowalny. Ponadto powinien gwarantować stabilność oraz nie zaburzać sprawności katalitycznej enzymu [46–48]. W tym kontekście, w literaturze udokumentowano użycie hydrofobowych rozpuszczalników organicznych, nadkrytycznych cieczy i cieczy jonowych (IL) [49–51]. Podobna sytuacja, ma również miejsce w przypadku mieszanin głęboko eutektycznych [40,52]. W przeciwieństwie jednak do rozpuszczalników organicznych czy też cieczy jonowych, mieszaniny eutektyczne są uznawane obecnie w literaturze, za rozpuszczalniki zdolne do przezwyciężenia większości głównych ograniczeń, napotykanych przy użyciu wspomnianych tradycyjnych rozpuszczalników organicznych [44]. Zgodnie z badaniami, opisanymi w literaturze, związki tworzące rozpuszczalniki eutektyczne są w wielu przypadkach jednocześnie pierwotnymi metabolitami organizmów żywych, tj. aminokwasami, kwasami organicznymi, cukrami lub pochodnymi cholinowymi [53,54]. Powstałe z nich mieszaniny eutektyczne mogą tworzyć środowisko reakcji dla enzymów podobne do cytoplazmy, co w praktyce oznacza, że enzymy mogą przekształcać nienaturalne substraty w naturalnym środowisku (lub bardzo do naturalnego zbliżonym). W szczególności ma to znaczenie dla enzymatycznej hydrolizy.

I.1 Biokataliza z udziałem enzymów.

W porównaniu z tradycyjną hydrolizą kwasową czy też zasadową, hydroliza enzymatyczna wymaga mniejszej energii aktywacji i względnie łagodniejszych warunków prowadzenia reakcji (w przybliżeniu, w zakresie temperatury 40–60°C i pH 4–9) [55]. Ponad to, w przeciwieństwie do typowej reakcji hydrolizy kwasowej i zasadowej, reakcje z udziałem enzymów hydrolitycznych zwykle nie prowadzą do wytwarzania toksycznych produktów pośrednich zapewniając tym samym niski stopień degradacji i korozji instalacji, brak produktów ubocznych, i brak szkód środowiskowych. Hydrolazy to grupa enzymów zdolnych do katalizowania rozkładu różnego rodzaju wiązań chemicznych przy użyciu wody. Naturalną ich rolą w organizmach żywych, jest dekompozycja składników odżywczych poprzez rozkładanie ich na mniejsze cząsteczki (np. cząsteczka laktozy hydrolizowana jest przez β -galaktozydazę do podjednostek

monosacharydowych jak glukoza i galaktoza). Dodatkowo enzymy w tym oczywiście hydrolityczne, wykazują wysoką stereoselektywność. Ze względu na ich wszechstronność pod względem właściwości katalitycznych, hydrolazy są kluczowymi enzymami w wielu procesach prowadzonych na skalę przemysłową. Mechanizm ich działania oparty na hydrolizie kwasowo zasadowej wymaga obecności nukleofilowej grupy funkcyjnej w miejscu aktywnym (np. grupę karboksylową kwasu asparaginowego w pepsynie, grupę hydroksylową seryny w proteazach serynowych lub tiolową cysteiny w proteazach cyteinowych/tiolowych jak np. papaina), która „atakuję” odpowiedni substrat elektrofilowy, tworząc kowalencyjny, stan przejściowy acyl-enzym [56–58]. Następnie, cząsteczka wody lub inny nukleofil, wykorzystywana jest do hydrolizy wiązania acyl-enzym w wyniku czego uwalniana jest cząsteczka substratu a enzym może ponownie rozpocząć poprzez związanie substratu kolejny cykl katalityczny [59].

Należy jednak podkreślić, że opisany powyżej mechanizm reakcji, posiada specyficzne obostrzenia, które są pochodną struktury katalizatora. Kluczowym elementem struktury molekularnej enzymu-ów jest centrum aktywne, którego budowa pozwala na prowadzenie reakcji z niższym nakładem energii w porównaniu do tradycyjnych katalizatorów stosowanych w syntezie różnego rodzaju związków chemicznych. Struktura przestrzenna centrum aktywnego enzymów pozwala na szybkie i (unieruchamianie) substratu i optymalną orientację względem grup funkcyjnych aminokwasów bezpośrednio zaangażowanych w przekształcanie go w produkt. Ponadto struktura obszaru katalitycznego enzymu pozwala na destabilizację struktury substratu, co często jest kluczowym etapem aktu katalitycznego [58]. Za ten mechanizm odpowiadają m.in. rozkład ładunku w centrum aktywnym i jego pobliżu oraz ilość obszarów/grup hydrofilowych i hydrofobowych w strukturze centrum aktywnego enzymu. Wymienione właściwości obszaru katalitycznego enzymów determinują ich specyficzność i selektywność, a także odpowiadają za zdolność tych biokatalizatorów do „rozdzielania” nawet bardzo zbliżonych strukturalnie związków chemicznych, takich jak cząsteczki substratu. Dzięki temu enzymy można stosować jako katalizatory chemoselektywne, regioselektywne i stereospecyficzne. Wśród enzymów z klasy hydrolaz dotyczy to przede wszystkim grup:

- Glikozydazy (EC 3.2.1): katalizujących hydrolizę wiązań glikozydowych wysoce regioselektywne i stereospecyficzne. Na przykład, β -galaktozydaza z *Escherichia coli* jest znana ze swojej zdolności do specyficznej hydrolizy wiązań β -glikozydowych, co jest kluczowe w procesie wspomnianego wcześniej, metabolizmu laktozy [60]. Nie jest w jednak zdolna do przeprowadzić hydrolizy cellobiozy mimo takiego samego typu wiązania glikozydowego – gdyż istnieją zbyt duże różnice strukturalne pomiędzy wspomnianymi disacharydami.
- Lipazy (EC 3.1.1.3): katalizujących hydrolizę estrów glicerolu. Są one wysoce chemoselektywne, regioselektywne i stereospecyficzne. Na przykład, lipaza z *Candida antarctica* (CALB) jest znana ze swojej regioselektywności i stereospecyficzności w produkcji estrów enancjomerycznie czystych [61]. CALB jest często stosowana w przemyśle do produkcji biodiesla, gdzie katalizuje transestryfikację trójglicerydów z metanolem do formowania estrów metylowych [49,62].
- Proteazy (EC 3.4): katalizujących hydrolizę wiązań peptydowych. Są one wysoce chemoselektywne, katalizując hydrolizę specyficznych wiązań peptydowych. Na przykład, trombina jest proteazą, która specyficznie rozpoznaje i hydrolizuje wiązania peptydowe po argininie w sekwencji peptydowej [63].

Dodatkowo należy zauważyć, iż struktura enzymu może ulegać istotnym zmianą podczas katalizy wynikającym z konieczności optymalizacji właściwości środowiska reakcyjnego jakim jest obszar katalityczny (centrum aktywne) w strukturze enzymu. W ten sposób centrum aktywne „dostosowuje” się właściwości fizykochemicznych określonego rodzaju substratu, gwarantując stabilne jego wiązanie [64]. W zależności od potrzeb struktura enzymu może ulegać większym bądź mniejszym zmianom konformacyjnym, w zależności od właściwości fizykochemicznych substratu oraz charakteru katalizowanej reakcji. W trakcie, gdy substrat oddziałuje z enzymem, odpowiednio rozmieszczone łańcuchy boczne aminokwasów tworzących miejsce aktywne, umożliwiają prowadzenie wydajnej katalizy. W przypadku niektórych enzymów, takich jak np.

glikozydazy, w skutek oddziaływań z enzymem cząsteczka substratu również nieznacznie zmienia kształt, zbliżając się do miejsca aktywnego. Tego typu indukowane dopasowanie zwiększa wierność rozpoznania molekularnego substratu w obecności konkurencji gwarantując, poprzez mechanizm korekty konformacyjnej, specyficzność substratową biokatalizatora [65]. Z punktu widzenia klasycznej syntezy chemicznej, opisana powyżej selektywność jest bardzo pożądaną właściwością i cechą biokatalizatorów. Mimo, iż każde zdarzenie katalityczne składa się z minimum trzech etapów (zazwyczaj większej liczby) niemniej jednak główną zaletą enzymów, jest ich zdolność do katalizowania reakcji ze zdumiewającą szybkością - wszystkie one zachodzą w przeciągu kilku milisekund. Najbardziej wymagającym z wspomnianych etapów cyklu katalitycznego, jest efektywna stabilizacja stanu/-ów przejściowych. Jest to etap biokatalizy decydujący o przebiegu całego procesu, charakteryzujący się powstaniem tak zwanej struktury stanu przejściowego, która znajduje się pomiędzy strukturami chemicznymi substratów i produktów. Przyjmuje się, że stany przejściowe reakcji enzymatycznych charakteryzują się czasem trwania rzędu 10^{-13} sekundy (tj. czasu drgań pojedynczego wiązania), co obrazuje, dlaczego struktura stanu przejściowego ma kluczowe znaczenie dla katalizy enzymatycznej. Wszelkie zaburzenia tego stanu, (na przykład zmiany konformacyjne białka wynikające z wpływu środowiska reakcji – nowego rozpuszczalnika), modyfikują zdolności operacyjne biokatalizatora, bądź też, w ostateczności, prowadzą do jego całkowitej inaktywacji. W tym miejscu warto wspomnieć, iż zmiany konformacyjne enzymu, wynikające z wpływu rozpuszczalnika, w którym wspomniane białko się znajduje, mogą prowadzić do „aktywowania” innej zdolności katalitycznej niż natywna aktywność katalityczna w środowisku wodnym. Jednymi z bardziej znanych enzymów posiadających takie właściwości są lipazy, katalizujące nie tylko reakcje hydrolizy estrów, ale również katalizujące reakcje estryfikacji, transestryfikacji, reakcje syntezy amidów bądź też reakcje aminolizy. Zdolności te, wynikają z unikalnej właściwości biokatalizatorów, a mianowicie z tak zwanej „pamięci kształtu” w zależności od wartości pH środowiska [66]. Grupy jonogenne białek, zachowują bowiem swój ostatni stan jonizacji zarówno po odwodnieniu, jak i po umieszczeniu w rozpuszczalnikach organicznych. Dzięki temu, enzymy zliofilizowane z wodnych roztworów o pH optymalnym do katalizy danej reakcji, pozwalają zwiększyć, czasem setki razy, szybkość reakcji w

rozpuszczalnikach organicznych. Opisany stan jonizacji, w rozpuszczalnikach organicznych można również optymalizować, (tym samym maksymalizować aktywność enzymatyczną), przez dodanie odpowiednich par buforowych kwasów i ich sprzężonych zasad [66]. Badania nad zastosowaniem enzymów w tradycyjnych rozpuszczalnikach organicznych takich jak toluen, heptan, heksan, DMSO czy acetonitryl, udowadniają, że nie dochodzi do denaturacji białka, przeciwnie, enzymy pozostają stabilne i aktywne [67]. Jednym z bardziej popularnych przykładów takich enzymów są lipazy (EC 3.1.1.3) katalizujące hydrolizę estrów. Enzymy te dodatkowo, w zależności od rozpuszczalnika, mogą również katalizować reakcje niemożliwe do przeprowadzenia w środowisku wodnym. W tym aspekcie wyróżnić szczególnie należy lipazę izolowaną z komórek drożdży *Candida antarctica* (CALB), która jest jednym z najczęściej stosowanych enzymów w chemii organicznej oraz w przemyśle [61]. CALB jest znana ze swojej stabilności w rozpuszczalnikach organicznych takich jak toluen, heptan, acetonitryl, DMSO, jak również w niektórych cieczach jonowych np. [BMIM⁺][Br⁻] czy [EMIM⁺][EtSO₃⁻] [68]. Dzięki tej właściwości, możliwe jest prowadzenie reakcji estryfikacji, transestryfikacji czy amidacji z udziałem wspomnianej lipazy. Podobnie subtylizyna (proteaza serynowa) – wytwarzana przez *Bacillus subtilis*, znana jest ze swojej stabilności w rozpuszczalnikach organicznych takich jak DMSO, *N,N*-dimetyloformamid, glikol propylenowy, dioksan czy glicerol. Stabilność wspomnianej proteazy, umożliwia prowadzenie reakcji syntezy peptydów, w rozpuszczalniku DMF. Warto przy tym zwrócić uwagę, iż stosowanie rozpuszczalników organicznych oraz ich mieszanin, pozwala skutecznie wpływać na selektywność enzymatyczną, w tym substratową stereo- regio- i chemoselektywność, umożliwiając w ten sposób prowadzenie reakcji odwrotnej w stosunku do reakcji w wodzie. Przykładem wspomnianych powyżej właściwości, są między innymi reakcje katalizowane przez zarówno lipazy jak i proteazy. Synteza maślanu butylu z maślanu winylu i 1-butanolu katalizowana przez lipazę (CALB) w środowisku cieczy jonowej [BMIM⁺][PF₆⁻] z dodatkiem trimetyloaminy cechuje 95% regioselektwność w stosunku do 80% wobec reakcji prowadzonej w czystej cieczy [BMIM⁺][PF₆⁻] [68]. Niestety, większość enzymów hydrolitycznych, wykazuje zdecydowanie niższą aktywność w rozpuszczalnikach organicznych niż w wodzie. Wynika to z obniżonej elastyczności strukturalnej enzymu, gdyż w środowiskach wodnych

enzymy posiadają ruchliwość konformacyjną niezbędną do optymalnej katalizy, czego nie posiadają w środowisku pozbawionym wody. Co ciekawe, w przypadku roztworów wodnych mieszanin eutektycznych, aktywność katalityczna enzymów, bardzo często osiąga wyższe wartości, niż w przypadku tradycyjnego środowiska wodno-buforowego [69–71]. Jednym z ciekawszych przykładów prowadzenia reakcji enzymatycznych w środowisku wodnym zawierającym dodatkowo mieszaninę eutektyczną, jest Praca Cao i wsp. opisująca asymetryczną biokatalizę 1,2-epoksyoktanu, który został zhydrolizowany do (R)-1,2oktanodiolu przy użyciu hydrolazy epoksydowej soi (SEH) [72]. Opisana reakcja w środowisku zawierającym mieszaninę eutektyczną (Ch[Cl]:U;PBS 15% v/v), osiągnęła wydajność 41% oraz czystość enancjomeryczną na poziomie 81%. Podobne obserwację poczyniono w badaniach autorstwa Weiza i wsp., w których to wykorzystano diglikozydazę do przeprowadzenia hydrolizy hesperydiny. We wspomnianej reakcji mieszanina eutektyczna została wykorzystana jako współrozpuszczalnik, aby zniwelować problem niskiej rozpuszczalności flawonoidów w środowisku wodnym [73]. Reakcja deglikozylacji w środowisku mieszaniny eutektycznej chlorek choliny: glicerol lub chlorek choliny:glikol etylenowy (stosunek molowy 1:2)] przeprowadzona została w układzie 40% – 60% bufor NaHPO₄ (v/v)]. W badaniach tych autorzy wykazali wpływ poszczególnych składników wspomnianej mieszaniny eutektycznej na przebieg reakcji jak i na stabilność oraz aktywność enzymu, wskazując, iż zarówno mieszaniny z gliceryną jak i glikolem etylenowym są w stanie znacznie zwiększyć aktywność enzymu. Podobnie Peng i wsp. badali wpływy różnych ilości rozpuszczalników eutektycznych na hydrolazę epoksydową z fasoli mung, w buforze fosforanowym [74]. Wykazali oni, iż 10% (v/v) dodatek układu chlorek choliny:glikol trietylenowy (TEG) (stosunek molowy 1:4) spowodował poprawę czystości enancjomerycznej produktu z 83% do 88%. W przypadku zwiększonej ilości mieszaniny eutektycznej w środowisku reakcji (z 10% do 30%), uzyskano wzrost czystości enancjomerycznej z 88% do 94% (niestety kosztem obniżonej wydajności). Podobne obserwacje w reakcji hydrolizy enzymatycznej opisane zostały w pracy Xu i wsp. Uzyskane wyniki badań nad aktywnością

β -glukozydazy w układzie mieszanina eutektyczna : bufor fosforanowy [(Ch[Cl]:glikol propylenowy 1:2; bufor NaHPO₄ w stosunku 50:50 (v/v)] dla reakcji hydrolizy p-nitrofenylo- β -

glukopiranozydu wykazały, iż aktywność biokatalizatora wzrosła o 225% względem reakcji w czystym buforze fosforanowym [75]. Dodatkowo, powyższe badanie wykazało, iż w przypadku czystej mieszaniny eutektycznej, dochodzi do dezaktywacji enzymu, podczas gdy 6% dodatek wody (v/v) eliminuje ten efekt, maksymalizując parametry kinetyczne enzymu. Podobnie Yang i wsp. w 2019 roku przeprowadzili hydrolizę oleju z orzeszków piniowych w mieszaninie eutektycznej, używając jako biokatalizatora lipazy PS do przygotowania wolnych kwasów tłuszczowych. Hydroliza była przeprowadzana przy użyciu mieszaniny chlorek choliny:mocznik (stosunek molowy 1:2) jako współrozpuszczalnika w wodzie, gdzie eutektyk stanowił dodatek na poziomie 43%. Prowadzona reakcja, pozwoliła uzyskać wydajność reakcji hydrolizy na poziomie 89% - przeliczając na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych otrzymanych jako produkty [76]. Podobnie w przypadku eksperymentu opisanego w pracy Zang i wsp. obecność mieszaniny eutektycznej w środowisku reakcji okazała się kluczowa, dla hydrolizy kwercetyny za pomocą enzymu hydrolizującego rutynę, ponieważ rozpuszczalność kwercetyny w mieszaninach eutektycznych jest nieporównywalnie większa niż w wodzie [0.00215 g/L – w wodzie; 35.5 g/L w układzie Ch[Cl]:1,2-Propanodiol-woda (7%)]. Najwyższa efektywność hydrolizy, w opisywanej reakcji, wynosząca 291,57 mg/g została osiągnięta przy 80% stężeniu mieszaniny eutektycznej (chlorek choliny : glicerol w stosunku molowym 1:1) w wodzie [77].

Opisane powyżej przykłady wykorzystania nietradycyjnych rozpuszczalników w procesach z wykorzystaniem biokatalizatorów to fragment obecnie opisywanej wiedzy w tym zakresie. Niemniej jednak stanowią one dowód na znaczący postęp w rozwoju bardziej zrównoważonych procesów oraz pokazują potencjał enzymów jako skutecznych biokatalizatorów oraz zalety prowadzenia reakcji biokatalizy w środowisku zawierającym mieszaniny eutektyczne.

II Cel pracy

Hipoteza proponowanych badań zakłada, iż mieszaniny eutektyczne zawierające sole choliny mogą znacząco wpływać na efektywność i specyficzność enzymatycznych reakcji hydrolizy. Hipoteza ta opiera się na założeniu, że sole choliny, mogą tworzyć unikalne mikrośrodowiska, które mogą wpływać na strukturę i funkcję enzymów, a tym samym na przebieg reakcji hydrolizy. W szczególności, sole choliny mogą wpływać na stabilność enzymów, ich aktywność katalityczną oraz selektywność wobec substratów. Dodatkowo, hipoteza ta sugeruje, że w zależności od anionu obecnego w soli choliny można zaobserwować różny wpływ na enzymatyczne reakcje hydrolizy, co otwiera możliwość optymalizacji tych reakcji poprzez dobór odpowiedniej soli choliny. Hipoteza proponowanych badań, zakłada, iż zróżnicowany skład mieszanin eutektycznych może mieć wpływ na parametry operacyjne badanych enzymów, a oddziaływania pomiędzy mieszaninami soli choliny oraz strukturą enzymu, mogą dostarczyć podstawowej wiedzy na temat użyteczności mieszanin soli choliny w enzymatycznych reakcjach hydrolizy z udziałem enzymów z grupy hydrolaz.

Hipotezy:

1. Rodzaj anionu obecnego w soli choliny determinuje zdolność soli choliny do tworzenia wiązań wodorowych oraz mieszanin typu DES i LTTM, co bezpośrednio przekłada się na właściwości fizykochemiczne tychże mieszanin (**publikacja P1-P3**).
2. Rodzaj związku HBD ma bezpośredni wpływ na właściwości fizykochemiczne mieszanin soli choliny (**publikacja P1-P3**).
3. Interakcje anionu obecnego w soli choliny oraz rodzaj użytego związku HBD, bezpośrednio wpływa na właściwości fizykochemiczne mieszanin soli choliny oraz na ich zdolność do stabilizacji enzymów. (**publikacja P1-P3**).

4. Stabilność termiczną mieszanin soli choliny ze związkami HBD, jest odzwierciedleniem siły wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie oraz jest zależna od anionu obecnego w danej soli choliny (**publikacja P1-P3**).
5. Stężenie mieszaniny soli choliny ze związkami HBD, w środowisku wodnym, determinuje stabilność oraz aktywność enzymów hydrolitycznych w medium reakcyjnym (**publikacja P1-P2**).
6. Mieszaniny soli choliny, w zależności od stężenia w medium reakcyjnym, wpływają na zwiększenie parametrów operacyjnych enzymów hydrolitycznych, w procesach biokatalizy (**publikacja P1-P3**).

Cele badawcze:

Głównym celem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora, było:

1. Synteza i charakterystyka mieszanin typu DES i LTTM powstałych z różnych soli choliny
2. Badania nad wykorzystaniem mieszanin DES i LTTM jako nowego środowiska lub modyfikatora środowiska reakcji hydrolizy enzymatycznej z udziałem wybranych enzymów z grupy hydrolaz

Cele szczegółowe:

1. Ocena wpływu strukturalnych cech anionów soli choliny na właściwości fizykochemiczne mieszanin soli choliny ze związkami HBD (**publikacja P1-P3**).
2. Ocena wpływu typu związku HBD na właściwości fizykochemiczne mieszanin soli choliny ze związkami HBD (**publikacja P1-P3**).
3. Ocena wpływu soli choliny na aktywność i stabilność enzymów hydrolitycznych (β -galaktozydazy oraz lipazy) w procesach biokatalizy (**publikacja P1-P3**).

4. Ocena wpływu niskich stężeń mieszanin soli choliny ze związkami HBD na stabilizację i aktywność enzymów hydrolitycznych β -galaktozydazy oraz lipazy (**publikacja P1-P3**).
5. Ocena przydatności mieszanin soli choliny ze związkami HBD jako środowiska reakcyjnego w biokatalizie, ze szczególnym uwzględnieniem zwiększenia wydajności i stabilności enzymów (**publikacja P1-P3**).

III Omówienie wyników badań

Praca doktorska opisuje preparatykę soli choliny oraz ich mieszanin ze związkami HBD, charakterystykę fizykochemiczną nowopowstałych mieszanin oraz ich zastosowanie w reakcjach hydrolizy z udziałem wybranych enzymów z grupy hydrolaz – β -galaktozydazy oraz lipazy. Wykorzystane wyniki badań przedstawione zostały w cyklu trzech publikacji:

- [P1]** Jakub Hoppe, Radosław Drozd, Ewa Byzia, Marcin Śmigłak, Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase,
International Journal of Biological Macromolecules, IF = 5.48 MEiN =140
Volume 136, 1 September 2019, Pages 296-304
- [P2]** Jakub Hoppe, Ewa Byzia, Magdalena Szymańska, Radosław Drozd, Marcin Smiglak, Acceleration of lactose hydrolysis using β - galactosidase and deep eutectic solvents
Food Chemistry, IF = 7.51 MEiN = 200
Volume 384, 1 August 2022, 132498
- [P3]** Jakub Hoppe, Ewa Byzia, Magdalena Szymańska, Patryk Bielecki, Radosław Drozd, Marcin Śmigłak An Effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, IF = 5.99 MEiN = 100
Volume 216, August 2022, 112518

Pierwsza publikacja **[P1]** dotyczy porównania wpływu poszczególnych układów mieszanin chlorku oraz octanu choliny na reakcje hydrolizy z udziałem enzymu β -galaktozydazy. Otrzymana w ten

sposób grupa związków została scharakteryzowana fizykochemicznie pod względem gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej oraz temperaturowych przemian fazowych, jak również pod względem wpływu na stabilność oraz aktywność enzymatyczną β -galaktozydazy, w reakcji z syntetycznym substratem - ortonitrofenylo- β -galaktozydem (ONPG).

Druga publikacja [P2] dotyczy analizy wpływu układów mieszanin lewulinianu choliny ze związkami HBD na reakcje hydrolizy z udziałem enzymu β -galaktozydazy. Otrzymana w ten sposób grupa związków została scharakteryzowana fizykochemicznie pod względem gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej oraz temperaturowych przemian fazowych, jak również pod względem wpływu na stabilność oraz aktywność enzymatyczną. Dodatkowo, wyznaczona została kinetyka reakcji dla naturalnego substratu – laktozy – dla enzymu β -galaktozydazy.

Trzecia publikacja cyklu [P3] dotyczy analizy wpływu układów mieszanin mleczanu choliny ze związkami HBD na reakcje hydrolizy z udziałem enzymu lipazy. Otrzymana w ten sposób grupa związków została scharakteryzowana fizykochemicznie pod względem gęstości, lepkości, przewodnictwa, stabilności termicznej oraz temperaturowych przemian fazowych, jak również pod względem wpływu na stabilność oraz aktywność enzymatyczną. Dodatkowo, wyznaczona została temperatura rozfałdowania enzymu oraz wydajność reakcji transestryfikacji z użyciem enzymu lipazy *candida antarctica*.

III.1 Selekcja oraz preparatyka wybranych soli choliny oraz ich mieszanin

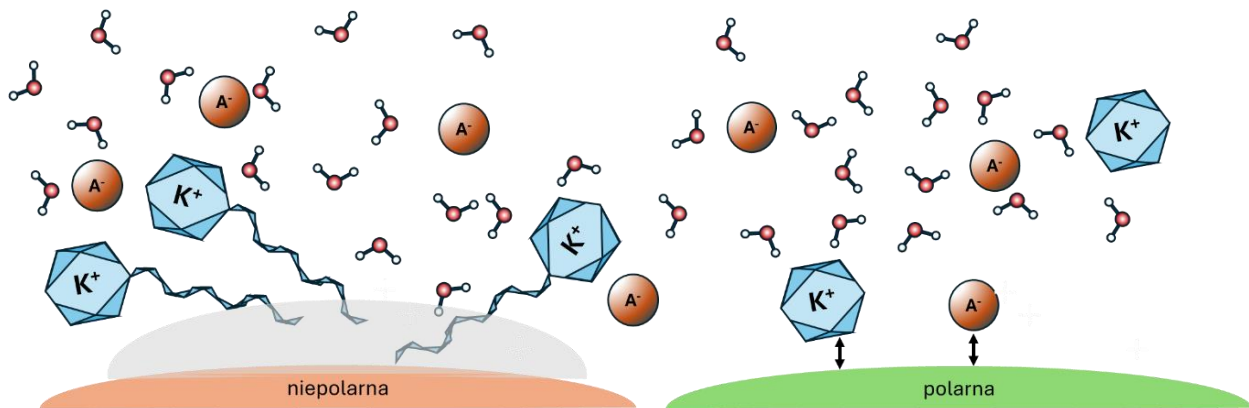
Wspomniana wcześniej specyfika prowadzenia reakcji enzymatycznych, jak również swoista „delikatność” samego biokatalizatora, powoduje, iż większość prowadzonych obecnie badań nad reakcjami enzymatycznymi w nowych rozpuszczalnikach, skupia się wokół dość wąskiej grupy,

zarówno samych rozpuszczalników, jak i enzymów [2,6,22,45,78]. Podyktowane to jest, podstawowym kryterium operacyjnym prowadzenia reakcji biokatalizy – stabilnością oraz aktywnością danego biokatalizatora w danym/nowym rozpuszczalniku [79,80]. Niestety, na chwilę obecną nie istnieje żadna metoda, pozwalająca przewidywać zachowanie wybranego enzymu w wybranym rozpuszczalniku, a większość badań prowadzonych jest metodą przesiewową [38]. Niemniej jednak, ze względu na specyfikę zarówno cieczy jonowych jak i mieszanin eutektycznych (opartych o czwartorzędowe sole amoniowe), za relatywnie dobry punkt startowy do badań wpływu mieszanin eutektycznych soli choline na zdolności operacyjne koenzymów hydrolitycznych, przyjąłem miejsce danego jonu (kationu i anionu) w szeregu liotropowym, zwanym szeregiem Hofmeistera. Szereg Hofmeistera to klasyfikacja jonów według ich właściwości liotropicznych, co oznacza zdolność wsalania i wysalania białek. Skutki tych zmian zostały po raz pierwszy opracowane przez Franza Hofmeistera, który badał wpływ kationów i anionów na rozpuszczalność białek w roztworach wodnych. Hofmeister odkrył szereg soli, które mają spójny wpływ na rozpuszczalność białek, oraz na stabilność ich struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej. Opisane dotychczas wyniki badań wykazały, że u podstaw mechanizmu szeregu Hofmeistera, leży zmienność energii solwatacji między jonami, a otaczającymi cząsteczkami [81,82]. Badania chemii kwantowej sugerują natomiast, iż pochodzenie szeregu Hofmeistera, wynika z oddziaływań elektrostatycznych. Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, iż ze względu na różny charakter jonów (hydrofobowy/hydrofilowy/amfifilowy), czwartorzędowe sole amoniowe (w tym sole choline) oddziałują z niepolarnymi/polarnymi oraz naładowanymi obszarami powierzchni białek na swój własny, specyficzny sposób.

Wiele opisanych w literaturze badań, wykorzystujących metody dynamiki molekularnej, pokazuje (Rys. 3-8), że stężenie kationów przewyższa stężenie anionów na powierzchni białka, niezależnie od ładunku białka [83]. Zaobserwowane zależności oraz opisane wyniki badań, tłumaczone są występowaniem sieci wiązań wodorowych głównie pomiędzy anionami soli, a rozpuszczalnikiem (wodą). Kationy, ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, nie są w stanie w pełni uczestniczyć w sieci wiązań wodorowych z wodą, w taki sam sposób jak aniony. Mogą oczywiście tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, ale zdolność do tworzenia

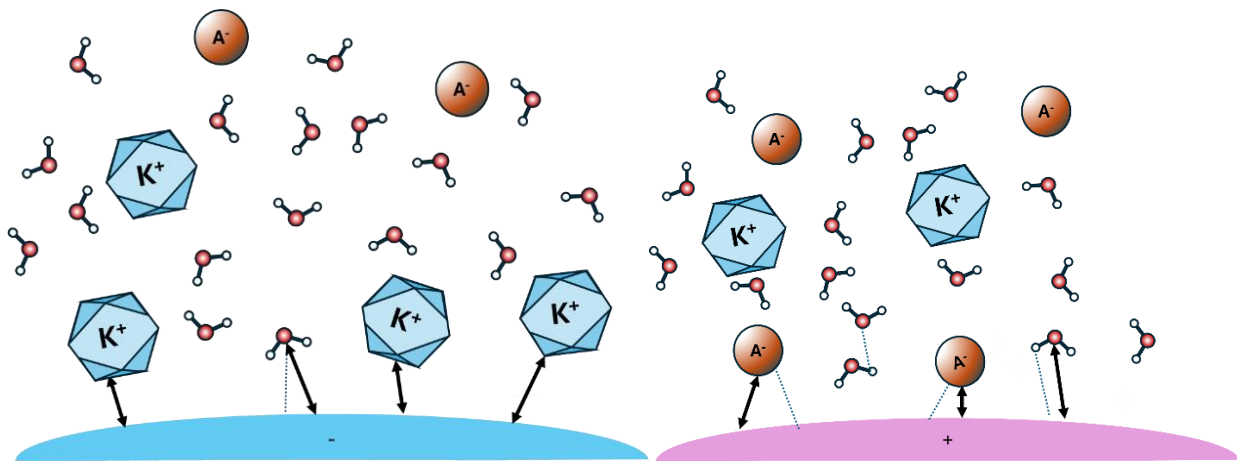
tych wiązań jest często ograniczona przez strukturę kationu oraz dystrybucję ładunku. Kationy z długimi łańcuchami alkilowymi mogą mieć ograniczoną zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z wodą, nie tylko ze względu na hydrofobowy charakter tych łańcuchów. Dodatkowo, ładunek kationu, który może być na tyle mocno rozproszony, że nie ma wystarczająco silnego pola elektrycznego w pobliżu konkretnych atomów, które mogłyby utworzyć wiązania wodorowe.

Aniony natomiast, które mają dodatkowe elektrony, tworzą silniejsze pola elektryczne wokół swoich atomów, co zdecydowanie ułatwia tworzenie wiązań wodorowych i faworyzuje w efekcie udział anionów w tworzeniu sieci wiązań wodorowych z rozpuszczalnikiem (wodą). W rezultacie, kationy w zdecydowanie mniejszym stopniu biorą udział w tworzeniu sieci wiązań wodorowych, co w przypadku reakcji biokatalizy w wodzie, powoduje, iż kationy są niejako zmuszone do interakcji z białkiem, gdyż woda tworzy sieć wiązań wodorowych głównie z anionami. Białka, podobnie jak kationy, ze względu na swą strukturę oraz rozkład ładunku, nie są w stanie w pełni uczestniczyć w sieci wiązań wodorowych z anionami i cząsteczkami wody, co czyni je atrakcyjnym miejscem dla kationów do interakcji. Oczywiście, negatywnie naładowane aminokwasy przyciągają więcej kationów do powierzchni enzymu, ale nadal są w konkurencji z cząsteczkami wody, które mogą tworzyć wiązania wodorowe z aminokwasami powierzchniowymi, w przeciwieństwie do kationów.

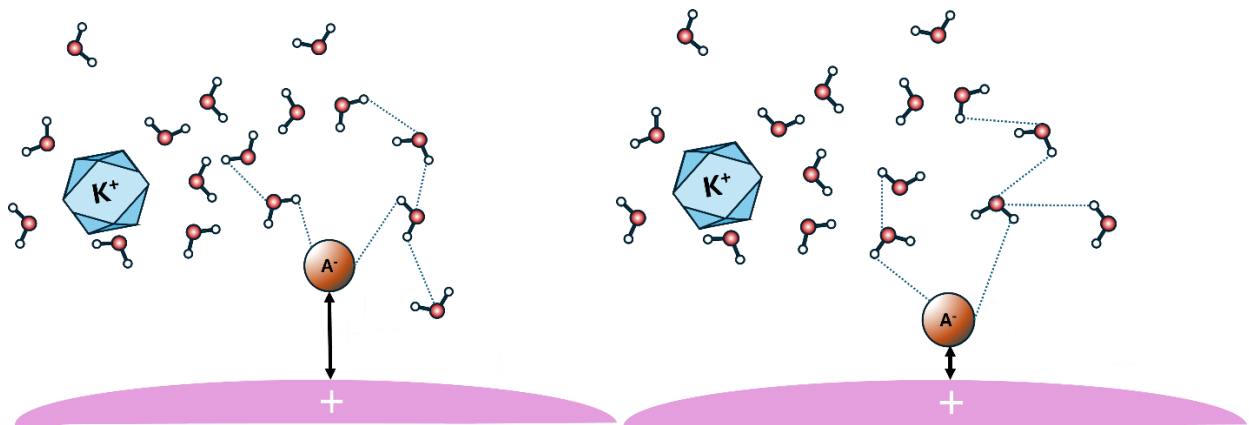


Rys. 3 Schemat interakcji kationu (z lewej) oraz anionu (z prawej), z niepolarnym oraz polarnym fragmentem powierzchni. Po lewej oddziaływania pomiędzy hydrofobowymi aminokwasami przy powierzchni białka, a hydrofobowymi łańcuchami obecnymi w kationie. Po prawej oddziaływania wynikające z tworzących się pomiędzy aminokwasami przy powierzchni białka, a anionem lub kationem z użyciem wiązań wodorowych [84–86].

Chociaż stężenie kationów przy powierzchni białka podawane w literaturze jest jako zwykle wyższe niż anionów to jednak średni czas przebywania anionu przy powierzchni białka opisany jest jako znacznie dłuższy. Ze względu na silne interakcje anionów (m.in w postaci wiązań wodorowych), zarówno z rozpuszczalnikiem jak i z dodatnio naładowanymi aminokwasami na powierzchni białka, w wielu badaniach obliczeniowych podkreśla się właśnie rolę anionów, jako ugrupowań o największym wpływie na białko [83,85,87,87].

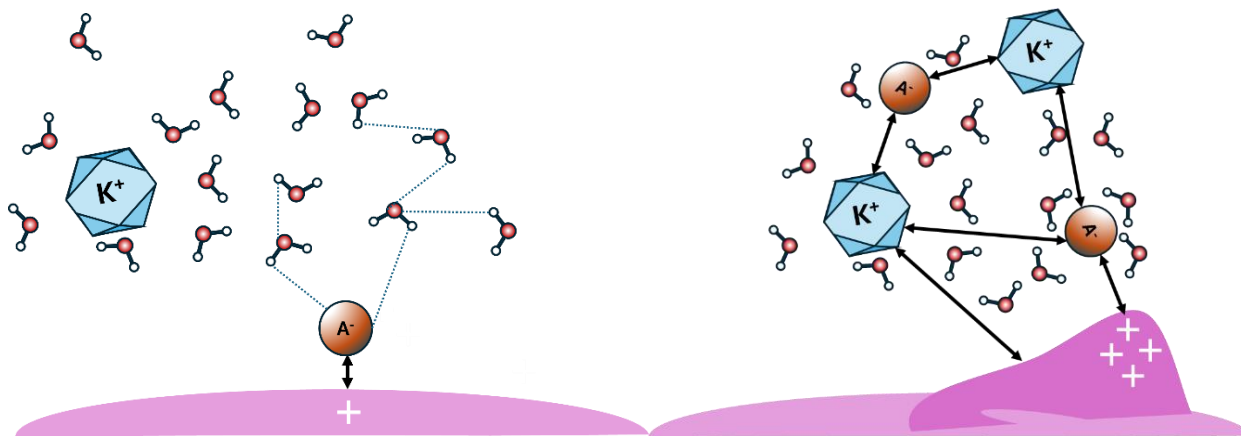


Rys. 4 Schemat interakcji kationy (z lewej) oraz anionu (z prawej), z ujemnie oraz dodatnio naładowaną powierzchnią białka, wskutek oddziaływań elektrostatycznych, przy jednoczesnym konkurencyjnym zachowaniu wody i jej zdolności do wiązania się z białkiem z użyciem wiązań wodorowych. [84–86]



Rys. 5 Schemat interakcji anionu, z dodatnio naładowaną powierzchnią białka, w skutek oddziaływań elektrostatycznych, przy jednoczesnym zachowaniu wiązań wodorowych z wodą [86,88].

Przykładem opisanych powyżej oddziaływań, jest praca Liem Bui-Le i współpracowników, analizująca, przy użyciu spektroskopii NMR, oddziaływania pomiędzy białkiem zielonej fluorescencji, a cieczami jonowymi. Przebadane zostały cieczy jonowe z kationem 1-butylo-3-metyloimidazoliowym oraz 1-butylo-1-metylopirolidyniowym wraz z anionami: chlorkowym, octanowym oraz trfilatowym ($-\text{OSO}_2\text{CF}_3$). Opisane wyniki badań pokazują, że w przypadku obu cieczy jonowych z anionem octanowym, największe przesunięcia wystąpiły głównie wewnątrz białka, bez wyraźnej preferencji dla polarnych czy hydrofobowych łańcuchów bocznych aminokwasów. Podobnie, w przypadku cieczy z anionem chlorkowym, nie było wyraźnej preferencji dla polarnych czy hydrofobowych reszt aminokwasowych. Natomiast w przypadku cieczy z anionem trfilatowym – zaobserwowano znaczące zmiany w przesunięciach sygnałów na widmie ^{15}N NMR. Sygnały pochodzące od hydrofobowych reszt aminokwasów na powierzchni białka, oddziałujące silnie z anionem – tłumaczą tym samym efekt rozfałdowania białka w obecności wspomnianych cieczy. [89]



Rys. 6 Schemat mechanizmu rozkładania enzymu na skutek oddziaływań pomiędzy anionem czwartorzędowej soli amoniowej, a powierzchnią białka [6,86,89].

Podobne obserwacje opisał w swej pracy Weingartner i wsp. odnosząc się szeregu Hoffmeistera, oraz czwartorzędowych soli amoniowych [90]. Zaproponował on podział cieczy jonowych, ze względu na wpływ struktury kationu i anionu na stabilność białka ribonuclease A, zgodnie z szeregiem dla kationów:

$N_{1111}^+ \parallel \text{Ch}^+ > N_{2222}^+ \approx \text{C}_2\text{mim}^+ \approx \text{Gua}^+ > \text{C}_4\text{C}_1\text{py}^+ > \text{C}_4\text{mim}^+ \approx N_{3333}^+ > \text{C}_6\text{mim}^+ \approx N_{4444}^+$
gdzie Ch^+ - kation choliny, Gua^+ - kation guanidyny

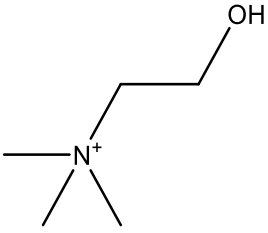
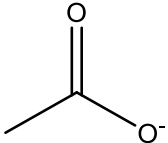
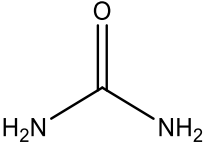
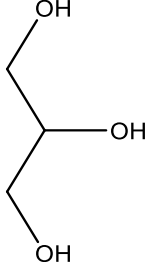
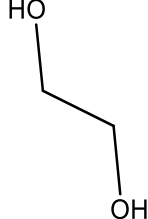
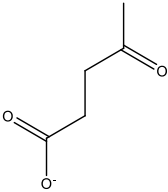
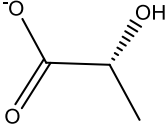
oraz dla anionów:

$\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- \parallel \text{EtSO}_4^- > \text{BF}_4^- > \text{OTf}^- > \text{SCN}^- \approx \text{N}(\text{CN})_2^- \gg \text{NTf}_2^-$

Weingartner wykazał, iż jony po lewej stronie \parallel stabilizują rybonukleazę, podczas gdy jony po prawej destabilizują. Odkrycie to odpowiada klasycznemu szeregowi Hofmeistera, opisującego fakt, że jony kosmotropowe (po lewej) zwiększają, a jony chaotropowe (po prawej) zmniejszają stabilność białka [91–93]. Zarówno pozycja kationu choliny w powyższym szeregu, jak i dotychczas opisane w literaturze oddziaływania czwartorzędowych soli amoniowych z enzymami z klasy hydrolaz, stanowią istotny kontekst dla opisanych w tej pracy badań. Analizując dostępne w literaturze wyniki badań, w szczególności opisujące dotychczasową wiedzę, dotyczącą oddziaływania cieczy jonowych na struktury białkowe oraz rozpatrując opisane szeregi liotropowe dla kationu choliny, w celu zbadania wpływu mieszanin eutektycznych soli choliny na środowisko

reakcji enzymatycznych oraz operacyjność enzymów z klasy hydrolaz, przygotowane zostały mieszaniny przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Mieszanki soli choliny w stosunku molowym 1:2 (HBA:HBD)

HBA		HBD			
 Kation choliny	I				
		Cl⁻ anion chlorkowy	A	B	C
		 anion octanowy	 karbamid	 propano-1,2,3-triol	 1,2-etanodiol
		 anion lewulinianowy			
	 anion mleczanowy				

Przedstawione w powyższej tabeli sole choliny wybrane zostały ze względu na możliwość analizowania soli choliny, względem anionu. Obecnie dostępna wiedza naukowa skupia się, głównie na wyjaśnieniu rodzaju oddziaływań w chlorku choliny oraz na aplikacyjności

wspomnianego związku. Przypisywany przez Abbot i wsp. fenomen dużej depresji temperatury topnienia mieszaniny chlorku choliny z mocznikiem, wynika z oddziaływań pomiędzy anionem choliny (w tym wypadku chlorkiem), a dwoma molami mocznika. Powstające wiązania wodorowe pomiędzy chlorkiem choliny a mocznikiem, odpowiedzialne za powstawanie mieszaniny eutektycznej, powstają również, w przypadku mieszaniny octanu choliny z mocznikiem. Jonowy charakter czwartorzędowych soli amoniowych sprzyja bowiem powstawaniu wiązań wodorowych [88,94–97]. Wspomniane mieszaniny eutektyczne, powstają w wyniku interakcji związków typu HBA i HBD. Rozpatrując wpływ anionu (element HBA) na mieszaninę eutektyczną, najważniejszą z punktu widzenia powstawania mieszaniny jest energia entalpii tworzenia. Entalpia tworzenia mieszaniny (ΔH_{DES}) może być postrzegana jako energia związana z tworzeniem mieszaniny z dwóch lub więcej składników. W termodynamice, entalpia jest miarą całkowitej energii systemu, a entalpia mieszania odnosi się do zmiany entalpii, która zachodzi, gdy określone ilości substancji są mieszane razem przy stałym ciśnieniu. Jest to ilość energii absorbowanej lub wydzielanej podczas procesu mieszania, co może odbywać się z absorpcją ciepła (proces endotermiczny) lub jego wydzielaniem (proces egzotermiczny). W kontekście mieszaniny eutektycznej ΔH_{DES} obejmuje wszystkie zmiany energetyczne wynikające z oddziaływań między cząsteczkami składników mieszaniny, w tym tworzenie i/lub rozrywanie wiązań międzycząsteczkowych. Na przykład, w przypadku mieszanin, gdzie składniki dobrze się ze sobą mieszają i tworzą silne oddziaływania międzycząsteczkowe, takie jak wiązania wodorowe lub oddziaływania dipol-dipol, ΔH_{DES} może być ujemna (proces egzotermiczny), co wskazuje na to, że energia jest wydzielana do otoczenia. Z drugiej strony, jeśli oddziaływania między składnikami są słabsze niż oddziaływania między cząstkami tych samych substancji, proces mieszania może wymagać absorpcji energii (proces endotermiczny), co skutkuje dodatnią wartością ΔH_{DES} . W przypadku mieszanin eutektycznych soli choliny, ilość energii entalpii związanej z tworzeniem mieszaniny z czystych składników (odzwierciedlającą różnicę między energią oddziaływań w mieszaninie, a energią oddziaływań w czystych składnikach), obrazuje siłę wiązań wodorowych obecnych w danej mieszaninie. Siłę tę również, można zaobserwować podczas dynamicznego pomiaru lepkości danej mieszaniny. Rozpatrując entalpię tworzenia wiązań wodorowych w mieszaninie, z punktu widzenia wyboru anionów w soli choliny, należy zwrócić uwagę, na następujące zależności.

Tabela 2 Interakcje pomiędzy związkami HBA i HBD w zależności od grup funkcyjnych,

HBA	HBD			
	Sól choliny	Mocznik	Glicerol	Glikol etylenowy
Chlorek choliny	Akceptor: Cl ⁻ ; Donor: NH ₂	Akceptor: Cl ⁻ ; Donor: 3x -OH	Akceptor: Cl ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: Cl ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH
Octan choliny	Akceptor: -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: -COO ⁻ ; ' Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH
Lewulinian choliny	Akceptor: -COO ⁻ , CO; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: -COO ⁻ , CO; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: -COO ⁻ , CO; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor: -COO ⁻ , CO; Donor: Kation choliny -OH
Mleczan choliny	Akceptor: -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor i Donor: -OH, -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor i Donor: -OH, -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH	Akceptor i Donor: -OH, -COO ⁻ ; Donor: Kation choliny -OH

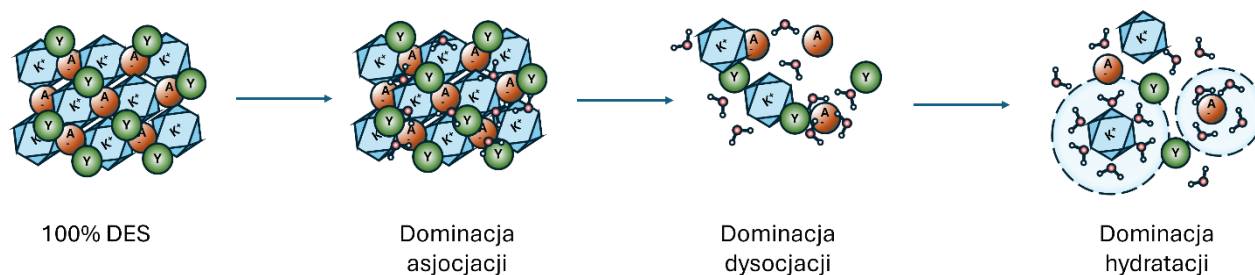
Zestawiając powyższe interakcje pomiędzy związkiem typu HBA, a HBD z obecną literaturą [88], potencjalne interakcje mieszanin eutektycznych z enzymem, rozważane są głównie z punktu widzenia ilości oraz siły wiązań wodorowych, obecnych pomiędzy związkami typu HBA i HBD, wynikających zarówno z obecności specyficznych grup funkcyjnych, jak i z rozkładu ładunku na powierzchni HBA. Silniejsze interakcje – niższa wartość entalpii tworzenia mieszaniny ΔH_{DES} pomiędzy składnikami mieszaniny oznaczają większą „łatwość” powstawania mieszaniny eutektycznej.

Tabela 3 Entalpia ΔH_{DES} wybranych soli choliny oraz związków typu HBD

HBA	Entalpia ΔH_{DES}				
	Sól choliny	Mocznik	Glicerol	Glikol etylenowy	Potencjalne interakcje z aminokwasami
Chlorek choliny	-97 J/mol	-78 J/mol	-108 J/mol		głównie z aminokwasami hydrofobowymi jak leucyna lub izoleucyna, ze względu na silne wiązania wodorowe z Cl ⁻ .
Lewulinian choliny	Niska: Silne wiązania z grupami -COO ⁻ i CO	Niska: Bardzo silne wiązania z grupami -COO ⁻ i CO	Niska: Silne wiązania z grupami -COO ⁻ i CO		Silne interakcje z aminokwasami polarnymi jak seryna, treonina; oraz z aminokwasami o charakterze zasadowym, przez grupę -COO ⁻ , np. lizyna, arginina.
Mleczan choliny	Bardzo niska: Wielokrotne wiązania wodorowe	Bardzo niska: Wielokrotne, bardzo silne wiązania	Bardzo niska: Wielokrotne wiązania wodorowe		Wysoka reaktywność z polarnymi i kwaśnymi aminokwasami (np. asparagina, glutamina) oraz możliwe oddziaływania z histydyną poprzez grupę -COO ⁻ .

HBA	Entalpia ΔH_{DES}			
Sól choliny	Mocznik	Glicerol	Glikol etylenowy	Potencjalne interakcje z aminokwasami
Octan choliny	Średnia: Stabilne wiązania z grupą $-\text{COO}^-$	Średnia: Bardzo stabilne wiązania z grupą $-\text{COO}^-$	Średnia: Stabilne wiązania z grupą $-\text{COO}^-$	Możliwe oddziaływania z aminokwasami bazowymi (np. lizyna, arginina) oraz polarnymi przez wiązania wodorowe z grupą $-\text{COO}^-$.

Zestawione w tabeli powyżej dane [22], dotyczące entalpii tworzenia (ΔH_{DES}), oraz wspomniane wcześniej badania dotyczące oddziaływań pomiędzy mieszaniną eutektyczną (lub cieczą jonową), a wodą (roztwory mieszanin), obrazują siłę oddziaływań elektrostatycznych oraz wiązań wodorowych w mieszaninach eutektycznych. Zgodnie z Chunyan Ma i wsp. [22] mieszaniny eutektyczne zachowują swoje właściwości w zakresie mieszaniny z wodą, w zakresie stężeń od 0-45% (woda:DES). Entalpia tworzenia tych związków jest tak niska, że mimo tak dużego rozcieńczenia, przewaga jest par HBA:HBD względem w roztworze, względem oddziaływań pomiędzy parami HBA:H₂O i HBD:H₂O.



Rys. 7 Proponowany schemat oddziaływań w układzie mieszanina eutektyczna-woda, pomiędzy składnikami mieszaniny [22] K^+ – kation; A^- – anion; Y – związek HBD; H_2O

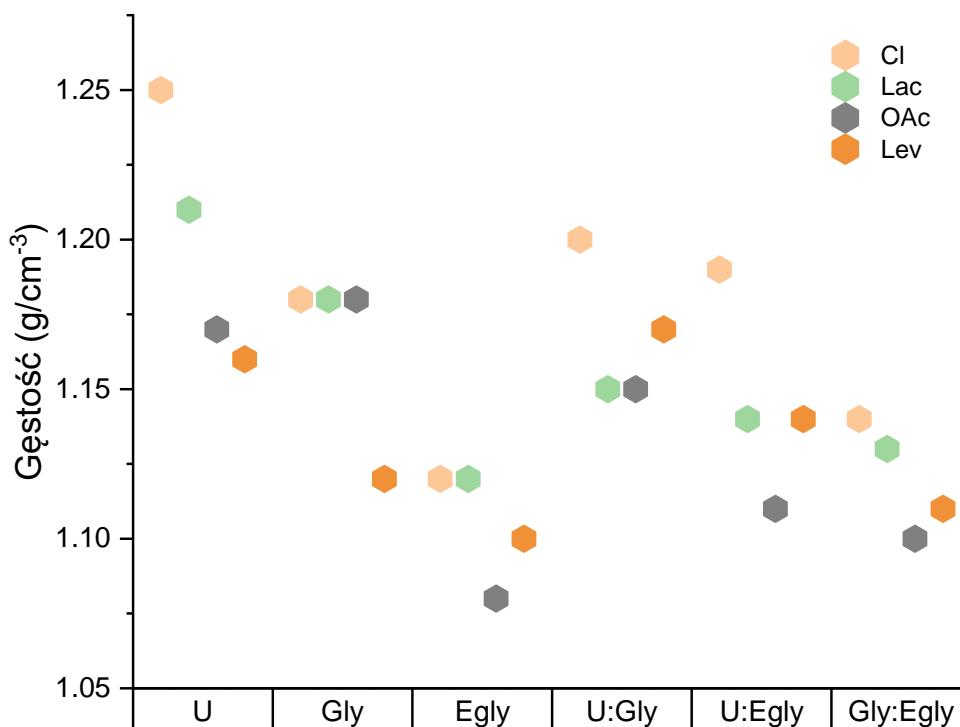
W swoich badaniach Couthinio i wsp. dowiódł iż niskie wartości entalpii tworzenia mieszaniny eutektycznej, należy przypisać głównie właściwościom kationu czwartorzędowej soli amoniowej [98]. Ponieważ kation choliny jest biologicznie powszechnie występującą cząsteczką (on i jego analogi występują w organizmach żywych [99]), odgrywające pierwszoplanową rolę aniony soli choliny, wybrane zostały również, ze względu na ich potencjalną biokompatybilność.

Proces syntezy powyższych soli choliny, dla każdej soli, poza komercyjnie dostępnym chlorkiem choliny, przebiegał według reakcji sól + kwas, gdzie jako substrat wyjściowy stosowany był wodorowęglan choliny, dzięki czemu ubocznym produktem było CO_2 i H_2O . Otrzymane w powyższy sposób sole choliny, zostały następnie wysuszone do zawartości wody poniżej 2%, a następnie zmieszane z 1 lub 2 związkami HBD w stosunku molowym, odpowiednio 1:2 oraz 1:1:1. Otrzymane w powyższy sposób mieszaniny eutektyczne tych soli zostały następnie wysuszone w celu obniżenia zawartości wody poniżej 2%, a następnie scharakteryzowane, w celu porównania wpływu poszczególnych soli na aktywność operacyjną wybranych enzymów hydrolitycznych w nowym środowisku.

III.2 Gęstość

Gęstość, jest jedną z kluczowych charakterystyk rozpuszczalnika. W przypadku mieszanin soli choliny opisanych w publikacjach [P1-P3], można zauważyć, iż mieszaniny te wykazują większą gęstość niż woda. Pomimo oczywistości otrzymanych wyników, należy zwrócić uwagę, iż mieszaniny eutektyczne nie należą do grupy prostych rozpuszczalników molekularnych. W przypadku mieszanin eutektycznych soli choliny, gęstość badanej mieszaniny dostarcza również informacji o interakcjach międzycząsteczkowych, obrazując w ten sposób swoje nadmiarowe właściwości molowe, które to mają bezpośredni wpływ na kwestię zachowania gęstości. Zespół badawczy Basaiahgari i wsp. przeprowadził pomiary gęstości glikolu etylenowego, glikolu dietylenowego, glikolu trietylenowego oraz glicerolu jako HBD i soli chlorku benzyloamoniowego jako związku typu HBA [100]. Ich wyniki wykazały, że mieszaniny eutektyczne na bazie glikolu etylenowego mają niższą gęstość niż mieszaniny eutektyczne na bazie glicerolu. Zaobserwowany wzrost gęstości mieszaniny, w której glikol etylenowy został zastąpiony glikolem dietylenowym i trietylenowym oraz glicerolem wykazał, iż zwiększenie liczby grup funkcyjnych -OH w związku typu HBD, powoduje powstawanie większej liczby wiązań wodorowych. Zwiększona ilość wiązań wodorowych natomiast, przyczynia się do większego usieciowania otrzymanego rozpuszczalnika, co zmniejsza dostępną wolną objętość molową. Podobne obserwacje podczas badań poczyniła

grupa badawcza Shafie i wsp. [15], obserwując różne wartości gęstości, przy różnych stosunkach molowych chlorku choliny w mieszaninie eutektycznej z kwasem cytrynowym. Wyniki prowadzonych badań wykazały, że wraz ze wzrostem ilości chlorku choliny w stosunku do kwasu cytrynowego gęstość malała. Z drugiej strony wraz ze wzrostem ilości kwasu cytrynowego – zwiększała się gęstość. Dodatkowo, badania przeprowadzone przez Basaiahgari i wsp. wykazały, że zwiększenie stosunku molowego związku HBD, sprzyja asocjacji między cząsteczkami HBD, sprzyjając większemu usieciowaniu mieszaniny eutektycznej, czego efektem jest właśnie zwiększona gęstość [100]. W związku z powyższym, łatwo zauważyć, iż zachowanie gęstości zarówno w cieczach jonowych jak i mieszaninach eutektycznych zależy jest, od nadmiarowych właściwości molowych mieszaniny. Uzyskane dane dotyczące gęstości poszczególnych mieszanin soli choliny ze związkami HBD (przedstawione w publikacjach [P1]-[P3]) obrazują powyższą teorię objętości nadmiarowej substancji, dla mieszanin zawierających jako związek HBD – glicerol. Przedstawione dane na wykresie (Rysunek 2) pokazują, iż dla soli choliny zawierającej anion chlorkowy, octanowy, mleczanowy – wartości gęstości są bardzo do siebie zbliżone (chlerek choliny vs. mleczan choliny; HBD – glicerol; $\Delta \approx 680 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Zjawisko to zostało zaobserwowane również dla pozostałych mieszanin przedstawionych na wykresie (Rysunek 3) przy różnych konfiguracjach mieszaniny (inny anion – inny HBD). Opisane wyniki sugerują, zgodnie z teorią nadmiarowych właściwości molowych mieszanin rzeczywistych, iż tworzona sieć wiązań wodorowych oraz ich struktura przestrzenna zawiera odpowiednio dużo wolnej przestrzeni (wolnych wakatów) aby pomieścić, wymienione aniony, bez względu na ich wielkość. Potwierdzenie powyższych badań, opisuje również Visser w swojej pracy, w której przedstawione zostały wyniki badań eksperymentu polegającego na zwiększaniu stosunku molowego soli organicznej do HBD. Otrzymane w tym eksperymencie wyniki, wykazały, że dodanie chlorku choliny do glicerolu powoduje zmniejszenie gęstości – co pokazuje, iż w przypadku mieszanin soli choliny, gęstość nie jest wielkością addytywną [101]. Analizując otrzymane wyniki badań, w publikacjach [P1-P3] zauważyć można, iż wartości gęstości względem anionu w soli choliny w mieszaninie, można uszeregować w kolejności chlerek > mleczan > octan > lewulinian. Nie jest to jednak wyznacznikiem siły wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie, a efektem struktury przestrzennej powstałej sieci wiązań wodorowych.



Wykres 1 Wartości gęstości mieszanin eutektycznych w temperaturze 25 st. Celsjusza, względem związków typu HBD

W przypadku analizy wpływu gęstości na reakcje biokatalityczne, należy zauważyć, iż enzym katalizuje reakcję tak skutecznie, że etapem ograniczającym szybkość katalizy jest dyfuzja substratu do miejsca aktywnego lub dyfuzja produktu na zewnątrz [102]. Zjawisko to nazywa się perfekcją kinetyczną lub perfekcją katalityczną, ponieważ wówczas szybkość katalizy enzymów jest ustalana przez reakcję kontrolowaną przez dyfuzję. Większość enzymów katalizuje swoje reakcje w tempie 1000-10 000 razy wolniejszym niż ten limit ustanowiony przez szybkość dyfuzji. Wynika to zarówno z ograniczeń chemicznych trudnych reakcji, jak i ograniczeń ewolucyjnych, które powodują, że tak wysokie szybkości reakcji nie zapewniają żadnej dodatkowej sprawności [102]. Porównując reakcje enzymatycznej z udziałem enzymów z grupy hydrolaz, naturalnym środowiskiem odniesienia jest woda. W związku z tym, że woda ma mniejszą gęstość niż badane

rozpuszczalniki, strumień dyfuzji substratu, ma wyższe wartości w wodzie niż w mieszaninach eutektycznych i cieczach jonowych. Faworyzuje to wodę jako najlepszy rozpuszczalnik do enzymatycznych reakcji hydrolizy. Niemniej jednak, zgodnie z wynikami badań [78], wiele enzymów, w tym również wykorzystane przeze mnie w badaniach, katalizują reakcje hydrolizy w rozpuszczalnikach organicznych lub cieczach jonowych, przy znikomej ilości wody, traktując wodę jako substrat. W tego rodzaju rozpuszczalnikach, ilość wody potrzebna do prowadzenia reakcji jest zdecydowanie mniejsza. Wiele enzymów, w tym enzymy opisane w publikacjach [P1-P3], katalizują reakcje w rozpuszczalnikach organicznych czy też w cieczach jonowych gdzie wody znajduje się mniej lub nawet zdecydowanie mniej w stosunku wagowym, względem rozpuszczalnika stosowanego jako środowisko reakcji [84]. W naturalnym środowisku, w konkretnym przedziale komórkowym, w cytozolu, enzym występuje w obecności szerokiej gamy różnego rodzaju związków chemicznych zarówno organicznych jak i nieorganicznych. Natywna struktura enzymu, znajduje się wówczas w specyficznej mieszaninie związków, gdzie aktywność oraz struktura wody oraz aktywność i stabilność enzymu są zależne od pozostałych rozpuszczonych związków takich jak sole czy związki organiczne [103]. Rozpatrując zatem wpływ gęstości soli choliny na reakcje hydrolizy z udziałem enzymów z klasy hydrolaz, należy pamiętać, iż tak naprawdę, to struktura wiązań wodorowych odgrywa w tym aspekcie kluczową rolę, a także różnice w wielkości i strukturze anionów zawartych w solach choliny. Powyższe aspekty determinują bowiem poziom usieciowania rozpuszczalnika, stabilność biokatalizatora w środowisku oraz prędkość dyfuzji substratu do centrum aktywnego biokatalizatora.

III.3 Lepkość

Wyniki prezentowane w poniższej sekcji, zostały zaczerpnięte z publikacji [P1-P3], w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru lepkości opisywanych mieszanin.

Lepkość danej substancji lub mieszaniny substancji jest parametrem o bardzo dużym znaczeniu dla praktycznego zastosowania. Większość soli choliny, tworzy mieszaniny eutektyczne typu DES lub LTTM, których to lepkość jest stosunkowo wysoka w temperaturze pokojowej (> 100 cP) w porównaniu do rozpuszczalników molekularnych.

Dodatkowo, obecność rozległej sieci wiązań wodorowych, oraz obecność oddziaływań elektrostatycznych i *van der Waalsa*, występujących w powstałej mieszaninie również prowadzi do zwiększonej lepkości badanego układu [104,105] Ponieważ wartości lepkości są silnie skorelowane z ilością wolnej objętości molowej oraz prawdopodobieństwem znalezienia otworów w powstałej strukturze sieci wiązań wodorowych (o wymiarach odpowiednich dla jonów soli choliny [106–108] różnice w wartościach lepkości otrzymanych dla poszczególnych soli choliny, można przypisać bezpośrednio wpływowi struktury anionu soli choliny. Efekt ten wynika z mechanizmu „kompleksowania” anionu czwartorzędowej soli amoniowej przez związki zdolne do oddawania wiązań wodorowych (HBD) [109]. Kompleksowanie jest przyczyną oddalenia się anionu od kationu w danej soli, a dyslokacja ta, powoduje obniżenie temperatury topnienia soli stosowanej w mieszaninie eutektycznej. Mimo iż, powstałe mieszaniny eutektyczne zachowują się jak ciecze jonowe i wykazują właściwości bardzo do nich podobne, ze względu na wyższą masę cząsteczkową, cechują się wyższą lepkością niż ciecze jonowe czy też konwencjonalne rozpuszczalniki. Mimo wyższych wartości lepkości, podobnie jak w przypadku cieczy jonowych, zależność intensywności oddziaływań międzycząsteczkowych (oddziaływanie wiązania wodorowego, dyspersyjnego i kulombowskiego) wraz ze wzrostem temperatury mieszaniny eutektycznej zmniejsza się, wpisując się w trend zgodny z teorią Arrheniusa, w której to lepkość cieczy zmniejsza się wraz ze wzrostem temperatury [110]. Na podstawie uzyskanych danych, przedstawionych w publikacjach [P1]-[P3] można zaobserwować, iż mieszaniny

zawierające mocznik wykazują największy spadek lepkości wraz ze wzrostem temperatury – co wynika z osłabienia siły wiązań wodorowych w mieszaninie. Z drugiej strony te same mieszaniny eutektyczne (zawierające mocznik), wykazują najwyższą lepkość w temperaturze pokojowej, spośród wszystkich obserwowanych mieszanin, co potwierdza z kolei obecność rozbudowanej sieci wiązań wodorowych. Warto również zauważyć, że obecność drugiego związku typu HBD w mieszaninie obniża całkowitą lepkość mieszaniny, prawdopodobnie z powodu niejednorodności powstałej sieci wiązań [111]. Niemniej jednak, analizując lepkość mieszanin należy pamiętać o właściwościach nadmiarowych, występujących w danej mieszaninie. Co istotne, nadmiarowe właściwości termodynamiczne ciekłych mieszanin są ściśle związane z oddziaływaniami międzycząsteczkowymi między składnikami mieszaniny. Wynika to między innymi z budowy chemicznej składników – różne geometrie odmiennych cząsteczek wywołują różne siły międzycząsteczkowe, a także odmienną reorientację cząsteczek w przestrzeni nowopowstałego rozpuszczalnika [6] – co również tłumaczy, podobieństwa w dynamice spadku wartości lepkości pomiędzy mieszaninami soli choliny zawierającymi sól o innym anionie, w mieszaninie z tym samym HBD. Ponad to, trójskładnikowe mieszaniny soli choliny, ze względu na zmniejszoną jednorodność przestrzenną, wykazują najmniejszy spadek lepkości wraz ze wzrostem temperatury. Niemniej jednak, zgodnie z pracą Toledo i wsp. mimo istotnych informacji z punktu widzenia właściwości fizykochemicznych, lepkość mieszanin eutektycznych, a także ich roztworów wodnych nie ma wpływu na stabilność oraz aktywność enzymatyczną, i jako wartość sama w sobie, nie jest istotna z punktu widzenia kinetyki reakcji katalizowanej enzymatycznie [112]. Niemniej jednak, z punktu widzenia oddziaływania rozpuszczalnika na białko, warto rozpatrzyć wartości lepkości mieszanin soli choliny w kontekście siły wiązań wodorowych, które można wyrazić w funkcji energii aktywacji przepływu (Ea). Energia aktywacji przepływu jest związana z siłą wiązań wodorowych w cieczy. Wiązania wodorowe są jednym z kluczowych rodzajów oddziaływań międzycząsteczkowych wpływających na właściwości reologiczne cieczy, w tym na lepkość. Dla układów eutektycznych, których przyczyną powstania jest siła oddziaływania wiązań wodorowych, wielkość energii aktywacji przepływu dostarcza informacji o sile wszystkich oddziaływań, w tym o sile wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie. Ponieważ energia aktywacji przepływu odnosi się do energii, która jest potrzebna do

umożliwienia cząsteczkom przesuwania się względem siebie tak, aby ciecz mogła płynąć. W kontekście wiązań wodorowych, E_a odzwierciedla więc energię potrzebną do "przerwania" wiązań wodorowych w procesie przepływu. **Silniejsze wiązania wodorowe** zwiększają lepkość, ponieważ wymagają większej energii do przerwania wiązań, co pośrednio zwiększa wartość E_a . **Słabsze wiązania wodorowe** prowadzą do niższej lepkości, ponieważ mniejsza energia jest potrzebna do umożliwienia cząsteczkom przesuwania się względem siebie. Warto zaznaczyć, że energia aktywacji przepływu nie jest wyłącznie determinowana przez siłę wiązań wodorowych, inne typy oddziaływań międzycząsteczkowych oraz struktura i rozmiar cząsteczek również odgrywają rolę [113]. Jednak w kontekście mieszanin, gdzie wiązania wodorowe są dominującym mechanizmem oddziaływań, można oczekiwać silnej korelacji między siłą tych wiązań, a energią aktywacji przepływu. Korzystając z przekształcenia równania Arrheniusa

$$\eta = A \cdot \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right)$$

Gdzie:

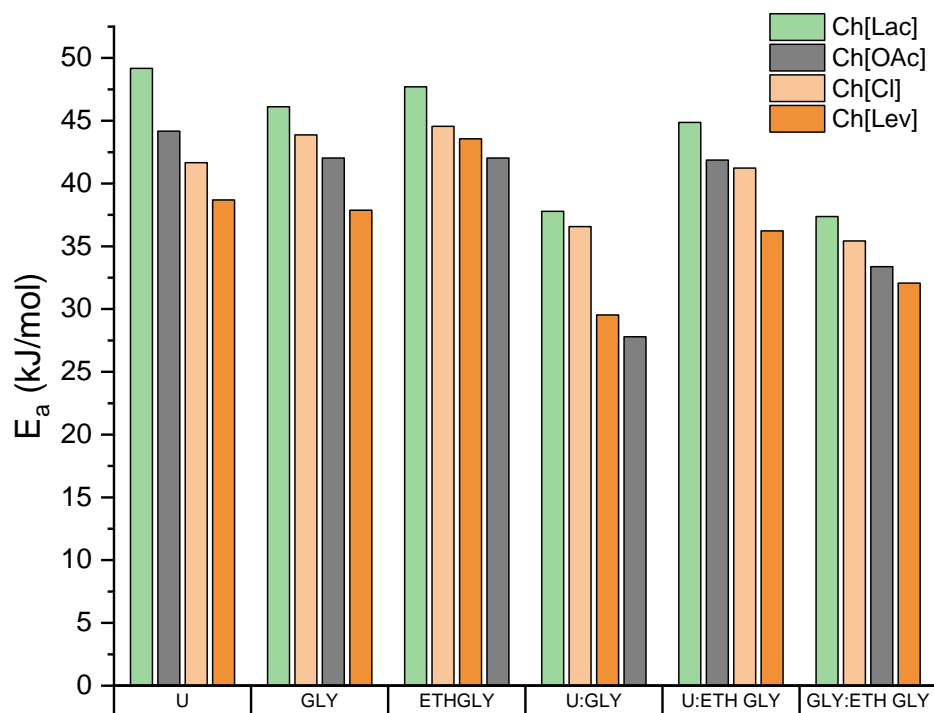
- η oznacza lepkość,
- A jest czynnikiem pre-eksponencjalnym, zależnym od mikroskopowych szczegółów układu,
- E_a to energia aktywacji przepływu,
- R jest uniwersalną stałą gazową równą $8.314 \frac{J}{mol \cdot K}$
- T reprezentuje temperaturę w skali Kelvina.

w celu wyznaczenia energii aktywacji przepływu, stosując analizę zmian lepkości przy różnych temperaturach, dla dwóch temperatur T_1 i T_2 oraz odpowiadających im lepkości η_1 i η_2 , wyznaczyć wzór na Energię aktywacji (E_a). Równanie Arrheniusa przyjmuje wówczas postać:

$$E_a = R \left(\frac{\ln\left(\frac{\eta_2}{\eta_1}\right)}{\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}} \right)$$

Powyższe równanie umożliwia obliczenie energii aktywacji przepływu E_a na podstawie zmian lepkości η przy różnych temperaturach, co jest kluczowe w badaniach reologicznych. Pozwala to na zrozumienie, jak zmienia się lepkość cieczy w reakcji na zmianę temperatury, co jest ściśle powiązane z siłą wiązań wodorowych oraz innymi oddziaływaniami międzycząsteczkowymi w analizowanym systemie. W przypadku mieszanin eutektycznych soli choliny, jest to kluczowa informacja, o sile oddziaływań wewnątrz mieszaniny. Dla analizowanych w tej pracy układów mieszanin eutektycznych soli choliny, przedstawione na wykresie (Rysunek 4) wartości energii aktywacji przepływu, obrazują, iż:

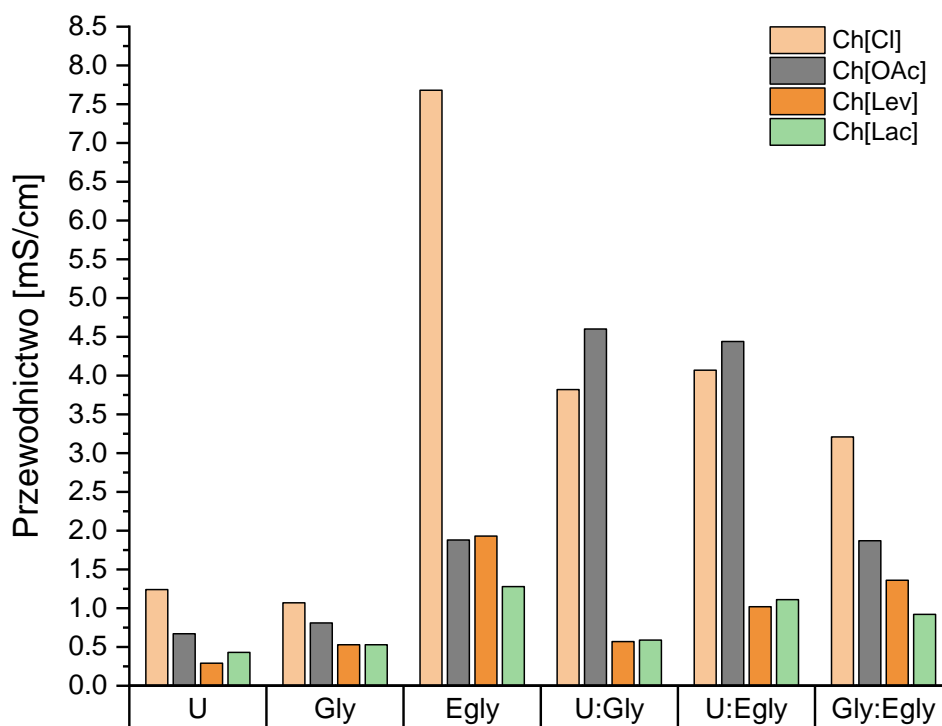
1. Najśłabsze oddziaływania wodorowe spośród badanych układów są obecne w mieszaninach octanu choliny oraz lewulinianu choliny, w układach zarówno z glicerolem jak i mocznikiem. Mieszaniny te wykazują niższe wartości E_a , co sugeruje słabsze oddziaływania wiązań wodorowych w mieszaninie.
2. Mieszaniny z glicerolem i/lub glikolem etylenowym w układach z chlorkiem choliny lub mleczanem choliny wykazują większe wartości E_a , co zgodnie z literaturą [114], wskazuje na bardziej złożone oddziaływania wiązań wodorowych w mieszaninie.
3. Najwyższe wartości E_a spośród badanych mieszanin eutektycznych, przypisać należy do mieszanin zawierających mocznik oraz mleczan choliny.



Wykres 2 Wykres energii aktywacji przepływu dla mieszanin soli choliny, dla zakresu pomiarów lepkości dynamicznej w zakresie temperatur 25-50 st. Celsjusza. Wykres przedstawia ilość energii potrzebnej do aktywacji ruchu cząstek względem siebie

III.4 Przewodnictwo

Wyniki prezentowane w poniższej sekcji, zostały zaczerpnięte z publikacji [P1-P3], w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru przewodnictwa.



Wykres 3 Wykres wartości przewodnictwa dla analizowanych mieszanin soli choliny w zależności od rodzaju związku HBD w mieszaninie

W podstawowym sensie przewodnictwo jonowe określa ilościowo, jak łatwo materiał przewodzi przepływ jonów lub jak łatwo materiał pozwala na przepływ prądu poprzez mechanizm przewodnictwa jonowego. Przewodność jonowa mieszanin eutektycznych soli choliny jest zwykle niższa niż wysokotemperaturowych stopionych soli ($6,17 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ dla mieszaniny eutektycznej chlorku choliny w $20 \text{ }^\circ\text{C}$ i $350 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ dla BiCl_3 w $200 \text{ }^\circ\text{C}$ [115]). Według Abbotta i wsp. różnica w przewodności wynika zarówno z rozmiaru jonów, jak i lepkości układu, które są związane ze

wspomnianą wcześniej teorią wakatów oraz wolnej objętości molowej [14,116]. W swojej pracy Abbot i wsp. wykazali bowiem, iż tzw. wolną objętość molową mieszanin eutektycznych można zwiększyć, zmniejszając wielkość kationów i zastępując HBD związkami fluorowanymi. Spowodowany w ten sposób wzrost wolnej objętości przyczynia się do zmniejszenia lepkości, co zwiększa przewodnictwo jonowe mieszaniny eutektycznej. Teoria wakatów została również wykorzystana do opisanego odwrotnego wpływu na przewodnictwo mieszanin eutektycznych. Kityk i in. odnotowali zmiany przewodnictwa soli NiCl_2 rozpuszczonej w Ch[Cl]:U w zakresie temperatur od 25 do 80 °C [117]. Ze względu na wielkość jonów, rozpuszczenie NiCl_2 w mieszaninie eutektycznej chlorku choliny z mocznikiem, zmniejszyło jej przewodnictwo. Zgodnie z teorią nadmiarowych objętości molowych, wielkość większego jonu zmniejsza wielkość wolnych przestrzeni w roztworze, co utrudnia transport jonów, a w konsekwencji zwiększa lepkość i obniża przewodnictwo. W związku z powyższym, analizując wyniki dotyczące przewodnictwa jonowego w publikacjach [P1]-[P3] należy zauważyć, iż wszystkie przebadane mieszaniny eutektyczne soli choliny wpisują się w dotychczasowe badania naukowe, i im mniejsza różnica pomiędzy wielkością kationu i anionu tym niższe przewodnictwo [2,5,6].

Tabela 4 Tabela wielkości kationu oraz anionu analizowanych soli choliny [116]

	jon	rozmiar [Å]
kation	choliny	3.29
	chlorkowy	1.71
anion	octanowy	1.84
	lewulinowy	2.34
	mleczanowy	2.72

III.5 Stabilność termiczna soli choliny i ich mieszanin

Wszystkie wyniki z poniższej sekcji są zaczerpnięte z publikacji [P1 – P3], w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru stabilności termicznej opisywanych mieszanin.

W przypadku mieszanin eutektycznych, stabilność termiczna, jest również użytecznym parametrem, pozwalającym określić siłę wiązań wodorowych w danej mieszaninie, wpływającą na jej właściwości fizykochemiczne. Sole choliny w czystej postaci, posiadają określone temperatury rozpadu (Tabela 5). Odchylenia od tych wartości, obecne w mieszaninach eutektycznych tychże soli, zgodnie z dotychczasowymi badaniami naukowymi [118] są wartością wypadkową sumy oddziaływań w mieszaninie pomiędzy związkiem typu HBA (czwartorzędową solą amoniową), a związkami typu HBD. W tym głównie oddziaływań wiązań wodorowych. W przypadku analizowanych stabilności termicznych soli choliny w czystej postaci, stabilność termiczną można uszeregować, zgodnie z poniższą tabelą (Tabela 6) względem anionu: anion chlorkowy > anion mleczanowy > anion lewulinowy > anion octanowy.

Tabela 7 Wartości temperatury rozkładu analizowanych soli choliny

Sól choliny	T _{onset} [°C]
Ch[Cl]	350.76
Ch[Lac]	212.54
Ch[Lev]	188.27
Ch[OAc]	176.74

Mieszaniny tychże soli natomiast, w układach ze związkami HBD, nie podążają za przedstawionym powyżej szeregiem. Przedstawione na poniższym wykresie (Rysunek 5) wartości T_{onset 5%} [°C] pokazują, iż mieszaniny z chlorkiem choliny, nie są mieszaninami najbardziej stabilnymi termicznie w tej grupie. Dla sześciu różnych mieszanin, w czterech przypadkach najstabilniejsze termicznie są mieszaniny zawierające mleczan choliny w tej grupie. Również w przypadku mieszanin zawierających octan choliny, mimo najniższej temperatury rozpadu wspomnianej soli, mieszaniny

octanu choliny z mocznikiem oraz glicerolem (1:1:1 mol:mol) wykazują najwyższą stabilność termiczną, spośród mieszanin z wymienionymi związkami HBD.

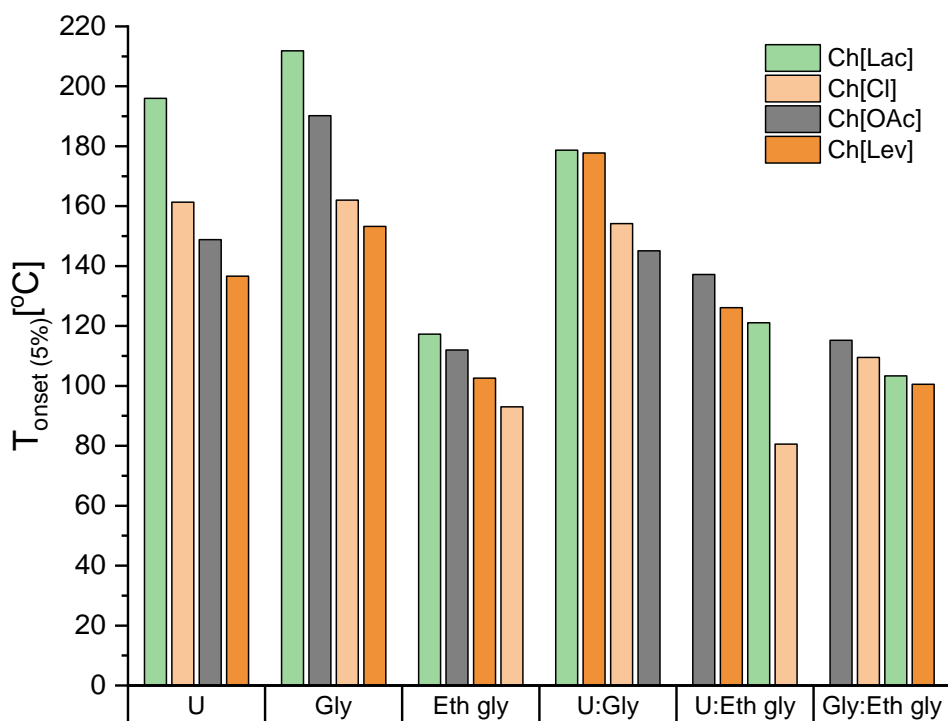
Właściwości termiczne mieszanin eutektycznych powstałych z analizowanych w tej pracy soli choliny oraz wspomnianych wcześniej związków HBD, wykazują różne temperatury degradacji (T_{onset}) i zgodnie z powyższym opisem, nie podążają za szeregiem przedstawionym w Tabela 7

Jednakże, w przypadku analizy termicznej mieszanin eutektycznych, istotniejszą wartością, jest temperatura początku degradacji substancji. Przyjęte w badaniach $T_{\text{onset}5\%}$ jest wartością opisującą utratę 5% wagowych masy w danej temperaturze. Jest to istotne z samego założenia formowania się mieszaniny eutektycznej. Punkt eutektyczny, wymaga ściśle określonych wartości ułamków molowych substancji – zgodnie z wykresem fazowym mieszaniny. Zaburzenie ilości jednego ze składników, powoduje, iż dana mieszanina, nie znajduje się już w punkcie eutektycznym i traci/zmienia swoje unikalne właściwości. Następuje przejście z mieszaniny homogenicznej w mieszaninę DES z nadmiarem jednego składnika (rozpuszczonego w DES; bardziej termicznie stabilnego).

Temperatury początku degradacji mieszaniny różnią się również, w zależności od związku będącego donorem wiązań wodorowych. Dla przykładu, przedstawione w tej pracy binarne mieszaniny soli choliny z mocznikiem jako donorem wiązań wodorowych, względem stabilności termicznej, można uszeregować następująco: anion chlorkowy > anion mleczanowy > anion octanowy > anion lewulinowy. W przypadku mieszanin binarnych z glicerolem, szereg ten również wygląda inaczej. Mimo zdecydowanie wyższej stabilności termicznej czystego chlorku choliny (względem octanu choliny), to właśnie mieszanina octan choliny: glicerol (w stosunku molowym 1:2) wykazuje się najwyższą stabilnością termiczną, z temperaturą początkowej degradacji $T_{\text{onset-5\%}} = 180.70^{\circ}\text{C}$. W przypadku mieszanin binarnych z glikolem etylenowym, sytuacja jest analogiczna – szereg stabilności termicznej jest identyczny jak dla mieszanin z glicerolem.

W przypadku mieszanin trójskładnikowych, wartości temperatury degradacji w punkcie początku procesu degradacji $T_{\text{onset-5\%}}$, są do siebie zbliżone (Rysunek 6). Dla układów

zawierających mocznik oraz glicerol jednocześnie lub mocznik oraz glikol etylenowy [stosunek molowy mieszaniny trójskładnikowej 1:1:1 (HBA:HBD:HBD)]. Różnice w stabilności termicznej wynikają, między innymi z różnic w siłach wiązań wodorowych między donorem wiązania wodorowego, a solą choliny. Mocznik może formować silniejsze wiązania wodorowe z solą choliny niż glikol etylenowy, co wyjaśnia wyższe temperatury T_{onset} i $T_{onset5\%}$ dla mieszanin eutektycznych z mocznikiem. Koncepcja ta jest wspierana przez wcześniejsze badania, które wykazały, iż siła wiązań wodorowych w mieszaninach eutektycznych ma kluczowe znaczenie dla ich stabilności termicznej [19,119,120].



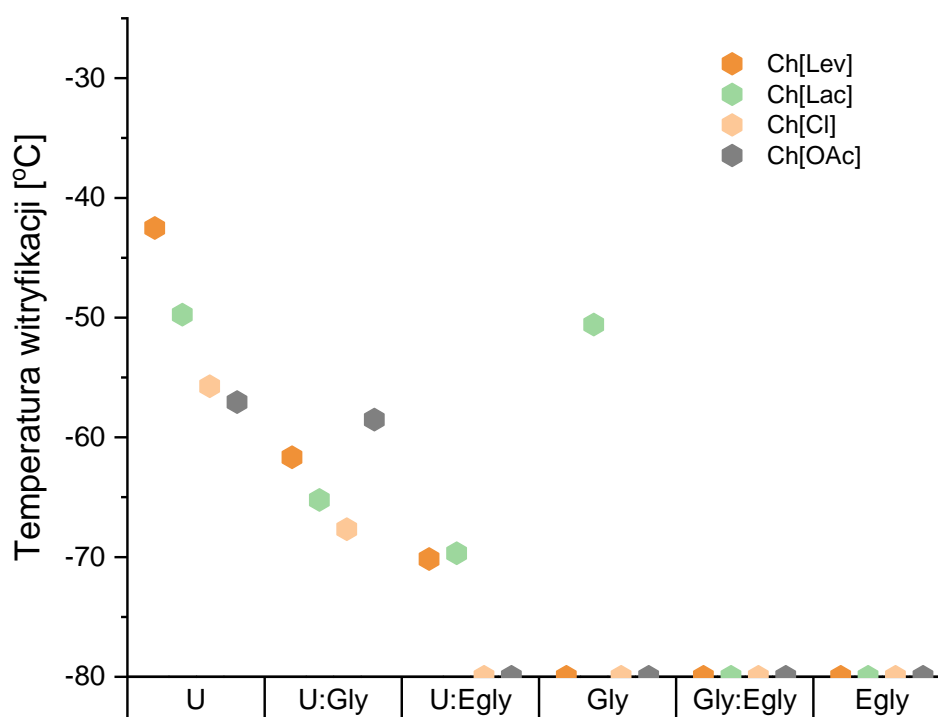
Wykres 4 Wykres wartości temperatur dla punktu $T_{onset-5\%}$ dla analizowanych mieszanin soli choliny w zależności od rodzaju związku HBD w mieszaninie

III.6 Przemiany fazowe soli choliny i ich mieszanin

Wszystkie wyniki z poniższej sekcji są zaczerpnięte z publikacji [P1 – P3], w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru przemian fazowych z użyciem różniczkowej kalorymetrii skaningowej.

Punkt eutektyczny jest główną cechą definiującą mieszaniny eutektyczne. Najbardziej powszechna obecnie mieszanina eutektyczna soli choliny - chlorek choliny: mocznik, ma punkt eutektyczny wynoszący 66,7% mol. mocznika [HBD] i 33,3% mol. chlorku choliny [HBA] lub stosunek molowy HBD:HBA 2:1. Jednakże w toku wielu opisanych badań [6] zaobserwowano, że mieszaniny DES potrafią posiadać więcej niż jeden punkt eutektyczny – w zależności od dobranych stosunków molowych [23] Obecnie bardzo często, za kryterium definiujące mieszaniny eutektyczne oparte o kompozycję: czwartorzędowa sól amoniowa:związek HBD, (poza oczywiście punktem eutektycznym) przyjmowane jest występowanie witrifikacji w danym układzie. Na podstawowym poziomie rozumienia mieszanin eutektycznych soli choliny, opisane w literaturze badania [23] przyjmują, że za powstanie eutektyku, odpowiedzialne są silne oddziaływania międzycząsteczkowe, w tym między innymi wiązania wodorowe powstające pomiędzy składnikami mieszaniny, powodujące zwiększenie odległości, pomiędzy anionem, a kationem w soli choliny. W przypadku soli choliny, temperatura zeszklenia mieszaniny eutektycznej zależy zarówno od związku HBD, stosunku molowego HBA:HBD jak i od samej soli organicznej, użytej do przygotowania danej mieszaniny. Zgodnie z literaturą [101], siła interakcji między HBD i anionem odgrywa kluczową rolę w organizacji nowopowstałego układu rozpuszczalnikowego. Powyższe wskazuje, iż kluczowym elementem jest zatem struktura samego anionu, jak również jej powinowactwo do tworzenia wiązań wodorowych z zastosowanym związkiem typu HBD. Efekt ten jest najbardziej widoczny, dla układu mleczan choliny:glicerol (**Wykres 5**). W przeprowadzonych badaniach, jest to jedyny układ, dla którego w badanym zakresie temperatur znaleziono temperaturę zeszklenia powyżej -80°C . Obecność dużej ilości grup OH zarówno w glicerolu jak i w anionie mleczanowym, bardzo mocno sprzyja powstawaniu nowych wiązań wodorowych. W przypadku wszystkich pozostałych przebadanych soli choliny, w studiowanym zakresie temperaturowym, temperaturę zeszklenia

zaobserwowano wyłącznie dla mieszanin zawierających mocznik. Podobnie jak w przypadku stabilności termicznej, temperatura zeszczenia, powiązana jest bezpośrednio z rodzajem związku HBD obecnego w mieszaninie.



Wykres 5 Wartości temperatury przejścia fazowego mieszanin soli cholinowej w zależności od anionu soli.

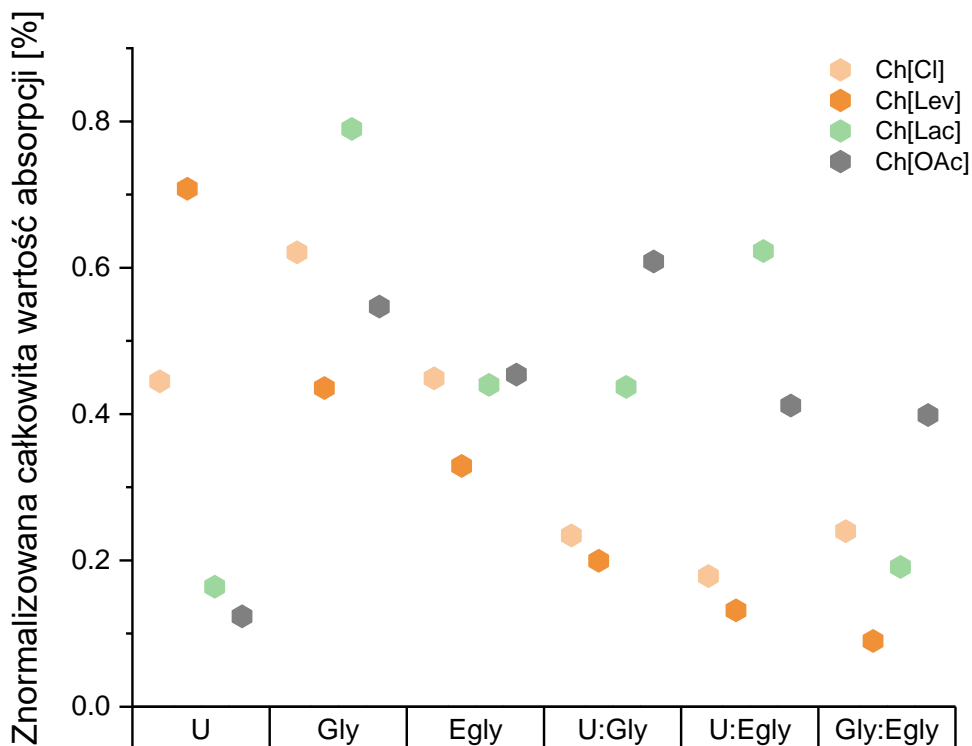
III.7 Spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR)

Wszystkie wyniki z poniższej sekcji są zaczerpnięte z publikacji **[P1 – P3]**, w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru FT-IR.

W kontekście rozważań nad wiązaniami wodorowymi w mieszaninach eutektycznych, widma FT-IR dostarczają kluczowych informacji na temat interakcji międzycząsteczkowych. W szczególności informacje na temat siły oraz liczby wiązań wodorowych obecnych w badanej mieszaninie, mają bardzo istotny wpływ na obserwowane charakterystyki widma. W zakresie drgań rozciągających O-H (około 3500 do 3000 cm^{-1}) oraz asymetrycznych drgań rozciągających C-N⁺ (954 cm^{-1}). Im silniejsze wiązania wodorowe, tym bardziej pik absorpcji przesuwają się w stronę niższych częstości. Opisane w literaturze wyniki badań [121,122] dotyczące spektroskopii FT-IR mieszanin eutektycznych soli choliny, opisują, że silniejsze wiązania wodorowe prowadzą do obniżenia częstości drgań cząsteczek. W przeciwnym przypadku, słabsze wiązania wodorowe przesuwają, piki absorpcji w stronę wyższych częstości. Znaczące jest również to, że wzrost ilości wiązań wodorowych prowadzi do zwiększenia intensywności piku, co wynika z proporcjonalnej relacji między polem pod krzywą a ilością wiązań.

Obecne w mieszaninach eutektycznych soli choliny, rozciągające drgania asymetryczne C-N⁺ przy liczbie falowej 950 cm^{-1} – 957 cm^{-1} są wynikiem oddziaływania kation-anion [123]. Wytworzone wiązania wodorowe pomiędzy anionem, a związkiem typu HBD, powodują swoiste „odciągnięcie” (oddalenie) anionu od kationu wpływając na intensywność drgań rozciągających. Im bardziej oddalony anion od kationu, tym całkowita wartość absorbancji będzie mniejsza niż dla tego wiązania, w porównaniu z czystą solą choliny – związkiem typu HBA – czyli prekursorem mieszaniny eutektycznej. Przedstawione na poniższym wykresie (Wykres 6 Wykres znormalizowanej całkowitej absorbancji dla sygnału na widmie FT-IR w zakresie 950 cm^{-1} – 957 cm^{-1} dla mieszanin eutektycznych soli choliny, w odniesieniu do wzorcowego sygnału obecnego w tym samym zakresie dla czystej czwartorzędowej soli amoniowej. Wartości znormalizowanej

całkowitej absorpcji dla sygnału w zakresie 950 cm^{-1} – 957 cm^{-1} (uwzględniające przesunięcie względem pików macierzystego danej soli cholinej),



Wykres 6 Wykres znormalizowanej całkowitej absorpcji dla sygnału na widmie FT-IR w zakresie 950 cm^{-1} – 957 cm^{-1} dla mieszanin eutektycznych soli cholinej, w odniesieniu do wzorcowego sygnału obecnego w tym samym zakresie dla czystej czwartorzędowej soli amoniowej.

wskazują, iż najsilniejsze wiązania wodorowe, lub też najbardziej liczne, występują przede wszystkim w mieszaninach dwuskładnikowych soli cholinej z glicerolem lub w przypadku mieszanin trójskładnikowych z mocznikiem i glicerolem jednocześnie (wartości >0 ; dotyczy to wszystkich wymienionych w tej pracy soli cholinej). Najsłabsze natomiast, lub też najmniej liczne wiązania wodorowe występujące pomiędzy związkami HBA:HBD, w przypadku mieszanin dwuskładnikowych znajdują się w mieszaninach eutektycznych z glikolem etylenowym (jedynym wyjątkiem jest mieszanina chlorek cholinej:glikol etylenowy). W przypadku mieszanin

trójskładnikowych, ze względu na dodatkowy składnik, nie można wnioskować, iż sytuacja jest analogiczna, gdyż występują również wiązania wodorowe bezpośrednio pomiędzy drugim i trzecim składnikiem mieszaniny eutektycznej. Jest to szczególnie, widoczne analizując powyższe wyniki w odniesieniu do wyników stabilności termicznej badanych DES. Zgodnie z wynikami stabilności termicznej mieszanin, najwyższa stabilność, przypisana została do mieszanin zawierających anion 2-hydroksypropanowy. W przypadku mieszaniny trójskładnikowej mleczanu choliney z glikolem etylenowym i glicerolem. Potwierdzając tym samym, występowanie większej ilości wiązań wodorowych w mieszaninie oraz wynikających z tego usieciowania właściwościach. W zgodzie z powyższymi wynikami, siłę wiązań wodorowych w mieszaninach soli choliney z analizowanymi związkami HBD, można uszeregować w kolejności anionów: mleczan > octan > chlorek > lewulinian. W przypadku związków HBD, najsilniejsze oddziaływania wodorowe, wśród badanych mieszanin, występują w układzie z glicerolem w stosunku molarowym 1:2.

III.8 Hydroliza enzymatyczna

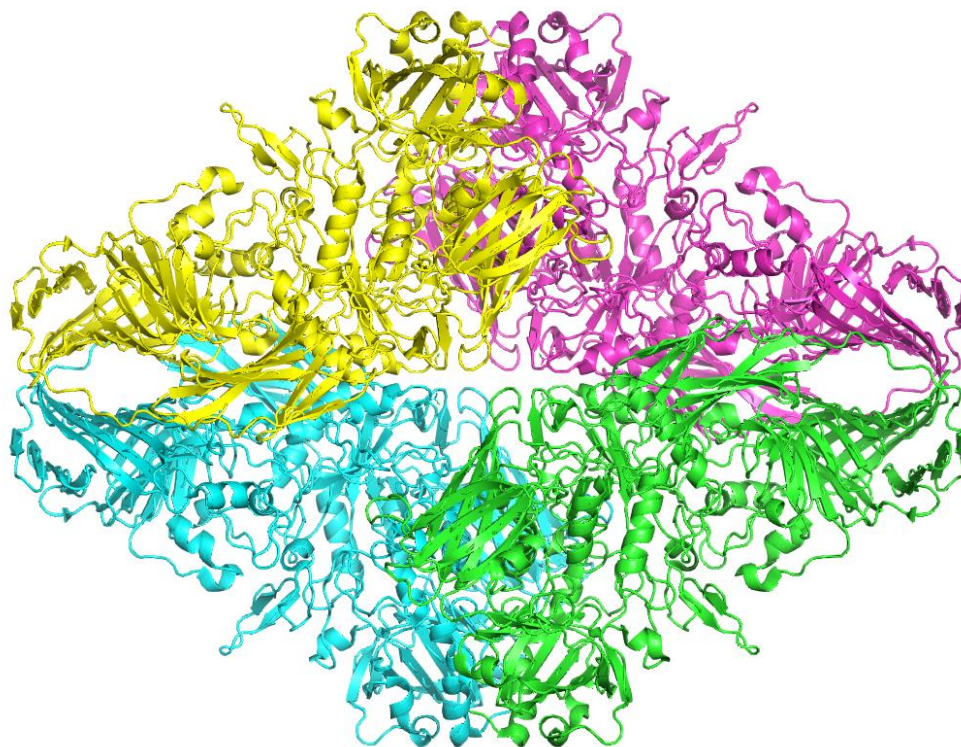
Hydroliza enzymatyczna jest jedną z najpopularniejszych reakcji enzymatycznych, zachodzących w środowisku naturalnym. Jest to proces, w którym enzymy hydrolityczne (hydrolazy) rozrywają wiązania w cząsteczkach danej substancji (w substratach) przy udziale cząsteczki wody, tworząc w ten sposób nowe związki – produkty hydrolizy. W przeciwieństwie do chemicznej hydrolizy, reakcje z udziałem enzymów hydrolitycznych cechują zdecydowanie łagodniejsze warunki reakcji oraz zdecydowanie większa czystość otrzymanych produktów oraz zdecydowanie bardziej skomplikowany mechanizm samej reakcji (Rys. 9). Dodatkowo w przypadku reakcji enzymatycznych zdecydowanie łatwiej uniknąć racemizacji otrzymanego produktu [124]. Niemniej jednak, należy zauważyć, iż reakcje hydrolizy enzymatycznej, w przeciwieństwie do hydrolizy chemicznej, są reakcjami wysoce zależnymi od substratu. Z tego właśnie względu, grupę enzymów hydrolitycznych dzieli się względem substratów, ulegających reakcji biokatalitycznej hydrolizy. Do grupy tej zalicza się enzymy takie jak:

1. Esterazy – enzymy rozszczepiające wiązania estrowe w lipidach – np. acetylocholino-esteraza, która po rozbiciu acetylocholino-esterazy na cholinę i kwas octowy pomaga w organizmach żywych w przekształceniu impulsu neuronowego w grupę octanową
2. Fosfatazy – enzymy katalizujące odszczepienie grupy fosforanowej od cząsteczek.
3. Lipazy – enzymy katalizujące wiązanie w glicerydach
4. Glikozydazy – enzymy odszczepiające pojedyncze cząsteczki cukrów od oligosacharydów
5. Peptydazy – enzymy katalizujące wiązania peptydowe.
6. Nukleozydazy - enzymy hydrolizujące wiązania nukleotydów.

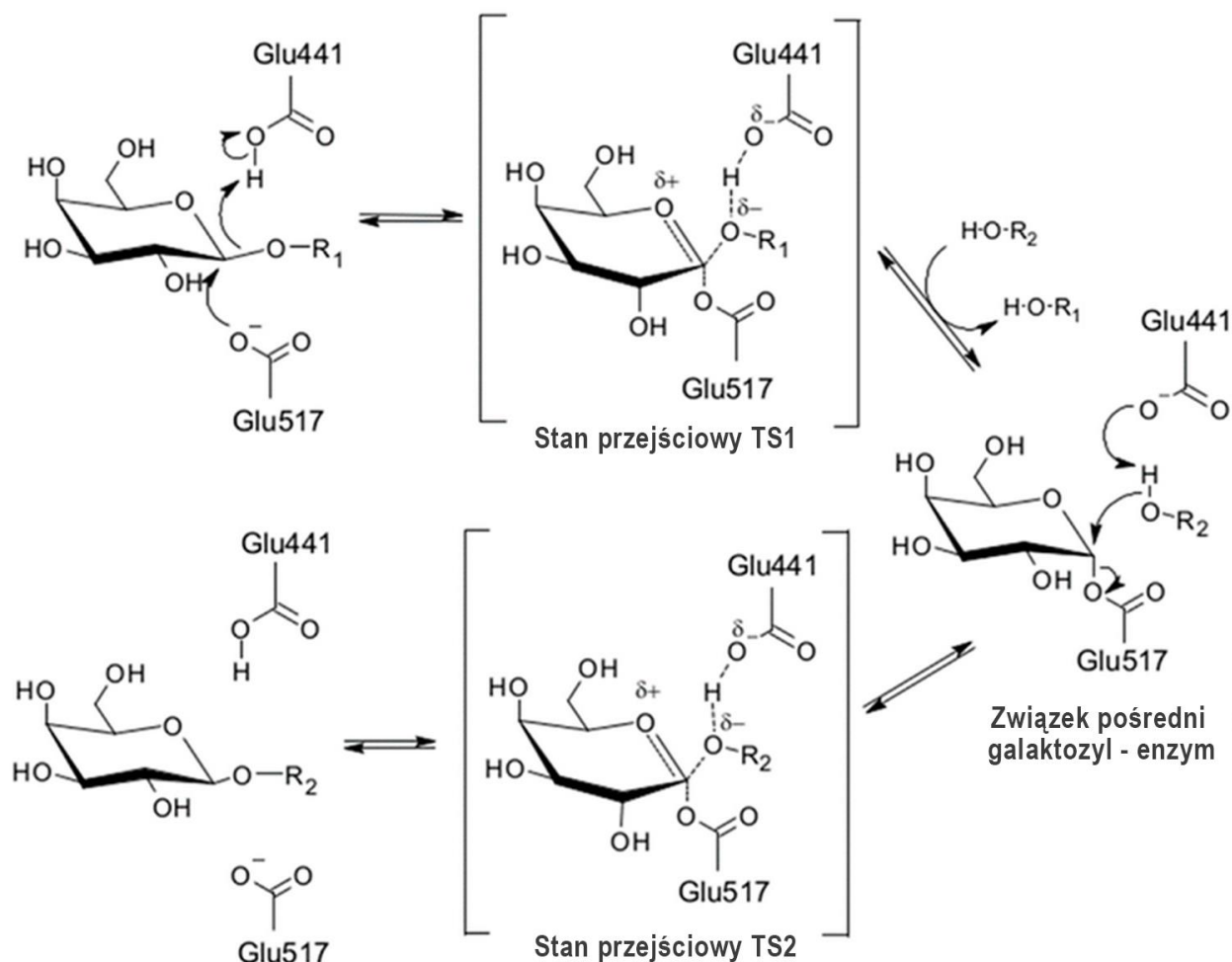
Mimo iż każda z wyżej wymienionych grup enzymów, skupia enzymy katalizujące reakcję hydrolizy, należy pamiętać iż kształt oraz rozmiar centrum aktywnego limituje rodzaj oraz wielkość związków, które mogą ulegać hydrolizie enzymatycznej – nawet w obrębie jednej grupy enzymów [125]. Ponadto, warunki prowadzenia reakcji enzymatycznej (pH i temp.), w przeciwieństwie do reakcji hydrolizy chemicznej, są ściśle określone i zależne od użytego do danej reakcji biokatalizatora. Wrażliwość enzymu na w/w warunki, może się zatem również objawiać jako czynnik wykluczający użycie danego enzymu do reakcji hydrolizy. Jest to szczególnie istotne z punktu widzenia stosowania innych niż woda rozpuszczalników, jako środowiska reakcji enzymatycznych. W niniejszej pracy, w celu określenia wpływu środowiska mieszanin eutektycznych na enzymatyczne reakcje hydrolizy, przebadane zostały dwa enzymy hydrolityczne:

β -galaktozydaza (EC 3.2.1.23; Rys. 8) z *Kluyveromyces lactis*, będąca homotetramerem, składa się z czterech identycznych jednostek polipeptydowych, z których każda zawiera 1023 aminokwasy. Każda podjednostka, zwana monomerem, zawiera pięć wyraźnie określonych domen strukturalnych. Centralna położona, trzecia domena, charakteryzująca się typem fałdowania α/β beczki, jest domeną posiadającą centrum aktywne. β -galaktozydaza wykazuje trzy aktywności enzymatyczne. Jest w stanie rozszczepić disacharyd laktozę na glukozę i galaktozę, które następnie mogą być wprowadzone do procesu glikolizy. Może katalizować transgalaktozylację laktozy do allolaktozy. Może katalizować rozszczepienie allolaktozy na monosacharydy. Działanie β -galaktozydazy jest dobrze poznane, dzięki szeroko analizom kinetycznym, biochemicznym, i

krystalograficznym. Podczas reakcji, substrat początkowo wiąże się blisko szczytu miejsca aktywnego, a następnie jest przemieszczany głębiej w kierunku centrum aktywnego. Pierwszy etap katalizy, zwany galaktozylacją, rozpoczyna się w momencie powstania stanu przejściowego reakcji, w wyniku dostarczenia protonu przez aminokwas Glu461 do atomu tlenu w wiązaniu glikozydowym. Galaktoza, obecna w laktozie, zostaje początkowo kowalencyjnie związana z enzymem β -galaktozydazy. Następnie wiązanie kowalencyjne między galaktozą a enzymem zostaje rozerwane przez cząsteczkę wody, co prowadzi do rozkładu laktozy na galaktozę i glukozę. W przypadku nadmiaru substratu, jakim jest laktoza, akceptorem w rozerwaniu wiązania kowalencyjnego stanu przejściowego może być cząsteczką glukozy zawarta w laktozie. W wyniku tego procesu powstaje allolaktoza w reakcji odwrotnej transgalaktozylacji. β -galaktozydaza umożliwia więc zarówno hydrolizę, jak i transgalaktozylację, w zależności od dostępności substratu. [60].

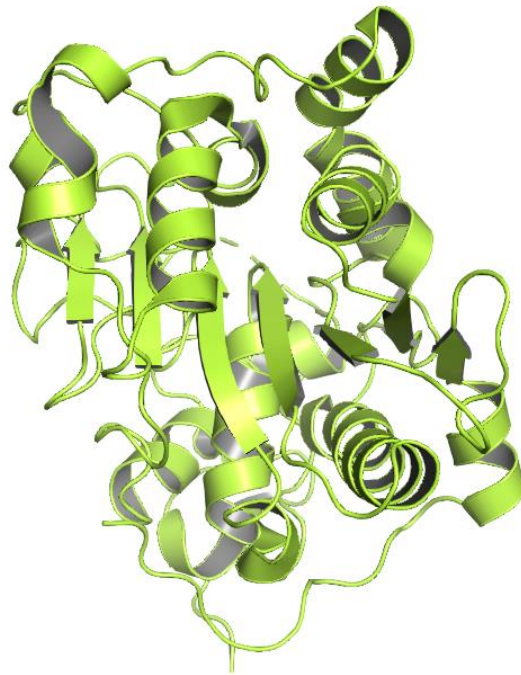


Rys. 8 Enzym β -galaktozydaza; Homotetramer złożony z czterech podjednostek o masie 116 kDa każda. Struktura pozyskana z bazy Protein Data Bank, rcsb.org; nr struktury 6DRV; obraz wygenerowany z użyciem oprogramowania PyMol. Cztery podjednostki tworzące oligomer zaznaczone zostały osobnymi kolorami.

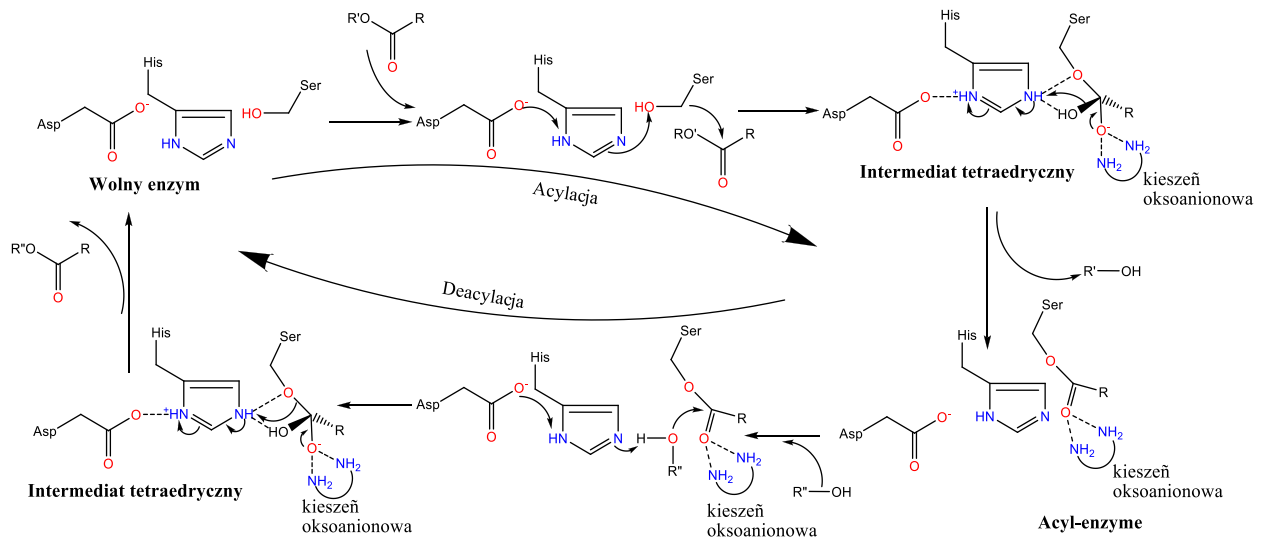


Rys. 9 Schemat reakcji dla β -galaktozydazy. Galaktozyd (Gal-OR) początkowo zostaje związany z enzymem (E) w pobliżu miejsca aktywnego (wiązanie płytkie z użyciem Glu441), następnie, substrat przemieszczony zostaje do centrum aktywnego. Pierwszy etap chemiczny (galaktozylacja) jest tutaj pokazany jako rozpoczynający się od układu $\text{E}\cdot\text{Gal-OR}_1$ i przechodzący przez stan przejściowy $\text{enzym}\cdot\text{TS}_1$ (przejściowe wiązanie kowalencyjne E-Gal), uwalniając pierwszy produkt HOR_1 . Następnie w procesie degalaktozylacji, stan przejściowy E-Gal , przy udziale wody, przekształcany jest w drugi stan przejściowy $\text{enzym}\cdot\text{TS}_2$, który prowadzi do kompleksu enzym-produkt (E-Gal), który to w efekcie, ostatecznie uwalnia drugi produkt – galaktozę. W przypadku produkcji allolaktozy, pierwszy produkt (glukoza) nie jest uwalniany i działa jako akceptor dla reakcji degalaktozylacji, uwalniając disacharyd, allolaktozę [60].

Lipaza (EC 3.1.1.3; Rys. 1) z *Candida antarctica* – jest jednym z najbardziej poznanych w świecie nauki enzymów. Należy do grupy hydrolaz, katalizujących hydrolizę wiązania estrowego związków karboksylowych nierozpuszczalnych w wodzie, takich jak trójglicerydy czy fosfolipidy. Reakcja hydrolizy przebiega według mechanizmu dwuetapowego. tzw. "aktywacji na granicy faz". Centrum aktywne enzymu, ukryte pod domeną osłaniającą, aktywowane jest w obecności granicy faz wodno-lipidowej. Aktywacja ta skutkuje zmianą konformacyjną, indukującą odsłonięcie hydrofobowego centrum aktywnego. Następnie wciągnięty do środka substrat, ulega hydrolizie z udziałem triady katalitycznej lipazy, złożonej z aminokwasów Ser105, His224, and Asp187. Najpierw kwas asparaginowy tworzy wiązanie wodorowe z histydyną, zwiększając pKa azotu imidazolu histydyny. Pozwala to histydynie działać jako silna zasada i deprotonować serynę. Deprotonowana seryna służy następnie jako nukleofil, atakując węgiel karbonylowy estru jednego z kwasów tłuszczowych na 1 lub 3 węglu w cząsteczce glicerolu będącego substratem lipidowym. Po zaatakowaniu lipidu tworzy się ujemnie naładowany pośrednik tetraedryczny, stabilizowany przez aminokwasy: fenyloalaninę i leucynę. Grupa karbonylowa ulega odtworzeniu, z segmentem szkieletu glicerolu działającym jako grupa opuszczająca. Cząsteczka wody następnie przekazuje proton do histydyny, tworząc reaktywny anion hydroksylowy. Anion hydroksylowy może następnie zaatakować węgiel karbonylowy lipidu, tworząc kolejny ujemnie naładowany pośrednik tetraedryczny, który jest ponownie stabilizowany przez dwie wspomniane reszty aminokwasowe. Po rekonstrukcji karbonylu, kataliczna seryna jest uwalniana, a monogliceryd i monomery kwasów tłuszczowych dyfundują do środowiska reakcji, robiąc miejsce dla kolejnej cząsteczki trójglicerydu [126].



Rys. 10 Struktura lipaza z *Candida antarctica* (CALB). Struktura została pozyskana z bazy Protein Data Bank, rcsb.org; nr struktury 4K6G; obraz wygenerowany z użyciem oprogramowania PyMol.



Rys. 11 Schemat reakcji acylacji oraz deacyłacji dla enzymu CALB.

III.8.1 Stabilność wybranych enzymów z grupy hydrolaz.

Wszystkie wyniki z poniższej sekcji są zaczerpnięte z publikacji [P1 – P3], w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru stabilności, dla danego enzymu.

Wszystkie enzymy hydrolityczne, są wrażliwe na zmiany zarówno pH jak i temperatury środowiska reakcji. Chcąc osiągnąć stabilne warunki pracy enzymu, stosuje się odpowiednie do danej reakcji pH roztworu (korzystając z odpowiednich buforów) oraz stabilizując temperaturę, na poziomie zapewniającym stabilność oraz maksymalną wydajność reakcji. Zgodnie z wynikami dotychczasowych badań nad wpływem rozpuszczalnika (jako medium reakcji) na enzymy hydrolityczne, należy stwierdzić, iż stabilizacja biokatalizatora jest możliwa, poprzez zastosowanie jako środowiska reakcji biokatalitycznej, rozpuszczalników organicznych [127], cieczy jonowych [47,84,128] oraz mieszanin eutektycznych [129,130]. Aby zatem określić potencjalną przydatność nowego środowiska reakcji (ciecz jonowa/mieszanina eutektyczna) dla reakcji enzymatycznej koniecznym jest wykluczyć działanie inhibicyjne danej cieczy.

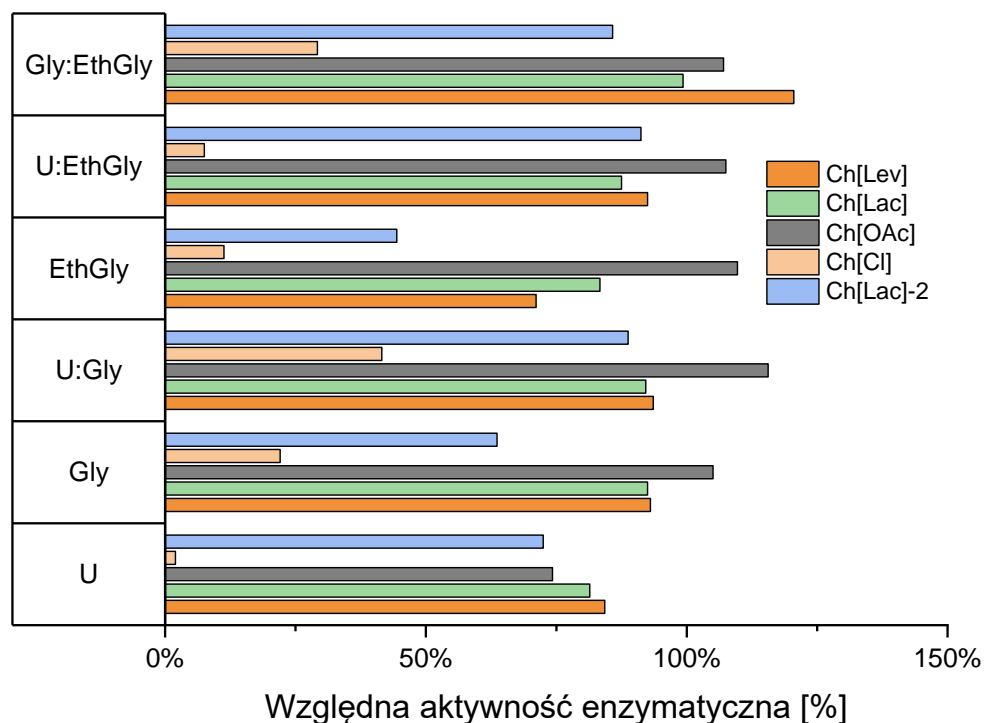
Stabilność enzymu jest kluczowym parametrem decydującym o jego dalszym zastosowaniu, dlatego też ocena stabilności zarówno β -galaktozydazy jak i lipazy CALB została przeprowadzona we wszystkich przedstawionych rozpuszczalnikach, przed dokonaniem pomiaru aktywności operacyjnej enzymu [131]. Enzym najpierw inkubowano w każdym układzie rozpuszczalników przez określony czas (30 i 60 min) w różnych temperaturach (30 i 40 °C), a następnie przeniesiono do standardowego roztworu buforowego, w którym przeprowadzono reakcję enzymatyczną. Wyniki wyrażono jako względną aktywność, względem próby kontrolnej (bez dodatku mieszaniny eutektycznej) po inkubacji z enzymem w tym samym czasie. Testy te wykorzystano do określenia spadku aktywności w funkcji czasu, w wybranym zakresie temperatur (30 – 40°C). Biorąc pod uwagę wyniki wcześniejszych badań Toledo i in. oraz Xu i in. postawiono hipotezę, że obecność specyficznego anionu organicznego zamiast anionu nieorganicznego w czwartorzędowej soli amoniowej, wraz z obecnością polioliu (jako związku HBD) wywiera istotny wpływ na aktywność enzymatyczną. Szczególnie ma to miejsce, gdy

mieszaniny soli choliny dodawane są w małej objętości. Dodatkowo, wyniki obrazujące podobne zachowanie enzymów hydrolitycznych, przedstawia również praca Xu i wsp. oraz Toledo i wsp. [75,112].

W przypadku enzymu β -galaktozydazy, hydrolizującego wiązanie o-glikozydowe w laktozie, każda przedstawiona w tej rozprawie sól choliny zawierająca anion organiczny, wykazała się działaniem wzmacniającym stabilność enzymu. Przedstawione na poniższym wykresie stabilności dotyczą wyników zebranych w publikacjach **[P1-P3]**. Akronim Ch[Lac]-2 dotyczy wyników otrzymanych w środowisku mleczanu choliny dla reakcji hydrolizy z udziałem lipazy (CALB). Wyniki przedstawione na wykresie (**Wykres 7**) zostały zawężone do prób zawierających 10% stężenie mieszaniny soli choliny. W przypadku lipazy, tylko mleczan choliny, oraz, zgodnie z literaturą, chlorek choliny], okazały się cieczami nie wpływającymi negatywnie na stabilność CALB [38,66,132].

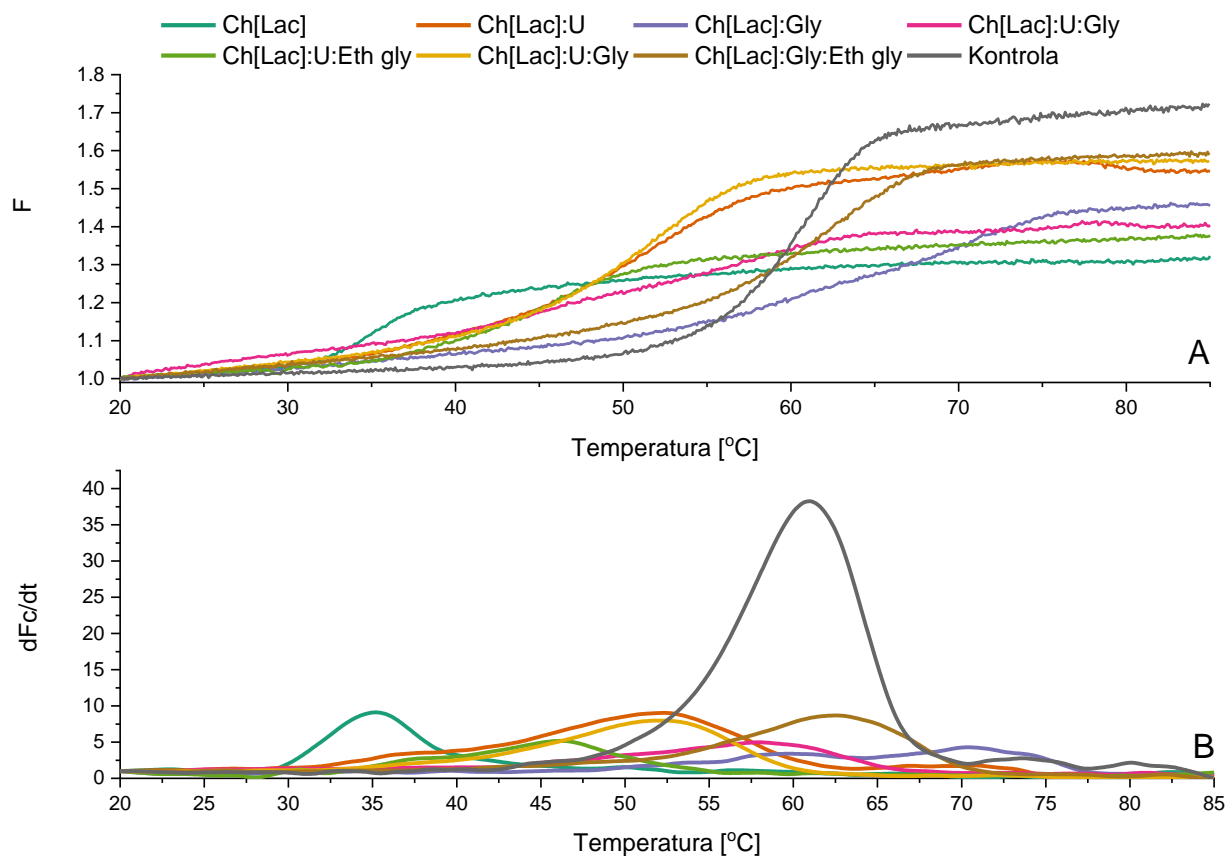
W przypadku β -galaktozydazy, najwyższa stabilność w czasie, ze względu na anion w soli choliny, przypisana może zostać do mieszanin zawierających glikol etylenowy, glicerol lub mieszaninę ich obu. Podobnie w przypadku mieszanin zawierających mocznik, co jest raczej nieoczekiwaną obserwacją, gdyż mocznik jest powszechnie znanym środkiem denaturującym enzymy [109,110]. Analiza powyższych wyników pokazuje również, że najwyższą aktywność względną uzyskano dla mieszaniny z układami eutektycznymi zawierającymi polirole – glikol etylenowy i glicerol. Nie jest to zaskakujące odkrycie, gdyż powszechnie wiadomo, że glicerol jest środkiem stabilizującym enzym [52]. Interesujące jest natomiast to, że glikol etylenowy daje podobne lub nawet lepsze wyniki szczególnie w obecności lewulinianu choliny. Podobnie ma się sytuacja w przypadku, stabilności hydrolaz względem temperatury. W przypadku badanych soli choliny, dla każdego enzymu dodatek cieczy jonowej, poprawił wynik stabilności enzymu względem próby kontrolnej. Niemniej jednak przy wyższych wartościach temperatur, pozytywny wpływ glikolu etylenowego zanika i tylko układy zawierające mieszaniny soli choliny o najwyższym stężeniu glicerolu (1:2) pozwalają enzymowi zachować swoją aktywność na poziomie wyższym niż dla próby kontrolnej w tej samej temperaturze [109,110]. Są to jednak wartości zdecydowanie niższe niż dla optimum temperaturowego (30°C). W przypadku β -galaktozydazy, tylko dla mieszaniny lewulinianu choliny

z glicerolem, stabilność temperaturowa wyrażona w relatywnej aktywności do próby kontrolnej w 30°C, spadła o 50%. Jest to jednocześnie 50-krotnie wyższy wynik, niż dla próby kontrolnej w tej samej temperaturze [110]. Mimo iż zgodnie z literaturą, posądzany o pozytywny wpływ na stabilność enzymu jest głównie glicerol [52], podobny efekt wywołuje również obecność soli choliny. Fenomen ten zaobserwowany został zarówno w publikacjach [P1-P3] dla każdego z badanych enzymów jak również, w literaturze [52,112,133]. Zebrane powyżej wyniki, obrazują, iż dla badanych enzymów, nie ma wspólnej zależności – względem zarówno badanych soli choliny jak i ich mieszanin. W przypadku β -galaktozydazy do inhibicji lub wręcz denaturacji białka dochodzi w środowisku wodnym, w którym zawartość badanej soli choliny lub jej mieszaniny eutektycznej



Wykres 7 Wykres wartości względnej aktywności enzymu β -galaktozydazy, po 60minutach w temperaturze 30st Celsjusza oraz CALB (ciecz Ch[Lac]-2)w tych samych warunkach.

przekracza 20%. W przypadku lipazy (CALB) natomiast, enzym zachowuje swoją stabilność przy obecności wody mniejszej niż 2% (>98% soli choliny lub jej mieszaniny), dodatkowo, co przedstawiają wyniki w publikacji [P3], w stężeniu powyżej 98% DES w wodzie, lipaza CALB jest stabilna (**Wykres 8**) oraz możliwe jest prowadzenie reakcji estryfikacji i transestryfikacji.



Wykres 8 Profil stabilności termicznej lipazy CALB w mieszaninach mleczanu choliny ze związkami HBD

III.8.2 Aktywność wybranych enzymów z grupy hydrolaz.

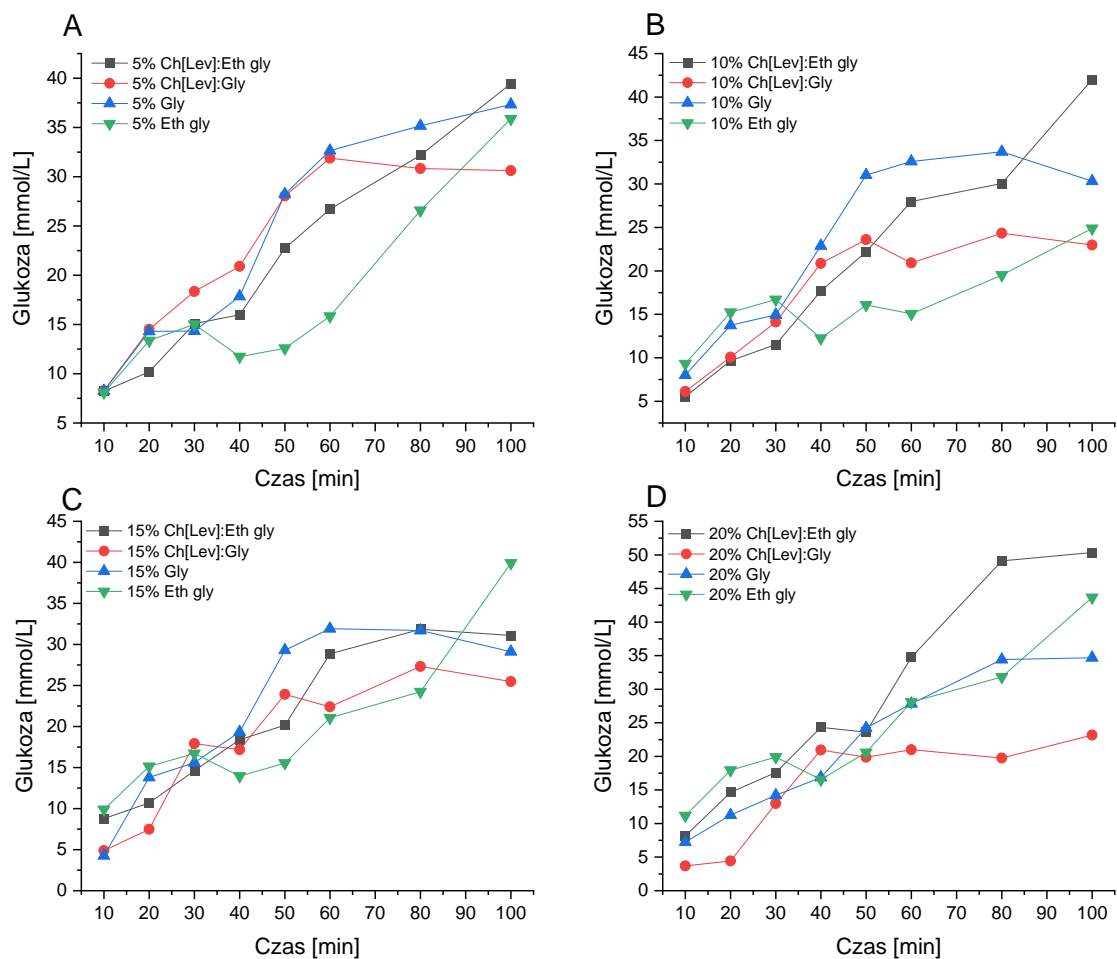
Wszystkie wyniki z poniższej sekcji są zaczerpnięte z publikacji **[P1 – P3]**, w których to opisana jest metodyka prowadzenia pomiaru aktywności dla danego enzymu.

Podobnie jak wszystkie katalizatory, enzymy zwiększają szybkość reakcji, obniżając jej energię aktywacji. Chemicznie, enzymy są jak każdy katalizator i nie są zużywane w reakcjach chemicznych ani nie zmieniają równowagi reakcji. W przeciwieństwie jednak do typowo chemicznych katalizatorów, enzymy są zdecydowanie bardziej specyficzne, tracąc swoją zdolności operacyjne poza optymalnymi warunkami (temperaturą i pH) lub wręcz ulegając trwałej denaturacji pod wpływem zbyt wysokiej temperatury, tracąc wówczas swoją strukturę i właściwości katalityczne, na skutek całkowitego rozfałdowania struktury enzymu. W przypadku opisanych soli choliny oraz ich mieszanin, należy zauważyć, iż największy wpływ na zdolności operacyjne enzymu, wywiera anion w soli choliny. Jest to szczególnie obserwowalne w przypadku wyników badań w publikacjach **[P1-P2]** oraz w literaturze [75,112,133]. W przypadku gdy Ch[Cl] hamował aktywność β -Gal nawet przy niskim stężeniu mieszaniny soli choliny w roztworze reakcyjnym, w obecności Ch[OAc] lub Ch[Lev] aktywność β -galaktozydazy wzrastała kilkukrotnie. Dodatkowo, zaobserwowano, iż wraz ze zmniejszającym się stężeniem mieszaniny Ch[Cl] (z dowolnym związkiem HBD) w wodzie, aktywność β -galaktozydazy wzrastała. Mimo to mieszaniny eutektyczne chlorku choliny, bez względu na stężenie, w badanych zakresach, nigdy nie osiągnęły wartości aktywności enzymatycznej obserwowanych w próbie kontrolnej. W przypadku natomiast, gdy anion soli choliny był organiczny, wartości aktywności enzymatycznej, zdecydowanie przewyższały wartości próby kontrolnej, już przy 5% stężeniu soli (lub mieszaniny) w medium reakcyjnym. Aktywność enzymatyczna prawie wszystkich przebadanych mieszanin soli choliny na bazie octanu choliny oraz lewulinianu, nawet z mocznikiem, przy stosunku procentowym między 5% a 20% (v/v) mieszanina eutektyczna – bufor NaHPO₄ (odpowiednio 95%–80%) wykazują znacznie większą aktywność w porównaniu z próbą kontrolną. Najbardziej stymulujący efekt dla aktywności β -Gal, (wzrost o ponad 270%) zaobserwowano w mieszaninie zawierającej dodatek 5% mieszaniny soli choliny (lewulinianu, octanu oraz mleczanu) z glicerolem oraz/lub z glikolem etylenowym. Na szczególną uwagę, zasługuje tutaj jednak lewulinian choliny.

Wyniki przedstawione w publikacji [P2] wykazały, iż zarówno lewulinian choliny jak i jego mieszaniny wywierają amplifikujący wpływ na aktywność hydrolityczną β -galaktozydazy, a najwyższe wartości aktywności zaobserwowane została dla mieszanin zawierających poliole, w szczególności glikol etylenowy oraz glicerol, w stężeniach poniżej 20%.

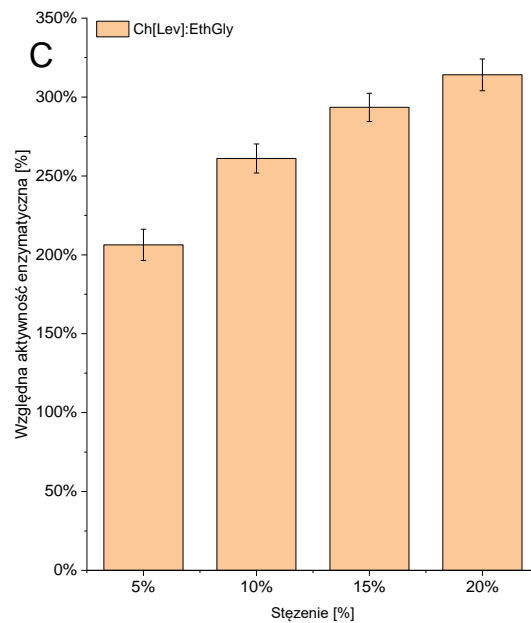
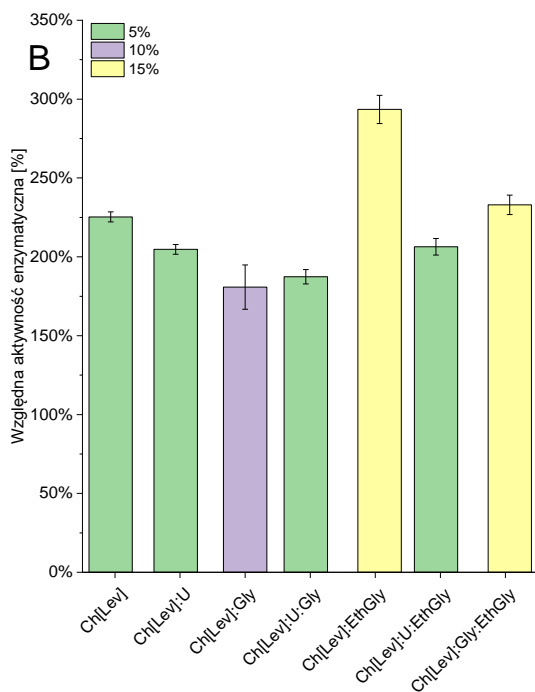
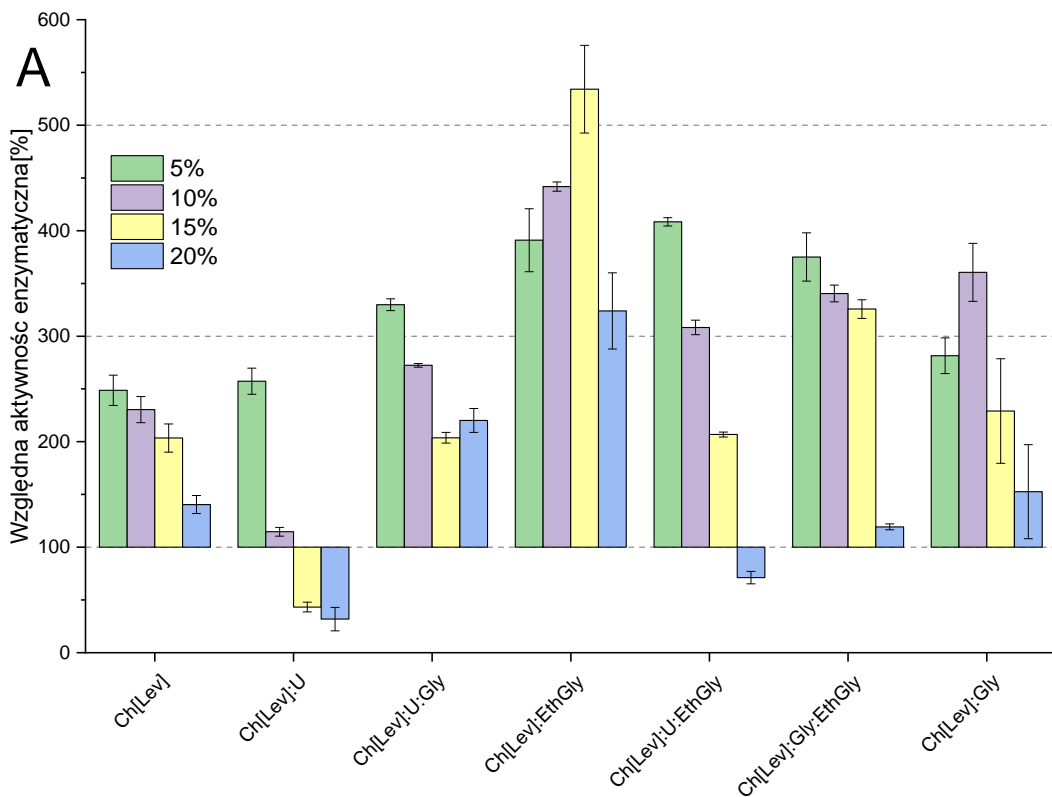
Dodatkowo, badania nad kinetyką reakcji (**Wykres 9**) wykazały, iż dodatek samej soli choliny (Ch[Lev]) również wzmocniło względną aktywność badanego enzymu – ponad dwukrotnie, już przy 5% stężeniu. We wszystkich badanych próbkach zawierających lewulinian choliny [w stężeniach 5%, 10%, 15%, 20% (v/v)] dodanych do roztworu buforowego (środowisko reakcji enzymatycznej), odnotowano wyższe wartości aktywności hydrolitycznej β -galaktozydazy. Nawet dla mieszaniny eutektycznej zawierającej w swoim składzie mocznik, w stężeniu od 5% do 20% (v/v) aktywności β -galaktozydazy były wyższe niż w próbie kontrolnej. Najwyższe wartości, ponownie zaobserwowano dla mieszanin, w których składzie jako HBD zastosowano poliole (Ch[Lev]:Gly; Ch[Lev]:EthGly Ch[Lev]:EthGly:Gly, Ch[Lev]:U:Gly, Ch[Lev]:U:EthGly). Najbardziej znaczący wynik można zaobserwować w środowisku reakcji enzymatycznej, zawierającym 15% mieszaniny Ch[Lev]:EthGly, w którym to aktywność β -galaktozydazy wzrosła prawie 5,5-krotnie. Znamienne jest, że podobny efekt zaobserwowany został dla rozpuszczalników zawierających mocznik. Jak wspomniano powyżej, mocznik znany jest z właściwości denaturujących białka [134], jednak mieszaniny soli choliny z mocznikiem jako związkami HBD, również wykazują właściwości wzmacniające aktywność β -galaktozydazy. Mimo niewielkiej ilości obecnie doniesień literaturowych porównywalnych z powyższymi, podobne zjawisko zostało zaobserwowane również dla innych enzymów z grupy hydrolaz [52,75,112]. Niemniej jednak, wspomniane doniesienia literaturowe, bardziej skupiają swą uwagę na pozytywnym wpływie użytego w mieszaninie soli choliny, danego związku HBD [112]. Powyższe wyniki uwzględnione w publikacjach [P1-P2] wykluczają zatem proponowaną w literaturze hipotezę, o wyłącznym wpływie związków typu HBD, na stabilność i aktywność enzymów w mieszaninie eutektycznej [112]. Co więcej, pokazują, że wzrost aktywności enzymatycznej jest również bezpośrednio związany z rodzajem anionu w czwartorzędowej soli amoniowej [135] oraz z oddziaływaniami anion soli choliny – związek HBD oraz anion soli choliny – powierzchnia enzymu [83,90,136–138]. W przypadku osobno stosowanych rozpuszczalników, dla obu przypadków

(lewulinian choliny i glikol etylenowy), zaobserwowano wzrost aktywności enzymatycznej względem próby kontrolnej w wodzie. Wyniki badania kinetyki reakcji, pokazują, iż efekt wzrostu jest 70% większy w przypadku mieszaniny lewulinian choliny: glikol etylenowy – niż w przypadku samego glikolu etylenowego w identycznym 10% stężeniu (Wykres 9)



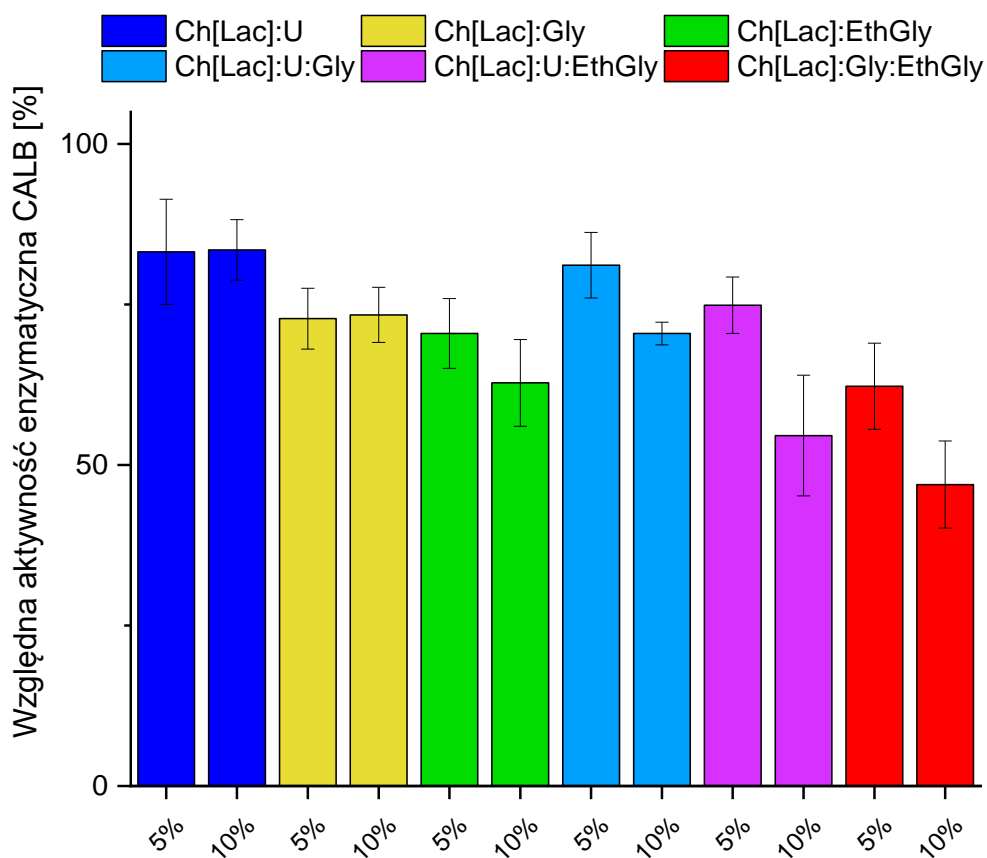
Wykres 9. Profil kinetyczny hydrolizy laktozy prowadzonej przez β -galaktozydazę, w środowisku reakcji, zawierającym różne stężenia analizowanych mieszanin lewulinianu choliny z glicerolem oraz z glikolem etylenowym

Należy jednak zauważyć, iż wzrost aktywności β -galaktozydazy w środowisku mieszanin soli choliny jest również zjawiskiem zależnym od stosowanego substratu. W przypadku β -galaktozydazy, wzrost aktywności enzymatycznej obserwowany podczas hydrolizy laktozy (naturalnego substratu) był o 50% niższy niż dla substratu modelowego (ONPG) gdzie zaobserwowany został wzrost aktywności o blisko 600% względem próby kontrolnej. Przeprowadzone modelowe reakcje z laktozą, jako naturalnym substratem dla β -galaktozydazy, pokazały, iż mieszaniny lewulinianu choliny również ze związkami HBD w stosunku molowym 1:2 oraz 1:1:1 nawet z mocznikiem, w stosunku procentowym 5% (v/v) mieszanina lewulinian choliny:mocznik (1:2) i 95% bufor, pozytywnie oddziałują na enzym, powodując wzrost aktywności β -galaktozydazy w porównaniu do próby kontrolnej. Ponownie, najwyższa aktywność hydrolityczna zaobserwowana została dla układów lewulinian choliny: glikol etylenowy lub/i glicerol (1:2 mol:mol, stężeniach 5% - 20% do w buforze). Niemniej jednak z substratem naturalnym – laktozą – najwyższe wartości aktywności enzymatycznej (wzrost o 300% względem próby kontrolnej) są wynikiem niższym niż dla modelowego substratu ONPG. Wynika to zarówno z rozmiaru jak i struktury substratu. Liczne grupy OH w laktozie, również bowiem oddziałują zarówno z anionem soli choliny jak i ze związkiem HBD. Pozytywny wpływ oddziaływań anionu soli choliny obrazuje wzrost aktywności β -galaktozydazy, w reakcji hydrolizy dla modelowego substratu ONPG. Opisane w niniejszej pracy mieszaniny soli choliny/sole choliny zawierające anion organiczny, aktywują enzym, zwiększając – wydajność reakcji enzymatycznej. W każdym badanym przypadku, aktywność β -galaktozydazy była blisko lub ponad, trzykrotnie w porównaniu z próbą kontrolną (**Wykres 10**).



Wykres 10 Względna aktywność enzymatyczna β -galaktozydazy w reakcji hydrolizy (A – substratu ONPG; B – laktozy) w środowisku mieszanin eutektycznych zawierających lewulinian choliny oraz związku HBD. C Względna aktywność enzymatyczna β -galaktozydazy w reakcji hydrolizy laktozy w środowisku zawierającym mieszaninę eutektyczną lewulinian choliny : glikol etylenowy, w zależności od stężenia mieszaniny w środowisku reakcji.

Wyniki przedstawione w publikacji [P3] analizujące wpływ mleczanu choliny na reakcję hydrolizy enzymatycznej z udziałem lipazy CALB, pokazały, iż zarówno zaobserwowane jak i opisane w literaturze [49,112,139,140] zjawisko wzrostu aktywności hydrolaz, przypisywane jest obecności dużej ilości grup -OH. Pozytywny wpływ glicerolu bądź glikolu etylenowego, zwiększający wartości aktywności enzymatycznej, nie został bowiem zaobserwowany, dla żadnej z opisanych w niniejszej pracy soli choliny, ani ich mieszanin – w reakcji z lipazą CALB. W przeciwieństwie do β -galaktozydazy, lakazy, β -glukozydazy wyższe wartości aktywności enzymatycznej, obserwowane są, według literatury [75,76,112,133] np. dla układu chlorek lub octan lub mleczan choliny:mocznik przy zawartości wody w mieszaninie w zakresie 5% - 15%. Wśród publikacji naukowych, wyjaśnienia tych zjawisk upatruje się głównie w eksperymentach obliczeniowych jak również w eksperymentach z użyciem spektroskopii ^{15}N NMR. Przeprowadzone badania przez C. Ma. i wsp. [22,86] nad dysocjacją cieczy jonowych, mieszanin eutektycznych, oraz nad interakcjami w wodzie pomiędzy tymi rozpuszczalnikami, a powierzchnią białka, sugerują zależność wzrostu aktywności enzymu od rodzaju grup funkcyjnych obecnych w mieszaninie i ich zdolności do tworzenia wiązań wodorowych.



Wykres 11 Względna aktywność hydrolityczna lipazy CALB w reakcji hydrolizy propionianu pentylu w środowisku zawierającym mieszaniny eutektyczne mleczanu choliney, Próba kontrolna zdefiniowana jako znormalizowana aktywność enzymatyczna =100%

Analiza wyników uzyskanych we wspomnianych publikacjach [P1-P3] pokazała, że wpływ soli choliney na aktywność enzymatyczną enzymów hydrolitycznych (β -galaktozydazy i lipazy) jest zależny nie tylko od rodzaju anionu, ale również od rodzaju związków HBD w roztworze. Zauważono znaczące zwiększenie aktywności enzymatycznej przy użyciu soli zawierających aniony organiczne, takie jak lewulinian czy octan, szczególnie w obecności glicerolu lub glikolu etylenowego, co sugeruje synergistyczne działanie tych składników, w przypadku β -galaktozydazy [110]. Układy zawierające mocznik, pomimo jego potencjalnie denaturujących właściwości, również nie hamowały, a w niektórych przypadkach nawet zwiększały aktywność enzymatyczną. Niska reaktywność mocznika, względem powierzchni enzymu w mieszaninach

eutektycznych, została już wcześniej zaobserwowana w literaturze [75,112]. Zjawisko to przypisywane jest bardzo silnym wiązaniem wodorowym pomiędzy grupami $-NH_2$ w moczniku, a anionem soli choliny. Niemniej jednak, te same sole choliny, w przypadku hydrolizy enzymatycznej z udziałem lipazy CALB dezaktywowały zdolności katalityczne enzymu. W literaturze opisano podobne efekty wzrostu aktywności hydrolitycznej innych enzymów w obecności soli choliny i związków HBD, co wskazuje na potencjalne uniwersalne mechanizmy oddziaływania tych składników na enzymy [49,75,112,141]. Warto jednak podkreślić, że wyniki te są pierwszym krokiem w kierunku pełnego zrozumienia wpływu środowiska reakcji na aktywność enzymów i wskazują na potrzebę dalszych, szczegółowych badań. W przyszłości kluczowe będzie zbadanie, jak specyficzne interakcje między anionami soli choliny a związkami HBD wpływają na konformację enzymów oraz ich aktywność w różnych warunkach reakcyjnych.

IV Wnioski

W pracy przedstawiono syntezę i charakterystykę mieszanin typu DES i LTTM z kationem choliny oraz anionami nieorganicznym chlorkowym oraz organicznymi: octanowym, lewulinowym, mleczanowym oraz możliwość ich zastosowania jako nowego środowiska w reakcjach biokatalizy, ze szczególnym uwzględnieniem hydrolizy enzymatycznej z udziałem enzymów z grupy hydrolaz.

Celem naukowym przedstawionej rozprawy doktorskiej były:

1. Synteza i charakterystyka właściwości fizykochemiczne mieszanin typu DES i LTTM powstałych z różnych soli choliny
2. Badania nad wykorzystaniem mieszanin DES i LTTM jako nowego środowiska lub modyfikatora środowiska reakcji hydrolizy enzymatycznej z udziałem wybranych enzymów z grupy hydrolaz

W odniesieniu do pierwszego celu przedstawionej pracy doktorskiej, przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Charakter oraz strukturalne cechy anionów soli choliny determinują ich zdolność do tworzenia wiązań wodorowych i mieszanin DES oraz LTTM, poprzez modyfikowanie wartości entalpi tworzenia kationu choliny, co znacząco wpływa na ich właściwości fizykochemiczne (**publikacja P1-P3**).
2. Typ związku HBD ma bezpośredni wpływ na właściwości fizykochemiczne mieszanin soli choliny, jednakże wpływ ten jest mniejszy niż wpływ anionu obecnego w soli choliny (**publikacja P1-P3**).

3. Aniony w solach choline tworzą złożone interakcje z związkami HBD, co bezpośrednio wpływa na właściwości fizykochemiczne mieszanin soli choline (**publikacja P1-P3**).
4. Gęstość mieszanin typu DES i LTTM zależy od anionu w soli choline w mieszaninie. Nie jest to jednak wyznacznikiem siły wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie, a efektem struktury przestrzennej powstałej sieci wiązań wodorowych. Przebadane mieszaniny można uszeregować w kolejności: chlorek > mleczan > octan > lewulinian. Gęstość mieszanin typu DES i LTTM nie jest wartością addytywną jej składowych (**publikacja P1-P3**).
5. Najśłabsze oddziaływania wodorowe spośród badanych układów są obecne w mieszaninach octanu choline oraz lewulinianu choline, w układach zarówno z glicerolem jak i mocznikiem. Mieszaniny te wykazują niższe wartości E_a , co sugeruje słabsze oddziaływania wiązań wodorowych w mieszaninie. Mieszaniny z glicerolem i/lub glikolem etylenowym w układach z chlorkiem choline lub mleczanem choline wykazują większe wartości E_a , co wskazuje na bardziej złożone oddziaływania wiązań wodorowych w mieszaninie. Najwyższe wartości E_a spośród badanych mieszanin eutektycznych, przypisać należy do mieszanin zawierających mocznik oraz mleczan choline (**publikacja P1-P3**).
6. Przebadane mieszaniny soli choline typu DES i LTTM wpisują się w dotychczasowe badania naukowe, wykazując iż im mniejsza różnica pomiędzy wielkością kationu i anionu tym niższe przewodnictwo (**publikacja P1-P3**).
7. Siła wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie jest zależna od rodzaju anionu w soli choline oraz typu związku HBD, co przekłada się na stabilność termiczną tychże mieszanin. Im większa sieć wiązań wodorowych obecnych w mieszaninie, tym wyższa temperatura początkowa procesu degradacji $T_{onset-5\%}$. (**publikacja P1-P3**).

W odniesieniu do drugiego celu przedstawionej pracy doktorskiej, przeprowadzone eksperymenty pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Wzrost aktywności enzymatycznej jest bezpośrednio związany z rodzajem anionu soli cholinej oraz z oddziaływaniem anion soli cholinej – związek HBD oraz anion soli cholinej – powierzchnia enzymu. Niskie stężenia mieszanin soli cholinej ze związkami HBD, w środowisku wodnym, mogą stabilizować enzymy hydrolityczne, zwiększając ich stabilność termiczną. Wzrost aktywności enzymatycznej wynikający z obecności mieszaniny soli cholinej w medium reakcyjnym, w niskim stężeniu (<20%), przewyższa wpływ na aktywność enzymatyczną obu związków stosowanych osobno, w tym samym stężeniu. Potwierdza to synergistyczne działanie obu związków obecnych w mieszaninie. Dodatkowo, wpływ stężenia mieszaniny soli cholinej (ze związkami HBD) na parametry operacyjne enzymu β -galaktozydazy jest zależny od substratu użytego w reakcji. W reakcji hydrolizy enzymatycznej z udziałem β -galaktozydazy – dla reakcji hydrolizy w środowisku lewulinianu cholinej z glikolem etylenowym z naturalnym substratem (laktozą) aktywność enzymatyczna była 50% niższa, niż dla reakcji hydrolizy z modelowym substratem ONPG, przy tym samym stężeniu mieszaniny dla obu reakcji. (odpowiednio 300% i 600% wzrost aktywności względem próby kontrolnej) **(publikacja P1-P2)**
2. Niskie stężenie mieszaniny typu DES lub LTTM soli cholinej w medium reakcyjnym może zwiększyć parametry operacyjne enzymów w procesach biokatalizy, jest to jednak zależne od charakteru biokatalizatora, mechanizmu reakcji oraz od substratu użytego w danej reakcji **(publikacja P1-P2)**.
3. W zależności od stężenia mieszaniny eutektycznej w medium reakcyjnym, enzymy mogą zachowywać stabilność jednocześnie wykazując aktywność inną, niż aktywność hydrolityczna, czego przykładem jest zdolność lipazy do prowadzenia reakcji

transestryfikacji, w środowisku mieszanin LTTM powstałych przy udziale mleczanu choliny **(publikacja P1-P2)**.

Podsumowując, moje badania ujawniają znaczący potencjał mieszanin eutektycznych w biokatalizie, jednocześnie zwracając uwagę na konieczność dalszych badań, aby przezwyciężyć istniejące ograniczenia i pełniej wykorzystać ich potencjał w przemyśle. Odkrycia te otwierają nowe możliwości dla optymalizacji procesów biokatalizy, podkreślając rolę szczegółowej analizy interakcji między solami choliny, ich anionami, a enzymami. Do największych ograniczeń badawczych należą precyzyjność oraz specyfika modelowania molekularnego oraz metody spektroskopii ^{15}N HN-HSQC z udziałem enzymów. Połączenie tych dwóch metod, może pozwolić na głębsze zrozumienie mechanizmu odpowiedzialnego za wzrost wydajności reakcji enzymatycznej w obecności soli choliny.

Literatura

- [1] A.P. Abbott, G. Capper, K.J. McKenzie, K.S. Ryder, Electrodeposition of zinc–tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 599 (2007) 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2006.04.024>.
- [2] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep eutectic solvents (DESs) and their applications, *Chemical Reviews* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [3] H. Zhao, G.A. Baker, Ionic liquids, and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (2013) 3–12. <https://doi.org/10.1002/jctb.3935>.
- [4] M.B. Singh, V.S. Kumar, M. Chaudhary, P. Singh, A mini review on synthesis, properties and applications of deep eutectic solvents, *Journal of the Indian Chemical Society* 98 (2021) 100210. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100210>.
- [5] E.L. Smith, A.P. Abbott, K.S. Ryder, Deep eutectic solvents (DESs) and their applications, *Chemical Reviews* 114 (2014) 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>.
- [6] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J.R. Sangoro, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications, *Chemical Reviews* 121 (2021) 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [7] M. Francisco, A. van den Bruinhorst, M.C. Kroon, Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents, *Angewandte Chemie International Edition* 52 (2013) 3074–3085. <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>.
- [8] C. Ruß, B. König, Low melting mixtures in organic synthesis – an alternative to ionic liquids? *Green Chem* 14 (2012) 2969. <https://doi.org/10.1039/c2gc36005e>.
- [9] C. Florindo, F.S. Oliveira, L.P.N. Rebelo, A.M. Fernandes, I.M. Marrucho, Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and

Carboxylic Acids, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2 (2014) 2416–2425.

<https://doi.org/10.1021/sc500439w>.

- [10] Y. Cui, C. Li, J. Yin, S. Li, Y. Jia, M. Bao, Design, synthesis, and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride, *Journal of Molecular Liquids* 236 (2017) 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.04.052>.
- [11] Y.-T. Liu, Y.-A. Chen, Y.-J. Xing, Synthesis and characterization of novel ternary deep eutectic solvents, *Chinese Chemical Letters* 25 (2014) 104–106. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2013.09.004>.
- [12] H.R. Lobo, B.S. Singh, G.S. Shankarling, Deep eutectic solvents and glycerol: a simple, environmentally benign, and efficient catalyst/reaction media for synthesis of N- aryl phthalimide derivatives, *Green Chemistry Letters and Reviews* 5 (2012) 487–533. <https://doi.org/10.1080/17518253.2012.669500>.
- [13] A.P. Abbott, D. Boothby, G. Capper, D.L. Davies, R.K. Rasheed, Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids, *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004) 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266j>.
- [14] A.P. Abbott, G. Capper, S. Gray, Design of improved deep eutectic solvents using hole theory, *ChemPhysChem* 7 (2006) 803–806. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500489>.
- [15] M.H. Shafie, R. Yusof, C.-Y. Gan, Synthesis of citric acid monohydrate-choline chloride based deep eutectic solvents (DES) and characterization of their physicochemical properties, *Journal of Molecular Liquids* 288 (2019) 111081. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111081>.
- [16] R. Xin, S. Qi, C. Zeng, F.I. Khan, B. Yang, Y. Wang, A functional natural deep eutectic solvent based on trehalose: Structural and physicochemical properties, *Food Chemistry* 217 (2017) 560–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.012>.
- [17] M.K. AlOmar, M. Hayyan, M.A. AlSaadi, S. Akib, A. Hayyan, M.A. Hashim, Glycerol-based deep eutectic solvents: Physical properties, *Journal of Molecular Liquids* 215 (2016) 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.032>.

- [18] D. Troter, Z. Todorovic, D. Djokic-Stojanovic, B. Djordjevic, V. Todorovic, S. Konstantinovic, V. Veljkovic, The physicochemical and thermodynamic properties of the choline chloride-based deep eutectic solvents, *J Serb Chem Soc* 82 (2017) 1039–1052. <https://doi.org/10.2298/JSC170225065T>.
- [19] N.F. Gajardo-Parra, M.J. Lubben, J.M. Winnert, Á. Leiva, J.F. Brennecke, R.I. Canales, Physicochemical properties of choline chloride-based deep eutectic solvents and excess properties of their pseudo-binary mixtures with 1-butanol, *The Journal of Chemical Thermodynamics* 133 (2019) 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.02.010>.
- [20] W. Guo, Y. HOU, S. Ren, S. Tian, W. WU, Formation of Deep Eutectic Solvents by Phenols and Choline Chloride and Their Physical Properties, *Journal of Chemical & Engineering Data* 58 (2013) 866–872. <https://doi.org/10.1021/je300997v>.
- [21] G.R. Jenkin, A.Z. Al-Bassam, R.C. Harris, A.P. Abbott, D.J. Smith, D.A. Holwell, R.J. Chapman, C.J. Stanley, the application of deep eutectic solvent ionic liquids for environmentally-friendly dissolution and recovery of precious metals, *Minerals Engineering* 87 (2016) 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2015.09.026>.
- [22] C. Ma, A. Laaksonen, C. Liu, X. Lu, X. Ji, The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents, *Chemical Society Reviews* 47 (2018) 8685–8720. <https://doi.org/10.1039/c8cs00325d>.
- [23] D. Yu, Z. Xue, T. Mu, Eutectics: formation, properties, and applications, *Chem. Soc. Rev.* 50 (2021) 8596–8638. <https://doi.org/10.1039/D1CS00404B>.
- [24] A.P. Abbott, G. Capper, D.L. Davies, K.J. McKenzie, S.U. Obi, Solubility of Metal Oxides in Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride, *J. Chem. Eng. Data* 51 (2006) 1280–1282. <https://doi.org/10.1021/je060038c>.
- [25] A.P. Abbott, J. Collins, I. Dalrymple, R.C. Harris, R. Mistry, F. Qiu, J. Scheirer, W.R. Wise, Processing of Electric Arc Furnace Dust using Deep Eutectic Solvents, *Aust. J. Chem.* 62 (2009) 341. <https://doi.org/10.1071/CH08476>.

- [26] M.A. Topçu, A. Rüßen, Ö. Küçük, Treatment of copper converter slag with deep eutectic solvent as green chemical, *Waste management (New York, N.Y.)* 132 (2021) 64–73.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.07.022>.
- [27] G. García, S. Aparicio, R. Ullah, M. Atilhan, Deep Eutectic Solvents: Physicochemical Properties and Gas Separation Applications, *Energy Fuels* 29 (2015) 2616–2644.
<https://doi.org/10.1021/ef5028873>.
- [28] A. Tatar, A. Barati-Harooni, A. Najafi-Marghmaleki, A. Bahadori, Accurate prediction of CO₂ solubility in eutectic mixture of levulinic acid (or furfuryl alcohol) and choline chloride, *International Journal of Greenhouse Gas Control* 58 (2017) 212–222.
<https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2017.01.013>.
- [29] Y. Xie, H. Dong, S. Zhang, X. Lu, X. Ji, Solubilities of CO₂, CH₄, H₂, CO and N₂ in choline chloride/urea, *Green Energy & Environment* 1 (2016) 195–200.
<https://doi.org/10.1016/j.gee.2016.09.001>.
- [30] F.S. Oliveira, A.B. Pereiro, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, Deep eutectic solvents as extraction media for azeotropic mixtures, *Green Chem* 15 (2013) 1326.
<https://doi.org/10.1039/c3gc37030e>.
- [31] C. Ma, S. Sarmad, J.-P. Mikkola, X. Ji, Development of Low-Cost Deep Eutectic Solvents for CO₂ Capture, *Energy Procedia* 142 (2017) 3320–3325.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.12.464>.
- [32] Q. Xu, L.Y. Qin, Y.N. Ji, P.K. Leung, H.N. Su, F. Qiao, W.W. Yang, A.A. Shah, H.M. Li, A deep eutectic solvent (DES) electrolyte-based vanadium-iron redox flow battery enabling higher specific capacity and improved thermal stability, *Electrochimica Acta* 293 (2019) 426–431. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.10.063>.
- [33] C.L. Boldrini, N. Manfredi, F.M. Perna, V. Trifiletti, V. Capriati, A. Abbotto, Dye-Sensitized Solar Cells that use an Aqueous Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvent as Effective Electrolyte Solution, *Energy Technology* 5 (2017) 345–353.
<https://doi.org/10.1002/ente.201600420>.

- [34] Z. Wu, R.-R. Huang, H. Yu, Y.-C. Xie, X.-Y. Lv, J. Su, Y.-F. Long, Y.-X. Wen, Deep Eutectic Solvent Synthesis of LiMnPO_4/C Nanorods as a Cathode Material for Lithium Ion Batteries, *Materials* 10 (2017) 134. <https://doi.org/10.3390/ma10020134>.
- [35] G. Cong, Y.-C. Lu, Organic Eutectic Electrolytes for Future Flow Batteries, *Chem* 4 (2018) 2732–2734. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.11.018>.
- [36] N. Altunay, A. Elik, R. Gürkan, Monitoring of some trace metals in honeys by flame atomic absorption spectrometry after ultrasound assisted-dispersive liquid liquid microextraction using natural deep eutectic solvent, *Microchemical Journal* 147 (2019) 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.003>.
- [37] Z. Maugeri, P. Domínguez de María, Whole-Cell Biocatalysis in Deep-Eutectic-Solvents/Aqueous Mixtures, *ChemCatChem* 6 (2014) 1535–1537. <https://doi.org/10.1002/cctc.201400077>.
- [38] M. Pätzold, S. Siebenhaller, S. Kara, A. Liese, C. Syldatk, D. Holtmann, Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis, *Trends in biotechnology* 37 (2019) 943–959. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.007>.
- [39] H. Zhao, C. Zhang, T.D. Crittle, Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85-86 (2013) 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.003>.
- [40] Z.-L. Huang, B.-P. Wu, Q. Wen, T.-X. Yang, Z. Yang, Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (2014) 1975–1981. <https://doi.org/10.1002/jctb.4285>.
- [41] M. Krystof, M. Pérez-Sánchez, P. Domínguez de María, Lipase-catalyzed (trans)esterification of 5-hydroxy- methylfurfural and separation from HMF esters using deep-eutectic solvents, *ChemSusChem* 6 (2013) 630–634. <https://doi.org/10.1002/cssc.201200931>.
- [42] S. Khandelwal, Y.K. Tailor, M. Kumar, Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations, *Journal of Molecular Liquids* 215 (2016) 345–386. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.015>.

- [43] H. Zhao, DNA Stability in Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90 (2015) 19–25. <https://doi.org/10.1002/jctb.4511>.
- [44] Y.P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W.F. Wong, M.A. Hashim, C.Y. Looi, Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges, *Biotechnology Advances* 35 (2017) 105–134. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.006>.
- [45] P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, W.-Y. Lou, Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis, *Bioresources and Bioprocessing* 4 (2017) 34. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0165-5>.
- [46] M.G. Kim, S.B. Lee, Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: interaction of organic solvents with enzymes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1 (1996) 181–190. [https://doi.org/10.1016/1381-1177\(96\)00005-7](https://doi.org/10.1016/1381-1177(96)00005-7).
- [47] J. Gorke, F. Sreenc, R. Kazlauskas, Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15 (2010) 40–53. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3079-z>.
- [48] D.T. Dang, S.H. Ha, S.-M. Lee, W.-J. Chang, Y.-M. Koo, Enhanced activity and stability of ionic liquid-pretreated lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 45 (2007) 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.01.001>.
- [49] H. Zhao, G.A. Baker, S. Holmes, New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel, *Organic & Biomolecular Chemistry* 9 (2011) 1908–1916. <https://doi.org/10.1039/c0ob01011a>.
- [50] A.A. Papadopoulou, M.H. Katsoura, A. Chatzikonstantinou, E. Kyriakou, A.C. Polydera, A.G. Tzakos, H. Stamatis, Enzymatic hybridization of α -lipoic acid with bioactive compounds in ionic solvents, *Bioresource Technology* 136 (2013) 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.067>.
- [51] M. Goldfeder, A. Fishman, Modulating enzyme activity using ionic liquids or surfactants, *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (2014) 545–554. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5395-7>.

- [52] H. Zhao, G.A. Baker, S. Holmes, Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 72 (2011) 163–167.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.015>.
- [53] I.M. Aroso, A. Paiva, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, Natural deep eutectic solvents from choline chloride and betaine – Physicochemical properties, *Journal of Molecular Liquids* 241 (2017) 654–661. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.051>.
- [54] D.J.G.P. van Osch, Dietz, Carin H. J. T., J. van Spronsen, M.C. Kroon, F. Gallucci, M. van Sint Annaland, R. Tuinier, A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2019) 2933–2942.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03520>.
- [55] R.A. Sheldon, D. Brady, M.L. Bode, The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis, *Chemical science* 11 (2020) 2587–2605.
<https://doi.org/10.1039/c9sc05746c>.
- [56] Q.Z. Zhou, X.D. Chen, Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochemical Engineering Journal* 9 (2001) 33–40. [https://doi.org/10.1016/s1369-703x\(01\)00118-8](https://doi.org/10.1016/s1369-703x(01)00118-8).
- [57] C.S. Kim, E.-S. Ji, D.-K. Oh, Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* beta-galactosidase in *Escherichia coli*, *Biotechnol Lett* 25 (2003) 1769–1774.
<https://doi.org/10.1023/A:1026092029785>.
- [58] A. Pereira-Rodríguez, R. Fernández-Leiro, M.I. González-Siso, M.E. Cerdán, M. Becerra, J. Sanz-Aparicio, Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase, *Journal of Structural Biology* 177 (2012) 392–401.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.11.031>.
- [59] T.L. de Albuquerque, M. de Sousa, Gomes e Silva, Natan Câmara, Girão Neto, Carlos Alberto Chaves, L.R.B. Gonçalves, R. Fernandez-Lafuente, M.V.P. Rocha, β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*: Characterization, production, immobilization, and applications - A review, *International Journal of Biological Macromolecules* 191 (2021) 881–898.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.133>.

- [60] D.H. Juers, B.W. Matthews, R.E. Huber, LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance, *Protein science a publication of the Protein Society* 21 (2012) 1792–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>.
- [61] R.R. Monteiro, J.J. Virgen-Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, T.N. Da Rocha, J.C. dos Santos, A.R. Alcántara, R. Fernandez-Lafuente, Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*, *Catalysis Today* 362 (2021) 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>.
- [62] H. Zhao, C. Zhang, T.D. Crittle, Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 85–86 (2013) 243–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.09.003>.
- [63] F.J. Contesini, R.R. de Melo, H.H. Sato, An overview of *Bacillus* proteases: from production to application, *Critical Reviews in Biotechnology* 38 (2018) 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>.
- [64] E.L. Bell, W. Finnigan, S.P. France, A.P. Green, M.A. Hayes, L.J. Hepworth, S.L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K.S. Ryan, N.J. Turner, S.L. Flitsch, *Biocatalysis*, *Nat Rev Methods Primers* 1 (2021) 1–21. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>.
- [65] H. Acidereli, E.G. Sogut, S.D. Mustafafov, M. Gulcan, F. Sen, *Biocatalysis: Fundamentals and solvent parameters*, in: *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*, Elsevier, 2021, pp. 73–84.
- [66] H. Monhemi, M.R. Housaindokht, A.A. Moosavi-Movahedi, M.R. Bozorgmehr, How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea choline chloride deep eutectic solvent, *Physical Chemistry Chemical Physics* 16 (2014) 14882–14893. <https://doi.org/10.1039/c4cp00503a>.
- [67] M. Matsumoto, K. Kida, K. Kondo, Enhanced activities of lipase pretreated with organic solvents, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76 (2001) 1070–1073. <https://doi.org/10.1002/jctb.491>.

- [68] Z. Yang, K.-P. Zhang, Y. Huang, Z. Wang, Both hydrolytic and transesterification activities of *Penicillium expansum* lipase are significantly enhanced in ionic liquid [BMIm][PF₆], *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 63 (2010) 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.014>.
- [69] I. Juneidi, M. Hayyan, M.A. Hashim, A. Hayyan, Pure and aqueous deep eutectic solvents for a lipase-catalysed hydrolysis reaction, *Biochemical Engineering Journal* 117 (2017) 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.003>.
- [70] E. Durand, J. Lecomte, B. Baréa, G. Piombo, E. Dubreucq, P. Villeneuve, Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions, *Process Biochemistry* 47 (2012) 2081–2089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027>.
- [71] E. Durand, J. Lecomte, B. Baréa, E. Dubreucq, R. Lortie, P. Villeneuve, Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids, *Green Chem.* 15 (2013) 2275. <https://doi.org/10.1039/c3gc40899j>.
- [72] S.-L. Cao, D.-M. Yue, X.-H. Li, T.J. Smith, N. Li, M.-H. Zong, H. Wu, Y.-Z. Ma, W.-Y. Lou, Novel Nano-/Micro-Biocatalyst: Soybean Epoxide Hydrolase Immobilized on UiO-66-NH₂ MOF for Efficient Biosynthesis of Enantiopure (R)-1, 2-Octanediol in Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 4 (2016) 3586–3595. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00777>.
- [73] G. Weiz, L. Braun, R. Lopez, P.D. de María, J.D. Breccia, Enzymatic deglycosylation of flavonoids in deep eutectic solvents-aqueous mixtures: paving the way for sustainable flavonoid chemistry, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 130 (2016) 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.04.010>.
- [74] F. Peng, Y. Zhao, F.-Z. Li, M.-H. Zong, W.-Y. Lou, The effect of deep eutectic solvents on the asymmetric hydrolysis of styrene oxide by mung bean epoxide hydrolases, *Bioresources and Bioprocessing* 5 (2018). <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0191-y>.
- [75] W.-J. Xu, Y.-K. Huang, F. Li, D.-D. Wang, M.-N. Yin, M. Wang, Z.-N. Xia, Improving β -glucosidase biocatalysis with deep eutectic solvents based on choline chloride, *Biochemical Engineering Journal* 138 (2018) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.002>.

- [76] G. Yang, T. Tong, Y. Yang, W. Liu, X. Wang, Amano Lipase PS-catalyzed Hydrolysis of Pine Nut Oil for the Fatty Acids Production Using Deep Eutectic Solvent as Co-solvent, *Journal of oleo science* 68 (2019) 977–988. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19069>.
- [77] Y.-Y. Zang, X. Yang, Z.-G. Chen, T. Wu, One-pot preparation of quercetin using natural deep eutectic solvents, *Process Biochemistry* 89 (2020) 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.019>.
- [78] K. Rezaei, E. Jenab, F. Temelli, Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids, *Critical Reviews in Biotechnology* 27 (2007) 183–195. <https://doi.org/10.1080/07388550701775901>.
- [79] J. Yao, C. Li, L. Xiao, Y. Wu, Q. Wu, Z. Cui, B. Wang, Influence of natural deep eutectic solvents on stability and structure of cellulase, *Journal of Molecular Liquids* 346 (2022) 118238. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118238>.
- [80] W.-W. Gao, F.-X. Zhang, G.-X. Zhang, C.-H. Zhou, Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis, *Biochemical Engineering Journal* 99 (2015) 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.005>.
- [81] H. Zhao, S.M. Campbell, L. Jackson, Z. Song, O. Olubajo, Hofmeister series of ionic liquids: kosmotropic effect of ionic liquids on the enzymatic hydrolysis of enantiomeric phenylalanine methyl ester, *Tetrahedron: Asymmetry* 17 (2006) 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2006.01.015>.
- [82] Kasimir P. Gregory, Erica J. Wanless, Grant B. Webber, Vincent S. J. Craig, Alister J. Page, The electrostatic origins of specific ion effects: quantifying the Hofmeister series for anions, *Chemical science* 12 (2021) 15007–15015. <https://doi.org/10.1039/D1SC03568A>.
- [83] C. Schröder, Proteins in Ionic Liquids: Current Status of Experiments and Simulations, *Topics in current chemistry (Cham)* 375 (2017) 25. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0110-2>.
- [84] H. Zhao, Protein Stabilization and Enzyme Activation in Ionic Liquids: Specific Ion Effects, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 25–50. <https://doi.org/10.1002/jctb.4837>.

- [85] A. Sanchez-Fernandez, A.J. Jackson, Chapter Four - Proteins in deep eutectic solvents: Structure, dynamics, and interactions with the solvent, in: R. Verpoorte, G.-J. Witkamp, Y.H. Choi (Eds.), *Advances in Botanical Research Eutectic Solvents and Stress in Plants*, Academic Press, 2021, pp. 69–94.
- [86] T. El Achkar, S. Fourmentin, H. Greige-Gerges, Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds, *Journal of Molecular Liquids* 288 (2019) 111028. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111028>.
- [87] H. Zhao, Protein Stabilization and Enzyme Activation in Ionic Liquids: Specific Ion Effects, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2016) 25–50. <https://doi.org/10.1002/jctb.4837>.
- [88] H. Wang, S. Liu, Y. Zhao, J. Wang, Z. Yu, Insights into the Hydrogen Bond Interactions in Deep Eutectic Solvents Composed of Choline Chloride and Polyols, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2019) 7760–7767. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06676>.
- [89] L. Bui-Le, C.J. Clarke, A. Bröhl, A.P.S. Brogan, J.A.J. Arpino, K.M. Polizzi, J.P. Hallett, Revealing the complexity of ionic liquid-protein interactions through a multi-technique investigation, *Commun Chem* 3 (2020) 55. <https://doi.org/10.1038/s42004-020-0302-5>.
- [90] H. Weingärtner, C. Cabrele, C. Herrmann, How ionic liquids can help to stabilize native proteins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 415–426. <https://doi.org/10.1039/C1CP21947B>.
- [91] S.S. Ribeiro, T.G. Castro, C.M. Gomes, J.C. Marcos, Hofmeister effects on protein stability are dependent on the nature of the unfolded state, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 23 (2021) 25210–25225. <https://doi.org/10.1039/D1CP02477A>.
- [92] Z. Yang, Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis, *Journal of Biotechnology* 144 (2009) 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.011>.
- [93] K.P. Gregory, G.R. Elliott, H. Robertson, A. Kumar, E.J. Wanless, G.B. Webber, V.S.J. Craig, G.G. Andersson, A.J. Page, Understanding specific ion effects and the Hofmeister series, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 24 (2022) 12682–12718. <https://doi.org/10.1039/D2CP00847E>.

- [94] P.A. Hunt, C.R. Ashworth, R.P. Matthews, Hydrogen bonding in ionic liquids, *Chemical Society Reviews* 44 (2015) 1257–1288. <https://doi.org/10.1039/C4CS00278D>.
- [95] K. Morokuma, Why do molecules interact? The origin of electron donor-acceptor complexes, hydrogen bonding and proton affinity, *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 294–300. <https://doi.org/10.1021/ar50116a004>.
- [96] Jeffrey GA, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, 1997.
- [97] Z. Maugeri, P. Domínguez de María, Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols, *RSC Adv* 2 (2012) 421–425. <https://doi.org/10.1039/C1RA00630D>.
- [98] M.A.R. Martins, D.O. Abranches, L.P. Silva, S.P. Pinho, J.A.P. Coutinho, Insights into the Chloride versus Bromide Effect on the Formation of Urea-Quaternary Ammonium Eutectic Solvents, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 61 (2022) 11988–11995. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c01274>.
- [99] S.H. Zeisel, CHOLINE | Properties and Determination, in: B. Caballero, L.C. Trugo, P.M. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2nd ed., Academic, San Diego, Calif., London, 2003, pp. 1251–1254.
- [100] A. Basaiahgari, S. Panda, R.L. Gardas, Effect of Ethylene, Diethylene, and Triethylene Glycols and Glycerol on the Physicochemical Properties and Phase Behavior of Benzyltrimethyl and Benzyltributylammonium Chloride Based Deep Eutectic Solvents at 283.15–343.15 K, *Journal of Chemical & Engineering Data* 63 (2018) 2613–2627. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00213>.
- [101] V. Fischer, *Properties and applications of deep eutectic solvents and low-melting mixtures*, 2015.
- [102] I.H. Segel, Enzyme Kinetics, in: W.J. Lennarz, M.D. Lane (Eds.), *Encyclopedia of biological chemistry* [electronic resource], Elsevier, Waltham, uuuu-uuuu, pp. 216–220.
- [103] R.J. Ellis, Macromolecular crowding: obvious but underappreciated, *Trends in Biochemical Sciences* 26 (2001) 597–604. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01938-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01938-7).

- [104] P.B. Sánchez, B. González, J. Salgado, J. José Parajó, Á. Domínguez, Physical properties of seven deep eutectic solvents based on l-proline or betaine, *The Journal of Chemical Thermodynamics* 131 (2019) 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2018.12.017>.
- [105] A. Boisset, J. Jacquemin, M. Anouti, Physical properties of a new Deep Eutectic Solvent based on lithium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide and N-methylacetamide as superionic suitable electrolyte for lithium ion batteries and electric double layer capacitors, *Electrochimica Acta* 102 (2013) 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.03.150>.
- [106] Y. Zhang, D. Poe, L. Heroux, H. Squire, B.W. Doherty, Z. Long, M. Dadmun, B. Gurkan, M.E. Tuckerman, E.J. Maginn, Liquid Structure and Transport Properties of the Deep Eutectic Solvent Ethaline, *The Journal of Physical Chemistry B* 124 (2020) 5251–5264. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c04058>.
- [107] Y.-P. Hsieh, R.B. Leron, A.N. Soriano, A.R. Caparanga, M.-H. Li, Diffusivity, Density and Viscosity of Aqueous Solutions of Choline Chloride/Ethylene Glycol and Choline Chloride/Malonic Acid, *J. Chem. Eng. Japan / JCEJ* 45 (2012) 939–947. <https://doi.org/10.1252/jcej.12we128>.
- [108] H.-Z. SU, J.-M. YIN, Q.-S. LIU, C.-P. LI, Properties of Four Deep Eutectic Solvents: Density, Electrical Conductivity, Dynamic Viscosity and Refractive Index, *Acta Physico-Chimica Sinica* 31 (2015) 1468–1473. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201506111>.
- [109] J. Hoppe, R. Drozd, E. Byzia, M. Smiglak, Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase, *International Journal of Biological Macromolecules* 136 (2019) 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.027>.
- [110] J. Hoppe, E. Byzia, M. Szymańska, R. Drozd, M. Smiglak, Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents, *Food Chemistry* 384 (2022) 132498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>.
- [111] F.S. Mjalli, J. Naser, Viscosity model for choline chloride-based deep eutectic solvents, *Asia-Pacific J Chem Eng* 10 (2015) 273–281. <https://doi.org/10.1002/apj.1873>.

- [112] M.L. Toledo, M.M. Pereira, M.G. Freire, J.P.A. Silva, J.A.P. Coutinho, A.P.M. Tavares, Laccase Activation in Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (2019) 11806–11814. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02179>.
- [113] G. Gygli, X. Xu, J. Pleiss, Meta-analysis of viscosity of aqueous deep eutectic solvents and their components, *Sci Rep* 10 (2020) 21395. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78101-y>.
- [114] R. Stefanovic, M. Ludwig, G.B. Webber, R. Atkin, A.J. Page, Nanostructure, hydrogen bonding and rheology in choline chloride deep eutectic solvents as a function of the hydrogen bond donor, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 3297–3306. <https://doi.org/10.1039/C6CP07932F>.
- [115] A.P. Abbott, Model for the conductivity of ionic liquids based on an infinite dilution of holes, *ChemPhysChem* 6 (2005) 2502–2505. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500283>.
- [116] C. D'Agostino, R.C. Harris, A.P. Abbott, L.F. Gladden, M.D. Mantle, Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by ¹H pulsed field gradient NMR spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011) 21383–21391. <https://doi.org/10.1039/c1cp22554e>.
- [117] A.A. Kityk, D.A. Shaiderov, E.A. Vasil'eva, V.S. Protsenko, F.I. Danilov, Choline chloride based ionic liquids containing nickel chloride: Physicochemical properties and kinetics of Ni(II) electroreduction, *Electrochimica Acta* 245 (2017) 133–145. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.05.144>.
- [118] N. Delgado-Mellado, M. Larriba, P. Navarro, V. Rigual, M. Ayuso, J. García, F. Rodríguez, Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis, *Journal of Molecular Liquids* 260 (2018) 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.03.076>.
- [119] D. Lapeña, F. Bergua, L. Lomba, B. Giner, C. Lafuente, A comprehensive study of the thermophysical properties of reline and hydrated reline, *Journal of Molecular Liquids* 303 (2020) 112679. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112679>.
- [120] T. Altamash, M. Atilhan, A. Aliyan, R. Ullah, M. Nasser, S. Aparicio, Rheological, Thermodynamic, and Gas Solubility Properties of Phenylacetic Acid-Based Deep Eutectic

Solvents, *Chem Eng & Technol* 40 (2017) 778–790.

<https://doi.org/10.1002/ceat.201600475>.

- [121] M. Hayyan, A. Abo-Hamad, M.A. AlSaadi, M.A. Hashim, Functionalization of graphene using deep eutectic solvents, *Nanoscale Res Lett* 10 (2015) 1004.
<https://doi.org/10.1186/s11671-015-1004-2>.
- [122] S.L. Perkins, P. Painter, C.M. Colina, Experimental and Computational Studies of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents, *Journal of Chemical & Engineering Data* 59 (2014) 3652–3662. <https://doi.org/10.1021/je500520h>.
- [123] W. Rahmalia, A. Shofiyani, Y. Sutiknyawati, S. Septiani, Simple Green Routes for Metal-Bixin Complexes Synthesis Using Glycerol-Based Deep Eutectic Solvent, *Indones. J. Chem.* 22 (2022) 1759. <https://doi.org/10.22146/ijc.76759>.
- [124] Z. Maugeri, W. Leitner, P. Domínguez de María, Chymotrypsin-Catalyzed Peptide Synthesis in Deep Eutectic Solvents, *European Journal of Organic Chemistry* 2013 (2013) 4223–4228. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201300448>.
- [125] J. Pleiss, M. Fischer, R.D. Schmid, Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chemistry, and physics of lipids* 93 (1998) 67–80.
[https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(98\)00030-9](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(98)00030-9).
- [126] L. Silvestrini, M. Cianci, Principles of lipid-enzyme interactions in the limbus region of the catalytic site of *Candida antarctica* Lipase B, *International Journal of Biological Macromolecules* 158 (2020) 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.061>.
- [127] S. Wang, X. Meng, H. Zhou, Y. Liu, F. Secundo, Y. Liu, Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review, *Catalysts* 6 (2016) 32.
<https://doi.org/10.3390/catal6020032>.
- [128] Z. Yang, W. Pan, Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis, *Enzyme and Microbial Technology* 37 (2005) 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.02.014>.
- [129] Z.-L. Huang, B.-P. Wu, Q. Wen, T.-X. Yang, Z. Yang, Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89 (2014) 1975–1981.
<https://doi.org/10.1002/jctb.4285>.

- [130] D. Lindberg, M. de La Fuente Revenga, M. Widersten, Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis, *Journal of Biotechnology* 147 (2010) 169–171. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.04.011>.
- [131] J.R. Xavier, K.V. Ramana, R.K. Sharma, β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing, *J Food Biochem* 42 (2018) e12564. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12564>.
- [132] J. Hoppe, E. Byzia, R. Drozd, M. Szymańska, P. Bielecki, M. Smiglak, An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 216 (2022) 112518. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>.
- [133] S. Khodaverdian, B. Dabirmanesh, A. Heydari, E. Dashtban-Moghadam, K. Khajeh, F. Ghazi, Activity, stability, and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents, *International Journal of Biological Macromolecules* 107 (2018) 2574–2579. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.144>.
- [134] J. Almarza, L. Rincon, A. Bahsas, F. Brito, Molecular mechanism for the denaturation of proteins by urea, *Biochemistry* 48 (2009) 7608–7613. <https://doi.org/10.1021/bi9007116>.
- [135] M. Kumari, U.K. Singh, I. Beg, A.M. Alanazi, A.A. Khan, R. Patel, Effect of cations and anions of ionic liquids on the stability and activity of lysozyme: Concentration and temperature effect, *Journal of Molecular Liquids* 272 (2018) 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.09.075>.
- [136] A. Schindl, M.L. Hagen, S. Muzammal, H.A.D. Gunasekera, A.K. Croft, Proteins in Ionic Liquids: Reactions, Applications, and Futures, *Front. Chem.* 7 (2019) 347. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00347>.
- [137] T. Steiner, G. Koellner, Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures, *Journal of Molecular Biology* 305 (2001) 535–557. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4301>.
- [138] Z.S. Derewenda, L. Lee, U. Derewenda, The occurrence of C-H...O hydrogen bonds in proteins, *Journal of Molecular Biology* 252 (1995) 248–262. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0492>.

- [139] B. Nian, C. Cao, Y. Liu, How *Candida antarctica* lipase B can be activated in natural deep eutectic solvents: experimental and molecular dynamics studies, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 95 (2020) 86–93. <https://doi.org/10.1002/jctb.6209>.
- [140] G. Pencreac'h, J.C. Baratti, Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media, *Enzyme and Microbial Technology* 18 (1996) 417–422. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00120-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00120-4).
- [141] J.-N. Tan, Y. Dou, Deep eutectic solvents for biocatalytic transformations: focused lipase-catalyzed organic reactions, *Appl Microbiol Biotechnol* 104 (2020) 1481–1496. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10342-y>.
- [142] H. Zhang, J.M. Vicent-Luna, S. Tao, S. Calero, R.J. Jiménez Riobóo, M.L. Ferrer, F. Del Monte, M.C. Gutiérrez, Transitioning from Ionic Liquids to Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 10 (2022) 1232–1245. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06999>.
- [143] J. Cao, R. Wu, F. Zhu, Q. Dong, E. Su, Enzymes in nearly anhydrous deep eutectic solvents: Insight into the biocompatibility and thermal stability, *Enzyme and Microbial Technology* 157 (2022) 110022. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110022>.
- [144] M. Panić, M. Cvjetko Bubalo, I. Radojčić Redovniković, Designing a biocatalytic process involving deep eutectic solvents, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 96 (2021) 14–30. <https://doi.org/10.1002/jctb.6545>.

V. Kopie cyklu publikacji

KOPIE CYKLU PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE, O KTÓRYCH MOWA W ART. 13 UST. 2 USTAWY O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI

[P1] Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase, International Journal of Biological Macromolecules, 136, 2019, 296-304

[P2] Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents, Food Chemistry, 384, 2022, 132498

[P3] An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties, 216, 2022, 112518



Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase

Jakub Hoppe^a, Radosław Drozd^b, Ewa Byzia^c, Marcin Smiglak^{c,*}

^a Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań, Poland

^b Department of Immunology, Microbiology and Physiological Chemistry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastów 45, 70-311 Szczecin, Poland

^c Poznań Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, ul. Rubież 46, 61-612 Poznań, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2019

Received in revised form 4 June 2019

Accepted 4 June 2019

Available online 6 June 2019

ABSTRACT

In presented study analysis of physicochemical properties of deep eutectic solvents (DESs) and their usefulness as an element of reaction medium for β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* was conducted. Analyzed DESs were based on choline salt derivatives: choline chloride, choline acetate and hydrogen bond-donors (HBD) such as: glycerol, ethylene glycol, urea, thiourea and levulinic acid. Results showed that reaction medium with appropriate amount of DES based on choline acetate had beneficial effect on activity of β -galactosidase. The 5% (v/v) addition of developed choline acetate:glycerol DES mixture enhanced enzyme activity almost three fold. The results of performed experiments have also revealed that β -galactosidase activity is less affected by the organic anion as choline acetate in ionic liquid, than inorganic anion as choline chloride. The developed green solvents as DES based on choline acetate exhibit a wide application potential that can be used to increase efficiency of enzyme-based industrial process.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the last decades, efforts have been made to replace volatile and toxic organic solvents often used in synthesis and chemical processes. This approach comprises the utilization of easy recyclable and non-volatile systems such as ionic liquids or deep eutectic solvents (DESs) [1]. Considerable scientific and economic interests have been devoted to extend the range of search for green solvents, lately, especially for natural deep eutectic solvents. In contrast to ionic liquids - composed of one anion and cation, DESs systems are being formed as an eutectic mixture of salts and Lewis and Brønsted acids and bases. The DESs are distinguished from the conventional solvents due to the fact of their properties such as limited volatility, low- to non-toxicity, biodegradability, sustainability, and quite commonly low production cost [2]. Nowadays green solvents play a vital role especially in pharmaceutical industry where enzymes often are used as catalysts [3]. From this reason a key issue is to design DES, that can be a safe environment for various enzymes. In the search of new deep eutectic solvents, nature observation can be a good point to start looking for optimal solution. The various metabolites in a cell are mixed together that results in significant reduction of its melting point and formation of ionic liquids at low temperatures, lower than the melting points of pure substances such as, for example, malic acid and sucrose [2]. Enzyme structure is optimally

designed by nature and express its desired properties in multicomponent DESs occurring in living cells [4]. The DESs composed from natural amino acids, organic acids, sugars, or choline derivatives seem to fulfil green chemistry principles that can be used as an enzymatic biocatalysts environment. The possibility of use of homogeneous eutectic mixtures as medium for the chemoenzymatic reactions in case of various proteases, lipases, peroxidases, laccases and glycohydrolases have been reported [5–7]. However the advantages of chemoenzymatic one-pot multistep processes with DES as solvent have high impact for the development of continuous effective methods that allows for applying them in large scale industrial process where stability of biocatalyst is a key factor. [8]. Gorke et al., [9] have shown that *lipase B* and *A* from *Candida antarctica*, retaining a high activity in DESs based on choline chloride paired with hydrogen-bond donor species such as acetamide, ethylene glycol, glycerol or urea. It was shown that DESs used as a co-solvents, enhance the reaction yields and conversion efficiencies of these hydrolases [10]. More recently Zhao et al., [11] have used biocompatible DESs such as 1:2 choline chloride/glycerol and 1:1.5 choline acetate/glycerol that permitted *CALB lipase*, to retain high activity and stability, that resulted in high conversions (up to 97%) in the enzymatic transesterification of Miglyol® oil 812 with methanol in proposed biodiesel synthetic pathway. However the variance in formed hydrogen network created by DES components can lead to formation of not desired by-products and also affect the effectiveness of chemoenzymatic reaction [12]. Moreover it can be assumed that different compositions of deep eutectic solvents, might lead to creating of an “enzyme-friendly”

* Corresponding author.

E-mail address: marcin.smiglak@popt.poznan.pl (M. Smiglak).

environment which will allow to stabilize the enzymatic reaction and simplify separation of the obtained product and DES. Due to industrial applicability, this is interesting field of research especially for other enzymes of high industrial interest. One of them is a β -galactosidase (β -Gal) which catalyzes of O-glycosylic bond hydrolyzing in milk sugar as lactose splitting it to glucose and galactose. Apart this activity enzyme has ability to transglucosylation and synthesis the prebiotic galacto-oligosaccharides [13].

The aim of this work was to prepare new group of natural compound based DESs, their characterization and first time examination of their usefulness as enhancers of the fungal β -galactosidase activity.

2. Experimental

2.1. Materials and methods

2.1.1. Materials

Choline chloride (99%), Choline bicarbonate (80% in H₂O), Urea (99%), Thiourea (99%), Glycerol (99%), Ethylene glycol (99%), Levulinic acid (99%), (2S,3R,4S,5S,6R)-2-[3-hydroxy-5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]phenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol (99%), Acetic acid (99%), were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA) and used without further purification unless otherwise stated.

2.2. Sample preparation

2.2.1. Synthesis of choline acetate

Acetic acid (0.12 mol) was added dropwise to solution of choline bicarbonate (0.12 mol) in methanol (50 mL). The reaction was carried out in round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar at 60 °C over 24 h period.

After completion of the reaction, the mixture was evaporated under reduced pressure at room temperature to avoid thermal decomposition of formed salt, to furnish pure product, 99% yield.

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm) = 1.91 (s, 3H, CH₃CO₂), 3.20 (s, 9H, (CH₂)₃N), 3.52 (t, 2H, CH₂N, *J* = 4.8 Hz), and 4.06 (m, 2H, CH₂OH).

2.3. Preparation of deep eutectic solvents

All DESs were prepared by mixing choline's derivatives (0.1 mol) and HBD at specific molar ratios (respectively 0.1 and 0.2 mol) with continuous stirring while heating at 60 °C until the homogenous liquid have been obtained. Molar ratios, abbreviations and appearances of all prepared DESs are shown in Table 1.

2.3.1. ¹H NMR

¹H NMR spectra were recorded on a Bruker BioSpin (400 MHz) spectrometer using D₂O as solvent with tetramethylsilane as the internal standard. Proton chemical shifts are shown in parts per million (δ ppm).

2.3.2. Assay of density and viscosity of DES

Viscosity were measured using rotary rheometer model equipped with 40 mm Peltier steel plate, with shear rate of 200 s⁻¹, gap of 1000 μ m and compression velocity of 100 μ m · s⁻¹ at 25 °C (water content of each sample did not exceed 1.75%wt and not affected the measured values).

The density measurements were made using the laboratory scale Radwag AS 510.3Y. Dried samples were placed in the test-tube. Sinkers (standardized glass ball with predetermined mass and volume), which density has been determined, was first weighed in the air and next in the tested liquid in test tube in the temperature range of 25–26 °C. Obtained density data were collected.

Table 1

Prepared DES based on choline chloride (DES I) and choline acetate (DES II).

DES I abbreviations	Molar ratio [mol: mol]	Appearance	Water content [%]	
Ia	Ch[Cl]:Urea	1:2	TL*	1.30
Ib	Ch[Cl]:Gly*	1:2	TL	1.45
Ic	Ch[Cl]:EthGly*	1:2	TL	1.36
Id	Ch[Cl]:Urea:Gly	1:1:1	TL	1.41
Ie	Ch[Cl]:Thiourea:EthGly	1:1:1	TL	1.70
If	Ch[Cl]:Urea:EthGly	1:1:1	TL	1.56
Ig	Ch[Cl]:Gly:EthGly	1:1:1	TL	1.12
Ih	Ch[Cl]:Gly:Lev*	1:1:1	TL	1.04
IIa	Ch[OAc]:Urea	1:2	PYL*	1.10
IIb	Ch[OAc]:Gly*	1:2	PYL	1.32
IIc	Ch[OAc]:EthGly*	1:2	PYL	1.06
IId	Ch[OAc]:Urea:Gly	1:1:1	PYL	1.07
IIe	Ch[OAc]:Thiourea: EthGly	1:1:1	PYL	1.20
IIf	Ch[OAc]:Urea:EthGly	1:1:1	PYL	1.13
IIg	Ch[OAc]:Gly:EthGly	1:1:1	PYL	1.07
IIh	Ch[OAc]:Gly:Lev*	1:1:1	PYL	1.22

*Gly – glycerol; Ethgly – ethylene glycol; Lev – Levulinic acid; TL – transparent liquid; PYL – pale yellow liquid.

2.3.3. Conductivity assay of DES solutions

Prior to analysis samples were dried under vacuum and water content has been measured. The water content of the samples was determined by Karl-Fischer titration using a Metrohm 915 KF Ti-Touch instrument with volumetric titration. Conductivity analyses were performed using CPC-411 Elmetron conductivity meter. The measurement was performed using conductivity meter probe placed in the test-tube along with sample and thermometer.

2.3.4. Differential scanning calorimetry analysis (DSC) of DES

Determination of the thermal transitions of the samples was performed using Mettler Toledo DSC 1 STARe System differential scanning calorimeter, coupled with a Huber TC100 immersion cooler. The calorimeter was calibrated for temperature and cell constants using indium (with a melting temperature of –116.54 °C, and specific enthalpy of melting of 28.71 J/g). All data were collected at atmospheric pressure, with nitrogen as a purge gas, and an empty sample pan as the reference. Masses of samples were between 6 and 15 mg. In the first heating cycle the heating ramp was set from 25 °C to 125 °C with heating rate 10 °C/min. At this temperature samples were held for 5 min isotherm. In the next step samples were cooled from 125 °C to –80 °C with cooling rate 10 °C/min, and then were kept for 10 min at –80 °C. The last step was heating sample from –80 °C back to 125 °C with heating rate 10 °C/min. The data from the DSC thermograms were obtained via analysis using the STARe Evaluation Software by Mettler Toledo.

2.3.5. Thermogravimetric analysis (TGA) of DES

Thermal stabilities were investigated using a TA Instrument TGA Q50 thermogravimetric analyzer, precise to within 0.1 °C in temperature and to within 0.01% in weight. The TGA experiments were conducted under nitrogen atmosphere and measured in the dynamic heating regime. Samples between 5 and 10 mg were heated from 25 °C to 500 °C with heating rate of 3.5 °C/min with a 10 min isotherm at 85 °C under nitrogen atmosphere. This isotherm step was intended to remove any remaining water present in the samples. Decomposition temperatures reported for all materials were established as the onset temperature for decomposition of the first 5% of the sample ($T_{5\%onset}$), and as the regular onset temperature for decomposition (T_{onset}) for the whole sample or for each of the consecutive steps in multistep decomposition.

2.3.6. Spectrometric analysis of DES

The spectra of prepared deep eutectic solvents, were collected using FTIR Broker TENSOR 27 spectrometer. Dried sample drops were placed on the IR sensor and the spectra were collected from 4000 to 500 cm^{-1} at room temperature.

2.3.7. Analysis of DES on influence on enzyme activity

As an model enzyme, the β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* (Sigma-Aldrich, ≥ 2600 U/g), was used. Samples for enzymatic reaction were prepared with 50%, 35%, 20%, 15%, 10% 5% of DES in phosphate buffer with pH 7.0. Activity of β -galactosidase was measured according to the method described by Craven et al. with 4-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) as a substrate (Fig. 1). Reaction was conducted in 15 min at temperature 30 °C. Initial concentration of ONPG was 5 mmol/l. Prior to analysis the β -galactosidase was diluted 1:1000 in phosphate buffer. The assay was performed by transferring 10 μl of diluted enzyme to 1.5 mL of substrate solution. After incubation time 300 μl of reaction mixture was transferred to cells on 96-well plates and absorbance was measured with use microplate reader, Thermofisher Scientific Multiskan Go Microplate Photometer, at wavelength 420 nm. One unit of enzyme liberate 1 μmol of 4-nitrophenyl per minute at assay conditions.

3. Results and discussion

In this article we have focused on deep eutectic solvents composed of choline salts derivatives - choline chloride and choline acetate and hydrogen bond donors such as urea, glycerol, ethylene glycol, thiourea and levulinic acid. The aim of this study was to prepare and to characterize new DESs and determine their usefulness as a suitable medium for hydrolase as a β -galactosidase. In order to determine studied DESs usefulness as a biocompatible solvent for enzymatic reaction medium, basic properties were determined, such as density, viscosity, conductivity as well as thermal stability.

In presented studies two groups of DESs (1a-h Ch[Cl] and 1la-h Ch[OAc]) were prepared and divided into the next subsets where one group was composed of mixtures of two chemical entities and the second group which involves mixtures of three compounds. Due to the very simple methodology of DES preparation - mixing of two substrates in specific molar ratio - the most important was to pay attention to water content, during preparation and purification, as this is major contaminant of the DES. All of the obtained DESs were used after determination of water content which for all mixtures was at the level of below 2%.

3.1. Density

Density is one of the most important physical properties for a solvent. Thus, it was analyzed for all of the DESs and where possible compared to available literature data. Densities data for studied choline chloride based DESs and choline acetate based DES are presented in Table 2.

All of the studied choline chloride based DESs exhibit higher densities than water. Also it is noticeable that in case of binary mixtures, the lowest density exhibit DES 1c (Ch[Cl]:EthGly), which seems to be the outcome of the lowest density of ethylene glycol among the other densities of HBD (glycerol and urea). In case of tertiary eutectic

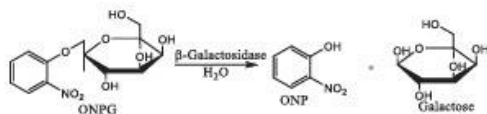


Fig. 1. Schema of catalysed by β -galactosidase, hydrolysis of ester bond in o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside used as substrate.

Table 2

Density of choline chloride (I) and choline acetate (II) based DES at 25 °C.

DES	HBD	Molar ratio [mol:mol]	Density [ρ , g cm^{-3}]	Density [lit] [ρ , g cm^{-3}]
1a	Urea	1:2	1.25	1.25[19]
1b	Glycerol	1:2	1.18	1.18[20]
1c	Ethgly	1:2	1.12	1.12[20]
1d	Urea:Gly	1:1:1	1.20	n/a
1e	Thiourea:Ethgly	1:1:1	1.14	n/a
1f	Urea:Ethgly	1:1:1	1.19	n/a
1g	Glycerol:Ethgly	1:1:1	1.14	n/a
1h	Glycerol:Lev	1:1:1	1.13	n/a
1la	Urea	1:2	1.17	n/a
1lb	Glycerol	1:2	1.18	n/a
1lc	Ethylene glycol	1:2	1.08	n/a
1ld	Urea:Gly	1:1:1	1.15	n/a
1le	Thiourea:Ethgly	1:1:1	1.17	n/a
1lf	Urea:Ethgly	1:1:1	1.11	n/a
1lg	Glycerol:Ethgly	1:1:1	1.10	n/a
1lh	Glycerol:Lev	1:1:1	1.11	n/a

mixtures, the lowest density can be assigned to mixture 1e (Ch[Cl]:Thio-Urea:EthGly) which can be due to the impact of the molar ratios within DES - where the amount of HBD is likely to influence the strength of hydrogen bond network.

Studied DESs based on choline acetate (Table 2) exhibit also higher densities than water, however lower than choline chloride based DESs which can be an outcome of greater affinity of chloride anion to the HBDs. Also it is noticeable that the densities of the binary eutectic mixtures seems to be higher than tertiary eutectic mixtures for all DESs, except for mixture 1lc (Ch[OAc]:EthGly) where HBD is ethylene glycol, which can be due to not only the impact of the molar ratios of components of DES but also because of weaker hydrogen bond structures.

3.2. Viscosity

Deep eutectic solvent systems are unique in their structure, as they are composed of salts (usually with high melting points) complexed with other compounds capable of donating hydrogen bonds [termed hydrogen bond donors (HBDs)] to the anion of the salt [22]. This complexation results in the anion being distanced from its cation counterpart of the salt. This dislocation of the anion results in lowering the melting point of the salt used in DES [23]. Depending on the molar ratio of the HBD to the salt, the DES may exist in liquid form even at temperatures much below ambient conditions. The DESs at these conditions behave as a liquid and shows properties very similar to ionic liquids (ILs). However, because of their high molecular weights, DESs have higher viscosities compared with conventional solvents. The high viscosity of DESs is mainly attributed to the presence of an extensive

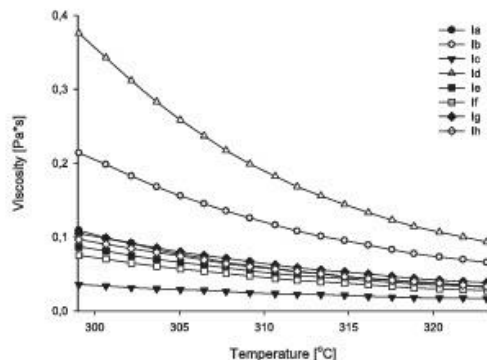


Fig. 2. Viscosity of DESs based on choline chloride.

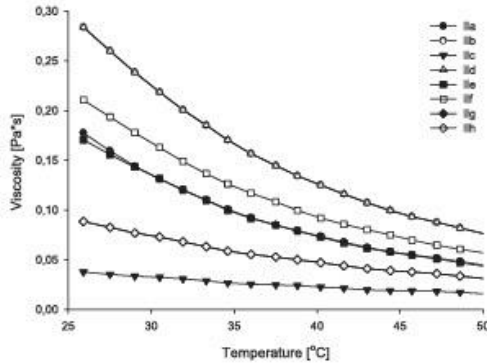


Fig. 3. Viscosity of DESs based on choline acetate.

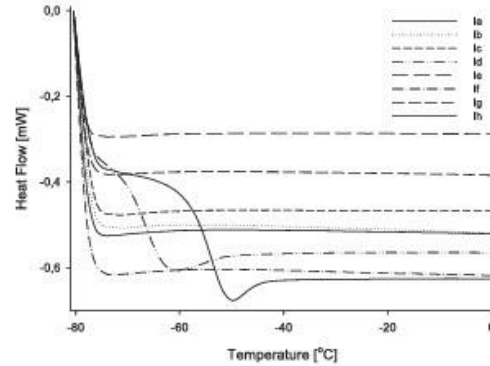


Fig. 4. DSC of choline chloride based DES.

hydrogen bond network between each component, which results in lower mobility of free species with in DES and also with van der Waals and electrostatic interactions. As the viscosity describes the internal resistance of a fluid to a shear stress and depends on the intermolecular interactions (H-bonding, dispersive and Coulombic interactions) - an increase in liquid temperature, significantly decreases the intensity of these intermolecular forces hence the viscosity of the solvent [14]. Shown in Figs. 2 and 3 effect of temperature increase on the DES - seems to follow the Arrhenius like behavior. As the temperature increases, the viscosity decreases.

Based on the data obtained, it is observed that the mixtures containing glycerol show the most significant drop in viscosity with temperature increase, which can be due to weakening the intensity of hydrogen bonding forces in the mixture. On the other hand the same DESs, containing glycerol, present the highest viscosity of all observed mixtures, which can be due to the presence of a robust 3D intermolecular hydrogen-bond network. Also it is worth noticing that presence of second HBD in the mixture seems to lower the overall viscosity of DES, probably due to the partial rupture of hydrogen bond network [15]. When mixing two substances to form a homogenous solution, the intermolecular solute-solute forces of attraction must be less than the solute-solvent intermolecular forces of attraction, and when these forces of attraction are equal, these two substances become miscible. The consequence of this physical bond breakage and formation is manifested in the re-arrangement of molecules. Moreover, the way they are packed leads in variation of physical properties such as density or

viscosity. In the thermodynamics, these variations are called excess properties. Excess thermodynamic properties of liquid mixtures are related to the intermolecular interactions between the constituents of the mixture. Many factors affect these properties such as, for example: the chemical structure of the components - different geometries of the unlike molecules induce intermolecular forces as well as the reorientation of the molecular species [16]. According to the obtained data, it was observed that the tertiary DES mixtures show the most significant drop in viscosity with temperature increase, due to higher weakening the intensity of hydrogen bonding forces in the mixture.

3.3. Conductivity

Due to the relatively high viscosities, most DESs exhibit weak ionic conductivities [17]. Since the conductivity of DESs depends on viscosity it is clear that significant changes of the salt and HBD molar ratio also influence the conductivities of DESs, which leads to assumption that Arrhenius-like equation can be used to predict the conductivity behavior of DESs.

Choline acetate based DESs show relatively lower viscosities than DESs based on choline chloride and since the conductivity of DESs depends on viscosity there should be significant increase in conductivity for mixtures based on Ch[OAc] DES. However the presence of acetate ion in salt and HBD molar ratio also influence the conductivities of DESs, which, as stated above, leads to assumption that Arrhenius-like equation can be used to predict the conductivity behavior of DESs. Comparing above DESs it can be seen that choline chloride deep eutectic

Table 3
Conductivity of choline chloride and choline acetate based DES at 25 °C.

DES		Molar ratio	Conductivity [σ , mS \times cm $^{-1}$]	Conductivity [lit] [σ , mS \times cm $^{-1}$]
Ia	Ch[Cl]:Urea	1:2	1.24	1.80 (40 °C) [21]
Ib	Ch[Cl]:Glycerol	1:2	1.07	1.05 (20 °C) [19]
Ic	Ch[Cl]:EthGly	1:2	7.68	7.61 (20 °C) [19]
Id	Ch[Cl]:Urea:Gly	1:1:1	3.82	n/a
Ie	Ch[Cl]:ThioUrea:EthGly	1:1:1	4.09	n/a
If	Ch[Cl]:Urea:EthGly	1:1:1	4.07	n/a
Ig	Ch[Cl]:Gly:EthGly	1:1:1	3.21	n/a
Ih	Ch[Cl]:Gly:Lev	1:1:1	1.09	n/a
Iia	Ch[OAc]:Urea	1:2	0.67	n/a
Iib	Ch[OAc]:Glycerol	1:2	0.81	n/a
Iic	Ch[OAc]:EthGly	1:2	1.88	n/a
Iid	Ch[OAc]:Urea:Gly	1:1:1	4.60	n/a
Iie	Ch[OAc]:ThioUrea:EthGly	1:1:1	0.34	n/a
Iif	Ch[OAc]:Urea:EthGly	1:1:1	4.44	n/a
Iig	Ch[OAc]:Gly:EthGly	1:1:1	1.87	n/a
Iih	Ch[OAc]:Gly:Lev	1:1:1	1.61	n/a

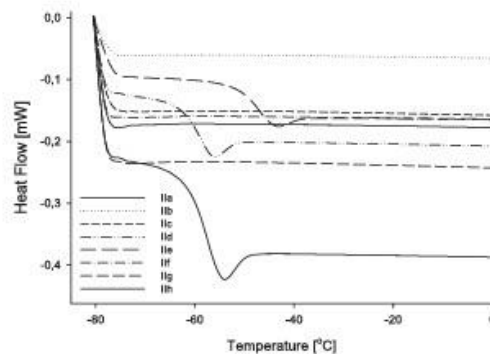


Fig. 5. DSC of choline acetate based DES.

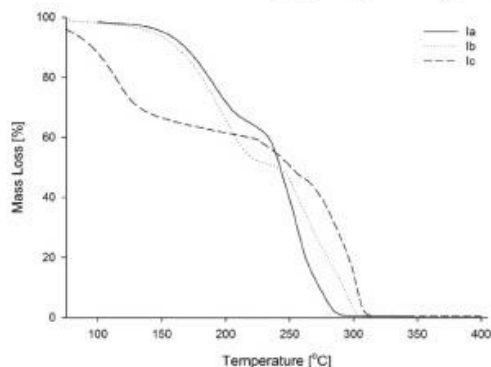


Fig. 6. TGA chart for choline chloride based DESs containing 2 moieties.

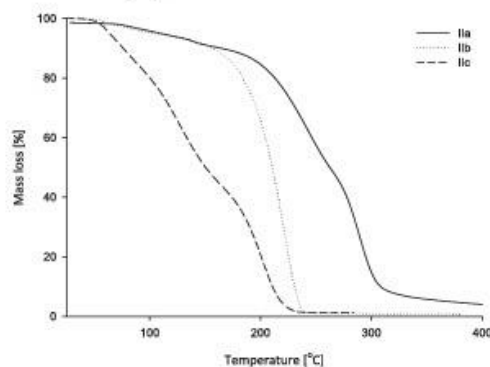


Fig. 8. TGA chart for choline acetate based DESs containing 2 moieties.

solvents shows higher conductivities (Table 3), which can be an outcome of small, more mobile chloride anion.

3.4. Differential scanning calorimetry

The mixtures were characterized by DSC to determine the presence of thermal transitions and then to compare to the raw choline chloride or choline acetate, as well as, to other mixtures of choline salts and HBD's used in those mixtures. The DSC of choline chloride is dominated by the presence of an endothermic peak at 86.31 °C, which comes from a crystallographic arrangement phase transition [17]. This peak is not observable in any DES mixture – what could be indicative of lack of molar excess of choline chloride in the mixtures (Fig. 4). This means that all choline chloride molecules are involved in molecular interactions and the mixtures ratios are optimal for obtaining deep eutectic solution. For mixtures where urea was used as a HBD there is a glass transition observable at respectively –55.73 °C for Ia (Ch[Cl]:Urea) and at –67.67 °C for Id (Chol:Urea:Glycerol). For the mixtures where as a hydrogen bond donors liquid substrates were only used (ethylene glycol, glycerol, levulinic acid), there were no observable phase transition changes within investigated temperature range. This behavior is also present for the mixtures where thiourea was used as a HBD with ethylene glycol. There is a chance that phase transition could be observed at lower temperatures (beyond our instrument capability) – that kind of shift to lower temperatures is observable for mixtures containing urea and mixtures containing glycerol:urea as a HBD [17].

The DESs mixtures based on choline acetate were also characterized by DSC (Fig. 5) to determine the presence of thermal transitions and

then to be compared to pure choline acetate and other mixtures of choline acetate with HBDs. The DSC of choline acetate presents endothermic peak with the maximum at lower temp then that presented in choline chloride due the presence of different/bigger acetate anion. This peak is not observable in any other mixture – which could indicate that there is no molar excess of choline acetate present in the mixture, all choline acetate molecules are involved in molecular interactions, and the mixtures ratios are optimal for obtaining deep eutectic solvent.

For mixtures where urea was used as a HBD there is a glass transition state observable at respectively –67.05 °C for Ila (Ch[OAc]:Urea) and at –68.51 °C for IId (Ch[OAc]:Urea:Gly) and at –61.12 °C for IIE (CholineOAc:ThioUrea:EthGly). The shift of the temperature of glass transition phase to higher temperatures (compared to choline chloride based DES) comes probably from the presence of urea or thiourea molecules interacting with acetate anion which is not only bigger but also weaker in terms of being hydrogen bond acceptor. The created hydrogen bonds with acetate anion are weaker than those made with chloride anion which leads to weaker counteraction. For the mixtures where as a hydrogen bond donors liquid substrates were only used (ethylene glycol, glycerol, levulinic acid), there were no observable phase transition changes in the considered temperature range.

3.5. Thermogravimetric analysis

Fig. 6 presents TGA slopes for the DESs based on choline chloride containing only two components Ia (Ch[Cl]:Urea), Ib (Ch[Cl]:Gly), and Ic (Ch[Cl]:Ethgly). As can be seen on Fig. 6 the highest thermal

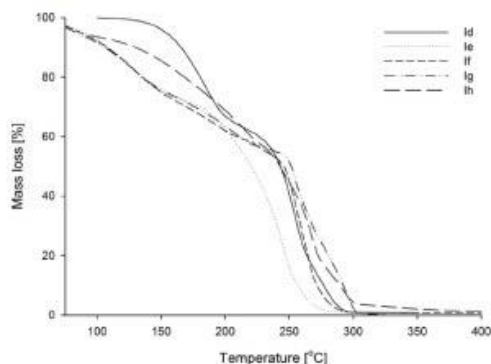


Fig. 7. TGA chart for choline chloride based DES containing 3 moieties.

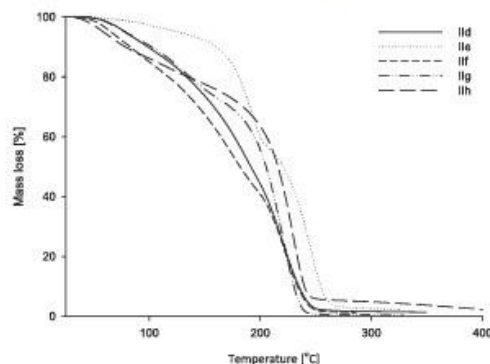


Fig. 9. TGA chart for choline acetate based DESs containing 3 moieties.

Table 4
Thermogravimetric analysis of choline chloride based DESs.

DES	HR* [°C/min]	T _{onset} [°C]	T _{onset-5%} [°C]	T ₁ [°C]	T ₂ [°C]	T _{onset} [Ref]
Ia	3.5	161.36	153.29	237.28	–	1725 [22]
Ib	3.5	162.04	153.93	247.40	–	183.8 [22]
Ic	3.5	92.99	78.84	226.23	270.36	107.1 [22]
Id	3.5	154.16	146.45	240.21	261.84	n/a*
Ie	3.5	110.41	104.88	190.51	235.24	n/a*
If	3.5	80.59	76.56	149.27	246.98	n/a*
Ig	3.5	109.49	104.01	187.78	249.44	n/a*
Ih	3.5	148.7	141.26	242.42	288.93	n/a*

HR* - heating rate.

stability can be assigned to **Ia** (Ch[Cl]:Urea) mixture, because of its first onset point being at higher temperature comparing to other DESs. At the same time it has the lowest decomposition temperature of choline chloride itself. According to this finding one can conclude that the DES **Ia** Ch[Cl]:Urea, even though has narrowest thermal stability window, it is the most temperature stable DES consisting of choline chloride and one HBD described in this article.

Fig. 7 shows the TGA slopes for the DESs based on choline chloride containing three moieties - **Id** (Ch[Cl]:Urea:Gly), **Ie** (Ch[Cl]:Thio-Urea:EthGly), **If** (Ch[Cl]:Urea:EthGly), **Ig** (Ch[Cl]:Gly:EthGly), **Ih** (Ch[Cl]:Lev:Gly). It can be concluded, that the DESs containing as a HBD only ethylene glycol are the least stable of all the eutectic mixtures analyzed due to the relatively high volatility of ethylene glycol. On the other hand, the most stable DESs are those formed from HBDs with high thermal stabilities and boiling points such as urea, thio-urea and glycerol.

Fig. 8 presents TGA slopes for the DESs based on choline acetate containing only two moieties **Ila** (Ch[OAc]:Urea), **Ilb** (Ch[OAc]:Gly) and **Ilc** (Ch[OAc]:EthGly). As can be seen the highest thermal stability can be assigned to the DES **Ila** (Ch[OAc]:Urea), probably because of the high thermal stability of urea.

Fig. 9 presents the TGA slopes for the DESs based on choline acetate containing three moieties - **Ild** (Ch[OAc]:Urea:Gly), **Ile** (Ch[OAc]:Thio-Urea:EthGly), **Ilf** (Ch[OAc]:Urea:EthGly), **Ilg** (Ch[OAc]:Gly:EthGly), **Ilh** (Ch[OAc]:Lev:Gly). Presented curves shows that the highest thermal stability can be assigned to **Ile** (Ch[OAc]:ThioUrea:EthGly) mixture, because of its first onset point being at higher temperature comparing to other DESs. However all of presented DESs shows similar thermal stability, which is probably an outcome of thermal stability of Ch[OAc] and its weaker ability of hydrogen bonding creation. Obtained results showed that the DESs based on choline acetate (Table 4) are less stable than those based on choline chloride (Table 5). Most of them show lower thermal stability than pure choline acetate except the DES **Ila** (Ch[OAc]:Urea). This indicates that to obtain the DESs with high stability, it is recommended using choline salts with small anion and HBD with low volatility and high thermal stability such as urea or thiourea. It is also worth noting that the ability to create hydrogen bonds are much higher for the chloride anion in choline salts than for acetate anion, thus deep eutectic solvents based on choline acetate, as expected, show lower thermal stability, because of weaker, less robust hydrogen

Table 5
Thermogravimetric analysis of choline acetate based DESs.

DES	HR* [°C/min]	T _{onset} [°C]	T _{onset-5%} [°C]	T ₁ [°C]	T _{onset} [Ref 5C/min for DESs]
Ila	3.5	148.83	141.38	223.06	n/a*
Ilb	3.5	190.22	180.70	–	n/a*
Ilc	3.5	111.97	106.37	185.23	n/a*
Ild	3.5	145.08	137.82	239.48	n/a*
Ile	3.5	168.34	159.92	226.75	n/a*
Ilf	3.5	137.18	130.32	209.89	n/a*
Ilg	3.5	115.24	109.47	197.54	n/a*
Ilh	3.5	106.70	101.36	–	n/a*

HR* - heating rate.

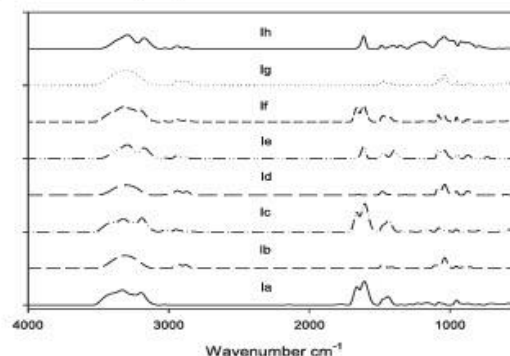


Fig. 10. FT-IR spectra of choline chloride based DESs.

bond network, which can be easier destabilized by increasing temperature.

3.6. Infrared spectroscopy

Compared spectra of each DES show many changes in the frequency shifts, bands widths and absorbance values. In the range of high wave number, the stretching vibration absorption peaks of hydroxyl groups (-OH) between 3500 and 3000 cm⁻¹ are almost the same. One can also observe that the peak in DES **Id** (Ch[Cl]:Urea:Glycerol) is a bit broader than in any other DESs which could indicate that hydrogen bonds were formed between glycerol hydroxyl groups and choline chloride (H-O...H and OH...Cl), and that there was more hydrogen bonds than in other DESs (Fig. 10). Also, the -CH₃ of choline chloride shifted to 1437 cm⁻¹ (from 1480 cm⁻¹ in DES containing only glycerol as HBD and from 1442 cm⁻¹ in DES containing only Urea as HBD) respectively. It is also observable that stretching of bands of functional groups have been downshifted to 1109 cm⁻¹, 1037 cm⁻¹, and 862 cm⁻¹ (namely C—O stretching, C-C-O asymmetric stretching, and C-C-O symmetric stretching).

The downshift and intensity of characteristic group could be indicative of a large number of hydrogen bonds network formed between the components of DESs. In the light of the above it can be concluded that the DESs containing both urea and glycerol seem to have the most robust hydrogen bond network of all analyzed DESs in this article.

Presented in Fig. 11 spectra of DESs based on choline acetate shown changes in the frequency shifts, bands widths as well as in absorbance

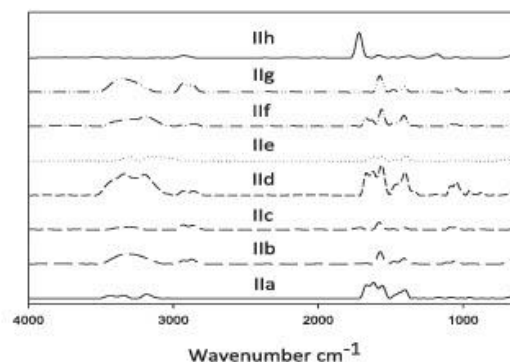
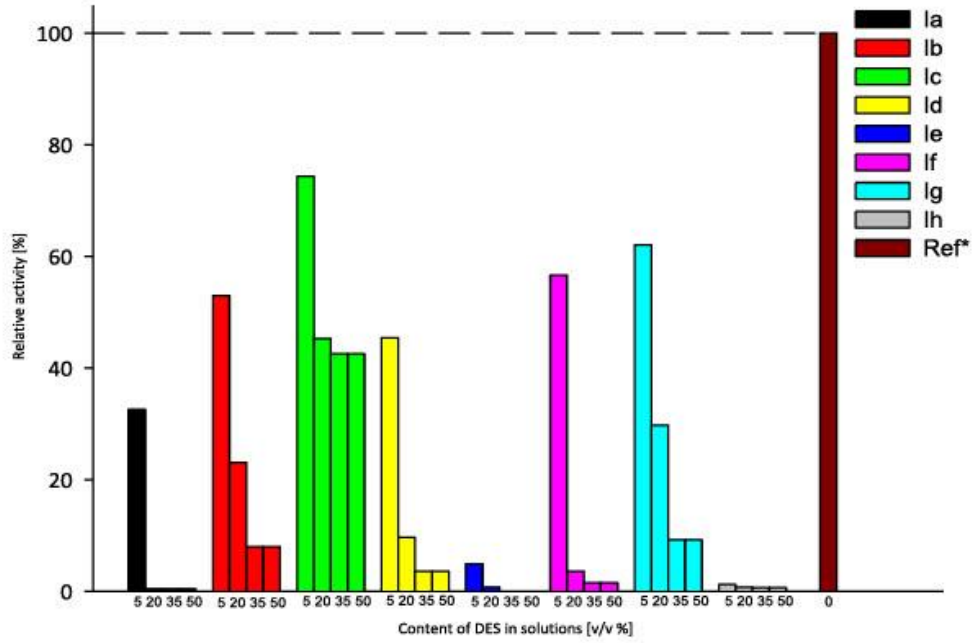
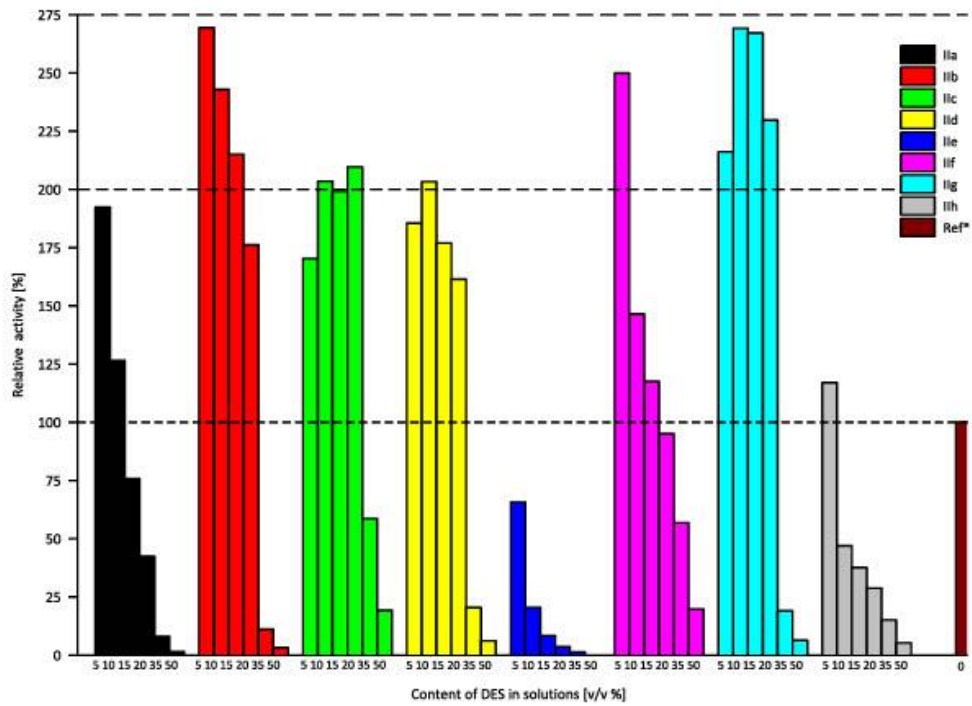


Fig. 11. FT-IR spectra of choline acetate based DESs.

Fig. 12. The effect of Ch[Cl] DES on β -Gal activity.Fig. 13. The effect of Ch[OAc] DES on β -Gal activity.

values. In the fields of high wave number, the stretching vibration absorption peak of hydroxyl group (-OH) between 3500 and 3000 cm^{-1} are almost the same except the DES **IIc** (Ch[OAc]:EthGly) which is the most narrow. It could indicate that there are less hydrogen bonds than in other DESs. It is also observable that there is small to none stretching of bands of functional groups, which should be seen accordingly at 1050–1430 cm^{-1} (namely C–O stretching, C–C–O asymmetric stretching, and C–C–O symmetric stretching). The lack of an intensity of characteristic groups could be indicative of the fact that there are not many atoms which are being part of hydrogen bond network formed between the components of DESs. In the light of the above it can be concluded that the DESs made of choline acetate do not form robust hydrogen bond network which corresponds with other aspect of the DESs formation, that the main factor for choline salts based DESs is the chloride anion.

3.7. Influence of DES on enzyme activity

As a model enzyme, glycohydrolase β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* was used, which split O-glycosidic bonds between glucose and galactose in lactose. The activity assay was performed with *p*-nitrophenyl- β -galactoside as substrate at pH 7.0. The result clearly showed that kind of HBD and kind of ions in DES play circular role in altering of tested enzyme activity. The DES based on Ch [Cl] strongly inhibited the activity of β -Gal even at low concentration of DES in reaction solution. The highest negative impact was noted for Ch[Cl] based DES **Ie** (Ch[Cl]:ThioUrea:EthGly) and the lowest for **Ic** (Ch[Cl]:EthGly) (Fig. 12). As it occurs, along with the decreasing amount of DESs based on Ch[Cl] towards water, it can be observed, that the enzyme activity is increasing in Ch[Cl]-based DES groups however never reaching the enzyme activity as in control. It can be explained by decreasing concentration of protein denaturing agent, especially urea which was a component of Ch[Cl] DES **Ia** (Ch[Cl]:Urea) and **Id** (Ch[Cl]:Urea:Gly) and **If** (Ch [Cl]:Urea:EthGly).

However the beneficial effect on hydrolytic β -Gal activity was noted for DESs based on choline acetate (Fig. 13). In this case, the scope of research was extended to analyze wider range of DES concentrations because of promising results. The activity assay was performed within six concentrations 5%, 10%, 15%, 20%, 35% and 50% of DES added to buffer solution. The enzyme activity, in almost all of DESs based on choline acetate, even with urea, at percentage ratio between 5% and 20% (v/v) DES (95%–80% buffer), exhibit far more increased activity compare to control (except DES **Ile** (Ch[OAc]:ThioUrea:EthGly)). In tested DES [with 5% (v/v) DES], where as a HBD polyols were used (**Iib**, **Iic**, **Iid**, **Iif**, **Iig**), the enzyme activity is being enhanced twice or more than twice compare to control (Fig. 13). The most stimulating for β -Gal activity, almost 275% fold increase in activity, was observed for the enzymatic reaction performed in mixture containing 5% of DES **Iib** (Ch[OAc]:Gly), **Iif** (Ch [OAc]:Urea:EthGly) and **Iig** (Ch[OAc]:EthGly:Gly). Similar activity can be observed in cases between 10% to 20% (v/v) DES concentrations. In case of higher concentrations, above 20%, the enzyme activity significantly drops below the activity of enzyme in reference sample. Also it is noticeable, that in case of Ch[OAc] based DESs, containing urea as a HBD (**Iia**, **Iid**), there is also increase of enzyme activity, quite significant – almost twofold if urea is a single HBD and more than twofold if there are two HBDs (urea and glycerol). Since urea is already known as a compound responsible for proteins inhibition/denaturation [18], this suggests, that primary reason of enzyme activity enhancement lies in the protective role of Ch [OAc] on enzyme structure contrary to Ch[Cl], where even low concentration of DES probably negatively influences enzyme structure. Nevertheless, further research is needed to determine the origin of observed phenomenon of observed increasing of enzyme activity in presence of choline acetate based DES. The possibly mechanism can

be connected both with enzyme structure modification or indirect influence on intermediate state in catalysed reaction.

4. Conclusion

The goal and concept of this work was to prepare new group of natural-based DESs, examine their basic properties and test the possibility of using such DESs, as an enzymatic reaction media additive. Prepared DESs, were examined for their basic properties and used as a water/buffer additive in the test of activity of β -galactosidase enzyme. Obtained result shows that, the addition of DESs to reaction medium has significant influence on the enzyme activity. The most enhancement of activity can be observed when as an additive, DESs based on choline acetate were used. Also, it can be concluded that not only presence of different anion in ionic liquid exerts influence, but also the presence of different HBD. In almost every case, the addition of polyols seems to have great impact on the enzyme stability and activity regardless of used ionic liquid. Taking into consideration, it is worth noticing, that in case of DES where as HBD urea or thiourea, where polyols seems to diminish the negative impact of such compounds. However, to explain this phenomenon further research is needed. The main findings of performed research suggest a great potential of choline acetate based DES as effective enhancer of β -galactosidase activity. The β -Gal nowadays is important enzyme for food processing industry and pharmacy. The ability of synthesis of prebiotic galacto-oligosaccharides (GOS), that are desired additives to many milk-based food product, press to continuous looking for effective methods, which allow increasing yield of the production process. The observed increased activity of β -Gal leads to supposition that DESs modify the catalytic mechanism and can also have influence on final product composition, especially structure of formed GOS, that is critical factor for further their application. However for confirm this hypothesis further research is necessary.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that they have no conflicts of interest to this work. We declare that we do not have any commercial or associative interest that represents a conflict of interest in connection with the work submitted.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from National Science Centre of Poland, project OPUS (no. UMO-2015/19/B/NZ9/03711) entitled "Nontoxic eutectic mixtures as alternative environment for conducting reactions with use of enzymes and microorganisms".

References

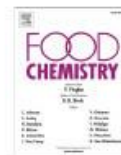
- [1] J.H. Clark, S.J. Tavener, *Org. Process Res. Dev.* 11 (2006) 149–155.
- [2] Y.H. Choi, J. van Spronsen, Y. Dal, M. Verberne, F. Hiolmann, L.W. Arends, G.-J. Wilkamp, R. Verpoorte, *Plant Physiol.* 156 (2011) 1701–1705.
- [3] R. Xin, S. Qi, C. Zeng, F. I. Khan, B. Yang, Y. Wang *Food Chem.*, 2017, 217, 560–567.
- [4] Y. Dal, R. Verpoorte, Y.H. Choi, *Food Chem.* 159 (2014) 116–121.
- [5] V. Gotor-Fernandez, C.E. Paul, J. *Biotechnol.* 293 (2019) 24–35.
- [6] W. Xu, Y. Huang, F. Li, D. Wang, M. Yin, M. Wang, Z. Xia, *Biochem. Eng. J.* 138 (2018) 37–46.
- [7] Y. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. FenWong, *Biotechnol. Adv.* 35 (2017) 105–134.
- [8] Mohd Ali Hashim, Chung Yeng Looi, M. Krystof, M. Perez-Sanchez, P. Dominguez de Maria, *ChemSusChem* 6 (2013) 630–634.
- [9] J.T. Gorke, F. Srilenc, R.J. Kazlauskas, *Chemical communication*, 10 (2008) 1235–1237.
- [10] C. Reichardt, *Green Chem.* 7 (2005) 339.
- [11] H. Zhao, G.A. Baker, S. Holmes, J. Mol. Catal. B *Enzym.* 72 (2011) 163–167.
- [12] R.A. Sheldon, *Chem. Eur. J.* 22 (2016) 12984–12999.
- [13] C. Guerrero, C. Vera, R. Conejeros, A. Illanes, *Enzym. Microb. Technol.* 70 (2015) 9–17 Mar.
- [14] R. Stefanovic, M. Lutzwig, G.B. Webber, R. Atkin, A.J. Page, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 3297–3306.

- [15] A.P. Abbott, R.C. Harris, K.S. Ryder, C. D'Agostino, L.F. Gladden, M.D. Mantle, *Green Chem.* 13 (2011) 82–90.
- [16] F.S. Mjalli, O.U. Ahmed, *Asia Pac. J. Chem. Eng.* 11 (2016) 549–557.
- [17] I.M. Aroso, A. Palva, R.L. Reis, A.R.C. Duarte, *J. Mol. Liq.* 241 (2017) 654–661.
- [18] J. Almaraz, L. Rincon, A. Balsas, F. Brito, *Biochemistry* 48 (2009) 7608–7613.
- [19] A.P. Abbott, G. Capper, S. Gray, *ChemPhysChem* 7 (2006) 803–806.
- [20] A.P. Abbott, R.C. Harris, K.S. Ryder, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 4910–4913.
- [21] A.P. Abbott, G. Capper, K.J. McKenzie, K.S. Ryder, *J. Electroanal. Chem.* 599 (2007) 288–294.
- [22] C. Florindo, F.S. Oliveira, L.P.N. Rebelo, A.M. Fernandes, *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2 (2014) 2416–2425.
- [23] Q. Zhang, K. Vigier, S. Royer, Sébastien F. Jérôme, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7108–7146.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents

Jakub Hoppe^{a,b}, Ewa Byzia^b, Magdalena Szymańska^c, Radosław Drozd^{c,*}, Marcin Smiglak^{b,4}

^a Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89b, 61-614 Poznan, Poland

^b Poznan Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, Rubież 46, 61-612 Poznan, Poland

^c West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Department of Microbiology and Biotechnology, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Deep eutectic solvents
Enzymes
Ionic liquids
Enhanced activity
Lactose
β-Galactosidase

ABSTRACT

A series of new deep eutectic solvents based on choline levulinate and various hydrogen bond donors were prepared and characterized by ¹H NMR, FT-IR, TG, and DSC. In particular, their physicochemical properties (density, viscosity, conductivity, and thermal stability) were determined and their usability as an enhancing additive to the enzymatic reaction mixture, for the enzyme was checked. It has been shown, that prepared DES, exhibits low viscosity (at 40 °C within the range 0.1–0.6 Pa·s), high thermal stability (in almost all cases above 150 °C), and density within the range 1.1–1.17 g cm⁻³. Also, it has been shown, that obtained mixtures can stabilize the enzymes, and positively influence on its activity. The addition of up to 15% (v/v) of DES mixture composed of choline levulinate: ethylene glycol, enhanced more than threefold lactose hydrolysis yield by β-galactosidase. The present study shows the relevance of the newly designed DES series for improving enzymes properties with the potential to apply in the effective conversion of food processing origin substrates.

1. Introduction

Food processing aimed at improvement of its nutrition and safety has been of great interest to many researchers. Of particular importance is the so-called functional food that besides basics nutritional values are enriched with special ingredients having a specific beneficial effect on human health. This group of food products includes pro-and prebiotics that improves overall human health by affecting the composition of intestines microbiota (Siró et al., 2008). One of the more important groups of prebiotics is that of galactooligosaccharides (GOS) which are derivatives of lactose that can be synthesized by β-galactosidase thanks to its transglycosylation activity. The prebiotic properties of GOS make them valuable additives of infant milk formulas. The main role of GOS is stimulating the development of intestinal bacterial flora (*Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp) while inhibiting the growth of non-beneficial bacteria like clostridia and enterococci (Lamsal et al., 2012; Sangwan et al., 2011). Additionally, by high stability in the acidic environment during the food processing, their excellent taste quality, relatively low sweetness, and low calories value they are desired in the modern food

industry as a functional sweetener used in beverages, milk products, bakery products, and meat products (Splechtna et al., 2006; Patel & Goyal, 2011). On the other hand lactose, primarily present in many dairy products, in the presence of lactase deficiency in humans, may cause a range of health problems, including abdominal cramps, bloating, flatulence, loose stools, and diarrhea (He et al., 2008; Turnbull et al., 2015). One of the ways to deal with this problem is to reduce the risk of lactose intolerance by producing lactose-free foods. It can be achieved by using enzymes that specifically hydrolyze this disaccharide or convert it to more useful food additives such as GOS. The β-galactosidases are known to cleave the O-glycosylic bond in lactose, splitting it into galactose and glucose. Inappropriate conditions, β-galactosidases can also perform transglucosylation leading to the formation of galactooligosaccharides (Jurado et al., 2004; Guerrero et al., 2015). The activity of β-galactosidase depends upon the assay conditions, such as pH and temperature (Becerra et al., 1998), hence the stability and activity of β-galactosidase also greatly depends on the solvent, which is used as the enzymatic reaction medium. Recently, in an attempt to follow the rules of green chemistry, much attention has been paid to

Abbreviations: Ch[Lev], choline levulinate; U, urea; Gly, glycerol; Eth gly, ethylene glycol; β-gal, beta-galactosidase; HBA, hydrogen bond acceptor; HBD, hydrogen bond donor; TL, transparent liquid.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: Radoslaw.Drozd@zut.edu.pl (R. Drozd), Marcin.Smiglak@ppnt.poznan.pl (M. Smiglak).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>

Received 9 April 2021; Received in revised form 21 December 2021; Accepted 15 February 2022

Available online 17 February 2022

0308-8146/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

non-volatile and nontoxic solvents which could replace water or currently used organic solvents in biosynthesis. Known for years ionic liquids (IL) still occupy the first place of this interest, as the most suitable and designable replacement for solvents for enzymatic reaction processes (Gorke et al., 2010). Apart from IL, a new group of solvents such as deep eutectic solvents (DES) has emerged. Different from conventional solvents, DESs are in many ways similar to ionic liquids. They exhibit low to non-volatility, low toxicity, and on contrary to many ionic liquids, they are often biodegradable and cheap in terms of production cost (Choi et al., 2011). Ease of preparation is another advantage. DESs can be obtained by simply mixing quaternary ammonium salts with proper hydrogen bonds donors (HBDs) at specific molar ratios. The crucial part is to design application-specific solvents – by choosing proper substrates. The important part of this undertaking is to obtain a solvent that will behave exactly as desired yet be green (non-toxic, cheap, biodegradable) at the same time and show the predicted and desired properties. One of the most promising areas of application of these deep eutectic solvents is as an environment for enzymatic reaction (Itoh, 2017; Gonzalo et al., 2020). DES has been successfully applied as a solvent of haloalkane dehalogenase, benzaldehyde lyase and phospholipase D. DES improved their thermal stability and reaction yield by increasing the substrate solubility (Xu et al., 2017). Similar benefits have been found for protease catalyzed reactions. The transesterification activity of the crosslinked proteases subtilisin and α -chymotrypsin, immobilized on chitosan, was individually examined in DES consisting of a 1:2 M ratio mixture of ChCl:Glycerol containing 3% (v/v) water. Crosslinked subtilisin exhibited an excellent activity in conjunction with a selectivity of 98% in the transesterification reaction of *N*-acetyl-L-phenylalanine ethyl ester with 1-propanol (Zhao et al., 2011). Another example of a positive influence of DES has been reported in the study of the lipase-catalyzed hydrolysis reaction of *para*-nitrophenyl palmitate. The enzyme was mostly deactivated in pure DES, however, in an aqueous solution of ChCl/glycerol, the half-life of lipase at 40 °C was enhanced by 9.2 times when compared to the control sample (Kim et al., 2016). The above reports have demonstrated a high potential in the use of deep eutectic solvents as enzymatic reaction media (Ibn Majdoub Hassani et al., 2019; Gotor-Fernández & Paul, 2019; Tan & Dou, 2020; Pätzold et al., 2019). In the light of the above, it can be assumed that it is possible to stabilize the enzyme reaction and obtain high levels of yields with the possibility of easy separation of the obtained product, by preparing an “enzyme-friendly” DES composition. However, not every hydrolase enzyme is stable and active in DES. According to literature findings, the enhanced activity phenomenon can be addressed to cation, anion, or HBD compound as well. Acquiring knowledge of enzyme behavior in the DES environment might lead to an increase not only in the reaction yields but also alternation in the selectivity of substrates. This also might lead to lower the cost of production and perhaps open new routes for the many industries, where the enzymatic reactions are present (Toledo Hijo et al., 2016). Especially in the food industry potential benefits can be achieved with such methods in the field of food chemistry and galactooligosaccharides, however, it is yet to study.

The aim of this study was to analyze the effects of a new kind of eutectic solvents based on choline levulinate ionic liquid, on the catalytic properties of microbial β -galactosidase.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Choline bicarbonate (80% in H₂O), Levulinic acid (99%), Urea (99%), Glycerol (99%), Ethylene glycol (99%) Lactose (99%), and solution of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* (Lactozyme L, ≥ 2600 U per gram of preparation), were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA). All chemicals were used without further purification.

2.2. Choline levulinate synthesis

Levulinic acid (0.12 mol) was added dropwise to a solution of choline bicarbonate (0.12 mol) in water (50 mL). The reaction was carried out in a round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar at 40 °C over a 24 h period. After the reaction completion, the mixture was evaporated under reduced pressure at room temperature to avoid thermal decomposition of the formed salt, to furnish the pure product, 99% yield.

2.3. Preparation of choline levulinate based deep eutectic solvents

All deep eutectic solvents were prepared by mixing choline levulinate (0.1 mol) and suitable HBD at specific molar ratios (respectively 0.1 and 0.2 mol) upon continuous stirring at 60 °C. Obtaining a homogeneous mixture determined the readiness of the DES.

The substrates before mixing were dried (HBD and choline levulinate) separately in order to remove water. The prepared DES were finally dried again and stored in a glass container at room temperature. Molar ratios, abbreviations, and appearances of all prepared DESs are presented in Table 1. The ¹H NMR spectra of choline levulinate based DES are presented in supplementary materials – Figs. S6–S11

2.4. ¹H NMR analysis of choline levulinate

¹H NMR spectra of developed choline levulinate were recorded on a Bruker Avance 400 spectrometer (400 MHz) using D₂O. Proton chemical shifts are shown in parts per million (δ ppm). The ¹H NMR spectrum of choline levulinate is presented in supplementary materials – Fig. S5

2.5. Density and viscosity assay of DES

The densities and viscosities of DESs were measured using a laboratory-scale Radwag AS 510.3Y and TA Instruments AR2000EX rheometer at atmospheric pressure. The temperature accuracy was controlled to ± 0.1 °C. The accuracy of the density value was ± 0.001 g·cm⁻³. Before the measurements, the density apparatus was calibrated with distilled water and dry air. The uncertainties of the viscometer were estimated to be $\pm 2\%$. In each measurement, water contamination was below 1.5%wt. However, even though this value could influence the measured property, it was not possible, even after extended drying periods and using various drying techniques, to decrease the water content in prepared samples to below 1.13%.

2.6. Conductivity assay of DES solutions

Conductivity analyses were made using the CPC-411 Elmetron conductivity meter. The DESs were enclosed in a sealed chamber with a meter probe, at a temperature-controlled by a thermostatic water bath. Each measurement was performed 3 times. Prior to analysis, the water content of DES samples was determined using the Karl-Fischer titration Metrohm 915 KF Ti-Touch instrument. The measurements were performed at 25 °C.

2.7. Differential scanning calorimetry analysis

Differential Scanning Calorimetry (DSC) measurements were performed using a Mettler Toledo DSC 1 STARe System differential scanning calorimeter, coupled with a Huber TC100 immersion cooler. The assays were made at atmospheric pressure, with nitrogen as a purge gas, and an empty sample pan as the reference. The sample masses were between 6 and 12 mg. The samples were scanned in 3 cycles. The first heating cycle was from -25 °C to 125 °C. At 125 °C, samples were held for 10 min isotherm. Then the samples were cooled from 125 °C to -80 °C, held at this temperature for 10 min, and heated in the third heating cycle from -80 °C to 125 °C. In each cycle, the temperature change rate was 10 °C/min.

Table 1
DES solvents based on choline levulinate.

HBA	HBD	Eutectic Solvent Code	HBA:HBD [mol:mol]	Name (abbreviation)	Appearance	Water content [%]
		1a	1:2	Ch[Lev]:U ^a	TL ^d	1.44
		1b	1:2	Ch[Lev]:Gly ^b	TL	1.13
		1c	1:2	Ch[Lev]:EthGly ^c	TL	1.46
		1d	1:1:1	Ch[Lev]:U:Gly	TL	1.36
		1e	1:1:1	Ch[Lev]:U:EthGly	TL	1.44
		1f	1:1:1	Ch[Lev]:Gly:EthGly	TL	1.41

a - Urea; b - Glycerol; c - Ethylene glycol; d - transparent liquid; HBA- hydrogen bond acceptor, HBD-hydrogen bond donor.

2.8. Thermogravimetric analysis (TGA) of DES

Thermal stabilities of the obtained DESs were determined by thermogravimetric analysis using a TA Instrument TGA Q50 thermogravimetric analyzer, allowing temperature measurements to the accuracy of 0.1 °C and mass to the accuracy of 0.01%. All TGA measurements were made in the dynamic heating regime, under nitrogen atmosphere. A dynamic mode in the temperature range from 25 °C to 500 °C at a heating rate of 3.5 °C/min. was used to determine the onset of decomposition temperatures. Since the obtained DESs were very hygroscopic, before measurements, all samples were held for 10 min at 85 °C under nitrogen atmosphere, to remove any remaining water. Decomposition temperatures reported for all DESs studied were established as the onset temperature for decomposition of the first 5% of the sample ($T_{5\%onset}$), and as the regular onset temperature for decomposition (T_{onset}) for the entire sample or each of the consecutive steps in multistep decomposition.

2.9. Spectrometric analysis of DES

For each of the prepared deep eutectic solvents, the FTIR spectra were measured using an FTIR Broker TENSOR 27 spectrometer. Dried sample drops were placed on the IR sensor and the spectra were taken from 4000 to 500 cm^{-1} at room temperature.

2.10. Analysis of DES influence on β -galactosidase enzyme activity

Solutions for enzymatic reaction with β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* were prepared in the following concentrations: 5%, 10%, 15%, 20% of DES in phosphate buffer (v/v) at a constant pH of 7.0. The enzyme activity was measured according to modified method described by Craven et al. (1965). The substrate was 4-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) (Fig. 1). The initial concentration of ONPG was 5 mmol/l and the reaction time was 15 min. at 30 °C. Prior to analysis, β -galactosidase was diluted 1:1000 in phosphate buffer. The assay was performed by transferring 10 μl of the diluted enzyme to 1.5 mL of the substrate solution. After incubation time, 300 μl of the reaction mixture was transferred to cells on 96-well microplates and absorbance was measured with the use microplate reader, Thermofisher Scientific Multiskan Go Microplate Photometer, at wavelength 420 nm. One unit of the enzyme was found to liberate 1 μmol of 4-nitrophenyl per minute in the assay conditions.

The other substrate for β -Gal was lactose. Solution of lactose in DES were prepared using lactose stock in sodium phosphate buffer to have the final concentration of 80 mM. The required pH value (pH 7.0) was adjusted using 1 M NaOH. Solutions of DES (20%, 15%, 10% 5%) containing lactose substrate and controls (80 mM lactose solution in sodium phosphate buffer, pH 7.0) were transferred to 96-well microplates in volume 300 μl per cell. The assays were initiated by addition to each cell

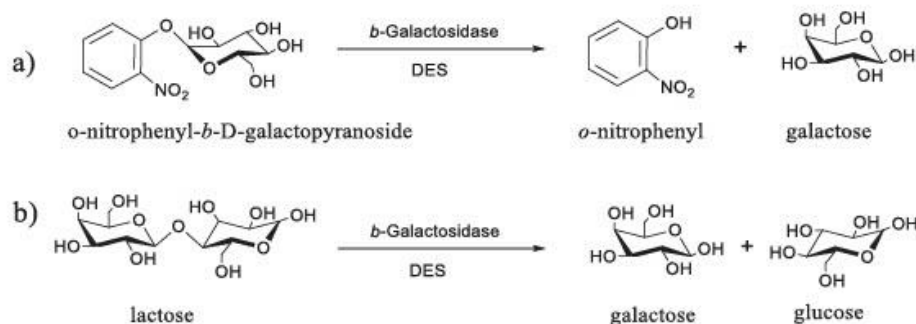


Fig. 1. Catalytic processes by β -galactosidase used in this work, a) hydrolysis of ester bond in *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside used as substrate and b) hydrolysis of β -1-4 glycosidic bond in lactose used as a substrate.

10 μ l of the appropriate diluted solution of the enzyme. The samples were stirred and incubated for 15 min. at 25 °C. Next 30 μ l of the reaction mixture or control were transferred to 300 μ l of the glucose test reagent (BioMaxima) on a 96-well microplate. After 10 min. of incubation at 25 °C, absorbances (500 nm) were recorded with a microplate reader. One unit of β -galactosidase liberates 1 μ mol of glucose from lactose per ml per minute in the assay conditions.

3. Results and discussion

The stability and effectivity of enzymes for application in food processing is the most important factor that determines its usefulness (Chapman et al., 2018). One of the possibilities of obtaining a positive effect on the biocatalyst is the use of ionic liquids or deep eutectic solvents showing a stabilizing effect on enzymes (Weingärtner et al., 2012). The milk and milk derivatives product valorization against lactose intolerance is nowadays an especially important topic (Rocha & Guerra, 2020). The enzymatic conversion of milk sugar, lactose by fungal β -galactosidase is a well-known method for the reduction of side effects of dairy products consumption. However, this enzyme stability and catalysis in this process can be affected by process conditions or the properties of milk derivatives. (Dutra Rosolen et al., 2015; BOSSO et al., 2016). The improvement of its operational stability using factors and methods safe in food processing is a challenge. However, the use of ionic liquids with their unusual properties could be considered for solving the problem (Toledo Hijo et al., 2016). The prepared group of new DESs based on choline levulinate salt was divided into two subsets. The first subset included eutectic solvents made of choline levulinate and one hydrogen bond donor. The other subset comprised eutectic solvents made of choline levulinate and two hydrogen bond donors. (Table 1). In the process of DES mixture preparation, utmost care was taken to eliminate water, as this is the main impurity of the deep eutectic solvents, to allow accurate measurements of physicochemical properties. All physicochemical assays were conducted after securing water content below the level of 2%.

3.1. Density, viscosity, and conductivity assay of choline levulinate based DESs

One of the most important physical properties of a liquid is density, whose values determined for choline levulinate-based deep eutectic solvents are collected in Table 2. According to the results presented in Table 2, all examined eutectic solvents, based on choline levulinate have densities greater than that of water. Interesting observations were made for the two HBD - glycerol and ethylene glycol. Densities of glycerol and

Table 2
The densities and conductivities of choline levulinate based DESs at 25 °C.

--	HBA	HBD	HBA: HBD	Density	Conductivity [σ , mS cm ⁻¹]
			[mol: mol]	[ρ , g cm ⁻³]	
I	Chol [Lev]	-	-	1.14	1.56
Ia	Chol [Lev]	Urea	1:2	1.16	0.29
Ib	Chol [Lev]	Glycerol	1:2	1.12	0.53
Ic	Chol [Lev]	EthGly	1:2	1.10	1.93
Id	Chol [Lev]	Urea: Glycerol	1:1:1	1.17	0.57
Ie	Chol [Lev]	Urea:EthGly	1:1:1	1.14	1.02
If	Chol [Lev]	Glycerol: EthGly	1:1:1	1.11	1.36

HBA- hydrogen bond acceptor, HBD-hydrogen bond donor.

ethylene glycol at 298.15 K are 1.12 and 1.10 g/cm³, respectively. The samples containing these HBD show densities similar to those of their pure HBD components and slightly lower than pure ionic liquid. The density of pure choline levulinate with 1.49 % water content is 1.136 g/cm³, which shows that, in this case, density is not an additive parameter.

3.1.1. Viscosity of choline levulinate based DESs

Viscosity is a measure of a liquid's resistance to shear stress and arises from the liquid particles' ability to slide past each other. Since the viscosity of mixtures depends greatly on density, it is understandable, that in this regard, viscosity mostly depends on attractive electrostatic forces. For substances of high densities, the electrostatic forces require a high amount of energy to disrupt, which explains the great shear resistance. However, the differences in density among all DESs tested in this study are relatively small, thus total electrostatic attractions per unit volume among the tested compounds will be similar, so this cannot entirely explain large differences in viscosity. Since deep eutectic solvents are composed of complexed quaternary ammonium salts with various hydrogen bond donor compounds (Sheldon, 2016), according to Stefanovic et al. (Stefanovic et al., 2017) it is important to consider differences in viscosity in DES also through the presence and size of hydrogen bond network in each DES. This approach enables understanding of this phenomenon, especially, taking into consideration the relative hydrogen bond capacities of each HBD - urea can donate four hydrogen bonds, glycerol - three and ethylene glycol - only two hydrogen bonds. This explains that even though the densities are similar, the hydrogen bond networks among the tested DESs are different. The acquired results indicate that eutectic solvents containing urea and glycerol as HBD (together or separately) show the highest decrease in viscosity with increasing temperature (see supplementary materials Fig. S1). This is the outcome of weakening the intensity of hydrogen bonding forces in the mixture between ionic liquid and HBD, and weakening of the intensity of hydrogen bonding between particles of HBD only, respectively. In consequence, the molar ratio of mixtures containing two moieties (only one HBD) exhibits a higher viscosity drop than mixtures containing three moieties (two different HBD). According to Abbott et al. (2011), the presence of the second HBD probably causes partial rupture of the hydrogen bond network (Abbott et al., 2011). This is due to the fact, that homogenous solution requires that the intermolecular solute-solvent forces of attraction are greater than or equal to the solute-solute forces of attraction to enable two substances to become miscible. The presence of two different HBDs in DES forces reorganization of the molecules in the mixtures (compared to DES with only one HBD) which affects the way the molecules are packed. The outcome of this behavior of molecules is the differentiation of viscosities. (Mjali & Ahmed, 2016). As follows from the results, the eutectic mixtures composed of three moieties have low viscosities, to begin with, therefore, the temperature increase does not lower them significantly. It can be treated like evidence that tertiary mixtures do not have a robust hydrogen bond network.

3.1.2. Conductivity of choline levulinate based DESs

Choline levulinate-based DESs show relatively low viscosities, which as mentioned above, results from the relatively weak hydrogen bond network. The conductivity of DESs depends on viscosity, it is clear that the HBD molar ratio also influences the conductivities of DESs. This also leads to the assumption that the Arrhenius-like equation can be used to predict the conductivity behavior of DESs. As shown in Table 2, the conductivities of the prepared DESs are significantly lower than that of the pure ionic liquid choline levulinate. Moreover, for DES made of three moieties, the drop in conductivity compared to that of pure Ch[Lev] is lower than for the two-compound mixtures. The most interesting behavior was observed for the mixtures containing ethylene glycol. For DES Ch[Lev]:EthGly (Ic) a significant increase in conductivity was noted. Also, for the eutectic solvent composed of 3 moieties (Ie, If) that incorporate ethylene glycol in the structure, the results show an increase

in conductivity, compared to that of the DES composed of two moieties (Ia, Ib). Since the structures of the polyols are similar, it can be expected that hydrogen bond networks in Ch[Lev]:EthGly and Ch[Lev]:Glycerol are also similar, and different from the hydrogen bond network in Ch[Lev]:Urea. The same effect should be expected in the DESs containing two HBD, however, according to Stefanovic et al. (Stefanovic et al., 2017), there are also HBD self-interactions that can change the structure of the hydrogen bond network. According to the previous work of Hayes, et al. different structures between an ionic liquid and different HBD may lead to the different behavior of the fluid, that for instance is manifested as a higher conductivity (Hayes et al., 2015). Thus, it is possible that there is a direct correlation between the strength and nature of the hydrogen bond network in the bulk liquid and its physical properties, e.g. conductivity. Despite the similarity in the structures of the glycerol and ethylene glycol, a similar effect was not observed.

3.2. Thermal stability of choline levulinate based DESs

3.2.1. Differential scanning Calorimetry

All the prepared DES were investigated by DSC (supplementary materials Fig. S2.) to ascertain if any thermal transitions occur within the studied temperature range. The obtained results were analyzed and compared to those obtained for pure choline levulinate and other DES mixtures from the studied group. The DSC of pure choline levulinate shows only a glass transition step at 68.42 °C. There are no other peaks, which means that there are no other thermal transitions steps in the temperature range considered. For the sample Ch[Lev]:Urea (Ia) the glass transition step was observed at -39.28 °C, for Ch[Lev]:Urea:Glycerol (Id) the glass transition step occurs at -58.37 °C and for Ch[Lev]:Urea:EthGly (Ie) at -66.62 °C. Also, for these samples no other peaks are observed. It could indicate that the addition of urea shifts the glass transition point to higher temperatures, however when urea is present in DES together with another HBD (glycerol or ethylene glycol) the glass transition point is shifted to higher temperatures, hence not as high as for the mixture with only urea as an HBD. In all investigated samples containing urea as an HBD, only glass transitions are observed. For the DES samples with only liquid substrates used as a hydrogen bond donor (Ch[Lev]:Glycerol (Ib), Ch[Lev]:EthGly (Ic), Ch[Lev]:Glycerol:EthGly (If)), no phase transition changes occurred. There is a possibility that phase transition could occur at lower temperatures (beyond the access of our instrument), however, since the mixtures are homogenous, and no phase transitions such as crystallization or melting take place, it can be presumed that molar ratios of used substrates are at the optimal level for the preparation of eutectic solvent.

3.2.2. Thermogravimetric analysis of choline levulinate based DESs

The thermogravimetric analysis of the new developed DES showed their high variability following from their different structures TGA thermograms (Table 3; supplementary materials Fig. S3) for the DESs based on two moieties - choline levulinate and a single HBD, compounds Ia, Ib, Ic, (Ch[Lev]:Urea), (Ch[Lev]:Glycerol), and (Ch[Lev]:Ethylene glycol) exhibit differences in their thermal decomposition. TGA thermogram for the eutectic solvent Ch[Lev]:Urea (Ia) shows two different slopes. At 136.66 °C the first decomposition step of urea into cyanic acid, ammelide, and biuret takes place (Bernhard et al., 2012), which overlaps the decomposition step of Ch[Lev] starting at around 188 °C. This step also overlaps the decomposition of biuret which, can be seen as a long linear drop above 198 °C. Ch[Lev]:Glycerol mass loss caused by evaporation of glycerol begins above 131 °C, takes place in one step to thermal decomposition of Ch[Lev], shifting thermal stability of this DES to lower values. It was observed that both processes occur in a single narrow step, significantly below the glycerol boiling point (290 °C) and close to the T_{onset} temperature of Ch[Lev] at 188.27 °C. For Ch[Lev]:EthGly (Ic) evaporation of ethylene glycol takes place at 102.62 °C at which the first mass loss is manifested. The second event of mass loss (T_{2nd}), with an onset point at 194.07 °C, is attributed to the

Table 3

Thermogravimetric analysis of choline levulinate based DESs.

	HBA	HBD	[mol: mol]	HBA: HBD [C/ min]	HR ^a [°C]	T _{onset} [°C]	T _{onset- 2nd} [°C]	T _{2nd} ^a
I	Ch [Lev]	-	-	-	5	188.27	179.62	-
Ia	Ch [Lev]	Urea	1:2	1:2	5	136.66	105.39	198.60
Ib	Ch [Lev]	Glycerol	1:2	1:2	5	153.26	131.11	-
Ic	Ch [Lev]	EthGly	1:2	1:2	5	102.62	86.47	194.07
Id	Ch [Lev]	Urea:Glycerol	1:1:1	1:1:1	5	177.77	158.85	204.06
Ie	Ch [Lev]	Urea:EthGly	1:1:1	1:1:1	5	126.11	101.13	207.61
If	Ch [Lev]	Glycerol: EthGly	1:1:1	1:1:1	5	100.55	84.97	203.62

^a - onset temperature for the second decomposition step observed.

decomposition of Ch[Lev]. Analysis of the thermographs shown in Fig. S3.A indicates that Ib (Ch[Lev]:Glycerol) mixture is characterized by the highest thermal stability of binary eutectic mixtures investigated in this study as the onset of its mass loss signal occurs at the highest temperature. Fig. S3.B presents the TGA thermograms of the DES mixtures composed of choline levulinate and two different HBD, samples Id, Ie, If, (Ch[Lev]:Urea:Glycerol), (Ch[Lev]:Urea:EthGly), (Ch[Lev]:Glycerol:EthGly). The thermogram of Ch[Lev]:Urea:Glycerol (Id) mixture presents a wide mass loss signal corresponding to the simultaneous decomposition of all DES components. It can be also concluded that the onset temperature of decomposition of this DES is limited by the thermal stability of the pure ionic liquid. The TGA curve for DES Ch[Lev]:Urea:EthGly (Ie) is similar to that of DES Ch[Lev]:EthGly (Ic), however, with the higher onset temperatures of both signals, which is a result of urea presence. The first mass loss signal between 101.13 °C - 126.11 °C corresponds to evaporation of ethylene glycol, while the second one at around 198 °C to the decomposition of urea. The signal corresponding to the decomposition of Ch[Lev], overlaps that assigned to the decomposition of urea. The TGA thermogram for Ch[Lev]:Glycerol:EthGly (If) presents two mass loss signals. The first one between 84.97 °C - 100.55 °C which is due to evaporation and decomposition of ethylene glycol, while the second one at around 203.62 °C which is the beginning of evaporation of glycerol along with the decomposition of Ch[Lev]. As follows from the presented data, the deep eutectic solvents containing ethylene glycol, due to their volatility, are the least stable eutectic solvents studied. On the other hand, due to the high thermal stability of HBD such as urea and glycerol, the eutectic mixtures containing them exhibit the highest thermal stability. Consequently, Ch[Lev]:Urea:Gly (Id) shows the highest thermal stability, although it is limited by the stability of choline levulinate. It is also worth noting that the temperature of decomposition onset of each DES was lower than that of pure choline levulinate. As can be concluded from the above data, to acquire a eutectic solvent with elevated thermal stability, (which in this case is strictly limited by choline levulinate ionic liquid) it is recommended to use an HBD with low volatility and high thermal stability - such as urea or glycerol. An interesting point is that besides high thermal stability, these compounds can create a robust hydrogen bond network which also increases thermal stability. For example urea can deliver four hydrogen bonds (Migliorati et al., 2019) at the same time, presenting high thermal stability and non-volatility. The ability to create hydrogen bonds, however, not only depends on the HBD compound but also on the anion structure as well as on the hydrogen bond acceptor sites of the anion.

3.3. FT-IR spectroscopy

Fig. S4 (supplementary materials) presents the FT-IR of all DES based on choline levulinate used in this study. As can be seen, the differences in frequency shifts, absorbance values, and bandwidths are small to none. From among the spectra of all tested DESs, the one recorded for Ch[Lev]:Urea (Ia) stands out. This spectrum presents the broadest peak covering the range 3500 cm^{-1} – 3000 cm^{-1} and is assigned to the stretching vibrations of a hydroxyl group (–OH) from the choline cation. This can be a result of the strongest hydrogen bond network from among the tested DESs as well as the high hygroscopicity of this DES in comparison to the DESs with polyols. Small to none frequency shifts were detected for the bands corresponding to the stretching vibrations of functional groups, in the range of 1050 – 1430 cm^{-1} (C–O stretching, C–C–O asymmetric, and symmetric stretching). This lack of intensity of a specific group is probably an outcome of the limited amount of atoms involved in forming a hydrogen bond network in the studied DESs (Delgado-Mellado et al., 2018). According to the above data, the deep eutectic solvent based on choline levulinate, presented in this study, does not form strong hydrogen bond networks, as may be found in the DESs based on choline chloride (Hoppe et al., 2019).

3.4. Effect of DES on β -galactosidase stability

The enzyme stability is a key parameter that determines its further industrial application (Xavier et al., 2018). Therefore, evaluation of

β -galactosidase stability has been carried out in all presented solvents. The enzyme have been first incubated in each solvent system for a specific time (30 and 60 min) at different temperatures (30 and $40\text{ }^\circ\text{C}$), and then transferred to a standard buffer solution in which the enzymatic reaction was carried out. The results were expressed as relative activity referred to that of the control sample without eutectic mixture after enzyme incubation for 15 min. These tests were used to determine the time-dependent decrease in the activity of the enzyme and the temperature-dependent decrease in the activity while being stored in a solution with DES present. Taking into account results from the earlier study (Hoppe et al., 2019) as well as the study of Toledo et al. and Xu et al. it was hypothesized that the presence of specific organic anion instead of inorganic anion in quaternary ammonium salt, along with the presence of polyol HBD, exerts a significant influence on enzymatic activity, especially when added in a small volume (Toledo et al., 2019; Xu et al., 2018). To confirm this, in the present work, a similar concentration of DES mixture has been prepared. The obtained results are presented as means from three repeated experiments in typical runs to evaluate reproducibility. β -gal exhibited low thermal stability and high storage stability at $30\text{ }^\circ\text{C}$ in all tested eutectic systems, relative to the stabilities in the control sample. As shown in Fig. 2A, after 30 min of incubation, the highest loss of activity occurs only in the mixture containing pure ionic liquid Ch[Lev] and those containing eutectic systems with urea. For all other samples, the enzyme stability in solvents containing doped with eutectic solvents not only remains at the same level as for the control sample but in many cases, shows increased relative

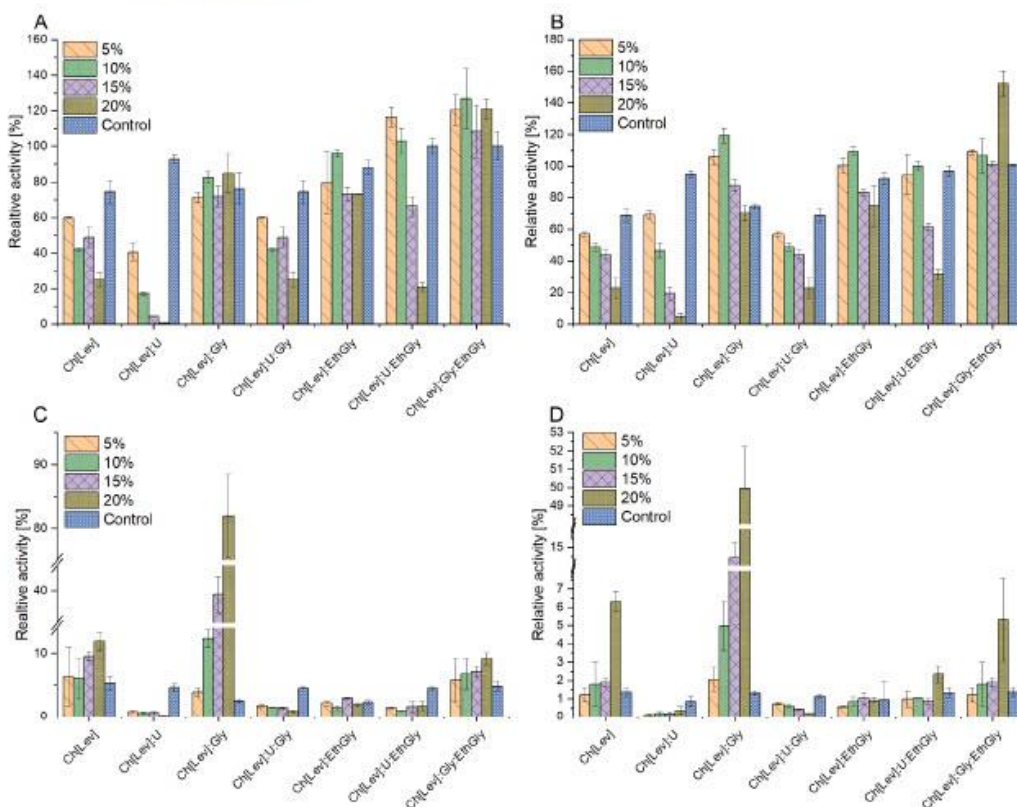


Fig. 2. Stability of β -galactosidase at $30\text{ }^\circ\text{C}$ [after 30 min (A) and 60 min (B)] and at $40\text{ }^\circ\text{C}$ [after 30 min (C) and 60 min (D)]. The activity is relative to the initial rate after 15 min of incubation of the control sample. Points are an average of triple runs with a SD error bar.

activity. It is worth emphasizing that for the samples with a small concentration (5% or 10%) of the eutectic mixtures (even for the solvents containing urea), the enzyme stability is being positively affected, also after one hour of incubation (Fig. 2B). This is a rather unexpected observation, as urea is known to be a denaturing agent. Analysis of the results also shows that irrespective of incubation time, the highest relative activity was obtained for the mixtures with eutectic systems containing polyols – ethylene glycol and glycerol. It is the most evident for the mixture with Ch[Lev]:EthGly: Gly (If) regardless of the amount of the DES added. It is well known, that glycerol is an enzyme stabilizing agent, (Ruan et al., 2003), but an interesting fact is that ethylene glycol gives similar or even better results especially in the presence of choline levulinate. However, as can be seen in Fig. 2C and Fig. 2D, at 40 °C, the ethylene glycol phenomenon disappears and only the systems containing eutectic mixtures with the highest glycerol concentration allow the enzyme to maintain its activity. In Ch[Lev]:Gly (Ib); Ch[Lev]:EthGly:Gly (If), even though the relative activity of β -galactosidase, remains at low levels and diminishes over time, it is still relatively high compared to control samples. The highest activity was obtained for Ch[Lev]:Gly (Ib) and as mentioned above, this effect is due to the presence of glycerol.

3.5. Effect of DESs composition on β -Gal activity

The enzyme β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* belongs to the family of hydrolases. As a hydrolytic enzyme, it splits O-glycosidic bonds between glucose and galactose in lactose in the presence of water. In our study *p*-nitrophenyl- β -galactoside was used as a model substrate. The enzyme activity was analyzed at pH 7.0. The changes observed in the enzyme activity were found to depend both on the concentration and type of HBD in DES. All eutectic mixtures had a favorable impact on the

hydrolytic activity of β -galactosidase, with the highest activity determined for the eutectic mixtures containing polyols, in particular ethylene glycol, in concentrations below 20%. As shown in Fig. 3A, the addition of the pure ionic liquid Ch[Lev] to the enzymatic reaction medium also enhanced the relative activity of the examined enzyme. In all tested samples containing DES [in concentrations of 5%, 10%, 15%, 20% (v/v)] added to a buffer solution (enzymatic reaction medium) the hydrolytic activity of β -galactosidase was increased. Even for 1a Ch [Lev]:Urea, in concentrations between 5% and 20% (v/v) added to 95%-80% buffer, the activities of β -galactosidase were higher than in the blank test. In almost all cases, whereas HBD polyols were used (Ch[Lev]:Gly (Ib); Ch[Lev]:EthGly (Ic), Ch[Lev]:EthGly:Gly (If), Ch[Lev]:U:Gly (Id), Ch[Lev]:U:EthGly (Ie)), the enzyme activity is being significantly enhanced in comparison to control sample (Fig. 3A). The most significant result can be observed in the reaction medium with 15% Ch[Lev]:EthGly (Ic) in which the activity of β -galactosidase was increased almost 5.5-fold. It is worth noting that a similar effect was also noted for DES solvents containing urea. As mentioned above, urea is well known for protein denaturation (Almarza et al., 2009), yet, DES mixtures with urea as an HBD also exhibit enhancing properties on β -galactosidase activity. In the light of the above data it can be expected, that the increase in enzymatic activity is related not only to the protective role of Ch[Lev] but also depends on the used HBD compound. To confirm this hypothesis, a model reaction was carried out, with lactose which is a natural substrate for β -galactosidase used as a substrate. The eutectic systems in concentrations expected to give the best results, based on the study with ONPG substrate, were selected to confirm a positive effect of Ch[Lev]:EthGly (Fig. 3 B). In general, all eutectic systems, even with urea, at a percentage ratio of 5% (v/v) eutectic solvent and 95% buffer, exhibit increased activity of β -galactosidase compared to the control sample.

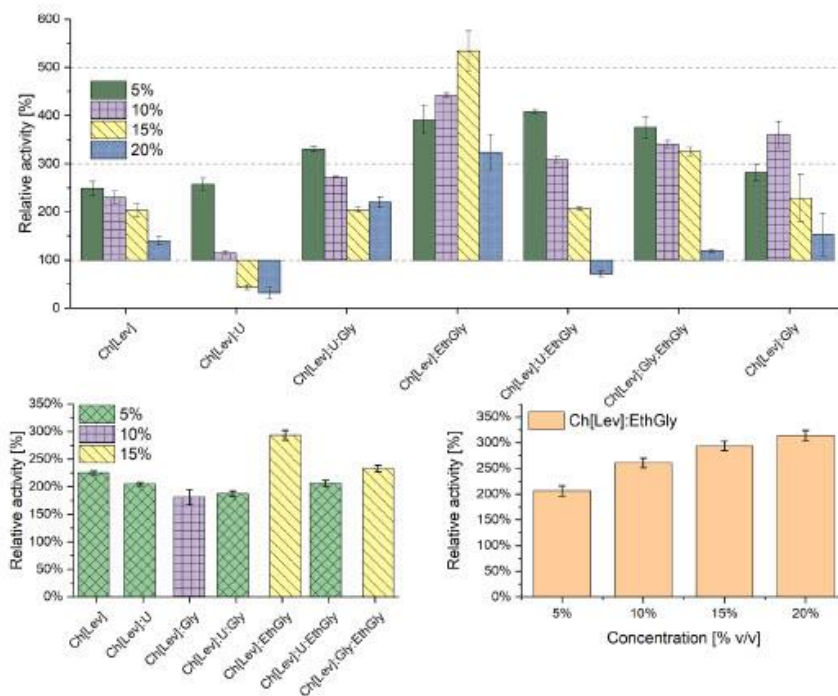


Fig. 3. The effect of Ch[Lev] DES on β -Gal hydrolytic activity with : (A) ONPG as a substrate; (B) Lactose as a substrate for the most effective concentrations of DES doping for ONPG substrate (A). Influence of DES Ch[Lev]:EthGly in different concentrations on β -Gal hydrolytic activity with lactose as a substrate (C). Presented bars are in reference to 100% relative activity of control sample.

Again, in all experiments with eutectic solvents in concentrations of 5%, 10%, 15%, 20% (v/v) only polyols used as HBDs (Ch[Lev]: Gly (Ib), Ch[Lev]:EthGly (Ic), Ch[Lev]:EthGly:Gly (If), Ch[Lev]:U:EthGly (Ie)), the activity of β -galactosidase was increased almost two- to threefold in comparison to that in the control sample (Fig. 3B).

Increased activity of β -galactosidase was observed in all tested systems and reached the highest value for the enzymatic reaction medium with Ch[Lev]:EthGly (Ic) eutectic solvent - increased with increasing concentration of this system (5% to 20%) (Fig. 3C). A more than threefold increase in β -galactosidase enzymatic activity was noted for the solution with 20% of Ch[Lev]:EthGly (Ic). In line with the earlier report by Hoppe et al., this phenomenon can be interpreted as a result of the interaction of the anion of the ionic liquid with the enzyme and HBD. Conducted research revealed that hydrolysis reaction in the environment containing a small amount of ethylene glycol (concentration 5% – 20%) exhibits a higher yield, than the reaction conducted in the control sample – Figs. S11 and S12. This explains the origin of the best results of choline levulinate: ethylene glycol DES mixture. The synergy effect of compounds occurs and obtained yields (100%) of hydrolysis reaction are the highest for this mixture. This is especially interesting in terms of DES molecular structure. According to Hammond et al. (Hammond et al., 2017), an unusual transition from ionic mixture to aqueous solution occurs when DES is being diluted. The presence of strongly coordinated DES components may hinder the interaction of those with the protein and water probably populates the protein interface. However, it is known that the DES components preferentially interact with the protein instead of water. The interaction through hydrogen bonds or electrostatic forces may cause a preferential interaction between protein residues and specific DES components. This is commonly observed in diluted DES (>50 wt% water), where ion-ion and protein behavior in deep eutectic solvents ion-hydrogen bond donor correlations vanish, and the solvent becomes a solution of the discrete DES constituents. In that regard, dilute DES has been shown to affect the local structure of horseradish peroxidase through protein-solvent interactions (Harif-Mood et al., 2017; Wu et al., 2014). Furthermore, specific ion effects were observed when using either choline chloride or choline acetate as the halide salt in the diluted DES systems. The presence of choline acetate resulted in a different protein secondary structure than choline chloride, also affecting protein function (Wu et al., 2014). This demonstrates that the discrete DES components interact with the protein potentially depending on their hydrophilicity/hydrophobicity, as observed in ILs which roughly comply with the traditional Hofmeister series (Zhao et al., 2016). Also described by Zhenkov et al. the intermolecular interactions of DES and water systems, and the peculiar effect of water on deep eutectic solvents described by Ma et al. suggest, that despite the dilution of DES, the protein surface interactions with DES constituents, may lead to the formation of DES system around the surface of the enzyme – which is being manifested as increased activity and stability of the studied enzyme in a water environment. (Zhekenov et al., 2017; Ma et al., 2018)

The effect of DES on the activity of the β -galactosidase was not widely studied especially in field of food processing. In most cases, the results were obtained for the reactions with immobilized β -galactosidase. Neri et al. (2008) reported 90% of lactose hydrolysis with using β -galactosidase covalently attached to a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic composite as a carrier and the immobilized enzyme was more effective in lactose cleavage than its soluble form. Rej Kumar and Devi (2001) showed β -galactosidase that using cross-linked poly(vinyl alcohol) was able to 95% of hydrolysis of lactose. Similarly, Pessela et al. (Pessela et al., 2003) obtained 98% conversion of lactose using β -galactosidase immobilized on sepa beads. The increased activity was explained by the beneficial effect of the immobilization on enzyme stability and increased resistance to reaction conditions. Having in mind, that a similar effect for the reaction medium admixture with ionic liquids only, has been observed and discussed by Zhao et al. (2006) who suggested that Hofmeister effects could be responsible for the enhanced

enzyme activity and stability in the reaction medium with ionic liquids. Also, Yang et al. (Yang, 2009) have shown that the kosmotropic effect of the anion from the ionic liquids on the enzymes, may hold for diluted aqueous solutions of ionic liquids. A confirmation of this hypothesis can be the enhanced β -gal activity in particular after comparing the enhanced activity of the enzyme in pure ionic liquid and the eutectic solvent based on this ionic liquid. The possible mechanism of changes in the catalytic properties of the enzyme can be related to modification of the β -galactosidase structure or indirect influence of DES on the stability of the critical transition state.

4. Conclusions

The aim of this study was to develop a new group of natural eutectic solvents, examine their physicochemical properties, and evaluate the performance of such solvents as additives to enzymatic reaction media. All eutectic solvents used in this study were subjected to the characterization of their physicochemical properties and used in the examination of β -galactosidase activity. The results indicate that the enzymatic reaction medium admixture with the eutectic solvents has a positive effect, on enhancing the enzyme activity. The highest values of enzymatic activity of β -galactosidase were obtained for the eutectic solvents based on choline levulinate and two polyols: ethylene glycol and glycerol (together and individually). In particular, the greatest impact on the stability and activity of the β -galactosidase enzyme was found to have the presence of ethylene glycol as an HBD in the DES used. It can be also concluded, that the presence of ethylene glycol or glycerol as a second HBD along with urea reduced the negative denaturing impact of the latter compound. These observations indicate that the presence of polyols allows the enzyme to keep its structure intact and not be involved with urea hydrogen bonding activity. Nevertheless, further research is needed to confirm these explanations. Apart from the enhanced yield of lactose processing by β -galactosidase in the levulinate-based DES reaction system, food safety is also an important issue. The studies on the toxicity of various choline salts, show, that the choline levulinate-based DES, exhibits low toxicity with LD50 values between the 500–5000 mg/kg that classify it to acute category III (Markiewicz et al., 2016). The safety of the rest components of the analyzed DES needs further analysis. However, the most powerful feature of eutectic mixtures is the flexibility to adjust their composition. The most powerful feature of eutectic mixtures is the flexibility to adjust their composition. Presented results showed, that the change of HBD from ethylene glycol to glycerol (which is non-toxic), in Ch[Lev]: Gly might also be used with success for significantly enhancing the B-Gal activity. Moreover in the food industry, with of course higher scale of the process, the products of the reaction can be easily separated using well known ion-exchange membrane separation method. This solution allows for quick and selective separation of all the DES components from the final product of the lactose enzymatic conversion reaction. Currently, this type of solution is offered by many companies as a ready-to-use system for many food industries and is commercially available.

Presented results suggest that there is a great scientific and industrial potential in eutectic solvents based on choline levulinate as β -galactosidase activity enhancers also in the field of food chemistry.

CRedit authorship contribution statement

Jakub Hoppe: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Ewa Byzła:** Data curation, Methodology. **Magdalena Szymańska:** Investigation, Visualization. **Radosław Drozd:** Methodology, Resources, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Marcin Smiglak:** Project administration, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Marcin Smiglak reports financial support was provided by National Science Center Poland.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from National Science Center (Poland), project OPUS (no. UMO-2015/19/B/NZ9/03711)

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>.

References

- Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. P., & Mantle, M. D. (2011). Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem*, *13*, 82–90.
- Almaraz, J., Rincon, L., Bahaas, A., & Brito, F. (2009). Molecular mechanism for the denaturation of proteins by urea. *Biochemistry*, *48*, 7608–7613.
- Becerra, M., Cerdán, E., & González Siso, M. I. (1996). Dealing with different methods for *Kluyveromyces fragilis* beta-galactosidase purification. *Biological Procedures Online*, *1*, 48–58.
- Bernhard, A. M., Peitz, D., Elsener, M., Wokaus, A., & Krücher, O. (2012). Hydrolysis and thermal stability of urea and its decomposition byproducts biuret, cyanuric acid, and melamine over anatase TiO₂. *Applied Catalysis B: Environmental*, *115–116*, 129–137.
- Bosso, A., Morioka, L. R. I., Santos, L. F. D., & Sugimoto, H. H. (2016). Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and skimmed milk. *Food Science and Technology*, *36*, 159–165.
- Chapman, J., Ismail, A., & Dins, C. (2018). Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts*, *8*, 238.
- Choi, Y. H., van Spronzen, J., Dai, Y., Verberne, M., Höllmann, F., Arends, I. W. C. E., ... Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant physiology*, *155*, 1701–1705.
- Delgado-Mellado, N., Larríba, M., Navarro, P., Rigual, V., Ayuso, M., García, J., & Rodríguez, P. (2018). Thermal stability of choline chloride deep eutectic solvents by TGA/FTIR-ATR analysis. *Journal of Molecular Liquids*, *260*, 37–43.
- Dutra Roelen, M., Gennari, A., Volpato, G., & Volken de Souza, C. F. (2015). Lactose Hydrolysis in Milk and Dairy Whey Using Microbial β -Galactosidases. *Enzyme research*, *2015*, Article 906240.
- Craven, et al. (1965). Purification, composition and molecular weight of the beta-galactosidase of *Escherichia coli* K12. *The Journal of Biological Chemistry*.
- de Gonzalo, G., Martín, C., & Fraaije, M. W. (2020). Positive impact of Natural Deep Eutectic Solvents on the Biocatalytic Performance of 5-Hydroxymethyl-Furfural Oxidase. *Catalysts*, *10*, 447.
- Görke, J., Sreenc, F., & Kazlauskas, R. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *15*, 40–53.
- Gotor-Fernández, V., & Paul, C. E. (2019). Deep eutectic solvents for redox biocatalysis. *Journal of biotechnology*, *293*, 24–35.
- Guerrero, C., Vera, C., Conejeros, R., & Illanes, A. (2015). Transgalactosylation and hydrolytic activities of commercial preparations of β -galactosidase for the synthesis of prebiotic carbohydrates. *Enzyme and microbial technology*, *70*, 9–17.
- Hammond, O. S., Bowron, D. T., & Edler, K. J. (2017). The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, *56*, 9782–9785.
- Harifi-Mood, et al. (2017). Density, viscosity, and conductivity of choline chloride+ethylene glycol as a deep eutectic solvent and its binary mixtures with dimethyl sulfoxide. *Journal of Molecular Liquids*. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.10.115>
- Hayes, et al. (2015). Structure and Nanostructure in Ionic Liquids. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/acs00411q>
- He, T., Venema, K., Priebe, M. G., Welling, G. W., Brummer, R. J.-M., & Vonk, R. J. (2008). The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *European journal of clinical investigation*, *38*, 541–547.
- Hoppe, J., Dron, R., Byrta, E., & Smiglak, M. (2019). Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 296–304.
- Ibn Majdoub Hassani, F. Z., Amzazi, S., & Lavandera, I. (2019). The Versatile Applications of DES and Their Influence on Oxidoreductase-Mediated Transformations. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*.
- Itoh, T. (2017). Ionic liquids as tool to improve enzymatic organic synthesis. *Chemical reviews*, *117*, 10567–10607.
- Jurado, E., Camacho, F., Lázón, G., & Vicaria, J. M. (2004). Kinetic models of activity for β -galactosidase: Influence of pH, ionic concentration, and temperature. *Enzyme and microbial technology*, *34*, 33–40.
- Kim, S. H., Park, S., Yu, H., Kim, J. H., Kim, H. J., Yang, Y.-H., ... Lee, S. H. (2016). Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *128*, 65–72.
- Lamial, et al. (2012). Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Ma, C., Laaksonen, A., Liu, C., Lu, X., & Ji, X. (2018). The peculiar effect of water on ionic liquids and deep eutectic solvents. *Chemical Society Reviews*, *47*, 8685–8720.
- Markiewicz, M., Maszkowska, J., Nardello-Rataj, V., & Stolte, S. (2016). Readily biodegradable and low-toxic biocompatible ionic liquids for cellulose processing. *RSC Advances*, *6*, 87325–87331.
- Migliorati, V., Sessa, P., & D'Angelo, P. (2019). Deep eutectic solvents: A structural point of view on the role of the cation. *Chemical Physics Letters*, *X*, 2, Article 100001.
- Mjalli, F. S., & Ahmed, O. U. (2016). Physical properties and intermolecular interaction of eutectic solvents binary mixtures: Reline and ethaline. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, *11*, 549–557.
- Neri, D. F., Balcão, V. M., Carneiro-da-Cunha, M. G., Carvalho, L. B., Jr., & Teixeira, J. A. (2006). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* onto a polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis. *Catalysis Communications*, *9*, 2334–2339.
- Patel, S., & Goyal, A. (2011). Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0558-5>
- Pätzold, M., Siebenhaller, S., Kara, S., Liese, A., Syldatk, C., & Holtmann, D. (2019). Deep Eutectic Solvents as Efficient Solvents in Biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, *37*, 943–959.
- Pessela, B. C., Fernández-Lafuente, R., Puentes, M., Vián, A., García, J. L., Carrascosa, A. V., Mateo, C., & Guisán, J. M. (2003). Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*, 369–374.
- Rejikumar, S., & Devi, S. (2001). Hydrolysis of lactose and milk whey using a fixed-bed reactor containing β -galactosidase covalently bound onto chitosan and cross-linked poly(vinyl alcohol). *International Journal of Food Science & Technology*, *36*, 91–98.
- Rocha, J. M., & Guerra, A. (2020). On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry by-product: An overview. *European Food Research and Technology*, *246*, 2161–2174.
- Ruan, K., Xu, C., Li, T., Li, J., Lange, R., & Balny, C. (2003). The thermodynamic analysis of protein stabilization by sucrose and glycerol against pressure-induced unfolding. *European journal of biochemistry*, *270*, 1654–1661.
- Sangwan, et al. (2011). Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02131.x>
- Sheldon, R. A. (2016). Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, *22*, 12984–12999.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugal, A. (2008). Functional food. Product development, marketing, and consumer acceptance—a review. *Appetite*, *51*, 456–467.
- Splechna, B., Nguyen, T.-H., Steinböck, M., Kulbe, K. D., Lorenz, W., & Haltrich, D. (2006). Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using beta-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*, 4999–5006.
- Stefanovic, R., Ludwig, M., Welber, G. B., Atkin, R., & Page, A. J. (2017). Nanostructure, hydrogen bonding, and rheology in choline chloride deep eutectic solvents as a function of the hydrogen bond donor. *Physical Chemistry Chemical Physics PCCP*, *19*, 3297–3306.
- Tan, J.-H., & Dou, Y. (2020). Deep eutectic solvents for biocatalytic transformations: Focused lipase-catalyzed organic reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*, 1481–1496.
- Toledo, M. L., Pereira, M. M., Pretre, M. G., Silva, J. P. A., Coutinho, J. A. P., & Tavares, A. P. M. (2019). Laccase Activation in Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *7*, 11806–11814.
- Toledo Hijo, A. A. C., Maximo, G. J., Costa, M. C., Batista, E. A. C., & Meireles, A. J. A. (2016). Applications of Ionic Liquids in the Food and Bioproducts Industries. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *4*, 5347–5369.
- Turnbull, J. L., Adams, H. N., & Gorard, D. A. (2015). Review article: The diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *41*, 3–25.
- Weingärtner, H., Cabrele, C., & Herrmann, C. (2012). How ionic liquids can help to stabilize native proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *14*, 415–426.
- Wu, et al. (2014). Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.01.001>
- Xavier, J. R., Ramana, K. V., & Sharma, R. K. (2018). β -galactosidase: Biotechnological applications in food processing. *Journal of Food Biochemistry*, *42*, Article e12564.
- Xu, P., Zheng, G.-W., Zong, M.-H., Li, N., & Lou, W.-Y. (2017). Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis. *Bioresources and Bioprocessing*, *4*, 34.
- Xu, W.-J., Huang, Y.-K., Li, F., Wang, D.-D., Yin, M.-N., Wang, M., & Xia, Z.-N. (2018). Improving β -glucosidase biocatalysis with deep eutectic solvents based on choline chloride. *Biochemical Engineering Journal*, *138*, 37–46.
- Yang, Z. (2009). Hofmeister effect: An explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, *144*, 12–22.
- Zhao, et al. (2016). Protein Stabilization and Enzyme Activation in Ionic Liquids: Specific Ion Effects. *Journal of chemical technology and biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.4837>

- Zhao, H., Baker, G. A., & Holmes, S. (2011). Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *Journal of molecular catalysis B, Enzymatic*, 72, 163–167.
- Zhao, H., Olubajo, O., Song, Z., Sims, A. L., Person, T. E., Lawal, R. A., & Holley, L. A. (2006). Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. *Bioorganic Chemistry*, 34, 15–25.

- Zhekenov, T., Toksanbayev, N., Kazakbayeva, Z., Shah, D., & Mjalli, F. S. (2017). Formation of type III Deep Eutectic Solvents and effect of water on their intermolecular interactions. *Fluid Phase Equilibria*, 441, 43–48.

Supplementary Materials

Enhanced hydrolysis of lactose using beta-galactosidase and deep eutectic solvents

Jakub Hoppe¹, Ewa Byzia², Magdalena Szymańska³ Radosław Drozd^{3*}, Marcin Smiglak^{2*}

¹Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89b, 61-614 Poznan, Poland

²Poznan Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, Rubiez 46, 61-612 Poznan, Poland

³West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Department of Microbiology and Biotechnology, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland

Table of Contents

1.Viscosity plot of DESs based on choline levulinate.....	S1
2.DSC chart of choline levuliant based DES.....	S2
3.TGA charts of choline levulinate based DES.....	S3
4. ¹ H NMR spectra of choline levuliant.....	S4
5. ¹ H NMR spectra of choline levuliant based DES.....	S5-S11
6. Hydrolysis of Lactose – Reaction kinetics for choline levulinate based DES with ethylene glycol and glycerol and liquid HBD compounds.....	S12
6.Hydrolysis of lactose – yield of glucose in choline levulinate based DES.....	S13

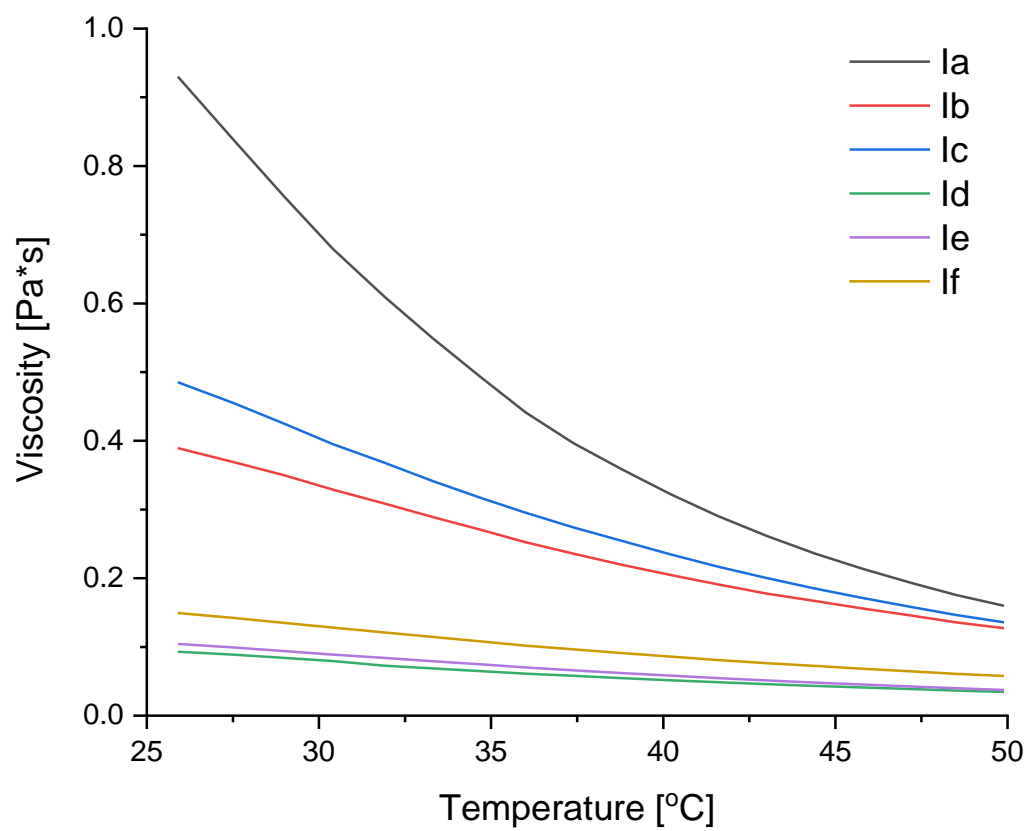


Figure S1. Viscosity of DESs based on choline levulinate depend on used HBD.

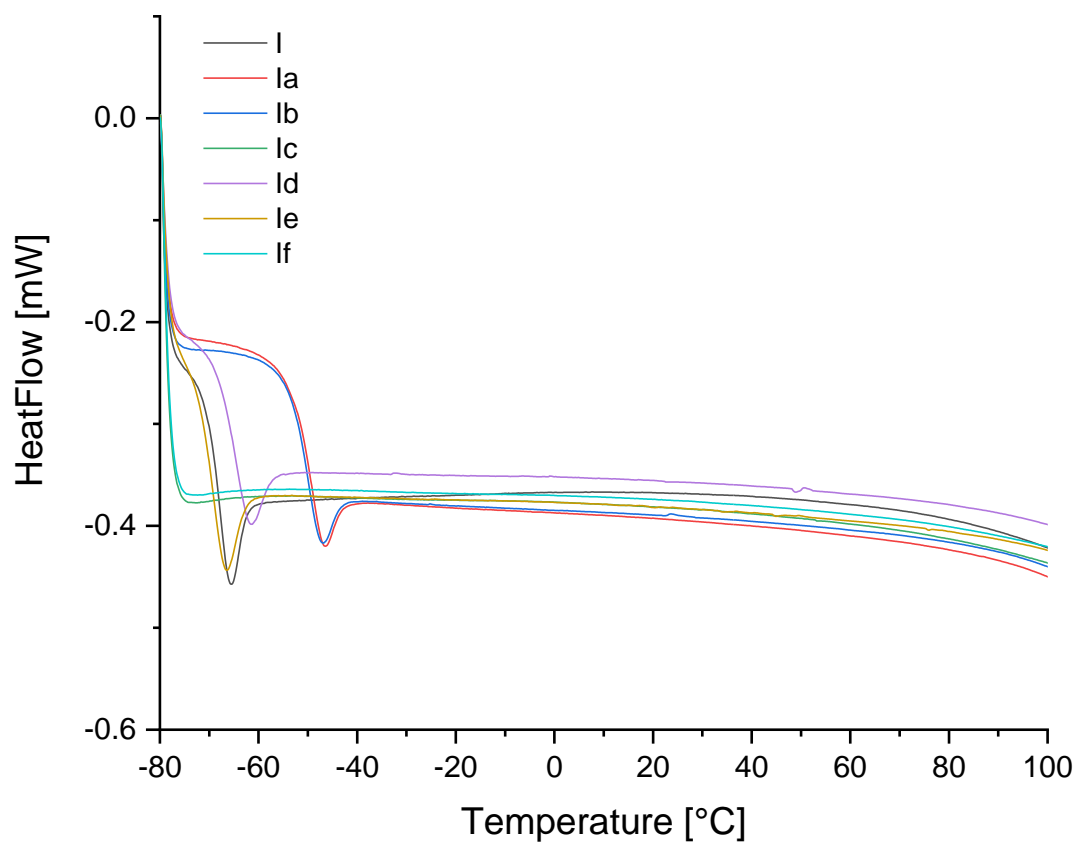


Figure S2. DSC chart of choline levulinate based DES

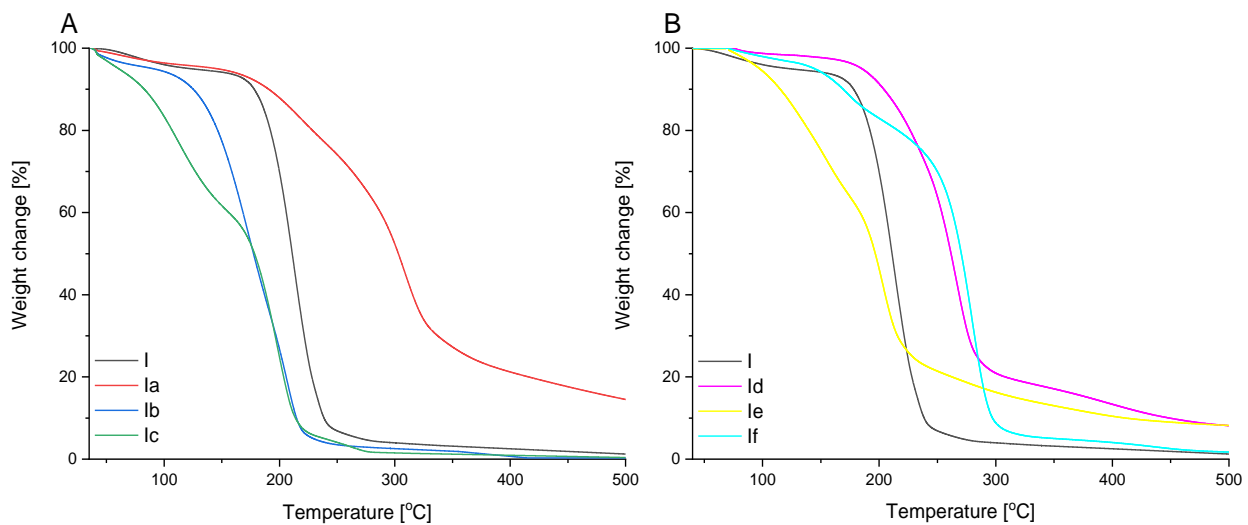


Figure S3. TGA charts based on choline levulinate containing (A) 1 HBD and (B) 2 HBD

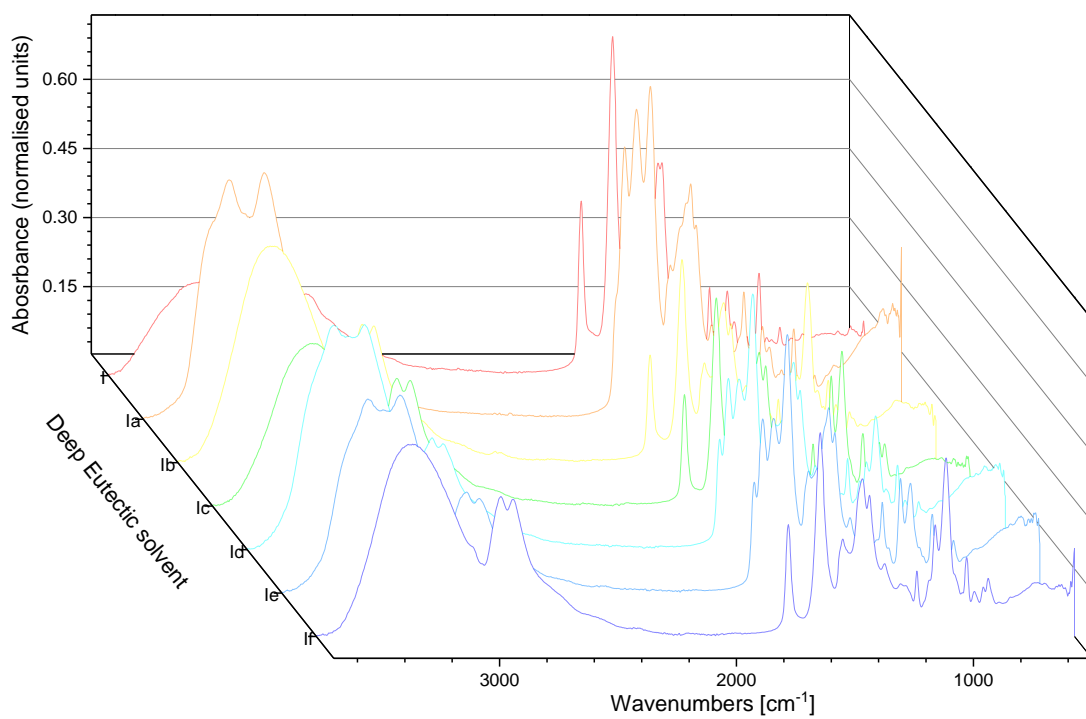


Figure S4. FT-IR Spectra of choline levulinate based DESs

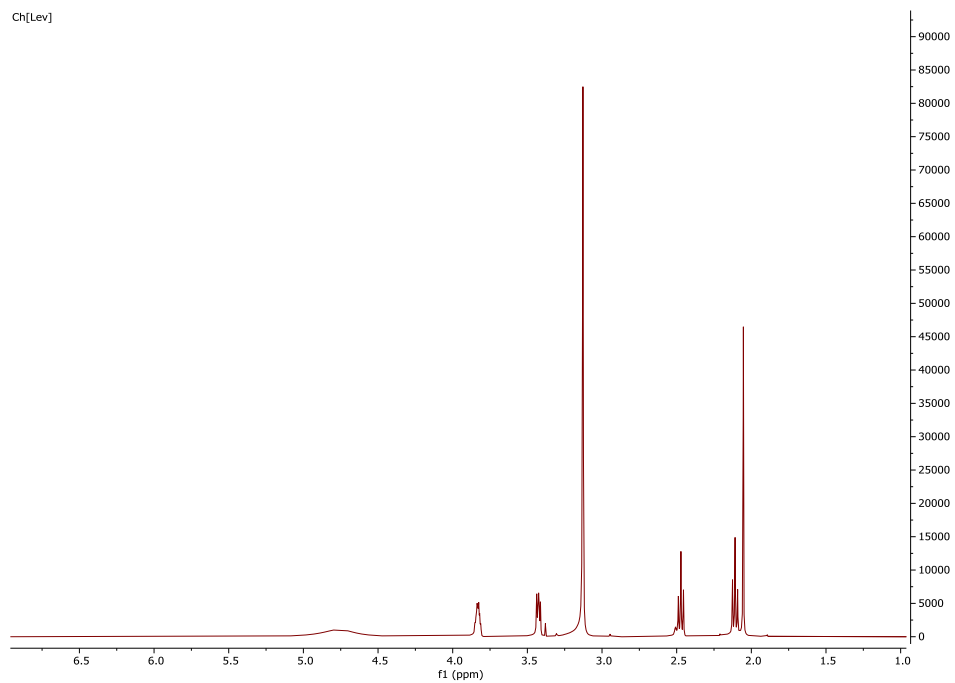


Figure S5 ^1H NMR spectrum of choline levulinate

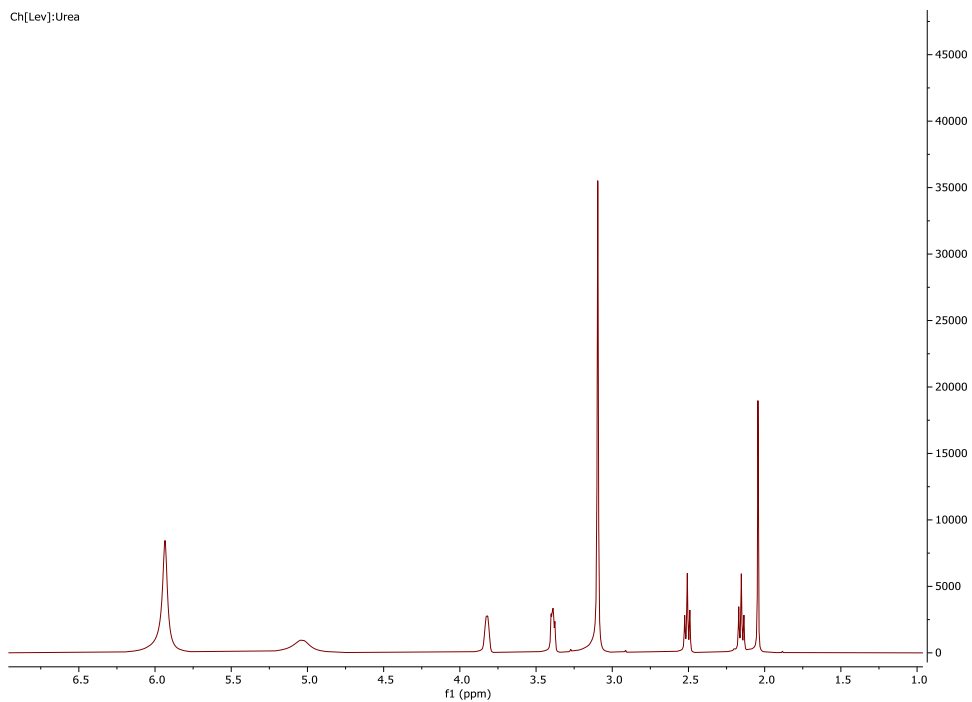


Figure S6 ^1H NMR spectrum of DES - choline levulinate:urea

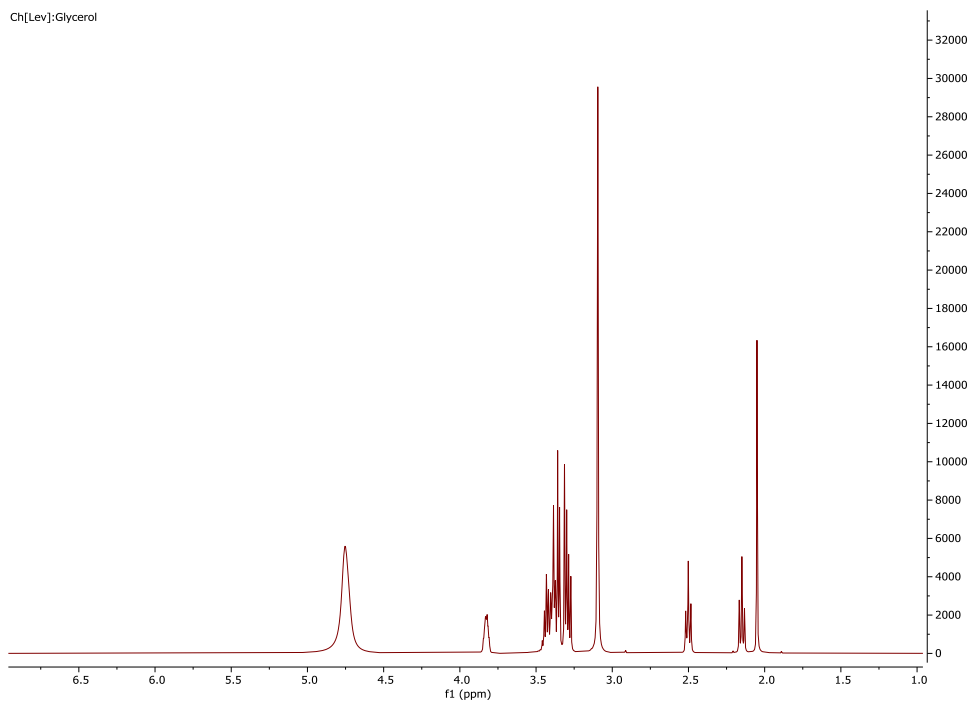


Figure S7 ^1H NMR spectrum of DES - choline levulinate:glycerol

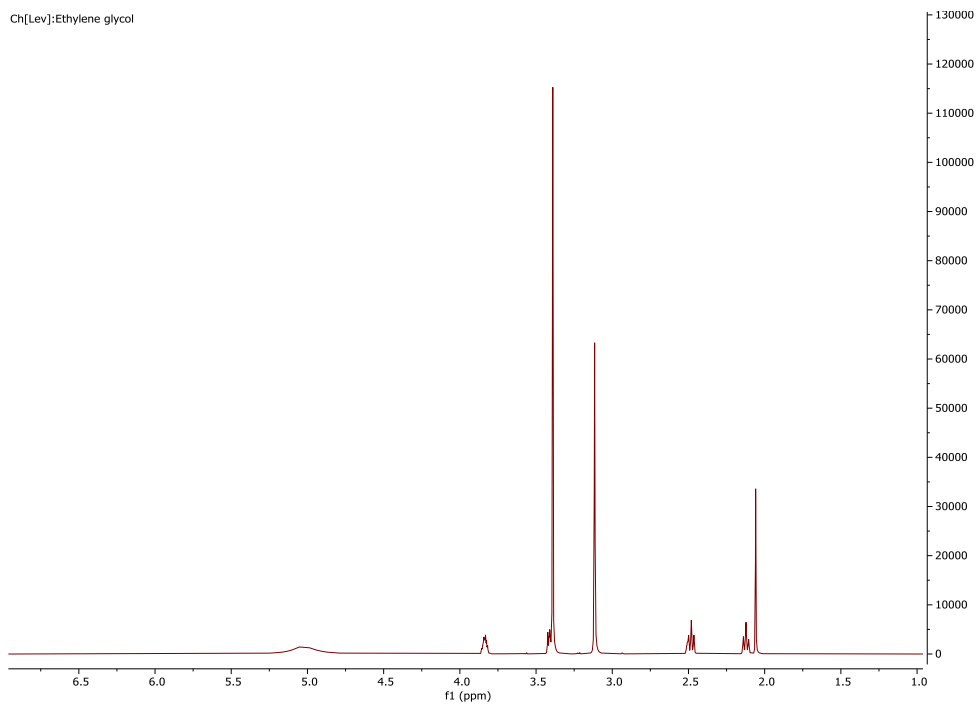


Figure S8 ^1H NMR spectrum of DES - choline levulinate:ethylene glycol

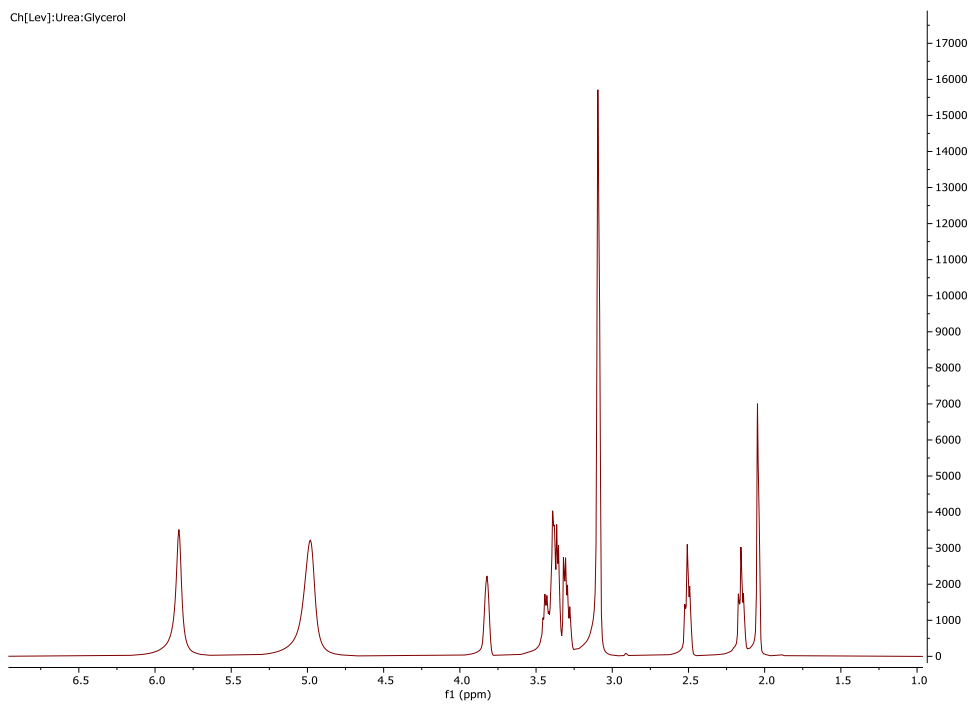


Figure S9 ^1H NMR spectrum of DES - choline levulinate:urea:glycerol

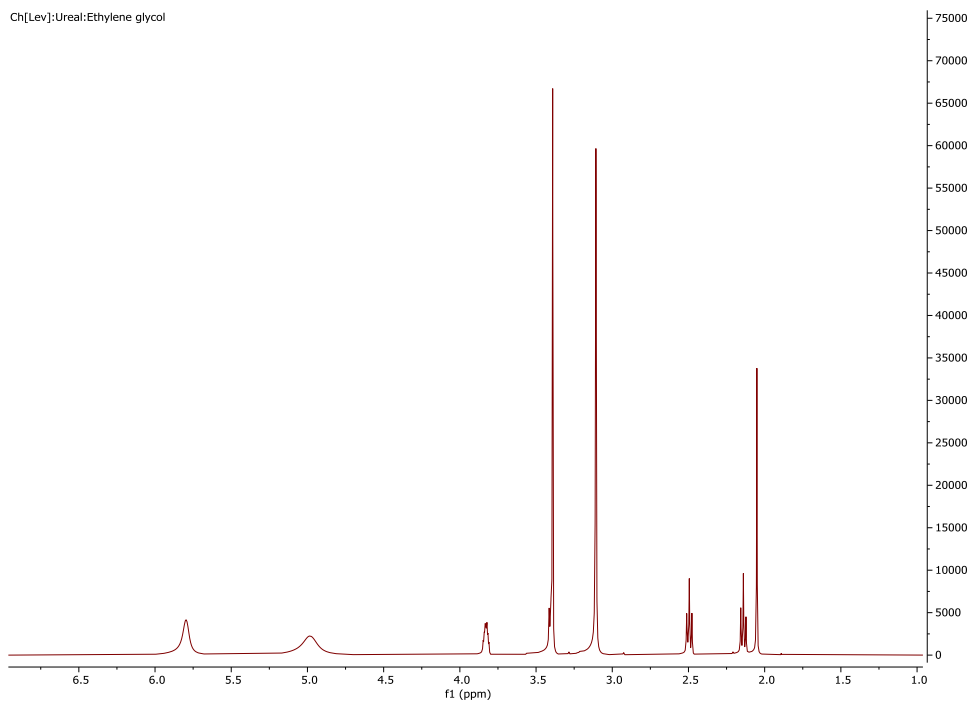


Figure S10 ^1H NMR spectrum of DES - choline levulinate:urea:ethylene glycol

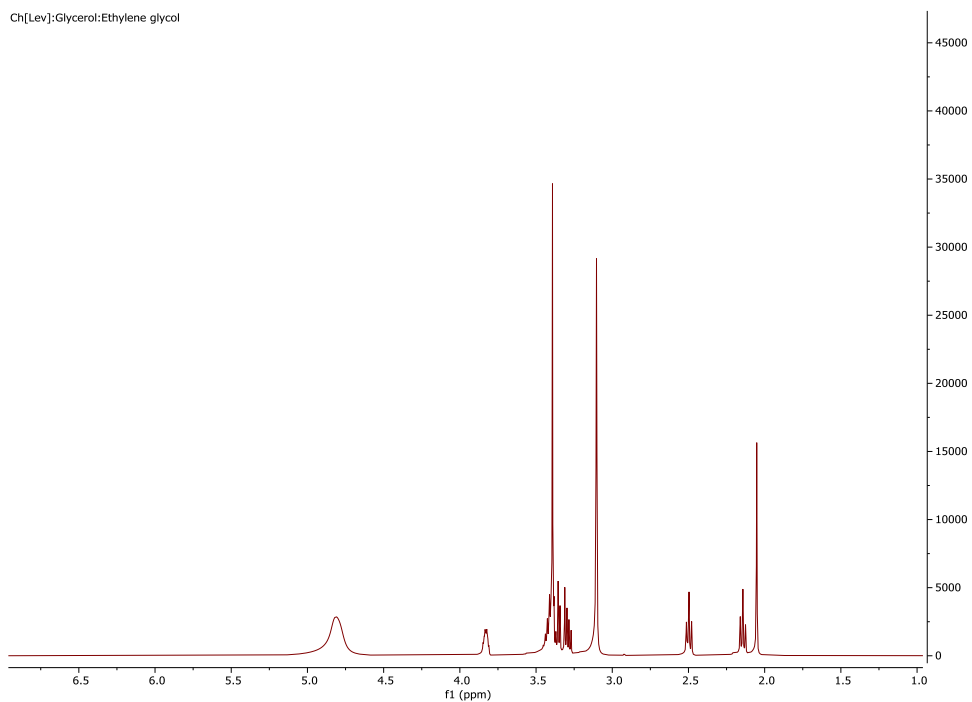


Figure S11 ^1H NMR spectrum of DES - choline levulinate:glycerol:ethylene glycol

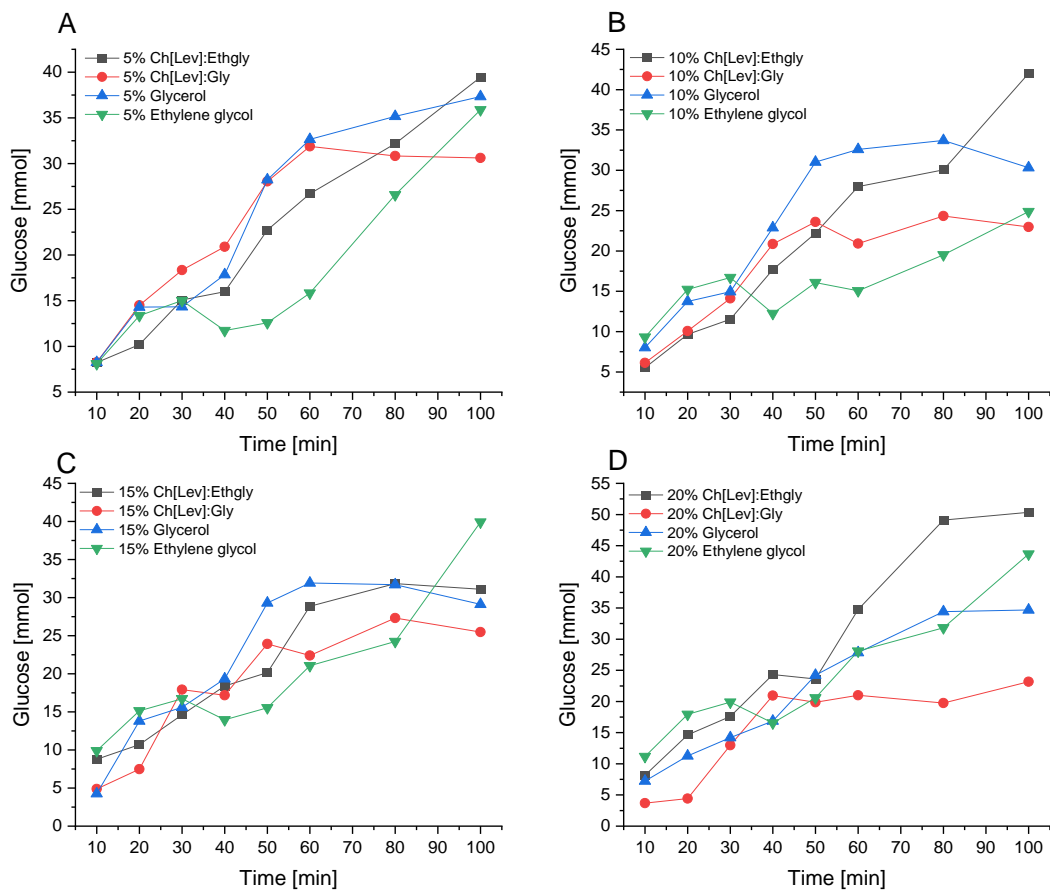


Figure S12 Reaction kinetics for choline levulinate based DES with ethylene glycol and glycerol and liquid HBD compounds at various concentrations [A – 5%; B – 10%; C – 15%, D – 20%]

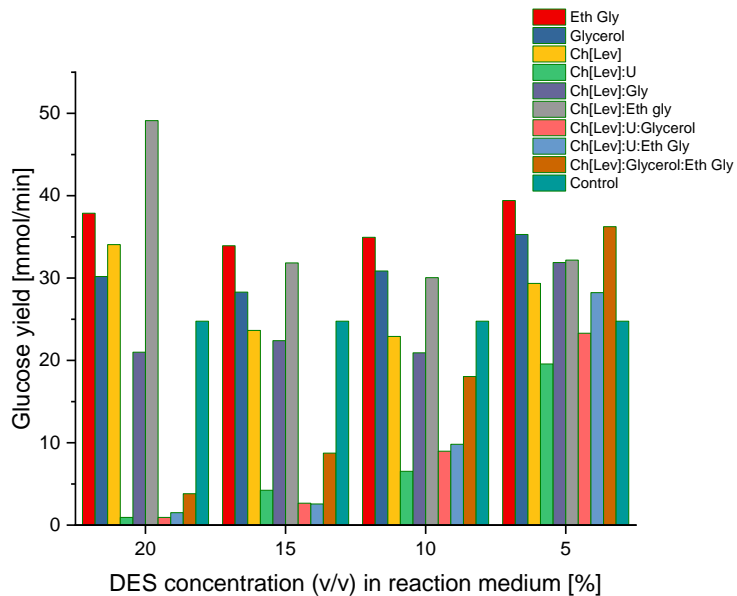


Figure S13 Hydrolysis of lactose – yield of glucose in choline levulinate based DES after one hour of incubation; starting concentration of lactose – 80mM



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties

Jakub Hoppe^{a,b}, Ewa Byzia^b, Radosław Drozd^c, Magdalena Szymańska^c, Patryk Bielecki^b, Marcin Smiglak^{b,s}

^a Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89b, 61-614 Poznań, Poland

^b Poznań Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, Rubież 46, 61-612 Poznań, Poland

^c West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Department of Microbiology and Biotechnology, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Lipase
Low transition temperature mixtures
Ionic liquids
Transesterification activity
Hydrolytic activity thermal stability

ABSTRACT

A new series of low transition temperature mixtures (LTTM) based on choline lactate quaternary ammonium salt and various hydrogen bond donors was prepared and characterized towards their physicochemical properties and usability as an enzymatic reaction mixture for lipase-catalyzed transesterification reactions. Studies of low transition temperature mixtures have shown a long-term stabilizing effect for lipase as well as a positive influence on lipase thermal stability. In the case of Ch[Lac]:Gly: EthGly increasing the stability of lipase by 8 °C (up to 55.2 °C) compared to the control sample. Conducted transesterification reactions were characterized by high yields – up to 98% – and high purity of the obtained products.

1. Introduction

Biocatalysis is considered to be a green and sustainable alternative technology falling within the principles of green chemistry [1]. In biocatalytic transformations, the application of a suitable solvent is crucial to obtaining satisfactory efficiency of conducted processes. In the recent years high emphasis was also placed on replacing toxic and volatile organic solvents with more eco-friendly ionic liquids [2]. Last decades, many efforts have been undertaken to use ionic liquids as a suitable medium for biocatalytic reactions [1–3]. However, even though ionic liquids are considered green solvents and an excellent environment to conduct nonaqueous biocatalytic reactions, they are still expensive and, in most cases, eco-toxic. Alternative to ionic liquids (IL) are deep eutectic solvents (DES) and low temperature transition mixtures (LTTM) which are often regarded as a kind of ionic liquids, although their physicochemical properties significantly differ from IL [4]. Having in mind the possibility to overcome the downsides of ionic liquids, a new class of solvents known as deep eutectic solvents (DES) and low-temperature transition mixtures (LTTM) emerged as an alternative medium for biocatalysis [5]. Those solvents are more interesting than ionic liquids, because of the hydrogen bonding ability of their

constituents which plays a vital role in the enhancement of enzyme activity and stability [6,7]. Both DES and LTTMs share comparable properties of ionic liquids, yet they possess advantageous qualities such as wide liquid range, water compatibility, low vapor pressure, non-flammability, biocompatibility, and biodegradability. Moreover, both of those solvent groups (DES and LTTMs) consist of at least one hydrogen bond donor (HBD) and one hydrogen bond acceptor (HBA) counterpart that not only results in the formation of a liquid mixture, but also interact with the enzyme surface. Since LTTM mixtures do not exhibit such a significant drop in melting temperature of their constituents, they are especially interesting in the case of biocatalysis, because of weaker interactions of hydrogen bond network with enzyme surface. In contrast to typical DES based on choline chloride and urea or glycerol used as HBD, LTTM mixtures exhibit a significantly weaker hydrogen bond network compare to their constituents [8]. Also, there are many nano structural differences of the formed solvents which comes from different anion counterpart in HBA [8,9]. This approach enables a more projectable behavior of the solvent towards the enzyme surface and may lead to a better understanding of the phenomenon of amplified activity or stability of the enzyme in a new environment. Nowadays, one of the most important enzymes in the industry are lipases which have the

Abbreviations: LTTM, Low-Transition Temperature Mixtures; DES, Deep Eutectic Solvents; CALB, Candida Antarctica Lipase B.

* Corresponding author.

E-mail addresses: radoslaw.drozd@zut.edu.pl (R. Drozd), Marcin.Smiglak@ppmt.poznan.pl (M. Smiglak).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>

Received 22 August 2021; Received in revised form 19 April 2022; Accepted 21 April 2022

Available online 27 April 2022

0927-7765/© 2022 Published by Elsevier B.V.

ability to conduct esterification, transesterification, and hydrolysis reactions [10]. Apart from their obvious ability to degrade ester bonds, attention is paid to the usefulness of lipases in the synthesis of biodiesel, various biosurfactants, and biodegradable polyesters [11–15]. Gorke et al., were one of the first who applied the deep eutectic solvents based on choline chloride as a solvent for esterification reaction catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* (CALB) [16]. Obtained results revealed that choline DES composed of choline chloride and ethylene glycol allow to obtain a product yield of 80% which is higher than previously obtained in heptane. Guajardo et al. conducted esterification of benzoic acid and glycerol using immobilized on acrylic resin lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435) in choline chloride:glycerol: water mixture – obtaining α -monobenzoate glycerol with conversion rate at 99%. [17,18]. Lozano et al. used Novozym 435 preparation in DES to conduct esterification of panthenol with free fatty acids, having in up to 83% conversion yield and 98% selectivity proving [18]. However, lipase-catalyzed hydrolysis reactions in DESs have rarely been reported in the literature. Kim et al. systematically evaluated the influence of thirteen types of DESs on the activity and stability of lipase by studying the *Candida rugosa* lipase (CRL), catalyzed hydrolysis of paranitrophenyl palmitate as a model reaction. Obtained results, show, that the structure of the HBA and HBDs and DES concentration is crucial for the stability and activity of lipase. Also, it has been established that DES containing glycerol are superior compared to DESs with amides for promoting lipase activity [19]. In the field of transesterification reactions with lipase, Durand et al. showed that DES containing glycerol or urea are superior in case of obtaining high activities and selectivity of lipase catalyzed reactions [20]. Durand et al., also conducted transesterification of methyl p-coumarate and methyl ferulate with octanol using Novozym 435 in choline chloride: urea (with 10% water content w/w) as reaction media, obtaining phenolipids with high level of substrate conversions [21]. A similar reaction was conducted by Shi et al. where the same immobilized lipase B preparation was used to catalyze the alcoholysis of methyl ferulate with fatty alcohols, to afford ferulic acid alkyl esters with significant yields (78–90%) in a ternary DES (Ch [Cl]:urea: glycerol, 1:1:1) containing 10% (w/w) of water [22]. Furthermore, choline chloride:urea DES containing 10% (v/v) water was found to be a superior medium for the Novozym 435-catalyzed synthesis of 1-caffeoylglycerol under continuous microflow conditions, delivering a total yield of 96.5% [23]. Also according to the literature and our previous study Hoppe et al., it is noticeable that the anion structure as well as the concentration of DES towards water also plays significant role in the enhancement phenomenon [24,25]. The small amount of DES or LTTM mixture doped to the reaction medium can significantly enhance the enzyme stability and hydrolytic activity. According to the recent work of Toled et al. this might be an outcome of the amount of hydroxyl groups of DES constituents [25]. The lipase catalyzed reactions are being conducted usually in typical DES environments that consist of choline chloride or choline acetate HBA compound [20]. Due to that, understanding the factors that govern lipase behavior in solvents, where the hydroxyl group is also present in HBA is crucial. Even though the activity enhancement lies within similar chemical compounds used to obtain a DES or LTTM, there is yet impossible to predict the best mixture to a selected enzyme. This is especially interesting from the chemical point of view as it might lead towards the possibility of mimicking nature fluids more precisely [25]. Presented study aimed to analyze the influence of a new kinds of low transition temperature mixtures based on choline lactate, on the catalytic properties of lipase from *Candida antarctica*.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Choline bicarbonate (80% in H₂O), Lactic acid (99%), Urea (99%), Glycerol (99%), Ethylene glycol (99%) Propyl propionate (99%) Pentyl

propionate (99%) 1-pentanol (99%) anhydrous Methanol (99.8%) and lipase from *Candida antarctica* (CALB, Sigma-Aldrich, ≥ 2600 U/g), were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA). All chemicals were used without further purification.

2.2. Choline lactate synthesis

Lactic acid (0.12 mol) was added dropwise to a solution of choline bicarbonate (0.12 mol) in water (50 ml). The reaction was carried out in a round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar at 40 °C over a 24 h period. After completion of the reaction, the mixture was evaporated under reduced pressure at room temperature to avoid thermal decomposition of formed salt, to furnish pure product, 99% yield.

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ (ppm) = 1.54 (d, 3 H, -CH₃), 3.16 (s, 9 H, (CH₃)₃N-), 3.62 (t, 2 H, -CH₂N(CH₃)₃), J = 4.8 Hz), 3.72 (s, 1 H, -OH), 4.53 (t, 1 H, -CH(CH₃)(OH)) and 6.84 (s, 1 H, -OH).

2.3. ¹H NMR analysis of choline lactate

¹H NMR spectra of prepared choline lactate were performed on a Bruker Avance 400 spectrometer (400 MHz) using d₆-DMSO. Proton chemical shifts are shown in parts per million (δ ppm).

2.4. Preparation of choline lactate base LTTM

All solvents were prepared by mixing choline lactate (0.1 mol) and suitable HBD at specific molar ratios (respectively 0.1 and 0.2 mol) with continuous stirring at 60 °C. Obtaining a homogeneous mixture determined the readiness of the LTTM. The substrates before mixing were dried (HBD and choline lactate) separately to remove water. The prepared LTTM were finally again dried and stored in a glass container at room temperature in darkness. Prior to analysis water content of LTTM samples was determined using Karl-Fischer titration Metrohm 915 KF Ti-Touch instrument. Molar ratios, abbreviations, appearances, and water content of all prepared LTTMs are presented in Table 1.

2.5. Density and viscosity assay of choline lactate LTTM

The densities and viscosities of LTTMs have measured with the laboratory scale Radwag AS 510.3Y and TA Instruments AR2000EX rheometer at atmospheric pressure. The temperature accuracy was controlled at ± 0.1 °C. The precision of the density values ± 0.001 g·cm⁻³. Before the measurements, the density apparatus was calibrated with distilled water and dry air. The uncertainties of the viscometer were estimated to be $\pm 2\%$. In each measurement, water contamination was below 1.5%wt. However, as this value could influence the measured property, it was not possible, even after extended drying periods and using various drying techniques, to decrease the water content in prepared samples to below 1.13%.

2.6. Conductivity assay of choline lactate LTTM solutions

Conductivity analyses were performed by CPC-411 Elmetron conductivity meter. The LTTMs were enclosed in a sealed chamber with a meter probe, and the temperature was controlled by a thermostatic water bath. Each of the measurements was performed three times.

2.7. Choline lactate LTTM differential scanning calorimetry analysis

Differential Scanning Calorimetry (DSC) measurements were performed using the Mettler Toledo DSC 1 STARe System differential scanning calorimeter, coupled with a Huber TC100 immersion cooler. The assay was conducted at atmospheric pressure, with nitrogen as a purge gas, and an empty sample pan as the reference. Masses of samples were between 6 and 12 mg. Samples were scanned in three cycles. First heating cycle from -25 – 125 °C. At a maximum temperature of 125 °C,

samples were held for 10 min isotherm. Next, samples were cooled from 125 °C to – 80 °C, held isothermal for 10 min at – 80 °C and again, in the third heating cycle, heated from – 80–125 °C. Each cycle (heating or cooling) was at the rate of 10 °C/min.

2.8. Thermogravimetric analysis (TGA) of choline lactate LTTM

Thermal stabilities of the LTTMs were determined by thermogravimetric analysis using a TA Instrument TGA Q50 thermogravimetric analyzer, precise to within 0.1 °C in temperature and to within 0.01% in weight. All the TGA experiments were measured in the dynamic heating regime and performed under a nitrogen atmosphere. A dynamic mode with a temperature range from 25 °C to 500 °C with a heating pace rate of 3.5 °C/min. was used to determine the onset decomposition temperatures. Since LTTMs are very hygroscopic, prior to measurement, all samples were held for 10 min isotherm at 85 °C under nitrogen atmosphere, to remove any remaining water. Decomposition temperatures reported for all LTTMs were established as the onset temperature for decomposition of the first 5% of the sample ($T_{9\%onset}$), and as the regular onset temperature for decomposition (T_{onset}) for the entire sample or each of the consecutive steps in multistep decomposition.

2.9. Analysis of choline lactate LTTM on influence on CALB hydrolytic activity

The substrate solution for lipase hydrolytic activity in presence of LTTMs was prepared by adding a 10 μ l of *p*-nitrophenylbutyrate (pNPB) stock solution (16.6 mM) to 3.3 ml of isopropanol and then the mixture was mixed with 30 ml of 50 mM phosphate buffer pH 7.2 containing 0.01% of Triton X-100 and appropriate amount of LTTMs. To start the assay the working substrate solution was transferred to microplate wells and equilibrated to the appropriate temperature (30 °C) over 5 min. Next 10 μ l of lipase solution in PBS (50 mM, pH7.2) was added and change in absorbance at 348 nm was monitored in kinetic mode with 1 min's intervals over 15 min [26]. All assays were conducted at least in triplicate. One unit of lipase activity was defined as the amount of lipase required to release 1 μ mol of *p*-nitrophenol per minute, under assay conditions.

2.10. Analysis of influence the choline lactate LTTM on thermal stability of CALB

Thermal influence of LTTM on the thermal stability of CALB was performed by the nano-format differential scanning fluorimetry (DSF) method with the use of Prometheus NT.48 device (NanoTemper Technologies). In this method, the temperature-dependent protein unfolding profile is measured by measuring the change in tryptophan fluorescence at emission wavelengths of 330 and 350 nm. Prior analysis, 10 μ l of the CALB solution in phosphate buffer (50 mM, pH7.2) was transferred to 200 μ l LTTM and mixed vigorously. Then, 10 μ l of the enzyme-DES mixture was loaded to sample handling capillary. Next, ready samples were moved immediately into Prometheus NT.48 device. The temperature increase ramp was set at 2.0 °C/min in a range from 20 °C to 85 °C.

The influence of extended incubation of CALB in DES depending on temperature on its hydrolytic activity was analyzed as follows; The 10 μ l of the CALB solution in phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) was transferred to 200 μ l LTTM and mixed vigorously then incubated at certain temperatures. The changes in activity were monitored periodically for 24 h according to the CALB hydrolytic activity assay protocol. The activity changes were expressed in % where the activity of CALB in phosphate buffer (control) was assumed as 100%.

2.11. Analysis of choline lactate LTTM influence on CALB transesterification activity

The transesterification reaction with CALB was conducted in

prepared LTTMs (5 ml) with the addition of substrates – propyl propanoate (1 mM) and 1-pentanol (1 mM) Fig. 1.

Prepared solvents were set at 30 °C and after stabilization of temperature. To start the reaction, 200 μ l of enzyme solution was added. Reaction was conducted for 24 h in sealed flasks with continuous stirring. After incubation time, 100 μ l of each reaction mixture was transferred to a vial containing 1 ml of anhydrous methanol to lipase deactivation and products extraction. GC analysis of extracted reaction mixture compounds was performed using a Bruker 436-GC chromatograph equipped with a BR-VOC capillary GC column (L \times I.D. 20 m \times 0.18 mm, df 1 μ m). The initial temperature of separation was 80 °C (3 min) and increased with the rate of 20 °C/min up to 160 °C and was maintained for the next 8.5 min. The total analysis time was 16 min with helium as carrier gas at a constants flow rate of 0.8 ml/min. The efficiency of lipase catalysed transesterification was calculated according to changes in concentration of the 1-pentanol.

2.12. Software

All spectra have been processed using Origin Graph Pro 2020.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties of choline lactate LTTM

The stability and effectiveness of lipases for application in industry is the most important factor that determines their usefulness [27]. To overcome this, it is crucial to possess a dedicated solvent/reaction medium which can ensure that both of those factors are kept at the desired level. To answer these needs, a group of new low transition temperature mixtures solvents based on choline lactate was prepared. Obtained mixtures were divided into two subsets. The first subset was low transition temperature mixtures consisting of choline lactate and one hydrogen bond donor. The second subset – LTTMs consisted of choline lactate and two hydrogen bond donors (Table 1). During the mixture preparation process, close attention was paid to the necessity to eliminate water, as this is the main impurity of the LTTMs, to allow accurate measurements of physicochemical properties. All physicochemical assays were conducted after establishing water content below the level of 2%.

3.1.1. Density and viscosity assay of lactate LTTM

3.1.1.1. Density of choline lactate LTTM. It is well known that density is important physical property of a liquid, due to its effect on design and operation processes. Table 1 presents the densities measured in the 25 °C temperature. Obtained results, shows that all examined mixtures, presents densities higher than water. Among the mixtures composed of two moieties, the highest density is being observed for the mixture containing urea (Ia) and for three moieties for the mixture containing urea and glycerol (Id). It is also worth to notice that the except mixture Ia, the densities of all mixtures exhibit density lower that density of pure choline lactate, which could indicate, that in this case, the density value is not additive.

3.1.1.2. Viscosity of choline lactate eutectic solvents. Similar to density, the viscosity of solvents is a prominent issue that needs to be addressed, especially when considering solvent for an enzymatic reaction medium. Since the viscosity depends on density, thus the ability of liquid particles to slide past each other, relies on the electrostatic forces. However, in case of low transition temperature mixtures, based on ionic liquid and hydrogen bond donors, it is necessary to also consider the presence of hydrogen bond network in the mixture. Hence, the mixture with high density, requires energy to disrupt not only electrostatic forces but also hydrogen bond network between particles of ionic liquid and HBD.

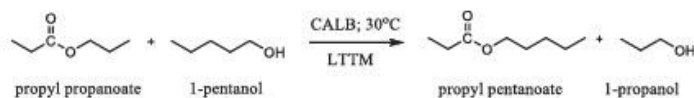


Fig. 1. Schema of catalyzed by CALB, transesterification reaction of propyl propanoate with 1-pentanol.

Table 1
Developed LTTM solvents based on choline lactate.

HBA	HBD	Eutectic Solvent Code	HBA:HBD [mol:mol]	Name (abbreviation)	Appearance	Water content [%]
		Ia	1:2	Ch[Lac]:U ^a	TL ^d	1.24
		Ib	1:2	Ch[Lac]:Gly ^b	TL	1.33
		Ic	1:2	Ch[Lac]:EthGly ^c	TL	1.76
		Id	1:1:1	Ch[Lac]:U:Gly	TL	1.68
		Ie	1:1:1	Ch[Lac]:U:EthGly	TL	1.73
		If	1:1:1	Ch[Lac]:Gly:EthGly	TL	1.71

a - Urea; b - Glycerol; c - Ethylene glycol; d - TL - Transparent liquid;
HBA- hydrogen bond acceptor, HBD-hydrogen bond donor

Having in mind that there are no major differences in values of densities of examined mixtures, it can be concluded that significant differences in viscosity comes mostly from the presence of hydrogen bond network and its size. According to Stefanovic et al. the amount of hydrogen bonds depends strictly on HBD, and urea can donate four hydrogen bonds where ethylene glycol only two. Moreover Mjalli et al. showed that presence of second HBD compound in mixture may break the primary hydrogen bond network, which could explain the lower viscosity of mixtures composed of three moieties [28]. Obtained results revealed, that solvents Ia Ch[Lac]:U and Ib Ch[Lac]:Gly exhibited the highest viscosity in studied group, and on contrary - solvents Ie Ch[Lac]:U:EthGly and If Ch[Lac]:Gly:EthGly (with two HBD) had a lower viscosity, than mixtures with one HBD. This theory is also confirmed when glycerol and urea together are being used as an HBD. As can be seen on Fig. S1 solvent Id Ch[Lac]:U:Gly also exhibit high viscosity - which is, according to this theory, due to robust hydrogen bond network. This is no surprise, because as stated above, urea can donate four hydrogen bonds and glycerol can donate three. In this case the possibility of hydrogen bonding is quite high, yet at the same time, the presence of two different HBD compounds disrupts the primary hydrogen bond network. This is also being explained with the viscosity data of Ic Ch[Lac]:EthGly. The ethylene glycol is able to donate only two hydrogens thus the mixtures Ie Ch[Lac]:U:EthGly and If Ch[Lac]:Gly:EthGly possess the lowest viscosity in studied mixtures.

3.1.2. Conductivity of choline lactate based LTTM

It is known that viscosity, which relates to the degree of fluidity of a liquid, has direct influence on the conductivity. The more viscous the

liquid, the less the motion of the ionic species - thus the lower conductivity of the fluid [29]. In the structure of the polyols, it could be expected that hydrogen bond networks in Ch[Lac]:EthGly and Ch[Lac]:Gly:EthGly should be similar enough to each other, and the conductivity should not be significantly different. However, HBD self-interactions can change the structure of hydrogen bond network and as such, according to Hayes, et al., different structures between ionic liquid and different HBD may lead to different behavior of fluid, for instance manifests itself with higher conductivity [30]. Thus there's a possibility that there is direct correlation between strength and nature of the hydrogen bond network in the bulk liquid and its physical properties, in this case conductivity. Despite the similarity in the structure between the glycerol and ethylene glycol, a similar effect was not observed. The results presented (Table S2) indicate that a simple change (by mixing it with the appropriate HBD compound) may be useful to achieve the desired conductivity (increased or decreased) of the pure ionic liquid.

3.1.3. Thermal stability assay of choline lactate based LTTM

3.1.3.1. Thermogravimetric analysis of choline lactate based LTTM. To perform a reaction in any liquid, it is important to characterize the thermal stability of it. This knowledge is of immense importance, especially in case of reactions where additional heating might be needed. Fig.S2A presents TGA slopes for mixtures composed of two components - choline lactate and one HBD - mixtures Ia Ch[Lac]:U, Ib Ch[Lac]:Gly and Ic Ch[Lac]:EthGly and pure ionic liquid Ch[Lac]. Except mixture Ia and Ib where single slopes can be observed all other mixtures exhibit two decomposition steps. For mixture Ic Ch[Lac]:

EthGly first decomposition step comes from evaporating ethylene glycol at 117.26 °C and second step, which starts at 212.72 °C comes from decomposition of Ch[Lac]. This is not surprised as for pure Ch[Lac] T_{onset} is 212.54 °C. For the sample Ia Ch[Lac]:U the decomposition curve shows only one step which begins at 195.98 °C. According to Bernhard et al. the decomposition of Urea proceeds with two steps – decomposition of urea into cyanic acid, ammeline and biuret and decomposition of biuret. In this case however, it is not observable because of overlapping step of Ch[Lac] decomposition within the same temperature range as decomposition of urea. Interesting however is the fact, that the addition of urea lowers the thermal stability of the mixture. In case of mixture Ib Ch[Lac]:Gly it can be noticed that there is also one decomposition step which starts at 211.88 °C, where evaporation and decomposition of glycerol overlaps with the decomposition of Ch[Lac]. It is worth to notice that this is in contrary to our previous work, where presence of urea was increasing and presence of glycerol was decreasing the thermal stability of the eutectic solvent [31].

Fig.S2B presents TGA curves for the mixtures composed of three moieties – quaternary ammonium salt and two different HBD. As it can be seen, in all cases the decomposition temperatures shift to lower values compared to the decomposition temperatures of two compound mixtures. For mixture Id Ch[Lac]:U:Gly the decomposition curve presents two slopes, with two onset temperatures, first at 178.70 °C which comes from evaporating and decomposition of glycerol and second at 204.20 °C responsible for decomposition of Ch[Lac]. Similar situation occurs with mixture Ie Ch[Lac]:U:EthGly and If Ch[Lac]:Gly:EthGly where decomposition of mixture begins with evaporation and decomposition of ethylene glycol HBD, at 121.06 °C and at 103.34 °C respectively, which in second step overlaps with decomposition of Ch[Lac] at 209.49 °C for Ie Ch[Lac]:U:EthGly and 221.24 °C for If Ch[Lac]:Gly:EthGly. Comparing obtained results, it should be noted, that all the mixtures express similar decomposition temperatures, which are always lower than the decomposition temperature of pure quaternary ammonium salt and that the two moieties mixture exhibit higher thermal stability than three moieties' mixtures.

3.1.3.2. Differential scanning calorimetry assay of choline lactate based LTTM. DSC analyzed all mixtures to determine the presence of phase transitions. Acquired results were analyzed in the studied temperature range in comparison to all other mixtures as well as to the pure choline lactate itself. Presented plots of Fig.S3 show, that the only phase transition which occurs in studied mixtures is the glass transition step, which occurs in all mixtures except Ie Ch[Lac]:EthGly and If Ch[Lac]:Gly:EthGly. The lowest glass transition temperature was noted at – 73.04 °C for the mixture Ie Ch[Lac]:U:EthGly which is slightly lower than pure ionic liquid (Ch[Lac]) glass transition step – recorded at – 69.83 °C. In the case of mixtures Ia Ch[Lac]:U and Ib Ch[Lac]:Gly, the glass transition step also appears in a similar temperature range at – 51.55 °C and – 52.93 °C. For the Id Ch[Lac]:U:Gly the glass transition step occurs at – 66.62 °C. For samples If Ch[Lac]:Gly:EthGly and Ie Ch[Lac]:EthGly no phase transition was recorded within studied temperature range. Taking into consideration all obtained results, it can be concluded that mixture containing two HBD shows lower temperature glass transition step than systems composed of ionic liquid and one HBD [5].

3.1.4. Thermal stability of lipase in of choline lactate based LTTMs

Fig.S4A presents plots of thermal stability of lipase in researched mixtures and pure Ch[Lac] within studied temperature range. Acquired results shows (Table 2) that all LTTMs containing urea, shifts the enzyme unfolding temperature, to the lower values compared to the control sample containing only water and PBS as well as the pure ionic liquid which begins to denature the enzyme at 31.7 °C. In case of systems containing urea, the most destabilizing solvent is Ie Ch[Lac]:U:EthGly where denaturation begins at 30.7 °C. Likewise situation occurs for

Table 2

Thermal stability profile of CALB in of choline lactate based LTTMs.

Sample	HR ^a [°C/min]	T_{onset} [°C]	Inflection point temp [°C]
I Ch[Lac]	2.0	31.7 °C ± 0.4	34.7 °C
Ia Ch[Lac]:U	2.0	31.9 °C ± 0.2	51.5 °C
Ib Ch[Lac]:Gly	2.0	48.7 °C ± 0.2	59.8 °C
Ic Ch[Lac]:EthGly	2.0	51.8 °C ± 0.2	78.2 °C
Id Ch[Lac]:U:Gly	2.0	38.7 °C ± 0.3	58.0 °C
Ie Ch[Lac]:U:EthGly	2.0	30.7 °C ± 0.1	45.8 °C
If Ch[Lac]:Gly:EthGly	2.0	55.2 °C ± 0.2	66.2 °C
C Control ^b	2.0	47.1 °C ± 0.2	61.2 °C

^a HR – heating rate

^b As control was taken enzyme solution in phosphate buffer pH 7.0.

solvents Ia Ch[Lac]:U and Id Ch[Lac]:U:Gly at 31.9 °C and 38.7 °C, respectively. It is worth to notice, that in case of mixture Id Ch[Lac]:U:Gly, even though the glycerol presence, which is known as a stabilizing agent for protein structure [32], the environment is still not suitable enough and the enzyme is unable to withstands the increase of temperature as in the case with a control sample. For samples containing polyols – glycerol and ethylene glycol (together or apart) the unfolding temperature is being shifted towards higher temperatures compared to control sample. However, despite the stabilizing properties of glycerol and unfolding temperature 48.7 °C for sample Ib Ch[Lac]:Gly the most beneficial effect can be observed for sample containing as a HBD glycerol and ethylene glycol together Ie Ch[Lac]:Gly:EthGly – with the onset temperature at 55.2 °C. Also, mixture Ic Ch[Lac]:EthGly exhibit more beneficial effect on lipase stability than sample with glycerol only – with onset temperature at 51.8 °C. Obtaining high yields for many reactions require time.

To perform time-demanding reactions or to perform reaction in continuous flow, it is essential, to know the long-term stability of catalyst. To gain such data, long term stability assay of lipase in selected solvents was conducted. According to acquired results (Table.5;Fig.S4), the most desirable temperature for reaction in studied solvents is 30 °C, where, no denaturation occurs for any of selected solvents except Ie Ch[Lac]:U:EthGly, where denaturation begins slightly above this temperature. Presented results on Fig.5 exhibit that, solvents Ib Ch[Lac]:Gly, Ie Ch[Lac]:U:EthGly, If Ch[Lac]:Gly:EthGly have beneficial influence on enzyme stability, which corresponds with results from thermal stability experiment (previous section). However, in the case of Ib Ch[Lac]:Gly the beneficial effect, is being observed after 24 h period. According to the literature, this is an outcome of the enzyme structure adaptation (especially intermolecular H-bonds between solvent and enzyme surface) to the hydrogen bonding network in a new environment [33,34]. Presented long-term stability studies using [Ch] [Lac] based LTTM mixtures, showed also that it takes time for the lipase to adapt to the medium regardless of the LTTM mixture used. Moreover, its hydrolytic activities change with the exposure time. These results confirm the need for an equilibration period to stabilize the conformational structure of the lipase. Similar trends were obtained for all the LTTMs studied (Fig. 2). This phenomenon can be attributed to the presence of the cholinium cation with a hydroxylated ion and the HBD compounds that mimics the hydrogen bonding functionality of water molecules and helps the enzyme return to its flexible, active conformation [35]. Xue et. al evaluated the effect of ionic liquids on the activity of lipase from *Candida rugosa* and demonstrated that the oxygen atoms of the cholinium cation and the acetate anion can form hydrogen bonds with water molecules around the lipase, increasing the

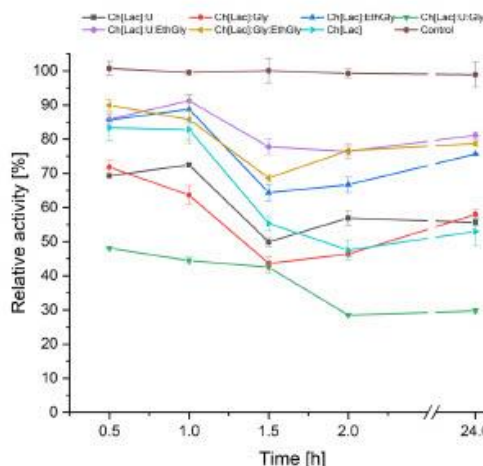


Fig. 2. Time dependent stability of CALB in LTTM mixtures. CALB was incubated at 30 °C and residual activity was measured at several time intervals.

nucleophilicity of the water and, consequently, increases the catalytic efficiency of the enzyme [36]. Furthermore, the authors also evaluated the individual activating effect of each ion, concluding that the cation has a stronger activation effect than the anion. Those results exhibit, that the stability of proteins in LTTMs is a result of a careful balance between the competitive interactions among the water, HBD compounds, the protein surface, and the ions of the ionic liquids and the ion's surface charge [37].

3.1.5. Influence of choline lactate based LTTMs on hydrolytic activity of lipase

Lipase is hydrolase, enzyme to catalyze a chemical bond with water as co-substrate. Having that in mind as well as taking into account our previous work [38] it was essential, to test hydrolytic activity of lipase in environment doped with LTTM. In case of β -galactosidase enzyme, the doping of a small amount of LTTM was crucial to amplify the hydrolytic activity of an enzyme. However, the acquired data presented in Fig. S5 shows that in case of lipase, there is no beneficial effect. In case of all reaction medium doped with 5% and 10% of LTTM, obtained results are not satisfactory, and despite the used amount of doping, the enzymatic activity is lower than in the control sample. Interesting is the fact, that the lowest activity can be addressed to the samples containing polyols only Ib Ch[Lac]:Gly and Ic Ch[Lac]:EthGly. In case of mixture composed of two moieties - 73% and 62% of relative activity at doping amount of 10% for Ib Ch[Lac]:Gly and Ic Ch[Lac]:EthGly respectively and in case of mixture of three moieties If Ch[Lac]:Gly:EthGly - 47% of relative activity of CALB. On contrary, mixtures containing urea as an HBD, exhibits significant drop on relative activity values compared to mixtures with polyols, yet still at a lower level than control sample. The best results can be addressed to the sample containing urea only - Ia Ch[Lac]:U which is approximately 83% in reference to control sample. In both cases, 5% and 10% doping, the result is almost the same - 83.2% and 83.5% respectively. Interesting is the fact, that urea is being known as a denaturing agent, and glycerol on contrary is known as a lipase stabilizing compound, in this research the opposite effect is observed.

3.1.6. Assay of transesterification activity of lipase in choline lactate based LTTM

It is known that lipase in absence of water has ability to conduct transesterification reaction. Having in mind, that at room temperature, the enzyme is stable in examined solvents, interesting was to determine

whether the transesterification reaction can be performed in those solvents. The catalytic activity of lipase was determined on the reaction between 1-pentanol and propyl propionate in 1:1 molar ratio. Obtained results (Fig. 3) shows that the best result can be obtain, whereas reaction medium, low transition temperature mixtures containing urea or glycerol as an HBD being used (together or separately). The highest yield can be addressed to sample Ib Ch[Lac]:Gly with 96% conversion rate which is slightly higher than for samples Ia Ch[Lac]:U and Ic Ch[Lac]:U:Gly with yields 94% and 93% respectively. On the contrary, samples containing ethylene glycol as a HBD - among studied samples - always diminish the efficiency of conversion. This can be seen for the sample Ig Ch[Lac]:U:EthGly which exhibits the lowest yield - 48% of conversion rate. This could indicate that, despite stability of lipase in solvents containing ethylene glycol as a HBD, the enzyme transesterification activity is being inhibited. This is similar to hydrolytic activity inhibition - as hydrolytic activity in reaction medium doped with LTTM containing ethylene glycol also exhibit the lowest relative activity values.

4. Discussion

Despite the enzyme stability in prepared solvents, it occurred that the hydrolytic activity of CALB in prepared solvents exhibit lower values than in control sample - in phosphate buffer solution. The activity prevails however, the achieved activity is at best 83% of relative activity (in sample Ia Ch[Lac]:U) in reference to control sample, while samples containing polyols (glycerol or ethylene glycol also together or apart) exhibit even lower values. Those results are on contrary to Kim et al., who used DES based on choline chloride and glycerol to promote lipase hydrolytic activity [19]. This might indicate, anion in choline salt play's vital role in promoting and stabilizing lipase in DES or LTTM solution. Also according to Fredes et al. lipase (in this case Novozym 435) is more stable in a DES:buffer solution than in 100% phosphate buffer or pure DES which is also on contrary to this research [39]. Table 2 shows that samples of choline lactate mixed with polyols exhibit amplifying influence on lipase stability - The onset temperature, for sample If Ch[Lac]:Gly:EthGly is 15% higher than for control sample (55.2 °C vs 47.1 °C respectively). This might lead to assumption that most of the influence of enzyme behavior comes from the anion of choline salt. In case of transesterification activity of CALB, obtained results shows, that non-aqueous biocatalytic transformation remains unaffected for solvents containing urea and glycerol. This corresponds with the work of Durand et al. well as with the work of Shi et al. where obtained results, were at best conversion rates in the presence of urea and glycerol (used

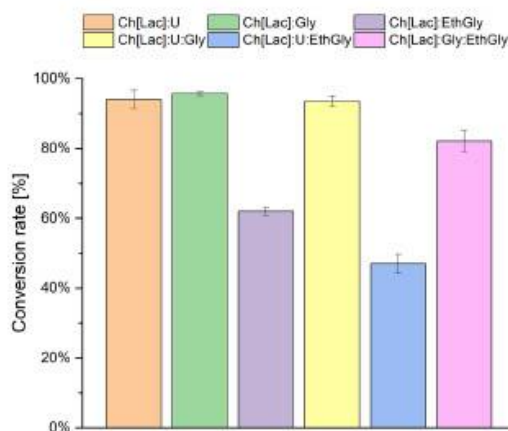


Fig. 3. The yields (%) of pentyl propanoate in transesterification reaction using lipase in choline lactate based LTTMs. Error bars represent standard deviations.

as a HBD in eutectic solvent) [21]. Obtained results of efficiency transesterification reaction catalyzed in presented LTTMs by analyzed CALB are also consisted with obtained for Liu et al. and Durand et al. where transesterification of methyl caffeate and glycerol with yield of 96.5% where reported [23]. Also immobilized CALB on polystyrene resin (Novozym 435) have shown beneficial role on its activity DES Ch[Cl]: Urea solution (10% water, w/w) in transesterification reaction of methyl p-coumarate and methyl ferulate with octanol with yield 98% and 90% respectively [21]. According to Cao et al. [36] to prepare the most promising solvent for transesterification reaction using CALB it is best to use hydrophobic mixtures (DES or LTTM) with the significant amount of hydroxyl group present in the HBD compound. This research exhibit, that the amount of hydroxyl group in anion of choline salt also plays a vital role in transesterification reaction and that the hydrophilicity of prepared mixtures haven't influenced the yield of transesterification. Taking above into account as well as the results of transesterification of propyl propanoate with 1-pentanol described in this work, in can be assumed that LTTMs based on choline lactate are suitable for biocatalytic transesterification reaction with lipase.

5. Conclusion

The goal and concept of this work was to prepare new group of natural-based low transition temperature mixtures, examine their basic properties and evaluate the possibility of using such LTTMs, as an enzymatic reaction medium. Prepared LTTMs, were examined for their basic properties and used as a water/buffer additive in the test of activity of hydrolytic activity of lipase as well as a reaction medium (pure LTTMs) in the test of transesterification activity. Obtained result shows that, the stability of enzyme is being unaffected at room temperature for any of studied LTTMs, however the composition of LTTM influence the thermal stability of CALB significantly, especially at elevated temperatures. Also, this work has proven that the addition of small volumes of studied LTTMs to reaction medium has no beneficial influence on the enzyme hydrolytic activity. However, in case of LTTMs used as reaction medium, the transesterification activity remains unaffected, only for solvents LTTM containing glycerol. Having that in mind, it can be concluded, that presence of glycerol plays crucial role in the LTTM beneficial influence effect on lipase. It is also worth noticing, that in case of all mixtures studied in this work, also urea as a HBD plays significant role. In tested LTTMs, activity (both hydrolytic and transesterification) remains at higher levels when as HBD urea is being used. This leads to assumption, that structure of hydrogen bond network, might be the most crucial factor for stability and activity of studied lipase. However, to confirm this, further research is needed.

CRedit authorship contribution statement

Jakub Hoppe: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Software, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. Ewa Byzła: Data curation, Methodology, Funding acquisition. Patryk Bielecki: Investigation, Methodology, Data curation. Marek Smiglak: Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing. Radosław Drozd: Methodology, Resources, Supervision, Validation. Radosław Drozd: Writing – review & editing. Magdalena Szymańska: Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from National Science Center Poland, project OPUS, no. UMO-2015/19/B/NZ9/03711.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.colsurfb.2022.112518.

References

- [1] T. Itoh, Ionic liquids as tool to improve enzymatic organic synthesis, *Chem. Rev.* 117 (2017) 10567–10607, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00159>.
- [2] H. Suo, L. Xu, C. Xu, X. Qiu, H. Huang, Y. Hu, Enhanced catalytic performance of lipase covalently bonded on ionic liquids modified magnetic alginate composites, *J. Colloid Interface Sci.* 553 (2019) 494–502, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.06.049>.
- [3] Z. Zhao, H. Chunmiao, Du Chuanhu, X. Ping, Z. Weiwei, Efficient synthesis of cefadroxil in [Bmim][NTf₂]-phosphate cosolvent by magnetic immobilized penicillin G acylase, *J. Chin. Chem. Soc.* 66 (2019) 1649–1657, <https://doi.org/10.1002/jccs.201900272>.
- [4] B.B. Hansen, S. Spittle, B. Chen, D. Poe, Y. Zhang, J.M. Klein, A. Horton, L. Adhikari, T. Zelovich, B.W. Doherty, B. Gurkan, E.J. Maginn, A. Ragauskas, M. Dadmun, T.A. Zawodzinski, G.A. Baker, M.E. Tuckerman, R.F. Savinell, J. R. Sangoro, Deep eutectic solvents: a review of fundamentals and applications, *Chem. Rev.* 121 (2021) 1232–1285, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>.
- [5] M. Francisco, A. van den Bruinhorst, M.C. Kroon, Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52 (2013) 3074–3085, <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>.
- [6] J. Cao, R. Wu, F. Zhu, Q. Dong, E. Su, How to improve the efficiency of biocatalysis in non-aqueous pure deep eutectic solvents: a case study on the lipase-catalyzed transesterification reaction, *Biochem. Eng. J.* 179 (2022), 108336, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108336>.
- [7] A. Arakaya, A.E. Unlü, S. Takaç, Use of deep eutectic solvents in the enzyme catalyzed production of ethyl lactate, *Process Biochem.* 84 (2019) 53–59, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.003>.
- [8] A. Faraone, D.V. Wagle, G.A. Baker, E.C. Novak, M. Ohl, D. Reuter, P. Lunkenheimer, A. Loidl, E. Mamontov, Glycerol hydrogen-bonding network dominates structure and collective dynamics in a deep eutectic solvent, *J. Phys. Chem. B* 122 (2018) 1261–1267, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b11224>.
- [9] M. Francisco, A.S.B. González, Sara Lago García de Dios, W. Weggenans, M. C. Kroon, Comparison of a low transition temperature mixture (LTTM) formed by lactic acid and choline chloride with choline lactate ionic liquid and the choline chloride salt: physical properties and vapour-liquid equilibria of mixtures containing water and ethanol, *RSC Adv.* 3 (2013) 23553–23561, <https://doi.org/10.1039/C3RA40309C>.
- [10] P. Chandra, Enespa, P. Singh, P.K. Arora, Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review, *Microb. Cell Fact.* 19 (2020) 169, <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- [11] V. Zambare, R. Patankar, B. Bhusare, L. Christopher, Recent advances in feedstock and lipase research and development towards commercialization of enzymatic biodiesel, *Processes* 9 (2021) 1743, <https://doi.org/10.3390/pr9101743>.
- [12] N. Sarmah, D. Revathi, G. Sheelu, K. Yamuna Rani, S. Sridhar, V. Mehtab, C. Sumana, Recent advances on sources and industrial applications of lipases, *Biotechnol. Prog.* 34 (2018) 5–28, <https://doi.org/10.1002/abpr.2581>.
- [13] C. Bernal, F. Guzman, A. Illanes, L. Wilson, Selective and eco-friendly synthesis of liposaminic acid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts, *Food Chem.* 239 (2018) 189–195, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.105>.
- [14] C. García-Oliva, A. Perona, A. Rumbero, P. Hoyos, M.J. Hernández, Enzymatic synthesis and molecular modelling studies of rhamnose esters using lipase from *Pseudomonas stutzeri*, *Int. J. Mol. Sci.* 23 (2022), <https://doi.org/10.3390/ijms23042239>.
- [15] C.I. Kountela, S.N. Vouyiouka, Enzymatic polymerization as a green approach to synthesizing bio-based polyesters, *Macromol* 2 (2022) 30–57, <https://doi.org/10.3390/macromol2010003>.
- [16] J.T. Gorke, F. Srijenc, R.J. Kazlauskas, Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents, *Chem. Commun.* (2008) 1235–1237, <https://doi.org/10.1039/b716317g>.
- [17] N. Guajardo, C.R. Müller, R. Schreiber, C. Carlesi, P. Domínguez de María, Deep eutectic solvents for organocatalysis, biotransformations, and multistep organocatalyst/enzyme combinations, *ChemCatChem* 8 (2016) 1020–1027, <https://doi.org/10.1002/cssc.201501133>.
- [18] P. Lozano, E. Alvarez, S. Nieto, R. Villa, J.M. Bernal, A. Donaire, Biocatalytic synthesis of panthenyl monocoyl esters in ionic liquids and deep eutectic solvents, *Green. Chem.* 21 (2019) 3353–3361, <https://doi.org/10.1039/C9GC01076A>.
- [19] S.H. Kim, S. Park, H. Yu, J.H. Kim, H.J. Kim, Y.-H. Yang, Y.H. Kim, K.J. Kim, E. Kan, S.H. Lee, Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 128 (2016) 65–72, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.012>.

- [20] E. Durand, J. Lecomte, B. Baréa, G. Piombo, E. Dubreucq, P. Villeneuve, Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions, *Process Biochem.* 47 (2012) 2061–2069, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.027>.
- [21] E. Durand, J. Lecomte, B. Baréa, P. Villeneuve, Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 16–23, <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300246>.
- [22] Y. Shi, L. Bian, Y. Zhu, R. Zhang, S. Shao, Y. Wu, Y. Chen, Y. Dang, Y. Ding, H. Sun, Multifunctional alkyl ferulate esters as potential food additives: Antibacterial activity and mode of action against *Listeria monocytogenes* and its application on American sturgeon caviar preservation, *Food Control* 96 (2019) 390–402, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.030>.
- [23] X. Liu, X.-Y. Meng, Y. Xu, T. Dong, D.-Y. Zhang, H.-X. Guan, Y. Zhuang, J. Wang, Enzymatic synthesis of 1-caffeoylglycerol with deep eutectic solvent under continuous microflow conditions, *Biochem. Eng. J.* 142 (2019) 41–49, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.11.007>.
- [24] W.-J. Xu, Y.-K. Huang, F. Li, D.-D. Wang, M.-N. Yin, M. Wang, Z.-N. Xia, Improving β -glucosidase biocatalysis with deep eutectic solvents based on choline chloride, *Biochem. Eng. J.* 138 (2018) 37–46, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.002>.
- [25] M.L. Toledo, M.M. Pereira, M.G. Freire, J.P.A. Silva, J.A.P. Coutinho, A.P. M. Tavares, Laccase activation in deep eutectic solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 11806–11814, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02179>.
- [26] C.R. Calado, S.M. Monteiro, J.M. Cabral, L.P. Fonseca, Effect of pre-fermentation on the production of cutinase by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biosci. Bioeng.* 93 (2002) 354–359, [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(02\)80067-6](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(02)80067-6).
- [27] P. Adlercreutz, Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6406–6436, <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>.
- [28] F.S. Mjalli, O.U. Ahmed, Physical properties and intermolecular interaction of eutectic solvents binary mixtures: relin and ethaline, *Asia Pac. J. Chem. Eng.* 11 (2016) 549–557, <https://doi.org/10.1002/apj.1978>.
- [29] F.S. Mjalli, J. Naser, B. Jibril, V. Alizadeh, Z. Gano, Tetrabutylammonium chloride based ionic liquid analogues and their physical properties, *J. Chem. Eng. Data* 59 (2014) 2242–2251, <https://doi.org/10.1021/je5002126>.
- [30] R. Stefanovic, M. Ludwig, G.B. Webber, R. Atkin, A.J. Page, Nanostructure, hydrogen bonding and rheology in choline chloride deep eutectic solvents as a function of the hydrogen bond donor, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 3297–3306, <https://doi.org/10.1039/c6cp07932f>.
- [31] J. Hoppe, E. Byzia, M. Szymańska, R. Drozd, M. Smiglak, Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents, *Food Chem.* (2022), 132496, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132496>.
- [32] S.L. Bradbury, W.B. Jakoby, Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: effects on aldehyde dehydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69 (1972) 2373–2376, <https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2373>.
- [33] T. El Harrar, B. Frieg, M.D. Davari, K.-R. Jaeger, U. Schwaneberg, H. Gohlke, Aqueous ionic liquids redistribute local enzyme stability via long-range perturbation pathways, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19 (2021) 4248–4264, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.001>.
- [34] M. Shehata, A. Unlu, U. Sezerman, E. Timucin, Lipase and water in a deep eutectic solvent: molecular dynamics and experimental studies of the effects of water-in-deep eutectic solvents on lipase stability, *J. Phys. Chem. B* 124 (2020) 8801–8810, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c07041>.
- [35] J.-Q. Lai, Z. Li, Y.-H. Liu, Z. Yang, Specific ion effects of ionic liquids on enzyme activity and stability, *Green. Chem.* 13 (2011) 1860, <https://doi.org/10.1039/c1gc15140a>.
- [36] L. Xue, Y. Zhao, L. Yu, Y. Sun, K. Yan, Y. Li, X. Huang, Y. Qu, Choline acetate enhanced the catalytic performance of *Candida rugosa* lipase in AOT reverse micelles, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 105 (2013) 81–86, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.050>.
- [37] A. Kumar, P. Venkatesu, Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? *Int. J. Biol. Macromol.* 63 (2014) 244–253, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2013.10.031>.
- [38] J. Hoppe, R. Drozd, E. Byzia, M. Smiglak, Deep eutectic solvents based on choline cation - physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase, *Int. J. Biol. Macromol.* 136 (2019) 296–304, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2019.06.027>.
- [39] Y. Predes, L. Chamorro, Z. Cabrera, Increased selectivity of novozym 435 in the asymmetric hydrolysis of a substrate with high hydrophobicity through the use of deep eutectic solvents and high substrate concentrations, *Molecules* 24 (2019), <https://doi.org/10.3390/molecules24040792>.

Supplementary Materials

Effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties

Jakub Hoppe¹, Ewa Byzia², Magdalena Szymańska³, Park Bielecki², Radosław Drozd^{3*}, Marcin Smiglak^{2*}

¹Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89b, 61-614 Poznan, Poland

²Poznan Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, Rubież 46, 61-612 Poznan, Poland

³West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Department of Microbiology and Biotechnology, Piastów Avenue 45, 70-311 Szczecin, Poland

Table of Contents

1. Density and conductivity values for <i>LTTMs</i> based on choline lactate depend on used HBD.....	S2
2. Viscosity plot of <i>LTTMs</i> based on choline lactate depend on used HBD.....	S3
3. TGA charts of choline levulinate based DES.....	S4
4. DSC charts of choline levulinate based DES.....	S5
5. Thermal stability profile plot of CALB in choline lactate based <i>LTTMs</i>	S6
6. Choline lactate based <i>LTTM</i> influence on hydrolytic activity of lipase at 25°C.....	S7

Table S1. Density of choline lactate based LTTM

	HBA	HBD	HBA:HBD [mol:mol]	Density [ρ , g cm ⁻³]
I	Ch[Lac]	-	-	1.1947
Ia	Ch[Lac]	Urea	1:2	1.21
Ib	Ch[Lac]	Glycerol	1:2	1.18
Ic	Ch[Lac]	EthGly	1:2	1.12
Id	Ch[Lac]	Urea:Glycerol	1:1:1	1.15
Ie	Ch[Lac]	Urea:EthGly	1:1:1	1.14
If	Ch[Lac]	Glycerol:EthGly	1:1:1	1.13

Table S2 Conductivity of choline lactate based LTTM solvents at 25 °C

	HBA	HBD	HBA:HBD [mol:mol]	Conductivity [σ , mS cm ⁻¹]
I	Ch[Lac]	-	-	1.17
Ia	Ch[Lac]	Urea	1:2	0.43
Ib	Ch[Lac]	Glycerol	1:2	0.53
Ic	Ch[Lac]	EthGly	1:2	1.28
Id	Ch[Lac]	Urea:Glycerol	1:1:1	0.59
Ie	Ch[Lac]	Urea:EthGly	1:1:1	1.11
If	Ch[Lac]	Glycerol:EthGly	1:1:1	0.92

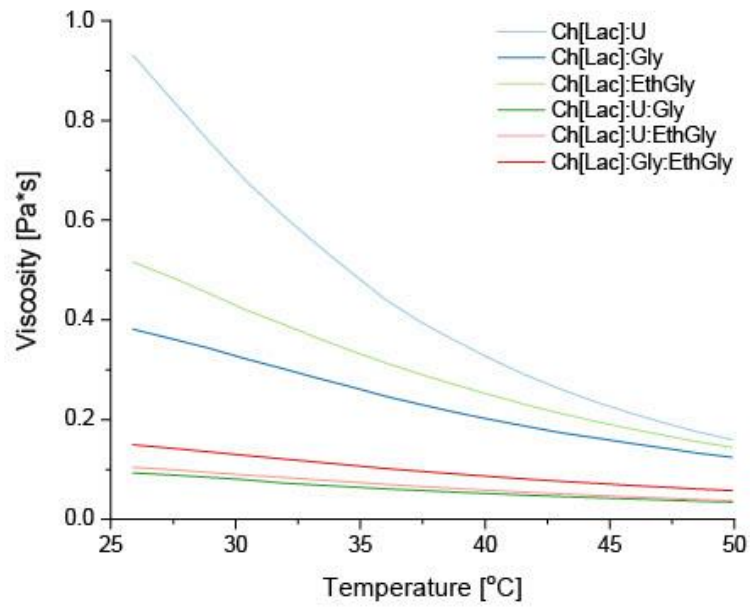


Figure S1. Viscosity of LTTMs based on choline lactate depend on used HBD.

Table S3 Thermogravimetric analysis of choline lactate based LTTM

	HBA	HBD	HBA:HBD	HR ^a	T _{onset}	T _{onset-5%}	T _{2nd} ^a
			[mol:mol]	[C/min]	[°C]	[°C]	[°C]
I	Ch[Lac]	-	-	3.5	212.54	139.62	-
Ia	Ch[Lac]	Urea	1:2	3.5	195.98	149.85	-
Ib	Ch[Lac]	Glycerol	1:2	3.5	211.88	146.87	-
Ic	Ch[Lac]	EthGly	1:2	3.5	117.26	102.34	212.72
Id	Ch[Lac]	Urea:Glycerol	1:1:1	3.5	178.70	159.12	204.20
Ie	Ch[Lac]	Urea:EthGly	1:1:1	3.5	121.06	102.03	209.49
If	Ch[Lac]	Glycerol:EthGly	1:1:1	3.5	103.34	86.07	221.24

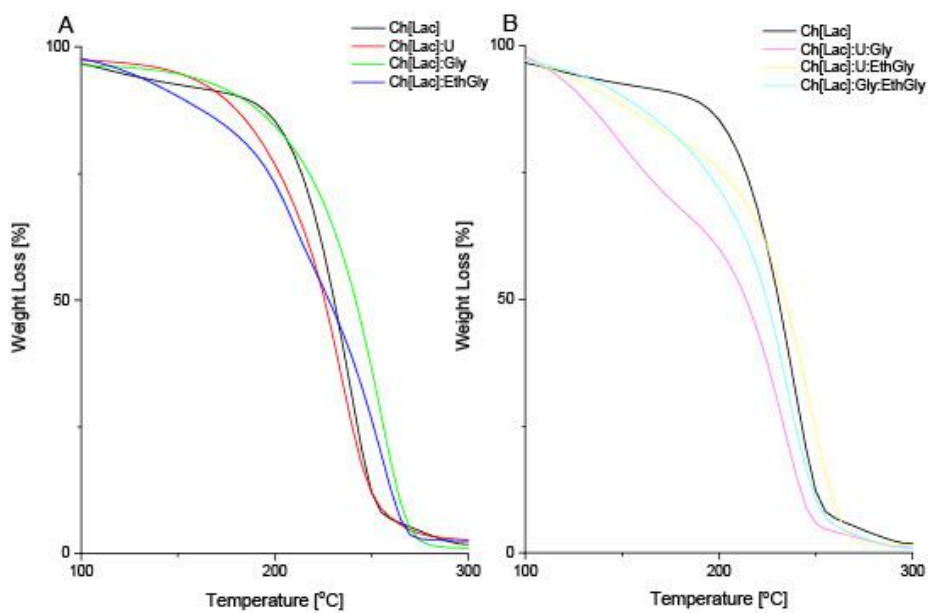


Figure S2. TGA charts based on choline lactate containing (A) 1 HBD and (B) 2 HBD

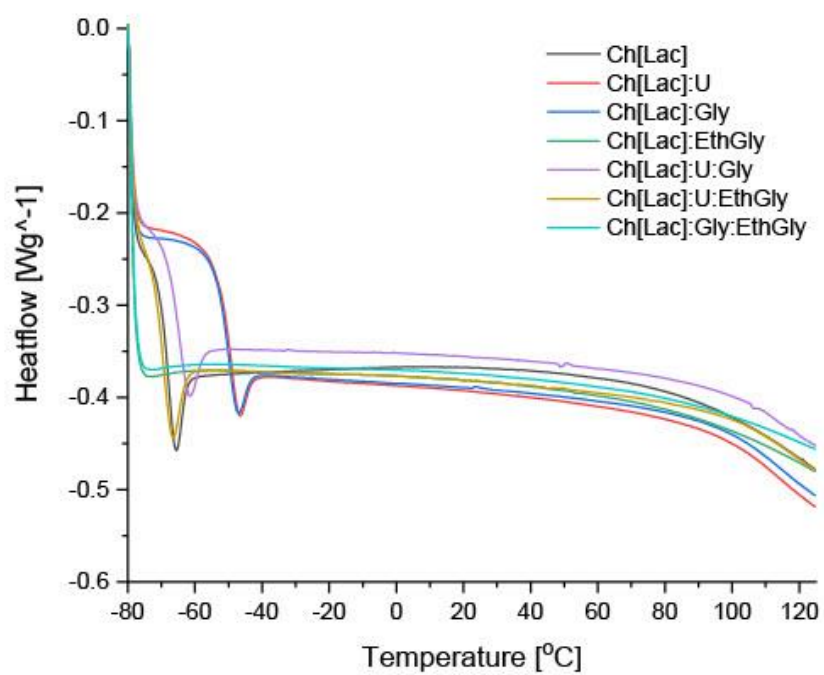


Figure S3. DSC chart of choline lactate based LTTMs

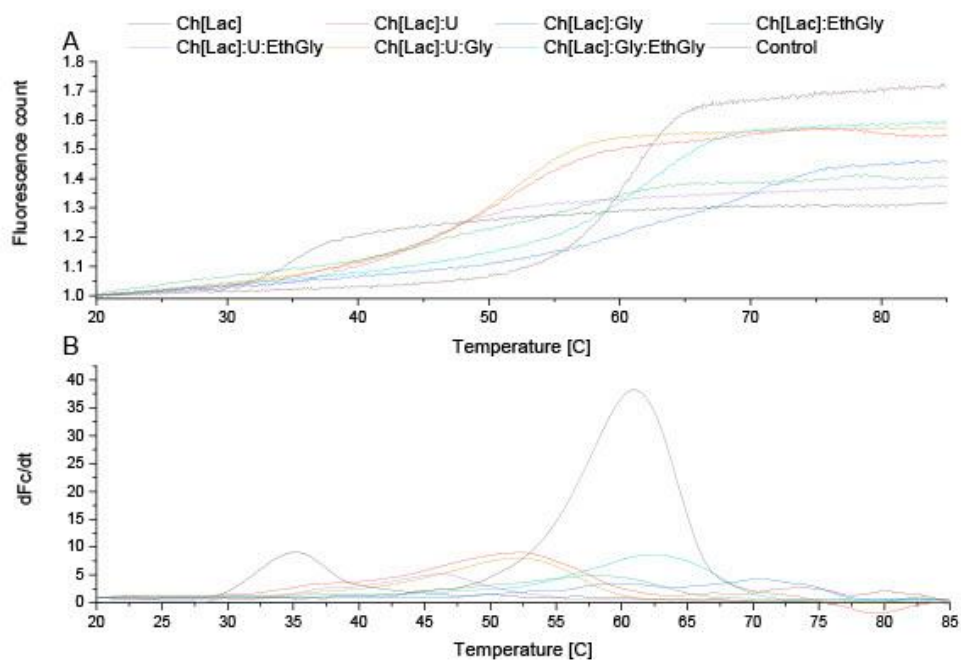


Figure S4. Thermal stability profile plot of CALB in choline lactate based LTTMs

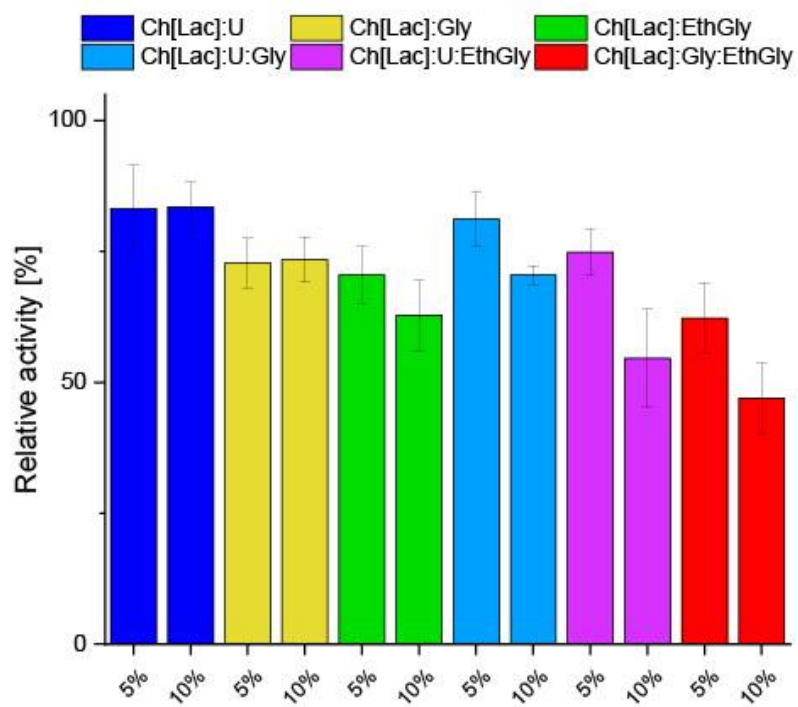


Figure S5. Influence of choline lactate based LTTM on hydrolytic activity of lipase. The assay was performed at 25°C.

VI. Oświadczenia współautorów

Dr Ewa Byzia

Material Synthesis group
Fundacja Uniwersytetu im.A.Mickiewicza
ul.Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., M., Smiglak M. *Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase*, *International Journal of Biological Macromolecules*, **2019**, 136, 296-304

DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.027>

Jako współautorka, mój udział polegał na wykonaniu pomiarów stabilności i aktywności enzymatycznej oraz na opracowaniu wyników.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 10%.

Ewa Byzia

Szczecin, 15.06.2022

Dr inż. Radosław Drozd
Centrum Dydaktyczno - Badawcze Nanotechnologii
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Al. Piastów 45
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Drozd R., M., Smiglak M. *Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β -galactosidase*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 136, 296-304.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.027>.

Jako współautor, mój udział polegał na dyskusji nad konceptem badań oraz na dyskusji nad analizą wyników i dyskusji z recenzentami.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 10%



Dr hab. Inż. Marcin Śmiglak
Material Synthesis group
Fundacja Uniwersytetu im.A.Mickiewicza
ul.Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., M., Śmiglak M. *Deep eutectic solvents based on choline cation - Physicochemical properties and influence on enzymatic reaction with β-galactosidase, International Journal of Biological Macromolecules*, **2019**, 136, 296-304

DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.027>

Jako współautor, mój udział polegał na dyskusji nad koncepcją badań, dyskusji nad wynikami oraz na dyskusji z recenzentami.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 20%.



Signed by /
Podpisano przez:

Marcin Śmiglak

Date / Data:
2024-06-27
15:33

Szczecin, 15.06.2022

Dr inż. Radosław Drozd
Centrum Dydaktyczno - Badawcze Nanotechnologii
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Al. Piastów 45
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Drozd R., M., Smiglak M. *Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents*, *Food Chemistry*, 384, 2022, 132498.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>.

Jako współautor, mój udział polegał na dyskusji nad konceptem badań oraz na dyskusji nad analizą wyników.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 10%.



Szczecin, 15.06.2022

mgr inż. Magdalena Szymańska
Centrum Dydaktyczno - Badawcze Nanotechnologii
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Al. Piastów 45
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Drozd R., M., Smiglak M. *Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents*, *Food Chemistry*, 384, 2022, 132498.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>.

Jako współautor, mój udział polegał na wykonaniu pomiarów stabilności termicznej enzymu.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 5%.

Magdalena Szymańska

Dr Ewa Byzia

Material Synthesis group
Fundacja Uniwersytetu im.A.Mickiewicza
ul.Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Drozd R., M., Smiglak M. *Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents*, *Food Chemistry*, 384, **2022**, 132498

DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>

Jako współautor, mój udział polegał na wykonaniu pomiarów stabilności i aktywności enzymatycznej oraz na opracowaniu wyników.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 15%.

Ewa Byzia

Dr hab. Inż. Marcin Śmiglak
Material Synthesis group
Fundacja Uniwersytetu im.A.Mickiewicza
ul.Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Drozd R., M. Smiglak. *Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents*, *Food Chemistry*, 384, **2022**, 132498

DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132498>

Jako współautor, mój udział polegał na dyskusji nad analizą wyników oraz dyskusji z recenzentami.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 20%.



Signed by /
Podpisano przez:

Marcin Śmiglak

Date / Data:
2024-06-27
15:42

Szczecin, 15.06.2022

mgr inż. Magdalena Szymańska
Centrum Dydaktyczno - Badawcze Nanotechnologii
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Al. Piastów 45
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Drozd R., M., Smiglak M. *An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties*, 216, 2022, 112518.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>.

Jako współautor, mój udział polegał na wykonaniu pomiarów stabilności termicznej enzymu.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 5%.

Magdalena Szymańska

Dr Ewa Byzia

Fundacja Uniwersytetu im.A.Mickiewicza
ul.Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., M., Smiglak M. *An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties.*

Colloids and surface B: Biointerfaces 216, **2022**, 112518

DOI <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>

Jako współautorka, mój udział polegał na wykonaniu pomiarów stabilności i aktywności enzymatycznej.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 10%.



Szczecin, 15.06.2022

Dr inż. Radosław Drozd
Centrum Dydaktyczno - Badawcze Nanotechnologii
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Al. Piastów 45
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzła E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., M., Smiglak M. *An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties, Colloids and surface B: Biointerfaces* 216, 2022, 112518.

DOI <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>.

Jako współautor, mój udział polegał na dyskusji nad konceptem badań oraz na dyskusji nad analizą wyników.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 10%.



Dr Patryk Bielecki

Poznań, dnia 26.06.2024

Fundacja Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
ul. Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., M., Smiglak M. - An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties, 216, 2022, 112518

DOI <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>

Jako współautor, mój udział polegał na przygotowaniu i analizie chromatograficznej próbek oraz współuczestniczeniu w pisaniu publikacji.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 10%.

Bielecki P.

Dr hab. Inż. Marcin Śmiglak
Material Synthesis group
Fundacja Uniwersytetu im.A.Mickiewicza
ul.Rubież 46
61-612 Poznań
Polska

OŚWIADCZENIE

W związku z postępowaniem doktorskim mgr Inż. Jakuba Hoppe, oświadczam, że w pracy:

Hoppe J., Byzia E., Szymańska M., Bielecki P., Drozd R., M., Smiglak M. *An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties. Colloids and surface B: Biointerfaces* 216, **2022**, 112518

DOI <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112518>

Jako współautor, mój udział polegał na dyskusji nad koncepcją badań, oraz dyskusji z recenzentami.

Mój udział w powstaniu niniejszej publikacji oceniam na 15%.



Signed by /
Podpisano przez:
Marcin Śmiglak

Date / Data:
2024-06-27
15:31