



Thermomorphe Lösungsmittelsysteme unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten und deren Einsatz in der Biokatalyse

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von Anja Gummesson, geb. am 14.07.1985 in Rostock

Rostock, 2019

Das Thema der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2013 bis September 2017 am Institut für Chemie der Universität Rostock am Lehrstuhl für Technische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Kragl bearbeitet.

1. Gutachter: Prof. Dr. Udo Kragl

Institut für Chemie, Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Andreas Seidel-Morgenstern

Institut für Verfahrenstechnik, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Datum der Einreichung: 14.06.2019

Datum der Verteidigung: 29.10.2019

Lagom.

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Udo Kragl für die interessante Themenstellung, die hilfreichen Diskussionen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Zudem danke ich herzlich für die Vermittlung und Unterstützung meines Aufenthalts bei Prof. Tom Welton am Imperial College London.

Beim BMBF bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung durch die Initiative Biotechnologie 2020+ und das Professorinnen-Programm II.

Jan von Langermann möchte ich für die gute Betreuung, die geduldige Einführung, die vielen wertvollen Anregungen aber auch für die gewährte Freiheit bei der Bearbeitung des Themas danken.

Für die herzliche Aufnahme in die NMR-Familie, die entspannte und freundschaftliche Büroatmosphäre, das Interesse am Fortgang meiner Arbeit, die schnellen NMR-Analysen und die aufmunternden Worte möchte ich mich bei Dirk Michalik, Ulrike Jost, Brigitte Goronzi, Heike Borgwaldt, Harald Grabow, Thomas Kröger-Badge und Monika Mohn bedanken. Ihr fehlt mir sehr!

Der Arbeitsgruppe Technische Chemie danke ich für die lustigen Labortage und Feierabende, für jegliche Hilfe und den guten Kaffee. Insbesondere bei Lars-Erik Meyer, Jan-Niklas Dohm und Jenny Kuziola möchte ich mich für die hervorragenden Ergebnisse und Ideen während der HiWi-Zeit und Masterarbeit bedanken.

Sandra Klehn danke ich für die Unterstützung bei den kleinen Problemen im täglichen Laboralltag.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Tom Welton und Prof. Jason Hallett vom Imperial College für die Möglichkeit des Forschungsaufenthalts und die ungezwungenen wissenschaftlichen Gespräche. Gilbert De Gregorio, Alberto Marcolongo, Agnieszka Brandt-Talbot, Liyana Ismail, Paul Corbett, Vivi Filippousi, Oliver Whitaker, Rafiq Norle, Shahrul Zahari und Clementine Chambon danke ich für die schöne Zeit in London – innerhalb und außerhalb des Labors.

Ich danke der Mensa für täglich gutes Essen und allen lieben Freunden, die mich dahin begleitet haben: Marleen Winterberg, Dr. Henrik Lund, René Kuzora, Stefan „der Pirat“ Oschatz, Martha Höhne, Markus Joksch, Bernd Müller, Marco (für mich bleibst du immer ein Tänzler) Cornelius, André Berndt, Michael Christoph, ... - unglaublich wie eine halbe Stunde den ganzen Tag retten kann ☺

Auch allen anderen Freunden danke ich dafür, dass ihr mein Leben so unglaublich schön macht!

Zuletzt möchte ich meiner Familie meinen tiefen Dank aussprechen. Danke an meinen lieben, den besten Mann Felix, meine tollen Kinder Bjarne und Freda, meine Eltern Birgit und Michael sowie meine Schwiegereltern Christiane und Steffen. Ohne euer Verständnis und eure Rücksicht wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Ich liebe euch!

Kurzfassung

Thermomorphe Lösungsmittelsysteme (TMS) bestehen aus Lösungsmittelmischungen, welche eine temperaturabhängige Mischungslücke aufweisen. Dieses Verhalten ermöglicht eine reversible makroskopische Phasenänderung zwischen Ein- und Zweiphasensystem. Bei Systemen mit einer oberen kritischen Lösungstemperatur können einphasige Reaktionsbedingungen bei höheren Temperaturen und eine leichte Rezyklierung des Katalysators nach der Phasentrennung bei niedrigeren Temperaturen erfolgen. Bezogen auf den jeweiligen Verteilungskoeffizienten reichern sich zudem die zumeist hydrophoben Produkte in der nicht-wässrigen Phase an, was eine vereinfachte Aufarbeitung gewährleistet.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Mischungen ionischer Flüssigkeiten und organischer Lösungsmittel mit Wasser und Salzen hinsichtlich ihres Phasenverhaltens und der Verwendbarkeit solcher Lösungsmittelsysteme für biokatalytische Reaktionen untersucht. Insbesondere Ammonium- und Imidazolium-basierte ionische-Flüssigkeiten-TMS zeigten gute bis hervorragende Aktivitäten, mehrmalige Rezyklierbarkeit der verschiedenen Enzyme und weitere Vorteile gegenüber klassischen Reaktionssystemen.

Abstract

Thermomorphic solvent systems are specific solvent mixtures that exhibit a temperature-dependent miscibility gap, which allows the utilization of a reversible macroscopic phase change between mono- and multiphasic conditions. For systems with upper critical solution temperature-type phase behaviour, monophasic reaction conditions at higher temperatures and an easy recycling of the biocatalyst after phase separation at lower temperatures can be achieved. In this study various ionic liquid/ water/ salt/ organic solvent-mixtures were screened regarding their liquid-liquid phase equilibria and evaluated with selected biocatalytic reactions. Especially ammonium- and imidazolium-based ionic liquid systems showed good to excellent catalytic activities and good recyclabilities with several enzymes and advantages in comparison to classical reaction conditions.

I Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis	iv
III Schemataverzeichnis	x
IV Tabellenverzeichnis	xii
V Verwendete Abkürzungen	xvi
VI Maßeinheiten	xviii
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung und Motivation	3
3 Theoretische Grundlagen	4
3.1 Ionische Flüssigkeiten	4
3.1.1 Die Entwicklung ionischer Flüssigkeiten	4
3.1.2 Die besonderen Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten	6
3.2 Biokatalysatoren	9
3.3 Unkonventionelle Lösungsmittel für biokatalytische Reaktionen	12
3.4 Ionische Flüssigkeiten als Extraktionsmittel von Biomolekülen	19
3.5 Biokatalyse in thermomorphen Lösungsmittelsystemen	21
4 Ergebnisse und Diskussion	28
4.1 Die Entwicklung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme	29
4.1.1 Verwendung von organischen Lösungsmitteln	30
4.1.2 Verwendung von ionischen Flüssigkeiten	39
4.2 Biokatalyse in thermomorphen Lösungsmittelsystemen	68
4.2.1 Lipasen	69
4.2.2 Aminotransferase	114
4.2.3 Saure Phosphatase	119
4.2.4 Alkoholdehydrogenasen	121
4.2.5 Weitere Enzyme	124

5 Zusammenfassung und Ausblick.....	129
A Anhang.....	132
A.1 Material	132
A.1.1 Verwendete Chemikalien und Biokatalysatoren	132
A.1.2 Verwendete Geräte.....	134
A.2 Methoden.....	135
A.2.1 NMR Messungen	135
A.2.2 Gaschromatographische Messungen.....	135
A.2.3 Herstellung der Puffer- und Salzlösungen.....	141
A.2.4 Synthese ionischer Flüssigkeiten.....	142
A.2.5 Screening geeigneter thermomorpher Systeme unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln.....	144
A.2.6 Screening geeigneter thermomorpher Systeme unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten.....	145
A.2.7 Screening geeigneter reactiomorpher Systeme unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten.....	148
A.2.8 Karl-Fischer-Coulometrie	149
A.2.9 Bestimmung der Wasseraktivität.....	150
A.2.10 1D-Gelelektrophorese der Enzyme	150
A.2.11 Absorptionsmessungen zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme	152
A.2.12 Statistik	160
A.3 Abbildungen und Tabellen	161
A.4 Biokatalyse in reactiomorphen Lösungsmittelsystemen.....	203
A.4.1 Die Entwicklung der reactiomorphen Lösungsmittelsysteme	204
Literaturverzeichnis.....	207

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Anzahl der Publikationen über "Biokatalyse in Ionischen Flüssigkeiten" seit 2000 bis 2017. [Scopus Suche nach <i>biocatalysis in ionic liquids</i> ; letzte Aktualisierung 08/2018]	1
Abbildung 3-1. Übersicht wichtiger Kationen in ILs.....	5
Abbildung 3-2. Kinetische Racematspaltung einiger chiraler Alkohole in Ionischen Flüssigkeiten. [van Rantwijk und Sheldon 2007].....	17
Abbildung 4-1. Trübungstemperaturen T_{Tr} der Mischung aus 10-20% (v/v) an $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ ($n = 1, 2, 3$) mit abhängiger Konzentration an 80-90% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0).	54
Abbildung 4-2. Einfluss von (A) 10% (v/v) 1,4-Dioxan und (B) 10% (v/v) Aceton als Phasenvermittler in der Mischung aus 10-20% (v/v) $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ ($n = 1, 2, 3$) und KPi (50 mM, pH 7,0) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	55
Abbildung 4-3. Einfluss der IL-Konzentration (links) sowie der Pufferkonzentration (rechts) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS. (Dreifachbestimmung)	56
Abbildung 4-4. Links: Einfluss von 10% (v/v) 1,4-Dioxan bei variierender Pufferkonzentration auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 80% (v/v) KPi). Rechts: Einfluss des Phasenvermittlers 1,4-Dioxan in verschiedenen Konzentrationen auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% KPi (50 mM, pH 7,0)). (Dreifachbestimmungen).....	57
Abbildung 4-5. Parallelverschiebung der Trübungstemperatur T_{Tr} durch Zugabe von 100 mM 1-PEA zum $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% (v/v) KPi, 5-15% (v/v) 1,4-Dioxan).....	58
Abbildung 4-6. Einfluss von 10-100 mM Substrat 1-Phenylethylacetat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 68 bzw. 70% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)) mit 10 bzw. 12% (v/v) 1,4-Dioxan.....	59
Abbildung 4-7. Einfluss von verschiedenen Mengen BSA auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS. Verglichen werden die TMS mit 10% und 12% v/v 1,4-Dioxan.....	59
Abbildung 4-8. Einfluss vier verschiedener Phasenvermittler (5-15% (v/v)) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)).	60
Abbildung 4-9. Relative Aktivität der CaLB in den verschiedenen Medien bezogen auf 50 mM KPi bei 30 °C (Mittelwerte aus Fünffachbestimmung).	70
Abbildung 4-10. Temperatur-Abhängigkeit der CaLB im Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0). (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).	73
Abbildung 4-11. Stabilität der CaLB in KPi (50 mM, pH 7,0) über 14 Tage bei 30 °C, 40 °C und 50 °C. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).	74
Abbildung 4-12. Kinetische Racematspaltung von 50 mM 1-Phenylethylacetat mit 97 U/ml CaLB in Kaliumphosphat-Puffer (KPi 50 mM, pH 7,0) bei 40 °C. (Mittelwerte aus Sechsfachbestimmung).	76

Abbildung 4-13. Kinetische Racematspaltung von 50 mM 1-Phenylethylacetat mit 97 U/ml CaLB im Zweiphasensystem aus Phosphatpuffer und MTBE bei 40 °C. (Mittelwerte aus Sechsfachbestimmung)	78
Abbildung 4-14. Stabilität der CaLB über 72 Stunden im TMS 2 bei 40 °C. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).....	83
Abbildung 4-15. Stabilität der CaLB über 30 h bei 40 °C in den TMS 3 bis 6.	86
Abbildung 4-16. Umsatz-Zeit-Diagramme der kinetischen Racematspaltung von 1-PEA im TMS 3, TMS 4, TMS 5 und TMS 6 (20% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$, 50 mM KPi pH 7,0, 30 mM Substrat, Enzymaktivität 97 U/ml, $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	87
Abbildung 4-17. Umsatz-Zeit-Diagramm der CaLB-Reaktion im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS bei 30°C, 40 °C und 50 °C im Vergleich.	89
Abbildung 4-18. Umsatz-Zeit-Diagramm der Umsetzung von 1-PEA mit veränderlichen CaLB-Konzentrationen über zwei Stunden bei 40 °C im TMS 3. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	90
Abbildung 4-19. Rezyklierung der CaLB im (A) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS mit 20% (v/v) 1,4-Dioxan-Zugabe über 5 Läufe und (B) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS mit 20% (v/v) und 40% (v/v) Aceton-Zugabe über 5 Läufe. (jeweils Mittelwerte aus Sechsfachbestimmung)	95
Abbildung 4-20. Stabilität der CaLB im TMS 7 und TMS 8 bei 40 °C über 24 Stunden.	97
Abbildung 4-21. Umsatz-Zeit-Diagramme der CaLB-Reaktion im [EMIm][NTf ₂]-KPi-DMSO-TMS (TMS 7, links) und [EMIm][NTf ₂]-KPi-Acetonitril-TMS (TMS 8, rechts) mit 30 mM 1-PEA, 97 U/ml CaLB bei 40 °C.	98
Abbildung 4-22. Langzeitstabilität der CaLB in reinem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) und dem Ammoeng™110-KPi-TMS.....	101
Abbildung 4-23. Umsatz-Zeit-Diagramm der kinetischen Racematspaltung mit CaLB im TMS 9.....	102
Abbildung 4-24. Rezyklierung der CaLB im Ammoeng™110-KPi-TMS über fünf Läufe.....	103
Abbildung 4-25. Vergleich der Stabilität von CaLB bei 40 °C über 200 h in NaPi (150 mM, pH 7,0) und im [BMIm][BF ₄]-NaPi-TMS (rechts ein Ausschnitt der ersten 2,5 h im TMS 10).	104
Abbildung 4-26. Umsatz-Zeit-Diagramm der kinetischen Racematspaltung mit CaLB im TMS 10. (Mittelwerte aus Sechsfachbestimmung)	105
Abbildung 4-27. Links: Umsatz-Zeit-Enantiomerenüberschuss-Diagramm. Rechts: Enantiomerenüberschuss-Umsatz-Diagramm der kinetischen Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im TMS 10 (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	106
Abbildung 4-28. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel der CaLB im [BMIm][BF ₄]-NaPi-TMS. S=Proteinstandard SeeBlue®, A=reiner Puffer, B=1PS des TMS, C=untere Phase des TMS, D=obere Phase des TMS.	107
Abbildung 4-29. Umsatz je Rezyklierungslauf bei der Rezyklierung der CaLB im [BMIm][BF ₄]-TMS.....	108

Abbildung 4-30. Übersicht der Konzentrations-Zeit-Diagramme der kinetischen Racematspaltung von 1 PEA in den untersuchten TMS A-F (verschiedene Konzentrationen von NaPi, 35% (v/v) IL, 50 mM Substrat, Enzymaktivität = 64,7 U/ml, $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$).....	110
Abbildung 4-31. Reaktion von 1-Octanol und Vinylacetat mit CaLB in 30% (v/v) $[\text{N}_{1142(\text{OH})}][\text{NTf}_2]$, 70% (v/v) 1-Octanol, 100 mM Vinylacetat, ~ 100 U/ml CaLB).....	112
Abbildung 4-32. Stabilität der ATA08 in Natriumphosphat-Puffer (200 mM) bei $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $pH = 8,0$	115
Abbildung 4-33. Ausbeute-Zeit-Diagramm der Reaktion von α -Methylbenzylamin mittels ATA08 zu Acetophenon in Natriumphosphat-Puffer (200 mM, $pH 8,0$), NaPi mit 0,03 μM DMSO und $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ -NaPi-DMSO-TMS im Vergleich bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	116
Abbildung 4-34. ATA08-vermittelte Reaktion von α -Methylbenzylamin in NaPi (50 mM) mit 0,2 mM Aceton, im $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ -NaPi-Aceton-TMS und im $[\text{N}_{1112(\text{OH})}][\text{NTf}_2]$ -NaPi-Aceton-TMS bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2 mM PLP. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	118
Abbildung 4-35. Umsatz-Zeit-Diagramme der photometrisch verfolgten Reaktionen von 2-Carboxyphenylphosphat (links: $c_1 = 3,65\text{ mM}$; rechts: $c_2 = 1,825\text{ mM}$) mittels saurer Phosphatase im Natriumacetatpuffer (750 mM, $pH = 5,5$) und im $[\text{BmIm}][\text{BF}_4]$ -NaAcP-TMS bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$	121
Abbildung 4-36. Umsatz-Zeit-Diagramm der enzymatischen Reduktion von Acetophenon zu (<i>R</i>)-1-Phenylethanol mittels <i>Lb</i> -ADH und <i>Lk</i> -ADH im $[\text{N}_{1112(\text{OH})}][\text{NTf}_2]$ -KPi-Isopropanol-TMS (mTMS 3) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$	123
Abbildung 4-37. Pferdeleber-ADH-vermittelte Reaktion von 50 mM Benzylalkohol, 250 mM Acetaldehyd und $1,5 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ NAD^+ im Ammoeng™110-KPi-TMS (mTMS 9) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$	124
Abbildung A-1. Isolierung des Reaktionsproduktes mittels selbstgebauter Säule.	141
Abbildung A-2. Einfluss von 1-Butanol als Phasenvermittler auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im organischen TMS mit 40% (v/v) KPi (50 mM, $pH 7,0$) und abhängigen Volumina THF.....	166
Abbildung A-3. Einfluss von Acetonitril als Phasenvermittler auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im organischen TMS mit verschiedenen 50 mM KPi-Volumina.....	167
Abbildung A-4. Einfluss von Acetonitril und Aceton als Phasenvermittler auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im organischen TMS aus 40% (v/v) KPi und veränderlichen Anteilen an MTBE.	167
Abbildung A-5. Einfluss des Phasenvermittlers Aceton auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[\text{N}_{1112(\text{OH})}][\text{NTf}_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% (v/v) KPi (50 mM, $pH 7,0$). Parallelverschiebung des linearen Zusammenhangs durch Zugabe von 100 mM 1-PEA.....	177
Abbildung A-6. Einfluss von 1-100 mM Substrat 1-Phenylethylacetat im $[\text{N}_{1112(\text{OH})}][\text{NTf}_2]$ -KPi-Aceton-TMS (20% (v/v) IL, 70 bzw. 72% (v/v) KPi, 8 bzw. 10% (v/v) Aceton) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	178

Abbildung A-7. Einfluss von 1-100 mg/ml BSA im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS (20% (v/v) IL, 70 bzw. 72% (v/v) KPi, 8 bzw. 10% (v/v) Aceton) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	178
Abbildung A-8. Einfluss des Phasenvermittlers Isopropanol im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	179
Abbildung A-9. Einfluss des Substrates Acetophenon im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Isopropanol-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	179
Abbildung A-10. Einfluss von BSA im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Isopropanol-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	180
Abbildung A-11. Trübungstemperaturen T_{Tr} im thermomorphen System aus 30-50% (v/v) $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ ($n= 2,3,4$) und 1-Octanol	182
Abbildung A-12. Trübungstemperaturen T_{Tr} im $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ -Octanol-TMS ($n = 2,3,4$) mit 25 mM Vinylacetat	182
Abbildung A-13. Trübungstemperatur T_{Tr} von 10-30% (v/v) Ammoeng TM 110 mit 100-1000 mM KPi.....	183
Abbildung A-14. Trübungstemperatur T_{Tr} im Ammoeng TM 110-KPi-TMS bei unterschiedlicher IL-Konzentration.....	183
Abbildung A-15. Einfluss des Substrates 1-Phenylethylacetat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im Ammoeng TM 110-TMS (30% (v/v) IL, 70% (v/v) 500 mM KPi).....	184
Abbildung A-16. Einfluss von BSA im Ammoeng TM 110-KPi-TMS (30% (v/v) IL, 70% (v/v) 500 mM KPi) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	184
Abbildung A-17. Parallelverschiebung der Trübungstemperatur T_{Tr} im Ammoeng TM 110-KPi-TMS bei Zugabe der Substrate Benzylalkohol und Acetaldehyd.....	185
Abbildung A-18. Einfluss von 20 mM des Substrates Benzylalkohol im Ammoeng TM 110-KPi-TMS (500 mM KPi) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	185
Abbildung A-19. Einfluss des Substrates und des Co-Faktor-Regenerators im Ammoeng TM 110-KPi-TMS (500 mM KPi) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	186
Abbildung A-20. Einfluss von BSA im Ammoeng TM 110-KPi-TMS mit Substrat und Cofaktor-Regenerator auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	186
Abbildung A-21. Trübungstemperaturen T_{Tr} im $[EMIm][NTf_2]$ -KPi-TMS mit dem Phasenvermittler Acetonitril (links) und DMSO (rechts) (50 mM KPi, pH 7,0).....	187
Abbildung A-22. Einfluss des Substrates 1-Phenylethylacetat im $[EMIm][NTf_2]$ -KPi-Acetonitril-/ $[EMIm][NTf_2]$ -KPi-DMSO-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	187
Abbildung A-23. Einfluss des Phasenvermittlers DMSO im $[EMIm][NTf_2]$ -NaPi-TMS (35% (v/v) IL, 30-45% (v/v) NaPi (50 mM, pH 7,0)) auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	188
Abbildung A-24. Das UCST-Phasenverhalten von $[BMIm][BF_4]$, H ₂ O und NaPi	190

Abbildung A-25. Trübungstemperatur T_{Tr} in Abhängigkeit von der IL-Konzentration im [BMIm][BF ₄]-NaPi-TMS.....	191
Abbildung A-26. Einfluss der Pufferkonzentration von NaPi auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im System mit 35% (v/v) [BMIm][BF ₄].....	191
Abbildung A-27. Parallelverschiebung der Trübungstemperatur T_{Tr}	192
Abbildung A-28. Einfluss von 10-100 mM Phenylethylacetat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} des [BMIm](BF ₄)-TMS.....	192
Abbildung A-29. Einfluss von BSA im [BMIm][BF ₄]-NaPi-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr}	193
Abbildung A-30. Das UCST-Phasenverhalten von [Bpy][BF ₄] und H ₂ O	193
Abbildung A-31. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms CaLB	194
Abbildung A-32. CaLB-Reaktion im organischen TMS 1 und TMS 2 bei 40 °C über 30 Stunden. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	196
Abbildung A-33. Anreicherung der IL-Phase über sechs Rezyklierungsläufe.....	197
Abbildung A-34. Einfluss von Acetat auf das ternäre System [BMIm][BF ₄], Wasser und NaPi.....	197
Abbildung A-35. Einfluss des Salzes Ammoniumsulfat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im System aus 50% (v/v) [BMIm][BF ₄] und 50% (v/v) Natriumacetat-Puffer (500 mM, pH 5,5).	198
Abbildung A-36. Einfluss des Substrates 2-Carboxyphenylphosphat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im System aus [BMIm][BF ₄] und NaAcPi 50:50.....	198
Abbildung A-37. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms ATA08 in verschiedenen Konzentrationen. (S = Proteinstandard SeeBlue®; D = NaPi (200 mM pH 8,0); E = ATA08 unverdünnt; A = 1:2 Verdünnung ATA08 in NaPi (200 mM, pH 8,0); B = 1:100 Verdünnung; C = 1:1000 Verdünnung; F = 1:10 Verdünnung.).....	199
Abbildung A-38. Die Temperaturabhängigkeit der volumetrischen Aktivität der ATA08 in 50 mM NaPi bei pH 8,0.....	199
Abbildung A-39. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms ATA08 in verschiedenen Medien. (S = Proteinstandard SeeBlue®, B = 5 mg ATA08 in 1 ml NaPi (200 mM, pH 8,0), A = 1:2 Verdünnung, C = ATA08 im 1PS des [EMIm][NTf ₂]-NaPi-DMSO-TMS, D = ATA08 in oberer TMS-Phase, E = ATA08 in unterer TMS-Phase).....	200
Abbildung A-40. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms saure Phosphatase (Typ IV-S) in verschiedenen Konzentrationen und Medien. (S = Proteinstandard SeeBlue®; A = 1,25 mg saure Phosphatase in 1 ml Natriumacetat-Puffer (0,1 M, pH 5,5); B = 2,5 mg saure Phosphatase in 1 ml Natriumacetat-Puffer (0,1 M, pH 5,5); C = Natriumacetat-Puffer pur; D = 2,5 mg saure Phosphatase im 1PS von [BMIm][BF ₄]-NaAcP-TMS; E = Enzym in oberer Phase des TMS; F = Enzym in unterer Phase des TMS)	200

Abbildung A-41. Die Temperatur-(links) und pH-Abhängigkeit (rechts) der sauren Phosphatase im Natriumacetat-Puffer (150 mM).....	201
Abbildung A-42. Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TPP106.....	201
Abbildung A-43. IR-Spektrum der reinen ionischen Flüssigkeit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	202
Abbildung A-44. Zusammensetzung von $[BMIm][BF_4]$ mit Natriumphosphat, Natriumacetat und Wasser für ein Reaktionssystem bei pH 7,0. Beurteilung der homogenen (1PS, gelb) und heterogenen Phasen (2PS, rot) bei 25 °C.	205

III Schemataverzeichnis

Schema 3-1. Synthese von [BMIm][BF ₄].....	6
Schema 3-2. Alkalische Phosphatase in Ethylammoniumnitrat. [Magnuson et al. 1984].....	14
Schema 3-3. Novozym 435 (immobilisierte CaLB) katalysierte enantioselektive Umesterung	16
Schema 3-4. Umesterung von Glucose nach KAZLAUSKAS et al. [Park und Kazlauskas 2001].....	16
Schema 3-5. Veresterung von L-Ascorbinsäure nach PARK et al. [Park et al. 2003].....	17
Schema 3-6. Reduktion von 2-Octanon in Puffer/ [BMIm][NTf ₂] mittels <i>Lb</i> -ADH mit Substrat-gekoppelter NADPH-Regeneration durch 2-Propanol. [Eckstein et al. 2004].....	18
Schema 3-7. System mit oberer kritischer Lösungstemperatur (links) und unterer kritischer Lösungstemperatur (rechts).	22
Schema 3-8. Phasendiagramm des ternären Lösungsmittelsystems aus Chloroform, Wasser und Essigsäure bei 25 °C und 1,013 bar. [entnommen aus Lüdecke und Lüdecke 2000a]	23
Schema 3-9. Orthogonale ternäre Phasendiagramme für ein hypothetisches System aus IL, Wasser und anorganischem Salz und Phasenvermittler (A) und für ein hypothetisches System aus IL, Wasser und anorganischen Salz (B) bei konstanter Temperatur und Druck.	25
Schema 3-10. Temperaturabhängigkeit der Binodalen. Die makroskopischen Auswirkungen sind auf der rechten Seite dargestellt.....	25
Schema 3-11. Hydrolyse des p-Nitrophenylpalmitats mittels Amano Lipase PS im TMS aus Hexanol-Methanol-Puffer bei 45 °C. [Behr et al. 2011].....	27
Schema 4-1. Schematische Darstellung der einzelnen Aspekte der entwickelten Reaktionssysteme.....	28
Schema 4-2. Prinzip der thermomorphen Lösungsmittelsysteme.....	29
Schema 4-3. Struktur der [N _{11n2(OH)}][NTf ₂]-IL, n = 1, 2, 3, 4, 5.....	53
Schema 4-4. Struktur der ionischen Flüssigkeit Ammoeng™110.....	63
Schema 4-5. Die Hofmeister-Reihe geordnet nach der Stärke des chaotopen Effekts der Anionen und Kationen. [Zhang und Cremer 2006]	71
Schema 4-6. Kinetische Racematspaltung des 1-Phenylethylacetats ((rac)-1-PEA) in reinem Puffer bei 40 °C mit Hilfe der CaLB.....	75
Schema 4-7. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) im Zweiphasensystem aus KPi (blau) und MTBE (gelb) bei 20 °C. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)	79
Schema 4-8. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den zwei Phasen des KPi-THF-Butanol-TMS (TMS 1) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: organische Phase, Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	81

Schema 4-9. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den zwei Phasen des KPi-Acetonitril-MTBE-TMS (TMS 2) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: organische Phase, Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)	82
Schema 4-10. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den zwei Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS (TMS 3) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	91
Schema 4-11. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den 2 Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS (TMS 4) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	91
Schema 4-12. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den 2 Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Acetonitril-TMS (TMS 5) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	92
Schema 4-13. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den 2 Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-DMSO-TMS (TMS 6) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	92
Schema 4-14. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den Phasen des TMS 7. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	99
Schema 4-15. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den zwei Phasen des Ammoeng™110-KPi-TMS bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	102
Schema 4-16. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den zwei Phasen des $[BMIm][BF_4]$ -NaPi-TMS bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	107
Schema 4-17. Reaktion von 1-Octanol mit dem Phasenvermittler und Substrat Vinylacetat im TMS11. .	111
Schema 4-18. Testreaktion von α -Methylbenzylamin und Pyruvat zu Acetophenon und Alanin mittels ATA08.....	114
Schema 4-19. Verteilung des α -Methylbenzylamin und Acetophenon in den Phasen des $[EMIm][NTf_2]$ -NaPi-DMSO-TMS. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)	117
Schema 4-20. Modellreaktion der sauren Phosphatase.....	119
Schema 4-21. Modellreaktion der ADH.....	122
Schema 4-22. Enzymatische Oxidation von Benzylalkohol zu Benzaldehyd mittels Pferdeleber-ADH ($T = 40$ °C, $pH 7,0$).....	123
Schema 4-23. Reaktion von Mandelonitril zu Benzaldehyd und Blausäure mittels MeHNL bei 35 °C und $pH 5,5$	125
Schema 4-24. Reaktion von Benzaldehyd zu (<i>R</i>)-Benzoin mittels TPP 106 bei 30 °C und $pH 7,5$	126
Schema 4-25. Laccase-vermittelte Oxidation von ABTS bei 30 °C.....	128
Schema A-1. Umsetzung von 4-Nitrophenylacetat zu 4-Nitrophenol mit CaLB liquid.....	153
Schema A-2. Die ionischen Flüssigkeiten Cholin-Dihydrogenphosphat und $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	196

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1. Übersicht wichtiger Anionen in ionischen Flüssigkeiten.....	5
Tabelle 3-2: Schmelzpunkte unterschiedlicher Chloride.....	7
Tabelle 3-3: Einfluss unterschiedlicher Anionen auf den Schmelzpunkt.....	7
Tabelle 3-4. Klassifizierung von Enzymen.....	10
Tabelle 4-1. Verwendete organische Lösungsmittel geordnet nach der $E_T(30)$ -Skala. [Reichardt und Welton 2011]	32
Tabelle 4-2. Wassergehalt ausgewählter ionischer Flüssigkeiten. (Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen)	41
Tabelle 4-3. Untersuchte ionische Flüssigkeiten mit Reinstwasser im Mischungsverhältnis 20:80. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen zwischen 0 und 99 °C.....	42
Tabelle 4-4. Bestimmung der Brechungsindizes n von dest. Wasser, 1-Octanol, $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ sowie $[N_{1152(OH)}][NTf_2]$ (Dreifachbestimmung) und Vergleich mit Literaturwerten.	49
Tabelle 4-5. Untersuchung des Phasenverhalten der $[BMIm][BF_4]$ -Wasser-Mischung bei Zugabe von Natriumphosphat-Salzen (NaPi). Beurteilung der homogenen (-) und heterogenen (+) Phasen bei 25 °C.	51
Tabelle 4-6. Zusammensetzung der organischen TMS 1 und 2 mit Angabe der Trübungstemperaturen T_{Tr}	81
Tabelle 4-7. Zusammensetzung der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS 3 bis 6.	85
Tabelle 4-8. Raum-Zeit-Ausbeute und Stereoselektivität der CaLB im TMS 4 bei variierender Temperatur.	89
Tabelle 4-9. Raum-Zeit-Ausbeute der CaLB in der kinetischen Racematspaltung von 1-PEA mit veränderlicher Enzymkonzentration im TMS 3.	90
Tabelle 4-10. Zusammensetzung der TMS 7 und TMS 8.	97
Tabelle 4-11. Zusammensetzung des Ammoeng™110-TMS.	100
Tabelle 4-12. Zusammensetzung des $[BMIm][BF_4]$ -NaPi-TMS.	104
Tabelle 4-13. Charakterisierung von verschiedenen IL-NaPi-Wasser-Systemen	109
Tabelle 4-14. Zusammensetzung des $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ -Octanol-TMS.	111
Tabelle 4-15. Raum-Zeit-Ausbeute und Enantiomerenüberschüsse der TMS 1 – 11 und B-F im Vergleich zu klassischen Reaktionssystemen für die CaLB.	113
Tabelle 4-16. Zusammensetzung des TMS 12.	116
Tabelle 4-17. Zusammensetzung der TMS 13 und TMS 14.	118
Tabelle 4-18. Zusammensetzung des TMS 15.	120
Tabelle 4-19. Modifizierte TMS (mTMS) für ADH-katalysierte Reaktionen.	122
Tabelle 4-20. Zusammensetzung der TMS 16 und TMS 17.	125

Tabelle 4-21. Zusammensetzung der TMS 18 und TMS 19.....	126
Tabelle 4-22. Zusammensetzung der TMS 20 bis TMS 22 für die Laccase-katalysierte Oxidationsreaktion.	
.....	127
Tabelle A-1. Übersicht verwendeter ionischer Flüssigkeiten.....	132
Tabelle A-2. Übersicht verwendeter Enzyme.....	133
Tabelle A-3. Übersicht verwendeter Hilfschemikalien.....	134
Tabelle A-4. Übersicht verwendeter Geräte.....	134
Tabelle A-5. Zusammensetzung der TMS für die Rezyklierungsversuche.....	139
Tabelle A-6. Zusammensetzung des TMS 4 zur Isolierung des Reaktionsproduktes.....	140
Tabelle A-7. Einwaagen und pH-Werte der hergestellten Pufferlösungen.....	141
Tabelle A-8. Einwaagen der Salzstammlösungen.....	142
Tabelle A-9. Zusammenfassung der untersuchten organischen Lösungsmittel für thermomorphe Lösungsmittelsysteme unterteilt in polar - nicht polar - semi-polar.....	144
Tabelle A-10. Verwendete ionische Flüssigkeiten sowie verschiedene Lösungsmittel für das Screening nach IL-basierten thermomorphen Lösungsmittelsystemen.....	145
Tabelle A-11. Verwendete (organische) Lösungsmittel als Phasenvermittler, geordnet nach ihrer Polarität.	
.....	147
Tabelle A-12. Genutzte Enzyme mit den zugehörigen optimalen Reaktionstemperaturen.....	149
Tabelle A-13. Zugesetztes Salz zu den jeweiligen Lösungsmittelsystemen.....	149
Tabelle A-14. Reaktionsmedium und chemische Verbindungen der simulierten Reaktionen bei optimalen pH-Werten.....	149
Tabelle A-15. Abschätzung der Probeneinwaage zur Bestimmung des Wassergehaltes mittels 831 KF Coulometer.....	150
Tabelle A-16. Zusammensetzung des TMS 11 zur Bestimmung der Wasseraktivität.....	150
Tabelle A-17. Ergebnisse der Messungen zur Wasseraktivität am AW SPRINT TH-500.....	150
Tabelle A-18. Zusammensetzung der IL-basierten TMS für die 1D-Gelelektrophorese.....	151
Tabelle A-19. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der <i>Candida antarctica</i> Lipase B.....	154
Tabelle A-20. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der Amintransferase ATA08.....	155
Tabelle A-21. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenasen <i>Lb</i> -ADH und <i>Lk</i> -ADH.....	155
Tabelle A-22. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase.....	156

Tabelle A-23. Zusammensetzungen und Messparameter zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Enzyme.....	157
Tabelle A-24. Zusammensetzungen und Messparameter zur Bestimmung der <i>pH</i> -Wert-Abhängigkeit der Enzyme.....	157
Tabelle A-25. Verwendete Konzentrationen und Volumina für die Kalibrierfunktion der Proteinbestimmung.....	158
Tabelle A-26. Verdünnung der Enzymlösungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD.....	159
Tabelle A-27. Zusammensetzung der Vials zur Bestimmung der Enzymkonzentration in der IL-Phase..	159
Tabelle A-28. Mischbarkeit der verwendeten Lösungsmittel bei T = 25 °C. + mischbar, - nicht mischbar.....	161
Tabelle A-29. Ordnung der verwendeten Lösungsmittel nach polar – semi-polar - unpolar, $E_T(30)$ -Werte nicht dargestellt.....	163
Tabelle A-30. Untersuchte organische Lösungsmittel mit Kaliumphosphat-Puffer im Mischungsverhältnis 20:40:40% (v/v). Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen zwischen 20 °C und 60 °C.....	163
Tabelle A-31. Mischung von 40% (v/v) KPi und 50% (v/v) Tetrahydrofuran mit einer Auswahl semi-polarer organischer Lösungsmittel. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.	165
Tabelle A-32. Mischung von 40% (v/v) KPi und 10-50% (v/v) MTBE mit einer Auswahl semi-polarer organischer Lösungsmittel. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.	165
Tabelle A-33. Phasenverhalten der $[N_{11n2}(OH)][NTf_2]$ -IL in der Mischung mit Kaliumphosphat-Puffer und polaren bis semi-polaren Lösungsmitteln als Phasenvermittler. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.....	168
Tabelle A-34. Phasenverhalten Ammonium-basierter ILs in der Mischung mit Kaliumphosphat-Puffer und polaren bis semi-polaren organischen Lösungsmitteln als Phasenvermittler. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogen (2PS) Phasen.....	169
Tabelle A-35. Phasenverhalten Ammonium-basierter ILs in der Mischung mit nicht polaren bis semi-polaren organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen. 170	170
Tabelle A-36. Vergleich der Mischbarkeit der $[NTf_2]$ -basierten ILs mit Alkoholen. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.....	171
Tabelle A-37. Phasenverhalten ionischer Flüssigkeiten mit $[BF_4]$ -Anion in der Mischung mit polaren bis unpolaren Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.	172

Tabelle A-38. Phasenverhalten einer wasserlöslichen ($[EMIm][EtSO_4]$) und einer wasserunlöslichen ($[EMIm][NTf_2]$) Imidazolium-basierten IL. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.....	173
Tabelle A-39. Phasenverhalten Imidazolium-basierter ionischer Flüssigkeiten in der 3-Komponenten-Mischung mit Kalumphosphatpuffer und polaren bis unpolaren organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.....	174
Tabelle A-40. Phasenverhalten untersuchter ILs in der 3-Komponenten-Mischung mit organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.....	175
Tabelle A-41. Charakterisierung von verschiedenen IL-NaPi-Wasser-Systemen	176
Tabelle A-42. Experimentelle Werte der freien Hydratisierungenthalpie ΔG_{hyd}	177
Tabelle A-43. Das Phasenverhalten von $[N_{11n_2(OH)}][NTf_2]$ in der Mischung mit Alkoholen. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen zwischen 20 und 60 °C.....	180
Tabelle A-44. $[EMIm]$ -basierte ionische Flüssigkeiten in der Mischung mit unpolaren bis polaren organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.	189
Tabelle A-45. Phasenverhalten des $[EMIm][NTf_2]$ in der Mischung mit gängigen organischen Lösungsmitteln, geordnet nach der elutropen Reihe.....	190
Tabelle A-46. Aktivität der untersuchten Lipasen in der Umsetzung von <i>p</i> -Nitrophenylacetat bei 30 °C und pH 7,0 in 50 mM Kalumphosphat-Puffer (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen).	194
Tabelle A-47. Die volumetrische Aktivität von CaLB in verschiedenen Medien bei 30 °C (Mittelwerte aus Fünffachbestimmung).	195
Tabelle A-48. Zusammensetzung der RMS 1 und RMS 2.....	205
Tabelle A-49. Zusammensetzung der RMS 3 und RMS 4.....	206

V Verwendete Abkürzungen

(R)-PE	(R)-1-Phenylethanol
(R)-PEA	(R)-1-Phenylethylacetat
(S)-PE	(S)-1-Phenylethanol
(S)-PEA	(S)-1-Phenylethylacetat
1-PE	(rac)-1-Phenylethanol
1-PEA	(rac)-1-Phenylethylacetat
1PS	1-Phasensystem (homogenes Gebiet)
2PS	2-Phasensystem (heterogenes Gebiet)
2-CPP	2-Carboxyphenylphosphat
4-NPA	4-Nitrophenylacetat
α -MBA	α -Methylbenzylamin
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)Diammoniumsalz
ADH	Alkoholdehydrogenase
APase	Acid Phosphatase, dt.: Saure Phosphatase
Asp	Asparaginsäure
ATA	Aminotransaminase
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderalbumin)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CaLB	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
ϵ	Dielektrizitätskonstante
ee	Enantiomerenüberschuss
etc.	<i>et cetera</i> , und die übrigen (Dinge)
GC	Gaschromatografie
His	Histidin
HLLE	homogeneous liquid-liquid extraction (homogene Flüssig-Flüssig-Extraktion)

HNL	Hydroxynitrillyase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IL(s)	Ionische Flüssigkeit(en)
KPi	Kaliumphosphatpuffer
min	Minuten
NaAcP	Natriumacetatpuffer
NaPi	Natriumphosphatpuffer
Nr.	Nummer
o. g.	oben genannten
PDB	Protein Data Bank, www.rcsb.org
RMS	Reactiomorphes System
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
Ser	Serin
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Thermomorphes System
$T_{\text{Sdp.}}$	Siedepunkt
$T_{\text{Smp.}}$	Schmelzpunkt
T_{Tr}	Trübungstemperatur (engl. <i>cloud point temperature</i>)
u. a.	unter anderen, unter anderem
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i> , gegen(übergestellt)
WR	Wiederfindungsrate
z. B.	zum Beispiel

VI Maßeinheiten

Die in dieser Arbeit verwendeten Maßeinheiten entsprechen den Einheiten im Internationalen Maßeinheitensystem (SI) gültigen Maßeinheiten. Aufgeführt sind im Folgenden alle abweichenden Einheiten und deren Umrechnungen.

Å	Ångström, $1 \text{ \AA} = 1 \cdot 10^{-10} \text{ m}$
°C	Grad Celsius, $\{\theta\}_{\text{C}} = \{T\}_{\text{K}} - 273.15$
l	Liter, $1 \text{ l} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$
min	Minuten, $1 \text{ min} = 60 \text{ s}$
M	Molar, $1 \text{ M} = 1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$
rpm	Rotationen pro Minute
% (w/w)	Massenanteil, $w_i = m_i / (m_i + m_j)$
% (v/v)	Volumenanteil, $V_i = V_i / (V_i + V_j)$
Da	Atomare Masseneinheit, $1 \text{ Da} = 1 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot N_A^{-1}$

1 Einleitung

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit organischen Lösungsmitteln ist die am häufigsten verwendete Methode für die Gewinnung von Produkten nach biokatalytischen Prozessen. [Behr et al. 2016] Durch das gestiegene Bewusstsein für Gefahren, Umwelt- und Gesundheitsrisiken in der chemischen Industrie, die vor allem von diesen organischen Lösungsmitteln ausgehen, ist das Interesse an alternativen Lösungsmittelkonzepten größer denn je. Es werden immer mehr Strategien für die Reaktionsführung und Produktgewinnung auf Grundlage grüner chemischer Prozesse entwickelt; diese führten seit Ende des letzten Jahrhunderts auch zu den weltweit intensiv erforschten ionischen Flüssigkeiten (engl.: *ionic liquids*; Abk.: IL). ILs werden in vielen Bereichen heute bereits technisch eingesetzt und die Produktion einiger Vertreter dieser Stoffklasse, die größtenteils der Familie der Imidazoliumsalze angehören, übersteigt eine Tonne pro Jahr. [Anderson et al. 2002; Plechkova und Seddon 2008; Petkovic et al. 2011] Zudem konnte bspw. für das BASIL-Verfahren von BASF eine deutlich verbesserte Ökoeffizienz gegenüber dem traditionellen Säurefängerprozess nachgewiesen werden, wodurch der industrielle Einsatz von ILs nicht nur wirtschaftliche Vorteile, sondern auch Umweltentlastungspotenzial hat. [Hofer et al. 2009; Anastas 2010] Seit fast 20 Jahren wächst die Attraktivität der ionischen Flüssigkeiten als alternatives Lösungsmittel auch für biokatalytische Reaktionen (siehe Abbildung 1-1).

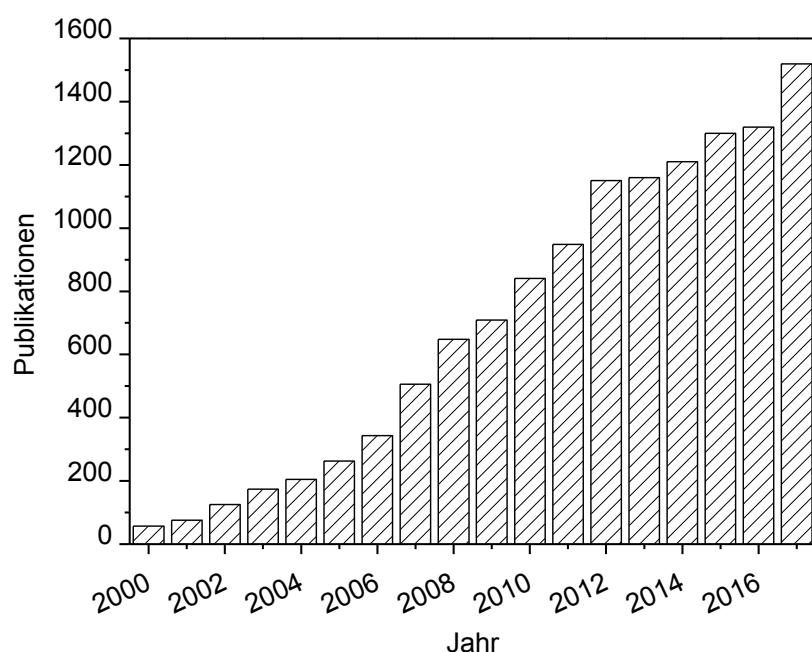


Abbildung 1-1. Anzahl der Publikationen über "Biokatalyse in ionischen Flüssigkeiten" seit 2000 bis 2017.
[Scopus Suche nach *biocatalysis in ionic liquids*; letzte Aktualisierung 08/2018]

Die inhärenten Vorteile von ILs hinsichtlich der Lösungsmittelleigenschaften und ihrer Fähigkeit, während der katalytischen Reaktion eine ausgezeichnete Mikroumgebung für Enzyme bereitzustellen, reichen jedoch nicht aus, um ihre Übertragung auf die effiziente Produktgewinnung zu garantieren. Wünschenswert wäre es daher ein Lösungsmittelsystem zu entwickeln, das eingangs einen optimalen Substratumsatz generiert und anschließend eine einfache Extraktion der Produkte mit der höchstmöglichen Reinheit sowie die gleichzeitige Wiedergewinnung des Biokatalysators und der IL für den erneuten Einsatz gewährleistet.

2 Zielsetzung und Motivation

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Lösungsmittelsysteme auf der Basis von Wasser, ILs, organischen Lösungsmitteln sowie organischen und anorganischen Salzen zu entwickeln, die eine temperaturabhängige Mischungslücke aufweisen, sie auf die Bedürfnisse biokatalytischer Reaktionen abzustimmen und den Einfluss des Mediums auf die Aktivität, Stabilität, Selektivität, die Rezyklierbarkeit der Enzyme und der IL sowie auf den Extraktionserfolg der Produkte zu untersuchen. Dieses sogenannte Medien-Engineering ist eine sinnvolle Alternative zum aufwendigen Protein-Engineering und ein vielversprechender Ansatz, um die Effizienz und Stabilität von Enzymen für den Einsatz in der organischen Synthese und damit auch für die industrielle Nutzung zu verbessern. Die Biokatalyse in alternativen Lösungsmitteln bringt zudem einige Vorteile mit sich [Carrea et al. 1995; Carrea und Riva 2000]:

- i. Wechsel in der Solvatation kann die Gleichgewichtslage und die Kinetik positiv beeinflussen
- ii. enzymkatalysierte Reaktionen, die in Wasser zurückgedrängt wurden, werden möglich wie z.B. die Umkehr hydrolytischer Reaktionen zugunsten der Synthese
- iii. durch Wasser induzierte Nebenreaktionen, wie bspw. die Sekundärhydrolyse von Produkten, können umgangen werden
- iv. hydrophobe Substrate werden besser gelöst
- v. bestimmte Produkte lassen sich leichter isolieren
- vi. der unlösliche Biokatalysator kann leichter zurückgewonnen werden
- vii. die Thermostabilität des Biokatalysators ist bei niedrigen Wassergehalten höher
- viii. die Enzymselektivität kann beeinflusst oder sogar umgekehrt werden
- ix. bessere Integrationsmöglichkeiten enzymatischer Reaktionen in die chemische Synthese

Anhand ausgewählter Reaktionsbeispiele mit Hilfe von Biokatalysatoren aus den Enzymklassen 1 (Oxidoreduktasen), 2 (Transferasen), 3 (Hydrolasen) und 4 (Lyasen) soll die Anwendbarkeit der neuartigen IL-basierten thermomorphen Lösungsmittelsysteme gezeigt werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Ionische Flüssigkeiten

ILs sind Salze, in denen die Ionen so schwach koordiniert sind, dass diese Verbindungen unter 100 °C oder sogar bei Raumtemperatur (*Raumtemperatur ionische Flüssigkeiten*, engl.: *room temperature ionic liquids*, RTILs) flüssig sind. Hierzu sind delokalisierte Ladungen nötig und mindestens ein Ion basierend auf einem organischen Molekül, um die Bildung eines stabilen Kristallgitters zu unterbinden. Es genügt daher bereits eine geringe thermische Energie, um die Gitterenergie zu überwinden und die feste Kristallstruktur aufzubrechen. [Fukumoto und Ohno 2007; Oppermann et al. 2011] Abhängig von ihrer Struktur weisen ILs attraktive und einzigartige physikochemische Eigenschaften auf. Dazu zählen u. a. vernachlässigbarer Dampfdruck [Earle et al. 2006], hohe chemische und thermische Stabilität [Kosmulski et al. 2004], hohe Ionenleitfähigkeit und großes elektrochemisches Fenster [Armand et al. 2009] sowie hohe Löslichkeit anorganischer und organischer Verbindungen [Anderson et al. 2002]. Darüber hinaus können die weiteren physikochemischen Eigenschaften wie Viskosität, Hydrophobie, Dichte und Löslichkeit von ILs durch verschiedene Kombinationen von Kationen und Anionen sowie Substituenten abgestimmt werden, um die ILs den spezifischen Anforderungen anzupassen. [Seddon 1997] Aus den genannten Gründen werden sie auch als "Designer-Solvents" bezeichnet und mit den Begriffen „saubere Chemie“ und „Green Chemistry“ in Verbindung gebracht. [Kohno et al. 2015]

3.1.1 Die Entwicklung ionischer Flüssigkeiten

Die Verbindung Ethylammoniumnitrat mit einem Schmelzpunkt von 12 °C als erste IL wurde im Jahr 1914 von Paul Walden beschrieben. [Walden 1914] Dem Potential dieser Substanzklasse wurde jedoch 70 Jahre lang keine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Lediglich Elektrochemiker bspw. in Hinblick auf die Anwendung in Hochleistungsbatterie-Systemen beschäftigten sich mit den Eigenschaften der ILs. [Hurley und Wler 1951] Erst zu Beginn der 80er Jahre begannen HUSSEY, OSTERYOUNG und WILKES mit der Synthese und Charakterisierung von Chloroaluminatschmelzen sowie deren Nutzung in der Elektrochemie und als nicht-wässrige, polare Lösungsmittel zur Untersuchung von Übergangsmetallkomplexen. [Wilkes et al. 1982] Die ersten Publikationen, in denen ILs als neue Reaktionsmedien und Katalysatoren für die organische Synthese beschrieben wurden, erschienen einige Jahre später; acide ILs mit Chloroaluminat-Ionen erwiesen sich beispielsweise als effektive Friedel-Crafts-Katalysatoren. [Earle et al. 1998] Diese Schmelzen hatten jedoch den Nachteil der extrem hohen Hydrolyseempfindlichkeit, so dass hydrolysestabilere, niedrig viskose ILs, die bei Raumtemperatur flüssig sind, gesucht wurden. [Wilkes und Zaworotko 1992] Dies kennzeichnete den Beginn der modernen Erforschung der ionischen Flüssigkeiten. [Wilkes 2002] Nach und nach widmeten sich immer mehr

Arbeitsgruppen der Synthese von luft- und wasserstabilen ILs basierend auf 1-Alkyl-3-methylimidazolium- bzw. 1,4-Dialkylpyridinium-Ionen (Abbildung 3-1). [Howlett et al. 2004; Fuller 1997]

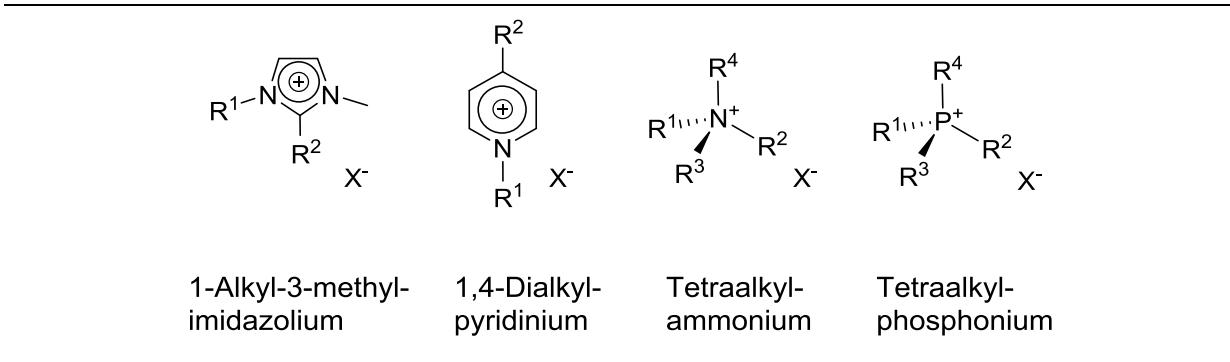


Abbildung 3-1. Übersicht wichtiger Kationen in ILs. [van Rantwijk und Sheldon 2007]

Diese bei Raumtemperatur flüssigen Verbindungen kombinierten hydrolysestabilere Anionen wie Tetrafluoroborat, Hexafluorophosphat, Nitrat, Sulfat und Acetat mit den heteroaromatischen Kationen. [Wilkes und Zaworotko 1992] Erstmals war mit diesen ILs eine einfache Handhabung der Schmelze ohne Schutzgasatmosphäre möglich und die neuen Systeme wurden schon bald erfolgreich als Medien in Reaktionen wie der Rhodium-katalysierten Hydrierung von Alkenen oder in nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktionen eingesetzt. [Seddon 1997; Holbrey und Seddon 1999a; Zhao et al. 2002; Newington et al. 2007] Mit der Entwicklung der neuen Generation von wasserstabilen ILs von Wasserscheid und Welton, die eine gute bis sehr gute Hydrolysestabilität mit interessanten physikochemischen Eigenschaften der resultierenden Schmelzen kombinierten, wurde das Spektrum an Möglichkeiten nochmals erweitert und umfangreich erforscht. [Wasserscheid und Welton 2008a]

Es wird geschätzt, dass es etwa 10^{18} verschiedene Kombinationsmöglichkeiten unterschiedlicher Kationen und Anionen gibt. [Rogers 2003] Eine Übersicht über wichtige Anionen in ILs bietet Tabelle 3-1.

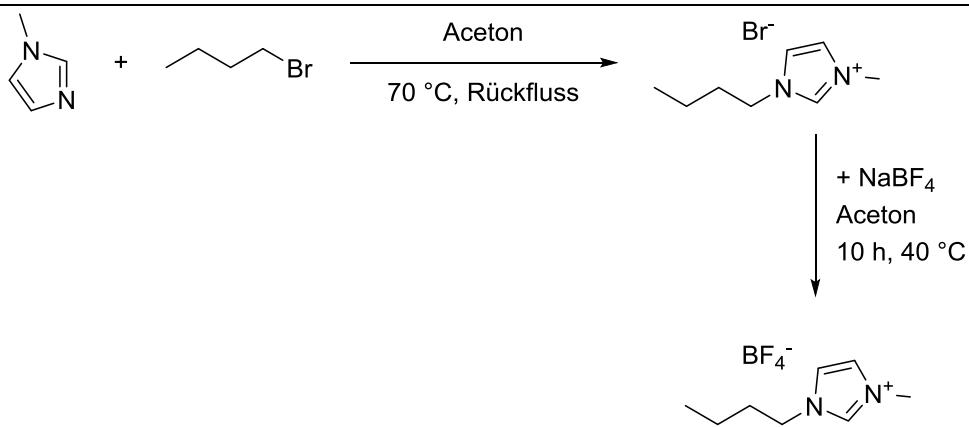
Tabelle 3-1. Übersicht wichtiger Anionen in ionischen Flüssigkeiten. [van Rantwijk und Sheldon 2007]

Name	Abkürzung	X-
Tetrafluoroborat	[BF ₄]	BF ₄ ⁻
Hexafluorophosphat	[PF ₆]	PF ₆ ⁻
Trifluormethylsulfonyl	[Otf]	CF ₃ SO ₃ ⁻
Bis(trifluoromethylsulfonyl)imid	[NTf ₂]	(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻
Methansulfonat	[MeSO ₃]	CH ₃ SO ₃ ⁻
Heptylsulfonat	[HpSO ₃]	n-C ₇ H ₁₅ SO ₃ ⁻
Tosyl	[TsO]	p-CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₃ ⁻
Methylsulfat	[MeSO ₄]	CH ₃ OSO ₃ ⁻

Dihydrogenphosphat	$[\text{H}_2\text{PO}_4]$	$(\text{HO})_2\text{PO}_2^-$
Acetat	$[\text{AcO}]$	CH_3COO^-
Nitrat	$[\text{NO}_3]$	NO_3^-
Chlorid	$[\text{Cl}]$	Cl^-
Bromid	$[\text{Br}]$	Br^-
Glycin	$[\text{GlyO}]$	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^-$

Die Nomenklatur ionischer Flüssigkeiten ist durch die IUPAC festgelegt. Allerdings sind die Namen oftmals von erheblicher Länge, weshalb Abkürzungen benutzt werden, die in der Literatur jedoch bis heute nicht einheitlich sind. Tabelle A-1 im Anhang zeigt die in dieser Arbeit verwendeten ILs und die gewählten Abkürzungen.

Die Synthese von ILs besteht meistens aus der Quaternisierung eines Amins oder Phosphans (vgl. Schema 3-1). Je nach verwendetem Alkylierungsreagenz können hierbei quartäre Salze mit unterschiedlichen Anionen erhalten werden, die bereits Schmelzpunkte unterhalb von 100 °C aufweisen. In einem zweiten Schritt können die Anionen variiert werden. Entweder kann das Anion, z. B. ein Halogenid, mit einer Lewis-Säure umgesetzt werden - es bildet sich eine IL in der Form eines Kation-Lewis-Säure-Adduktes. Oder alternativ ist ein Halogenaustausch gegen das gewünschte Anion denkbar. Dies kann z. B. durch die Zugabe eines Metallsalzes, über einen Ionenaustauscher oder durch Verdrängung des Anions durch starke Säuren geschehen. [Wasserscheid und Keim 2000] Die Synthese der verwendeten ILs ist in Kapitel A.2.4 dargestellt.



Schema 3-1. Synthese von [BMIm][BF₄]. [Dharaskar et al. 2013]

3.1.2 Die besonderen Eigenschaften ionischer Flüssigkeiten

Die Besonderheit, dass ILs ausschließlich aus Ionen bestehen, findet sich in den physikalischen Eigenschaften wieder. Über den gesamten Flüssigkeitsbereich bis hin zum Zersetzungspunkt weisen ILs einen sehr niedrigen Dampfdruck auf. Dieser lässt sich mit dem Dampfdruck flüssiger Metalle

vergleichen. [Freyland 2011] Gerade diese Eigenschaft macht sie für viele Anwendungen interessant, da anders als bei gängigen organischen Lösungsmitteln keine Verdunstung erfolgt. In den frühen 2000'ern gab es jedoch einige Publikationen, in denen gerade diese grundlegende Eigenschaft relativiert wurde. So stellten REBELO *et al.* fest, dass bestimmte ILs, vor allem welche ein $[NTf_2]$ -Anion enthalten, bei Temperaturen zwischen 200 °C und 300 °C im Hochvakuum destilliert werden können. [Rebelo *et al.* 2005] Kurz zuvor berichteten MACFARLANE *et al.* über die Destillierbarkeit der aus Kohlendioxid und Dimethylamin synthetisierten protischen ionischen Flüssigkeit DIMCARB wegen ihrer leichten thermischen Zersetzung. [Kreher *et al.* 2004; Bhatt *et al.* 2006] Die meisten ILs sind wegen des vernachlässigbaren Dampfdruckes nicht brennbar und aufgrund der ausgeprägt ionischen Struktur elektrisch leitfähig. [Wasserscheid und Welton 2008b]

Das wichtigste Definitionskriterium ionischer Flüssigkeiten ist ihr niedriger Schmelzpunkt. Zu den Faktoren, die die physikochemischen Eigenschaften einer IL beeinflussen, gehören die Größe (und damit die Masse), die Symmetrie, die Ladungsverteilung und die Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung der jeweiligen Ionen. In Tabelle 3-2 sind die Schmelzpunkte unterschiedlicher Chloride zu finden. Während die Alkalichloride hohe Schmelzpunkte aufweisen, finden sich bei den Chloriden mit organischen Kationen deutlich geringere Werte. Erklären lassen sich die niedrigeren Schmelzpunkte durch die niedrige Symmetrie, geringe intermolekulare Wechselwirkung (etwa durch die Abwesenheit von Wasserstoffbrückenbindungen) und gute Ladungsverteilung (z.B. durch Delokalisation) der Kationen. [Wasserscheid und Keim 2000]

Tabelle 3-2: Schmelzpunkte unterschiedlicher Chloride.
[Wasserscheid und Keim 2000]

Salz	$T_{Smp.}$ [°C]
NaCl	803
KCl	772
R = R' = Me ($[MMIm][Cl]$)	125
R = Me, R' = Et ($[EMIm][Cl]$)	87
R = Me, R' = nBu ($[BMIm][Cl]$)	65



Tabelle 3-3: Einfluss unterschiedlicher Anionen auf den Schmelzpunkt von Imidazoliumsalzen. [Wasserscheid und Keim 2000]

Imidazoliumsalz	$T_{Smp.}$ [°C]
$[\text{EMIm}][\text{Cl}]$	87
$[\text{EMIm}][\text{NO}_2]$	55
$[\text{EMIm}][\text{NO}_3]$	38
$[\text{EMIm}][\text{AlCl}_4]$	7
$[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$	6
$[\text{EMIm}][\text{CF}_3\text{SO}_3]$	-9
$[\text{EMIm}][\text{CF}_3\text{CO}_2]$	-14

Auch die in ILs verwendeten Anionen haben einen Einfluss auf die Schmelzpunkte. In Tabelle 3-3 sind die unterschiedlichen Schmelzpunkte am Beispiel verschiedener [EMIm]-Salze dargestellt. Es ist festzustellen, dass eine Vergrößerung des Anions bei gleicher Ladung zu einer Schmelzpunktterniedrigung führt. [Wasserscheid und Keim 2000]

ILs werden aufgrund ihrer ionischen Natur in der Regel als hochpolar betrachtet. [Reichardt 2005] Die Lösungsmittelpolarität, die nicht mit der Hydrophilie zu verwechseln ist, ist ein komplexes Konzept und wurde durch eine Vielzahl von Methoden untersucht [Theodor und Carriere 1975; Reichardt 2005] – jedoch konnte bis heute keine universelle Skala definiert werden. Die Neigung von Lösungsmitteln, eine Ladung zu stabilisieren, wird normalerweise aus dem Absorptionsmaximum eines solvatochromen Farbstoffs, wie beispielsweise Nilrot [Deye et al. 2002], Reichardt-Farbstoff [Reichardt 2005] oder unter Verwendung einer Fluoreszenzsonde bestimmt. [Soujanya et al. 1992] So konnten die Polaritäten der gebräuchlichen ILs, wie das [BMIm][BF₄]⁻, den Werten im Bereich der kurzkettigen Alkohole oder Formamid zugeordnet werden. [Kamlet et al. 1983; Muldoon et al. 2001] Eine solvatochromatische Untersuchung für die Nucleophilie von Anionen deutet darauf hin, dass die häufig verwendeten [PF₆]⁻ und [NTf₂]⁻-Anionen viel weniger nucleophil sind und damit implizit weniger "polar" als die kurzkettigen Alkohole. [Reichardt 1994; Oehlke et al. 2006]

Das Konzept der Lösungsmittelpolarität hat sich bei molekularen Lösungsmitteln als nützlich erwiesen, da die Ergebnisse, die auf chemischer Intuition und physikalisch organischer Chemie basieren, gut übereinstimmen. Bei ILs hingegen scheint das Polaritätskonzept zu komplex, um bspw. das Löslichkeitsverhalten oder die Reaktionsgeschwindigkeit vorherzusagen. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Wechselwirkungen ionischer Flüssigkeiten mit den gelösten Stoffen einem dualen Wechselwirkungsmodell gehorchen; d.h., ILs verhalten sich wie ein unpolares Lösungsmittel bei unpolaren Verbindungen, zeigen jedoch einen polaren Charakter in Anwesenheit von polaren Stoffen. [Dupont et al. 2002; Dupont 2004]

Eine umfassende Datenbank zu physikalischen Eigenschaften von ILs wie Schmelzpunkt, Dichte und Viskosität wurde von ZHANG und Mitarbeitern [Zhang et al. 2006] vorgestellt und in die Fachliteratur übernommen [Wasserscheid und Welton 2008b]. Andere Lösungsmitteleigenschaften in Bezug auf Polarität, Hydrophobizität und Lösungsmittelmischbarkeitsverhalten der ILs wurden in der Literatur ebenfalls bereits für spezifische Anwendungen beschrieben [Bonhôte et al. 1996; Huddleston et al. 2001; Tokuda et al. 2006; Singh et al. 2014; Vogl et al. 2016].

All diese interessanten Kombinationen von Eigenschaften eröffneten den Weg für eine Vielzahl von Anwendungen, beispielsweise Extraktionen [Visser et al. 2001; Pena-Pereira und Namieśnik 2014],

Trennungsprozesse [Anderson und Armstrong 2005; Claus et al. 2018], Nanomaterialsynthese [Antonietti et al. 2004; Zhou 2005; Bandomir et al. 2014], organische Synthese [Muzart 2006; Pârvulescu und Hardacre 2007; Hardacre und Parvulescu 2014] und enzymatische Reaktionen [Cull et al. 2000; Kragl et al. 2002a; Kragl et al. 2002b; Park und Kazlauskas 2003; van Rantwijk et al. 2003; Yang und Pan 2005; Moon et al. 2006; Patel et al. 2014].

Aufgrund der genannten Charakteristika werden ILs seit einiger Zeit als vielversprechende Substitute für leicht flüchtige, entzündliche oder giftige organische Lösungsmittel diskutiert. [Welton 1999; Rogers und Seddon 2002; Earle et al. 2006; Wasserscheid und Welton 2008b; Ventura et al. 2012; Smiglak et al. 2014] Mit dem Basil™-Verfahren zum Abfangen von Säuren bei der chemischen Synthese von Phosphorverbindungen fand bei der BASF der erste industrielle Prozess mit einer IL Anwendung. [Maase 2004]

ROGERS *et al.* postulierten, dass ILs in den nächsten zehn Jahren in vielen Anwendungen wiederzufinden sein werden, in denen bisher organische Lösungsmittel zum Einsatz kamen. Vermutet wird, dass der Markt für ionische Flüssigkeiten voraussichtlich von 10000 Tonnen 2014 auf etwa 52000 im Jahr 2022 steigen wird. [<https://www.gminsights.com/industry-analysis/ionic-liquids-market-report>, Zugriff: 02/2018] In diesem Zusammenhang spielen Flüssig-Flüssig-Extraktionsverfahren in jüngster Zeit insbesondere bei der Gewinnung und Aufreinigung von Biomolekülen aufgrund der steigenden Nachfrage nach biotechnologisch hergestellten Feinchemikalien eine entscheidende Rolle. [Wasserscheid und Welton 2008b]

3.2 Biokatalysatoren

Enzyme (griech.: en zyme - in der Hefe, im Sauerteig), früher auch Fermente (lat.: fermentum - Sauerteig) genannt, sind Makromoleküle mit einem Molekulargewicht zwischen 10.000 und 4.000.000 Da. [Bisswanger 2015] Fast alle Enzyme sind Proteine und üben wichtige Funktionen im Stoffwechsel von Organismen aus. Als natürlich vorkommende Copolymeren sind sie aus Polypeptidketten aufgebaut, die sich in der Regel aus 20 verschiedenen Aminosäuren als Monomere zusammensetzen. Die Aminosäuresequenz der Polypeptidketten ist genetisch festgelegt und wird als Primärstruktur bezeichnet. Sie ist ihrerseits verantwortlich für die Faltung der Polypeptidketten unter Ausbildung der Sekundärstruktur (typische Formen sind die α -Helix und das β -Faltblatt) sowie der Tertiärstruktur (die Verknäuelung der einzelnen Proteinmoleküle) und somit für die dreidimensionale Struktur des Enzyms. Darüber hinaus besitzen Enzyme, die aus mehreren Polypeptidketten bestehen, eine Quartärstruktur, die durch eine hohe Anzahl intermolekularer Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, Disulfidbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte) zwischen den einzelnen Untereinheiten hervorgerufen

wird. [Turner 2009] In ihrer Funktion als Biokatalysatoren setzen Enzyme die Aktivierungsenergie chemischer Reaktionen herab und erhöhen auf diese Weise die Reaktionsgeschwindigkeit. [Bisswanger 2015] Wie alle in der Natur vorkommenden Proteine sind Enzyme ausschließlich aus L-Aminosäuren aufgebaut; das aktive Zentrum eines Enzyms stellt demnach eine chirale Umgebung dar. Dort wechselwirken die räumlich benachbarten funktionellen Aminosäurereste spezifisch mit dem Substrat, indem sie die Chiralität des Substrates erkennen bzw. die Chiralität auf das Substrat übertragen. [Voet und Voet 2004] Somit können einerseits Enantiomere eines racemischen Substrates aufgrund ihrer unterschiedlichen Reaktionsraten in einer kinetischen Racematspaltung voneinander getrennt werden, andererseits können prochirale Substrate zu optisch aktiven Produkten umgewandelt werden.

Es existieren Biokatalysatoren für die unterschiedlichsten Arten von Reaktionen, wobei bis heute mehr als 10.000 Enzyme aus verschiedenen Organismen dokumentiert wurden.¹ [Schomburg et al. 2013] Beispielweise katalysieren Enzyme bei der Verdauung unterschiedliche Spaltungsreaktionen, um die aufgenommene Nahrung für den Stoffwechsel verwertbar zu machen (α -Amylase, Pepsin); Stoffwechselenzyme erhalten die Organfunktion des Gehirns, des Herzens, der Lunge, der Nieren (z.B. Creatinkinase) und selbst die Transkription und Replikation der Erbinformationen laufen enzymkatalysiert ab (RNA- und DNA-Polymerase). [Breuer und Stürmer 2006] Um die Vielzahl existierender Enzyme zu klassifizieren, wurden diese 1984 durch eine gemeinsame Kommission der IUPAC und der IUB in sechs Klassen eingeteilt (Tabelle 3-4). [Dixon 1985]

Tabelle 3-4. Klassifizierung von Enzymen.

EC-Klasse	Hauptklasse der Enzyme	Katalisierte Reaktion
1	Oxidoreduktasen	Reduktion/ Oxidation
2	Transferasen	Übertragung von funktionellen Gruppen
3	Hydrolasen	Bindungsspaltung durch Hydrolyse
4	Lyasen	Bindungsbildung- und spaltung kleiner Moleküle
5	Isomerasen	Isomerisationsreaktionen
6	Ligasen	Bindungsknüpfung oft mithilfe von ATP

Nach dieser Klassifizierung besitzt jedes Enzym eine vierstellige „Enzyme Commission“-Nummer [EC 1.2.3.4]. Die Zahlenfolge beschreibt dabei die Art der katalysierten Reaktionen, die Art des Substrates und die Natur des Cosubstrates; die letzte Ziffer stellt lediglich eine fortlaufende Nummer dar. Jedoch kann ein Enzym nicht vollständig durch die Angabe der EC-Nummer charakterisiert werden, da darüber hinaus auch der biologische Ursprung Einfluss auf Struktur und Eigenschaften des Enzyms haben.

¹ Es sind bereits rund 4800 Enzyme von der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) klassifiziert [Chang et al. 2009] und es wird angenommen, dass bis zu 25000 Enzyme in der Natur existieren. [Faber 2011]

Neben der Katalyse genannter natürlicher Reaktionen werden Enzyme heutzutage auch bevorzugt in der Industrie eingesetzt. Das Wissenschaftsgebiet der Biotechnologie bedient sich der Biokatalysatoren zur Herstellung oder Verarbeitung vieler Produkte, da die Verwendung von Enzymen einige Vorteile gegenüber konventionellen chemischen Prozessen bietet. So können im Gegensatz zu unkatalysierten Reaktionen und im Vergleich zur chemischen Katalyse um Größenordnungen höhere Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden. [Gröger et al. 2012] Durch den Einsatz von Enzymen anstelle von toxischen Übergangsmetallkatalysatoren können die Reaktionen unter milden Bedingungen (Raumtemperatur, Atmosphärendruck, neutraler pH-Wert) und ohne organische Lösungsmittel durchgeführt werden. Dies ist nicht nur aufgrund der Energieeinsparungen weniger kostenintensiv, sondern auch weitaus schonender für die Umwelt. [Kourist et al. 2009] Da Enzyme mit einer oder mehreren funktionellen Gruppen selektiv reagieren, kann das Anbringen und spätere Entfernen von Schutzgruppen, das normalerweise bei klassischen organischen Synthesen erforderlich ist, entfallen. [Gröger et al. 2012] Durch diese ausgesprochen hohen Chemo-, Stereo-, Regio- und Enantioselektivitäten entstehen bei enzymkatalysierten Reaktionen auch weniger Neben- und Abfallprodukte verglichen mit klassischen chemischen Verfahren. [Rozzell 1999; Schoemaker et al. 2003, Johannes und Zhao 2006] Die Tatsache, dass Enzyme zudem oft bioverträglich und abbaubar sind, prädestiniert sie in Bezug auf eine „grünere“ Chemie. [Sheldon et al. 2008]

Obwohl Enzyme in lebenden Systemen geschaffen werden und von Natur aus in wässrigen Lösungen arbeiten, gibt es zahlreiche potentielle Vorteile bei der Verwendung der Biokatalysatoren in nicht wässrigen Umgebungen. Unter anderem sind dabei die höhere Löslichkeit von hydrophoben Substraten, die Unlöslichkeit der Proteine - die ihre einfache Wiederverwendung erleichtern - und die Beseitigung mikrobieller Kontaminationen in Reaktoren zu nennen. [Lozano 2010; Sheldon 2012; Guan et al. 2015] Jedoch sind mit dem Einsatz von Enzymen auch einige Nachteile verbunden. So hängt die Enzymaktivität und -stabilität stark von Temperatur und pH-Wert ab und schränkt daher bspw. den Einsatz organischer Lösungsmittel oder Lösungsvermittler in enzymkatalysierten Reaktionen erheblich ein, was wiederum die maximal erreichbare Raum-Zeit-Ausbeute begrenzt. Untersuchungen zur Lösungsmitteltoleranz lieferten eine breitere Anwendbarkeit von Enzymen in nicht natürlicher Umgebung als erwartet. [Bortolini et al. 1998; Carrea und Riva 2000; Klibanov 2001; Stepankova et al. 2013] Weiterhin lassen sich etwa mit Hilfe der gerichteten Evolution stabilere Mutanten für die Biokatalyse entwickeln [Reetz und Jaeger 2000; Arnold et al. 2001; Bornscheuer 2009; Woodley 2013], die in vielen Fällen sogar einfacher und kostengünstiger als deren chemisches Pendant hergestellt werden können. [Kourist et al. 2009]

3.3 Unkonventionelle Lösungsmittel für biokatalytische Reaktionen

Die charakteristische dreidimensionale Struktur jedes Enzyms, die die Voraussetzung für die Aktivität des Biokatalysators liefert, wird durch Disulfidbrücken, Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen bestimmt. Letztere sind, abgesehen von einem geringen Beitrag an Van-der-Waals-Käften, nicht wirklich Wechselwirkungen, sondern vielmehr der entropiebedingte Ausschluss des Kontaktes von hydrophoben Gruppen mit Wasser, was dazu führt, dass sich diese in das Innere der Proteinstruktur wölben. [van Rantwijk und Sheldon 2007] Die Entfaltung des Enzyms erfordert die Dissoziation vieler Wasserstoffbrückenbindungen und bringt die innenliegenden hydrophoben Gruppen in Kontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel. Folglich werden Proteine durch Verbindungen destabilisiert, die spezifisch mit dem ungefalteten Protein interagieren. [Pace 1990; Jaenicke 1996] Auf der Basis der Deaktivierungskinetik wird allgemein angenommen, dass die Entfaltung in zwei Stufen verläuft: eine reversible erste Stufe, gefolgt von einer langsameren, irreversiblen zweiten Stufe. [van Rantwijk und Sheldon 2007]

Wasser als natürliches Medium der Enzymkatalyse interagiert ausreichend stark mit dem Biokatalysator, um ihn zu lösen, aber nicht stark genug, um die strukturellen Wasserstoffbrückenbindungen zu dissoziieren. Enzymlösungen sind jedoch oftmals selbst in reinem Wasser instabil, weshalb sie üblicherweise in Phosphat- oder Citratpuffern angesetzt werden. Dieser stabilisierende Effekt kann dem "Aussalzen" von hydrophoben Gruppen zugeschrieben werden, welcher die Energiebarriere für die Entfaltung und Exposition solcher Gruppen erhöht. [Hey et al. 2005] Enzymdehydratisierung, zum Beispiel durch Lyophilisierung, führt zu strukturellen Veränderungen in der Proteinstruktur, die bereits spektroskopisch bestätigt wurden. [Desai und Klibanov 1995; Roy und Gupta 2004] Diese konnten auf Coulomb-Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen zurückgeführt werden, die in einem Medium mit niedriger Dielektrizitätskonstante bis zu 80-mal stärker sind als in Wasser. Die kombinierten Effekte führen gewöhnlich zu einer Straffung der Struktur. Eine umfangreiche FT-IR-Studie mit *Candida antarctica* Lipase B (CalB) zeigte beispielsweise, dass bei der Dehydratisierung des Enzyms β -Faltblattstrukturen auf Kosten von α -Helices zunehmen. [Vecchio et al. 1999]

Anfang der 1980'er machten die grundlegenden Arbeiten von KLIBANOV *et al.* deutlich, dass Enzyme auch in hydrophoben organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden können. [Zaks und Klibanov 1985a] Viele Lipasen sowie einige Proteasen und Acylasen zeigten gute Aktivität und Stabilität in diesen Solventien, allerdings um den Preis einer stark reduzierten Reaktionsrate. [Klibanov 1997] Es wurde damit der Grundstein für die erfolgreiche Anwendung solcher Enzyme in nicht hydrolytischen Reaktionen wie der enantioselektiven Acylierung von Alkoholen und Aminen gelegt, die heute wichtige industrielle Anwendungen darstellen. [Schmid et al. 2001; Choi et al. 2015] Jene organische Lösungsmittel, wie

beispielsweise aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe, Ether und Alkohole, die gut toleriert werden, wechselwirken nur schwach mit dem Enzym; es wird vermutet, dass diese mehr oder weniger einem Vakuum um das Enzym ähneln. Es ist bekannt, dass Alkohole als Wasserstoffdonoren und -akzeptoren Lipasen hemmen. [Lotti et al. 2015] Lösungsmittel, die stark mit Proteinen interagieren, wie DMSO und DMF, neigen ebenfalls dazu einen irreversiblen Aktivitätsverlust zu verursachen. [Ruiz und Castro 2007; Doukyu und Ogino 2010] Der Einfluss organischer Lösungsmittel auf die Enzymaktivität wird oft im Hinblick auf die Entfernung von essentiellem Wasser diskutiert. Viele Enzyme benötigen zwar eine intakte Hydrathülle, aber es gibt auch zahlreiche Ausnahmen wie die bereits erwähnte CaLB, die ihre Aktivität sogar nach dem Trocknen über Phosphorpentoxid behält [Goede et al. 1993; Dolman et al. 1997] Wenige Cluster von Wassermolekülen, die vermutlich an die geladenen Gruppen auf der Oberfläche der Enzymmoleküle gebunden sind, sind hierbei für die katalytische Funktion in nicht wässrigen Umgebungen erforderlich. [Klibanov 2001; Liszka et al. 2012] Es wurde ebenso berichtet, dass Proteine nur dann die volle biologische Aktivität erreichen, wenn das umgebende Wasser ungefähr die gleiche Masse wie das eingesetzte Protein hat. [Frauenfelder et al. 2009] Laut CARREA UND RIVA seien Einflüsse reiner organischer Lösungsmittel nämlich auf eine Interaktion mit dem enzymgebundenen Wasser und nicht auf eine Interaktion mit dem Enzym zurückzuführen. [Carrea und Riva 2000] In diesem Zusammenhang liefern hydrophobe Lösungsmittel typischerweise eine höhere enzymatische Aktivität als hydrophile, weil letztere dazu neigen, diese essenziellen Wassermoleküle von der Enzymoberfläche zu verdrängen. [Lozano et al. 2015] Der Wasserbedarf eines Enzyms sollte jedoch immer eher in Bezug auf die thermodynamische Wasseraktivität a_w als auf die Wasserkonzentration diskutiert werden. [Bell, Halling et al. 1995; Kulschewski et al. 2013; Sasso et al. 2015]

Der Vorteil organischer Lösungsmittel ist die außerordentlich große Bandbreite von Eigenschaften, wie das erhöhte Lösungsvermögen für hydrophobe Substrate und Produkte gegenüber Wasser. Jedoch ist die Biokompatibilität des mit dem Enzym in Berührung stehenden Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung - zur Vorhersage dieser wurden verschiedenste Konzepte, insbesondere im Hinblick auf die Polarität, entwickelt. Unter der Polarität eines Lösungsmittels versteht man die Summe aller zwischenmolekularen Wechselwirkungen nach Art und Stärke, zu denen das Lösungsmittel fähig ist. [Eppert 1988] In der Praxis sind verschiedene empirische Polaritätsskalen in Gebrauch, die mehr oder weniger gute Näherungen bieten. Eine Größe, die relativ einfach bestimmt werden kann und offenbar gut mit der Löslichkeit korreliert, ist die Dielektrizitätskonstante ϵ . [van Vechten 1969] Außerdem kann die Polarität organischer Lösungsmittel auch nach dem $E_T(30)$ -Wert oder dem logP-Wert geordnet werden. [Leo et al. 1979; Ryu und Dordick 1992] Das logP-Konzept betrachtet direkt das Verhältnis zwischen der Hydrophobizität des Lösungsmittels und der katalytischen Aktivität des Biokatalysators [Laane et al 1985;

Sakuratani et al. 2007]. Der logP-Wert ist definiert als der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen n-Octanol und Wasser und somit dimensionslos (Gleichung 3-1).

$$\log P = \log \left(\frac{c_O^{S_i}}{c_W^{S_i}} \right) \quad (3-1)$$

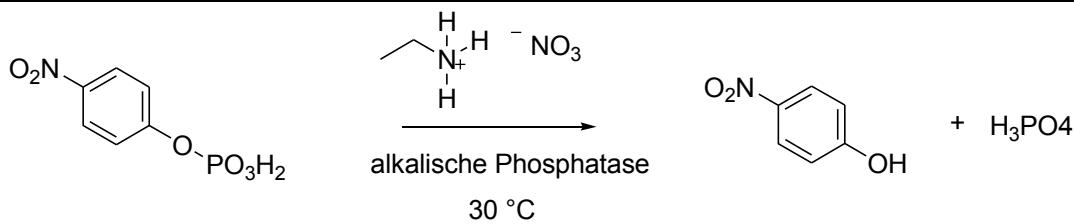
mit:

$c_O^{S_i}$ = Konzentration der Spezies i einer Chemikalie in der octanolreichen Phase

$c_W^{S_i}$ = Konzentration der Spezies i einer Chemikalie in der wasserreichen Phase

Ist der $\log P$ -Wert > 0 , löst sich eine Substanz besser in *n*-Octanol als in der wässrigen Phase; dieser Stoff zeigt demnach eine geringere Polarität bzw. ist hydrophob. Ist die Löslichkeit in Wasser besser als in 1-Octanol, so ergibt sich ein negativer $\log P$ -Wert, die Substanz ist polarer und verfügt über ein stabiles Dipolmoment. [Lee und Lin 2014] Werden organische Lösungsmittel, wie bspw. in Kapitel 4.2.1 beschrieben, als Medium für biokatalytische Reaktionen verwendet, so scheint der $\log P$ des Lösungsmittels entscheidend für den Einfluss auf das Enzym zu sein. [Laane et al. 1985] Vereinfacht kann dieses Konzept auch zur Vorhersage der Wasserlöslichkeit einer Verbindung verwendet werden und zeigt in erster Näherung eine Übereinstimmung zwischen steigendem $\log P$ -Wert und steigender Enzymaktivität. [Laane et al. 1987]

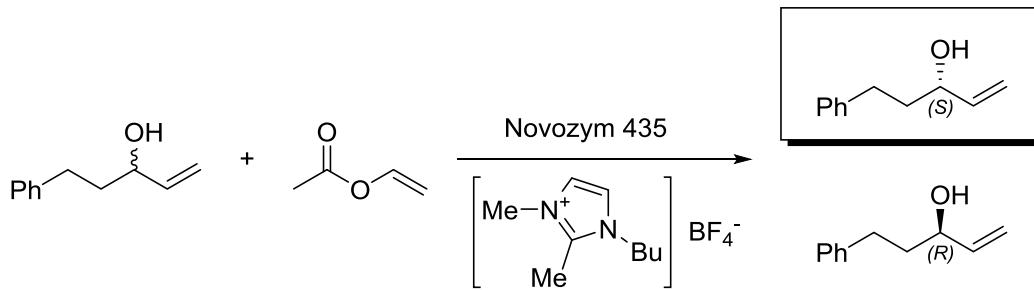
Das Ziel die niedrige Umsatzrate von Enzymen in organischen Medien zu verbessern, war eine wichtige Triebkraft bei der Ausdehnung der Forschung auf ionische Flüssigkeiten. ILs können aufgrund ihrer hochpolaren Natur die Destabilisierung des Übergangszustands, die negative Konformationsänderung durch Dehydrierung und den Verlust der Flexibilität des Enzyms beheben. Somit war die Brücke zur biokatalytischen Aktivität in ionischen Flüssigkeiten geschlagen, was 1984 exemplarisch durch die Phosphatase-Aktivität in 80%iger Ethylammoniumnitrat-Lösung nachgewiesen werden konnte (Schema 3-2). [Magnuson et al. 1984]



Schema 3-2. Alkalische Phosphatase in Ethylammoniumnitrat. [Magnuson et al. 1984]

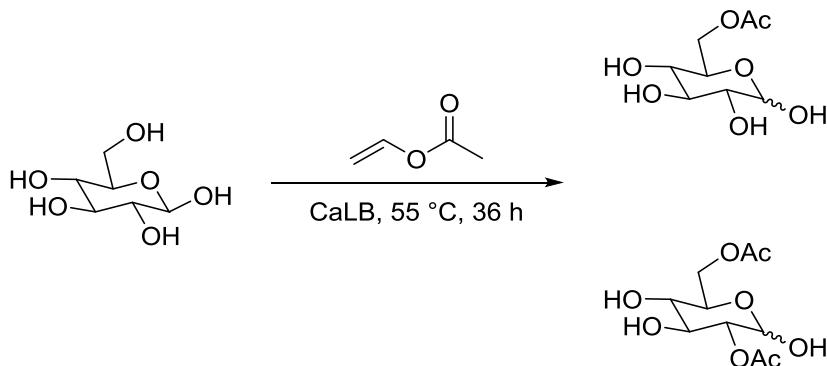
Daneben konnten Studien zu enzymatischen Reaktionen in ILs in den letzten zwei Jahrzehnten zeigen, dass diese umweltfreundliche Alternativen zu flüchtigen organischen Lösungsmitteln darstellen [Earle und Seddon 2000; Gorke et al. 2010], und die Enzyme in den untersuchten Lösungsmitteln sowohl eine sehr hohe Aktivität und thermische Stabilität als auch ausgezeichnete Substrat-, Regio- und Enantioselektivitäten aufweisen. [Habulin und Knez 2009] Daher wuchs das Interesse an ILs als neues und hocheffizientes Reaktionsmedium für biokatalytische Reaktionen linear (vgl. Abbildung 1-1). Der erste erfolgreiche Bericht über eine enzymkatalysierte Reaktion in reiner ionischer Flüssigkeit als Medium wurde 2000 von ERBELDINGER et al. [Erbeldinger et al. 2000] veröffentlicht. Lipasen, die für ihre Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln schon bekannt waren, schienen auch künftig die geeigneten Kandidaten für die Biokatalyse in ILs. [Madeira Lau et al. 2000; Schöfer et al. 2001; Lozano et al. 2001; Sheldon et al. 2002; Park und Kazlauskas 2003; Kaar et al. 2003; Madeira Lau et al. 2004; Ganske und Bornscheuer 2005a] Tatsächlich sind besonders mikrobielle Lipasen, wie die CaLB, katalytisch aktiv und stabil in den ionischen Flüssigkeiten der 1-Alkyl-3-methylimidazolium- und 1-Alkylpyridinium-Familie in Kombination mit Anionen wie $[BF_4]$, $[PF_6]$, $[TfO]$ und $[NTf_2]$. [Madeira Lau et al. 2000; Schöfer et al. 2001; Kim et al. 2001; Park und Kazlauskas 2003; Lozano et al. 2003; Husum et al. 2009] Die Umesterung mittels CaLB in diesen ILs konnte beispielsweise mit einer Effizienz, wie die in *tert*-Butylalkohol [Madeira Lau et al. 2000], Dioxan [Nara et al. 2002] oder Toluol verglichen werden. [Gathergood et al. 2004] Zudem stellte sich heraus, dass die Enantioselektivität der Lipasen in der Regel in hydrophoben Lösungsmitteln höher ist als in hydrophilen. [Parida und Dordick 1991; Ottosson et al. 2002]

Eines der Pionierbeispiele für die Biokatalyse in unkonventionellen Lösungsmitteln illustrierten ITOH et al. 2003. Sie untersuchten das Verhalten von Enzymen in ILs durch direkte Zugabe des Biokatalysators zu dem Substrat enthaltenden Reaktionsmedium. Mit ee-Werten von >99% und E>500 nach 3 Stunden Reaktionszeit konnte der (S)-Alkohol aus der kinetischen Racematspaltung von 5-Phenyl-1-penten-3-ol mit Vinylacetat in $[BMMIm][BF_4]$ enantioselektiv mittels der immobilisierten Lipase Novozym 435 erhalten werden (Schema 3-3, Ester nicht dargestellt). [Itoh et al. 2002] In $[BMIm][PF_6]$ zeigte die Reaktion mit dem Enzym überraschenderweise auch nach 24 Stunden keinen Umsatz. (Itoh et al. 2003; Itoh et al. 2001b)



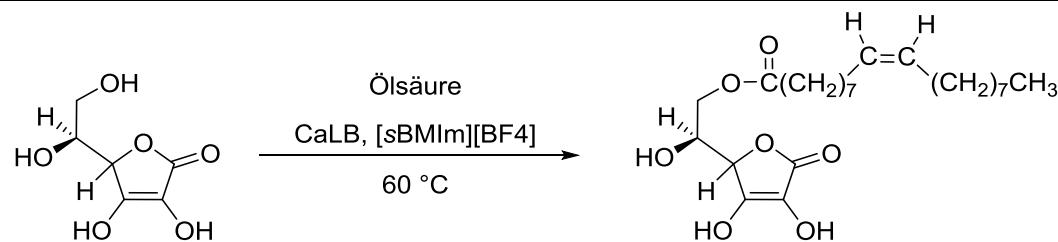
Schema 3-3. Novozym 435 (immobilisierte CaLB) katalysierte enantioselektive Umesterung von 5-Phenyl-1-penten-3-ol in [BMMIm][BF₄] nach ITOH *et al.* [Itoh et al. 2002]

Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurden die Produkte durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether in einem Zweiphasensystem extrahiert und der Überschuss an Ether in der IL-Phase wurde unter Vakuum entfernt. Da sich das geträgte Enzym in der schwereren IL-Phase sammelte, erlaubte dieser Ansatz die Wiederverwendung des Enzym-IL-Systems durch Zugabe von frischen Substraten ohne jeglichen Aktivitätsverlust. KAZLAUSKAS *et al.* konnten 2001 die Umesterung von Glucose in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten durchführen (Schema 3-4). Ein Vorteil bei der Reaktionsführung mit ILs ist die erhöhte Löslichkeit von Kohlenhydraten im Gegensatz zu anderen Lösungsmitteln. [Park und Kazlauskas 2001]



Schema 3-4. Umesterung von Glucose nach KAZLAUSKAS *et al.* [Park und Kazlauskas 2001]

Eine weitere interessante Synthese konnte die Arbeitsgruppe um KAZLAUSKAS *et al.* im Jahr 2003 veröffentlichen: die Veresterung von L-Ascorbinsäure mit Palmitinsäure im Beisein von CaLB in [BMMIm][BF₄] und verwandten ILs. Das Gleichgewicht der Reaktion wurde dabei durch Entfernen von Wasser im Vakuum auf die Produktseite verschoben (Schema 3-5). [Park *et al.* 2003]



Schema 3-5. Veresterung von L-Ascorbinsäure nach PARK et al. [Park et al. 2003]

Die Lipasen-vermittelte Racematspaltung chiraler Alkohole und Amine durch enantioselektive Acylierung ist eine der Hauptanwendungen von Lipasen in industriellen Prozessen. Da auch hier der Wunsch besteht, volatile organische Lösungsmittel durch ILs zu substituieren, wurden Untersuchungen zu Racematspaltungen mittels CaLB und Pcl (*Pseudomonas cepacia Lipase*) in ionischen Flüssigkeiten unternommen. Eine Auswahl zeigt Abbildung 3-2, eine breite Übersicht zum Thema der Biokatalyse in ionischen Flüssigkeiten kann sowohl dem Artikel von KRAGL, ECKSTEIN und KAFTZIK aus dem Jahr 2002 als auch dem Artikel von VAN RANTWIJK und SHELDON aus dem Jahr 2007 entnommen werden. [Kragl, Eckstein et al. 2002; van Rantwijk und Sheldon 2007]

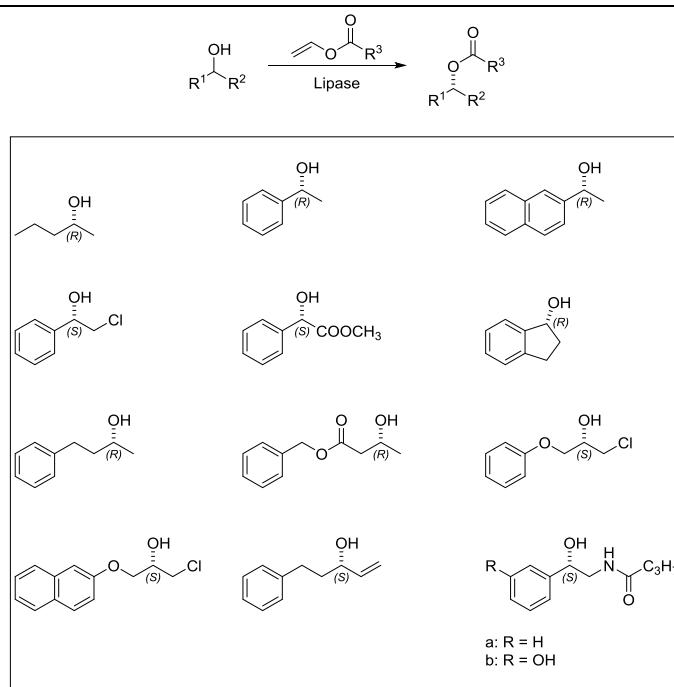
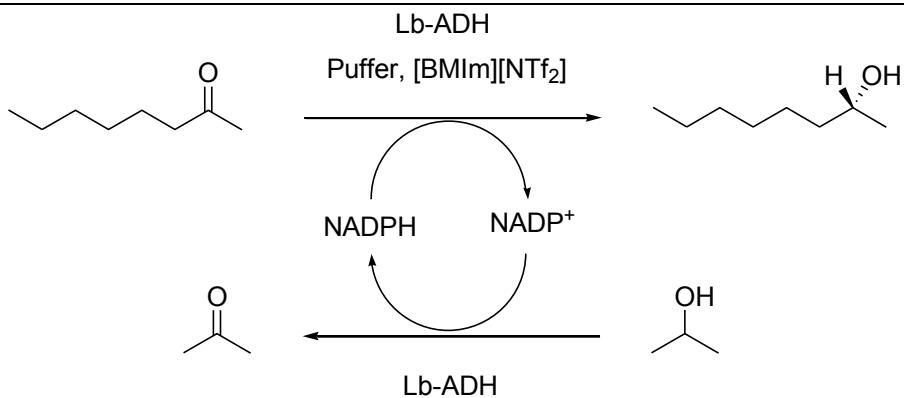


Abbildung 3-2. Kinetische Racematspaltung einiger chiraler Alkohole in ionischen Flüssigkeiten. [van Rantwijk und Sheldon 2007]

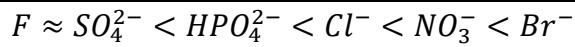
Neben Lipasen wurde auch eine große Anzahl anderer Enzyme bezüglich ihrer Aktivität in ILs untersucht [Kragl et al. 2002b; van Rantwijk und Sheldon 2007; Coelho und Ribeiro 2016]; besonders interessant darunter waren die Alkoholdehydrogenasen [Eckstein et al. 2004; Dreyer und Kragl 2008], Proteasen [Erbeldinger et al. 2000, Sangeetha et al. 2008; Zhao et al. 2003; Moniruzzaman et al. 2010b] und

Oxidoreduktasen [Hinckley et al. 2002; Das et al. 2007; Sgalla et al. 2007; Pinto et al. 2008]. Es liegt nahe, dass Enzyme, die in organischen Lösungsmitteln arbeiten, auch in ionischen Flüssigkeiten Aktivität zeigen. [Park und Kazlauskas 2003] Ein erfolgreiches Beispiel für die Anwendung einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* in einer [BMIm][NTf₂]-Lösung konnte 2004 von ECKSTEIN et al. in einem Zweiphasensystem vorgestellt werden (Schema 3-6). [Eckstein et al. 2004]



Schema 3-6. Reduktion von 2-Octanon in Puffer/ [BMIm][NTf₂] mittels *Lb*-ADH mit Substrat-gekoppelter NADPH-Regeneration durch 2-Propanol. [Eckstein et al. 2004]

Die komplexen Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Elektrolytlösungen, wozu auch die ionischen Flüssigkeiten zählen, werden nun seit mehr als einem Jahrhundert untersucht. HOFMEISTER beobachtete 1888 den Einfluss von Kationen und Anionen auf die Löslichkeit und die Stabilität des Proteins Ovalbumin. Die daraus entwickelte HOFMEISTER-Reihe beschreibt die Art der Wechselwirkung der Salze mit dem Biomolekül; sie ordnet Kationen und Anionen entsprechend ihrer Wirkung auf die Proteininstabilität. [Hofmeister 1888] Diese HOFMEISTER-Reihe korreliert mit dem kosmotropen und chaotropen Charakter der Ionen, die die Wechselwirkungen mit Wasser und den Effekt auf das Gleichgewicht der Mikrodomänen von niedriger und hoher Dichte des Wassers beschreibt. [Wiggins 2001] Beide Ansätze werden heutzutage oft als mehr oder weniger identisch angesehen. [Zhao 2006] Üblicherweise sind kosmotrope Salze klein, weisen eine hohe Ladung auf und können einen gelösten Stoff aus einem Lösungsmittel ausfällen (engl.: *salting-out ions*). Chaotrope Salze hingegen sind zumeist groß und wenig geladen und können das Auflösen einer Komponente in einem Lösungsmittel fördern (engl.: *salting-in ions*). Daher nimmt in der gezeigten HOFMEISTER-Reihe die chaotrope Wirkung der genannten Anionen von links nach rechts zu. [Zhang und Cremer 2006; Dupont et al. 2015]



Enzymlösungen werden durch kosmotrope Anionen und chaotrope Kationen, wie z. B. Ammoniumsulfat, stabilisiert, aber durch chaotrope Anionen und kosmotrope Kationen destabilisiert. Es sollte betont

werden, dass die Begriffe Kosmotropizität und Chaotropizität nicht eindeutig definiert sind und sich entweder auf die Ladungsdichte von Ionen oder die Wirkungen auf Proteine beziehen können. Die Analyse der Hofmeister-Effekte auf molekularer Ebene ist sehr komplex und das Verständnis bis heute alles andere als vollständig. Grundsätzlich wird diskutiert, ob Hofmeister-Effekte auf Proteine aus direkten Wechselwirkungen mit den Ionen resultieren oder indirekt sind, d. h. durch Veränderungen der Wasserstruktur verursacht werden. [Baldwin 1996; Collins 1997; Timasheff 2002] Auf Grundlage kalorimetrischer Messungen wurde sogar argumentiert, dass die Korrelationen zwischen der Kosmotropizität/ Chaotropizität und der Proteinstabilisierung zufällig sind. [Batchelor et al. 2004] Die bisher beste Erklärung scheint, dass kosmotrope Anionen Proteine durch "Aussalzen" der unpolaren Oberflächengruppen stabilisieren, während chaotrope, denaturierende Anionen (z. B. I^- , SCN^- und kosmotrope Kationen wie Ca^{2+}) die Peptidseinheit „einsalzen“ und folglich stärker mit der entfalteten Form des Proteins wechselwirken als mit der Nativen. [Baldwin 1996; Kumar et al. 2017]

Mit Wasser nicht mischbare ionische Flüssigkeiten haben sich als sehr geeignete Reaktionsmedien für enzymkatalysierte Reaktionen erwiesen. [van Rantwijk und Sheldon 2007; Domínguez de María 2008; Moniruzzaman et al. 2010a; Naushad et al. 2012] Der hygroskopische Charakter der ILs, der den essenziellen Hydratisierungsgrad um Enzymmoleküle liefert (z. B. $[\text{BMIm}][\text{NTf}_2]$ absorbiert bis zu 1,4% (w/w) Wassergehalt) [Bonhôte et al. 1996] könnte zudem als zusätzlicher Vorteil für die Biokatalyse angesehen werden. [Kumar et al. 2017] Auch wässrig-organische Zweiphasensysteme werden oft in Biotransformationen verwendet, um die Löslichkeit von hydrophoben Reaktanten und Produkten zu erhöhen. Neuere Arbeiten auf dem Gebiet der Biokatalyse beinhalten eine breite Palette an Enzymen in IL-Wasser-Mischungen. [Dreyer und Kragl 2008; Moniruzzaman et al. 2010b] Die Stabilität und Aktivität von Enzymen in wässrigen IL-Lösungen wird dann ebenfalls im Sinne von Hofmeister-Effekten diskutiert. [Jenkins und Marcus 1995; Frank und Evans 1945; Constantinescu, Weingärtner et al. 2007; Zhao 2016] Die speziellen Eigenschaften von ILs machen sie überdies zu geeigneten oder sogar überlegenen Lösungsmitteln für Flüssig-Flüssig-Extraktionsverfahren. [Moniruzzaman et al. 2010b]

3.4 Ionische Flüssigkeiten als Extraktionsmittel von Biomolekülen

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist die Trennmethode der Wahl, wenn Destillation und Rektifikation in industriell relevanten katalytischen Prozessen nicht anwendbar sind. Sie beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der zu trennenden Komponenten in zwei schlecht miteinander mischbaren Lösungsmitteln und folgt demnach dem NERNST'schen Verteilungsgesetz. Traditionell kommen dabei organische Lösungsmittel zum Einsatz, die jedoch erhebliche Nachteile mit sich bringen. [van Rantwijk und Sheldon 2007; Domínguez de María 2008; Moniruzzaman et al. 2010a; Naushad et al. 2012; Oppermann et al. 2011; Souza et al. 2015; Schomäcker et al. 2011; Kasaka et al. 2016] Vor allem der hohe Verbrauch an

diesen volatilen organischen Verbindungen und die damit verbundene Umweltbelastung motivierte schon früh zur Suche nach Alternativen. In der Mitte der 1950er Jahre schlug ALBERTSSON den Gebrauch wässriger Zweiphasensysteme (engl.: *aqueous biphasic systems*, ABS²) vor. [Albertsson 1986] ABS bestehen aus zwei schlecht miteinander mischbaren wasserreichen Phasen, die auf Polymer–Polymer-, Polymer–Salz- oder Salz–Salz-Kombinationen basieren. Da ABS hauptsächlich aus Wasser bestehen, können diese als biokompatible Medien für Zellen, Zellorganellen und biologisch aktive Substanzen angesehen werden und die bedenklichen organischen Lösungsmittel ersetzen. Sie haben sich daher als wirtschaftliche und effiziente nachgeschaltete Aufarbeitungsmethode in der Biotechnologie etabliert. [Freire et al. 2012a]

Im Hinblick auf die Extraktion von Proteinen und Enzymen aus reinen ionischen Flüssigkeiten ist wenig in der Literatur bekannt, da diese Makromoleküle entweder gänzlich unlöslich sind oder ihre Löslichkeit in ILs nur sehr gering ist. [Sheldon et al. 2002; Madeira Lau et al. 2004; Fujita et al. 2005; Fujita et al. 2006] Als Ansatz zur Erhöhung der Proteinlöslichkeit in ILs wurde anfangs auch die Zugabe kleiner Mengen an Wasser untersucht. Die Bildung von wässrigen Mikroemulsionströpfchen in einer hydrophoben IL stabilisiert durch eine Schicht von anionischen Tensiden ermöglichte so die Solubilisierung von aktiven Enzymen [Moniruzzaman et al. 2008]. Ein anderer Ansatz umfasste die chemische Modifikation von Enzymen oder Proteinen selbst [Laszlo und Compton 2001; Maruyama et al. 2002; Ohno et al. 2003; Bornscheuer 2009]. NAKASHIMA et al. berichteten 2005 über eine verbesserte Proteinlöslichkeit von *Subtilisin Carlsberg* in Imidazolium-basierten ILs durch Konjugation des Enzyms mit dem kammförmigen Polyethylenglykol PM13 [Nakashima et al. 2005]. Dennoch führte es bei allen Versuchen, in denen Enzyme in ILs gelöst wurden, zu einer verringerten katalytischen Aktivität aufgrund von Konformationsänderungen [Turner 2003; Madeira Lau et al. 2004]. Um die niedrige Proteinlöslichkeit und geschwächte Enzymaktivität zu überwinden, wurden daraufhin wässrige Zweiphasensysteme auf Basis von nicht volatilen ionischen Flüssigkeiten (IL-ATPS) erforscht. [Huddleston et al. 1998; Gutowski et al. 2003; He et al. 2005; Li et al. 2005; Ruiz-Angel et al. 2007]. ROGERS und Mitarbeiter untersuchten die Fähigkeit von kosmotropen Salzen (z.B. K₃PO₄) hydrophile ILs wie [BMIm][Cl] und [N₄₄₄₄][Cl] auszusalzen und waren die ersten, die 2003 die Phasendiagramme von IL-basierten ATPS publizierten. [Gutowski et al. 2003] Sie stellten bspw. fest, dass die Verteilung einfach substituierter Benzol-Derivate zwischen Wasser und [BMIm][PF₆] von der Ladung des Lösungsmittels und der relativen Hydrophobie abhängt. Dieses Verhalten nutzten ITOH et al. ebenfalls aus, um die Umesterungsprodukte und nicht

² Eine weitere in der Literatur häufig verwendete Bezeichnung für wässrige Zweiphasensysteme lautet ATPS (engl.: *aqueous two phase systems*).

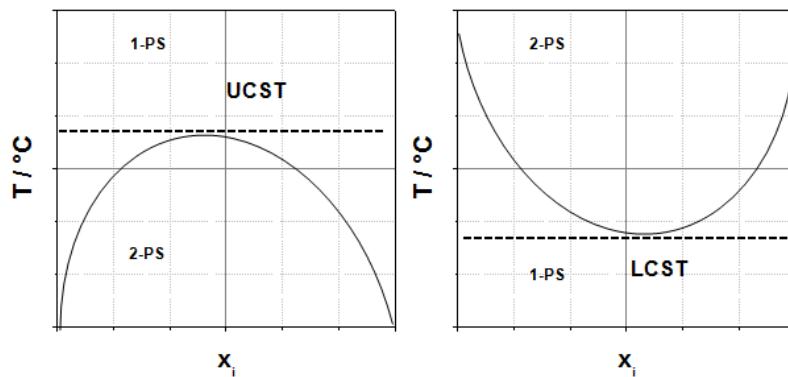
umgesetzten Reaktanten aus einem [BMIm][PF₆]-Gemisch zu extrahieren. Der Biokatalysator blieb in der IL-Phase suspendiert und konnte währenddessen fünfmal wiederverwendet werden. [Itoh et al. 2001a]

Weitere Anwendungen von IL-basierten ATPS bezogen sich auf die Extraktion von Testosteron und Epitestosteron aus menschlichem Urin oder auf die Extraktion von Opium-Alkaloiden aus *Pericarpium papaveris* unter Verwendung eines [BMIm][Cl]-K₂HPO₄-Systems [He et al. 2005; Li et al. 2005]. Die Extraktion von Proteinen mittels [BMIm][Cl]-K₂HPO₄-basierten ATPS aus menschlichen Körperflüssigkeiten wurde zuerst von WANG et al. beschrieben. [Wang et al. 2007]. Im Vergleich zu den bis dato angewandten Polymer-Mischungen konnte so die geringere Viskosität der IL-ATPS ausgenutzt werden, welche zu erhöhtem Stofftransport sowie zur Senkung des Energiebedarfs führte. Darüber hinaus wurden biologische Moleküle wie DNA und Aminosäuren selektiv aus wässrigen Medien in hydrophobe ILs extrahiert. [Wang et al. 2005; Cheng et al. 2007; Wang et al. 2007; Louros et al. 2010; Deive et al. 2011] Es wird davon ausgegangen, dass die Hydrophobie der Aminosäuren sowie die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Anion der IL und der kationischen Form der Aminosäuren die Hauptantriebskräfte des Extraktionsprozesses sind. Ammonium-basierte ionische Flüssigkeiten sind hydrophob, luft- und feuchtigkeitsstabil, preiswert und multifunktionell. Sie wurden neben den schon bestehenden industriellen Prozessen [Pernak et al. 2006; Plechkova und Seddon 2008; Hallett und Welton 2011; Melo et al. 2013]; katalytischen Reaktionen [Moriel et al. 2010; Gorke et al. 2010] und der Verarbeitung von Metall und Metalloxiden [Visser et al. 2001; Abbott et al. 2011] bald ebenso für eine mögliche Verwendung in Extraktionsprozessen vorgeschlagen [Domańska et al. 2007b; Domańska et al. 2007c; Gwala et al. 2010; Li et al. 2013; Włazło und Marciniak 2014]. Seither wurde das Spektrum erweitert und auch über Extraktionen von Metallionen, organischen und aromatischen Verbindungen sowie radioaktiven Isotopen durch wasserunmischbare ionische Flüssigkeiten mit hohen Selektivitäten berichtet. [Huddleston et al. 1998; Holbrey et al. 2003; Wei et al. 2003; Bridges und Rogers 2008; Álvarez et al. 2016; Morandeira et al. 2017b]

3.5 Biokatalyse in thermomorphen Lösungsmittelsystemen

Eine interessante Erweiterung der IL-basierten ATPS sind die thermomorphen Lösungsmittelsysteme (engl.: *thermomorphic solvent systems*, TMS) auf Basis temperaturabhängiger Mischungslücken, die erstmalig 1972 unter der Bezeichnung homogene Flüssig-Flüssig-Extraktion (homogeneous liquid-liquid extraction, HLLE) von MURATA et al. zur Extraktion von Eisen(III)dodeoyltrifluoracetonat in Propylencarbonat beschrieben wurden. [Murata et al. 1972] Werden zwei Stoffe, in der Regel gleichen Aggregatzustands, miteinander gemischt, so bilden sich eine oder mehrere Mischphasen aus, die von der generellen Mischbarkeit der Stoffe, deren jeweiliger Konzentration, dem Druck und der Temperatur abhängig sind. Je nachdem kann es dazu kommen, dass bei vollständiger Mischbarkeit der Stoffe nur

eine Mischphase auftritt, oder sich bei begrenzter Löslichkeit zwei verschiedene Mischphasen ausbilden, was als Mischungslücke bezeichnet wird. [Marcus 2002] Zu den häufigsten Typen von Mischungslücken zählen Systeme mit oberer kritischer Lösungstemperatur (engl.: *upper critical solution temperature*, UCST) und Systeme mit unterer kritischer Lösungstemperatur (engl.: *lower critical solution temperature*, LCST). Diese Mischungslücken können in Phasendiagrammen dargestellt werden (Schema 3-7). Die kritischen Punkte UCST und LCST stellen die Koexistenz des Einphasen- (1PS) und Zweiphasensystems (2PS) dar. Oberhalb der UCST und unterhalb der LCST sind zwei oder mehrere Stoffe in allen Konzentrationsverhältnissen vollständig mischbar und bilden folglich eine homogene Phase. Unterhalb der UCST und oberhalb der LCST existieren Mischungslücken (heterogene Phasen) für bestimmte Zusammensetzungen. [Nič et al. 2009]



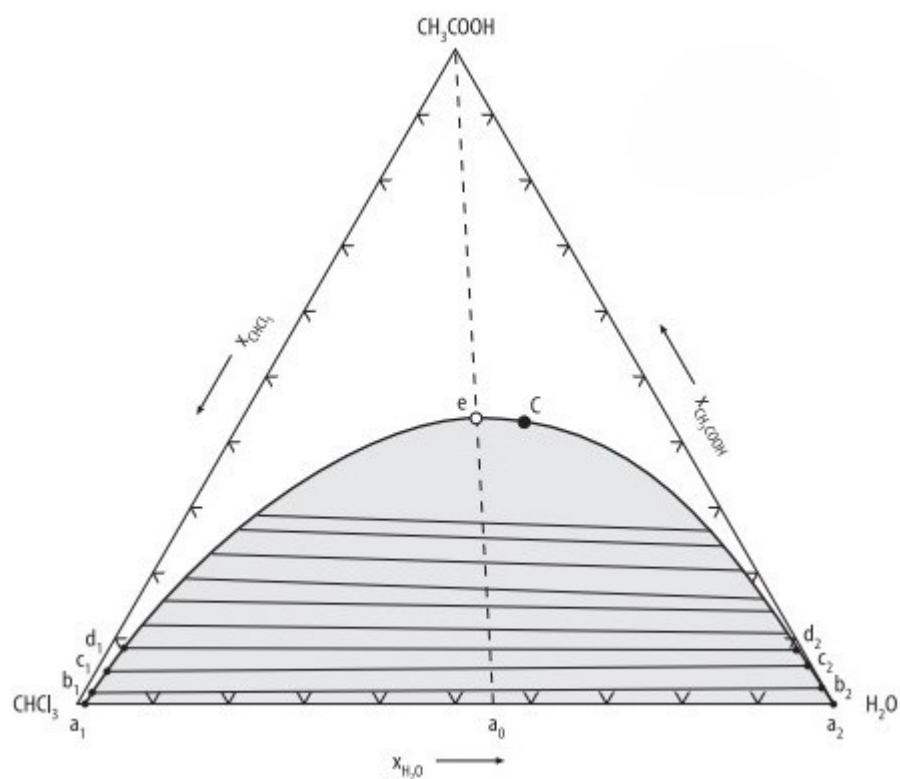
Schema 3-7. System mit oberer kritischer Lösungstemperatur (links) und unterer kritischer Lösungstemperatur (rechts).

Der Zustand eines solchen Systems, welches aus mehreren Komponenten und Phasen besteht, ist genau dann eindeutig charakterisiert, wenn für jede Phase Druck, Temperatur und Zusammensetzung bekannt sind. Stehen die genannten Variablen im Gleichgewicht, sind sie nicht alle unabhängig voneinander wählbar. Die Zahl der Variablen, die unabhängig voneinander gewählt werden können, ohne dass der Gleichgewichtszustand verlassen wird, wird als *Freiheitsgrade* bezeichnet. Die Anzahl der Freiheitsgrade F kann durch Gleichung (3-) beschrieben werden, wobei das System aus P Phasen und K Komponenten besteht.

$$F = K - P + 2 \quad (3-2)$$

Für binäre Systeme ($K = 2$) ist die Anzahl der Freiheitsgrade maximal drei (Druck, Temperatur und Zusammensetzung). Binäre Phasengleichgewichte sind also prinzipiell in einem dreidimensionalen Diagramm darstellbar. Übersichtlicher sind jedoch zweidimensionale Diagramme, die als Schnitte oder Projektionen aus dem dreidimensionalen Diagramm entstehen; es resultieren isotherme p,x -Diagramme oder isobare T,x -Diagramme. [Lüdecke und Lüdecke 2000a; Lüdecke und Lüdecke 2000b] Für ternäre Systeme ($K = 3$) ist die Zahl der Freiheitsgrade maximal vier, so dass nach der Vorgabe von Druck und Temperatur noch zwei Freiheitsgrade für die Zusammensetzung stehen. Daher müssen stets zwei Angaben (z. B. Molenbrüche) über die Zusammensetzung gegeben werden, um einen Punkt eindeutig beschreiben zu können. Dieser Punkt ist dann durch $x_3 = 1 - (x_1 + x_2)$ gegeben.

Als ein Beispiel mit UCST-Verhalten soll das ternäre System Chloroform/Wasser/Essigsäure ($\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$) dienen, dessen Phasendiagramm für feste Werte von Temperatur und Druck in Schema 3-8 dargestellt ist.



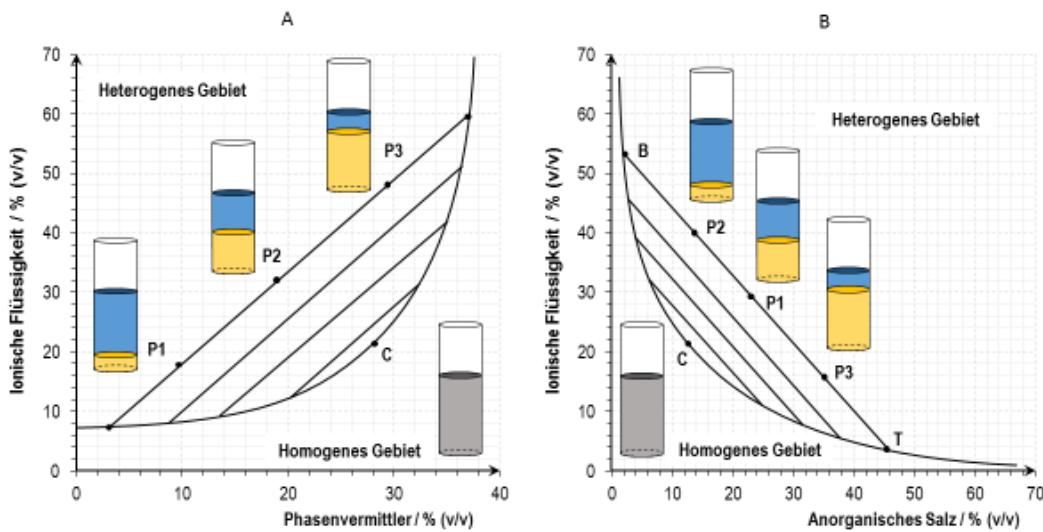
Schema 3-8. Phasendiagramm des ternären Lösungsmittelsystems aus Chloroform, Wasser und Essigsäure bei 25 °C und 1,013 bar. [entnommen aus Lüdecke und Lüdecke 2000a]

Unter den angegebenen Bedingungen für Druck und Temperatur sind Wasser mit Essigsäure und auch Essigsäure mit Chloroform jeweils über den gesamten Konzentrationsbereich mischbar. Das binäre System Chloroform/Wasser weist jedoch eine Mischungslücke auf, die im Diagramm auf der zugehörigen Dreiecksseite eingetragen ist (Punkte a_1 und a_2). Ein ganz kleiner Bereich der Wasser/Chloroform-

Mischungen mit Konzentrationen außerhalb der Mischungslücke (links von a_1 oder rechts von a_2) liegen als homogene Phasen vor. Geeignete Konzentrationen der zwei Komponenten liegen innerhalb der Mischungslücke und zerfallen etwa im Punkt a_0 in zwei Phasen – eine wasserreiche und eine chloroformreiche Phase. Durch schrittweise Zugabe der Essigsäure als dritte Komponente ausgehend von Konzentration a_0 im Zweiphasengebiet wandert die Gesamtzusammensetzung entlang der gestrichelten Geraden, die von der Konzentration der binären Mischung (a_0) zum Essigsäure-Eckpunkt führt. Es bleiben zunächst zwei Phasen bestehen, enthalten nun aber abhängig von der Konzentration zusätzlich Essigsäure. Die Konzentrationen der miteinander im Gleichgewicht stehenden ternären Phasen werden durch eine Gerade, die sogenannte Konode, verbunden, wobei die Mengenverhältnisse der Phasen nach dem Hebelgesetz bestimmt werden können. [Hatti-Kaul 2001] Die Gleichgewichtskonzentrationen b_1 und b_2 liegen auf der Gleichgewichtskurve, der Binodalen, die durch die Konoden verbunden wird. Das Überschreiten der Binodalen (Punkt e) ausgehend vom grau gezeichneten heterogenen Gebiet (Zweiphasengebiet) durch weitere Zugabe von Essigsäure führt zur Entstehung einer einzigen homogenen Phase, die außerhalb der Binodalen das Einphasengebiet bildet. Der Punkt, in dem die immer kürzer werdenden Konoden zu einem Punkt zusammenlaufen, heißt kritischer Punkt C und ist nicht zwangsläufig UCST (vgl. Schema 3-9). [Lüdecke und Lüdecke 2000b]

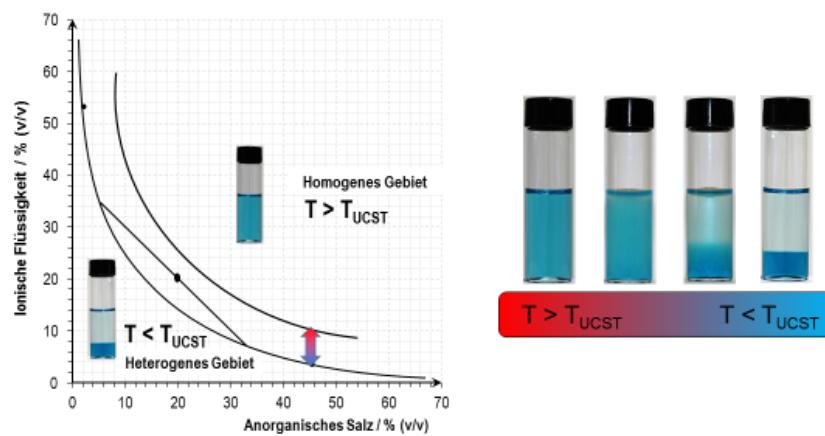
Schema 3-9 zeigt die zwei in dieser Arbeit betrachteten Systeme auf Grundlage des UCST-Verhaltens: zum Einen das Phasendiagramm eines hypothetischen Systems aus IL, Wasser, anorganischen Salz und Phasenvermittler (A), zum Anderen ein hypothetisches System aus IL, Wasser und anorganischen Salz (B) bei konstanter Temperatur und Druck. Auch das orthogonale ternäre Phasendiagramm ist eine geläufige Form für die Darstellung von Dreikomponentensystemen; der wesentliche Unterschied liegt darin, dass die Wasserkonzentration im Ursprung des Diagramms (100% (v/v) H_2O) konventionsgemäß festgelegt ist. Die Binodale teilt auch hier die Phasendiagramme in einen homogenen und einen heterogenen Bereich auf und stellt damit genau die Linie der Koexistenz der jeweiligen Phasen dar.

Am Beispiel des Diagramms B kann die Konzentration der Komponenten des vorgegebenen Punktes P1 mit Hilfe der Konode in der unteren IL-reichen Phase B und in der oberen salzreichen Phase T bestimmt werden. Aus dem Verhältnis B-P1 und P1-T kann das sich einstellende Volumenverhältnis der Phasen zueinander über das Hebelgesetz ermittelt werden. P1, P2 und P3 repräsentieren die Gesamtzusammensetzung dreier Zweiphasensysteme, die auf derselben Konode liegen und unterschiedliche Volumenverhältnisse aufweisen. Wie bereits erwähnt ist das Gleichgewicht dieser Systeme temperaturabhängig. Durch Änderung der Temperatur wird es auf die eine oder andere Seite verschoben, folglich ist auch eine Verschiebung der Binodalen im Phasendiagramm beobachtbar.



Schema 3-9. Orthogonale ternäre Phasendiagramme für ein hypothetisches System aus IL, Wasser, anorganischem Salz und Phasenvermittler (A) und für ein hypothetisches System aus IL, Wasser und anorganischen Salz (B) bei konstanter Temperatur und Druck.

Die experimentell aufwändige makroskopische Bestimmung der Phasenseparation durch Ermittlung der Trübungstemperatur T_{Tr} über einen weiten Zusammensetzungsbereich ist in der rechten Abbildung in Schema 3-10 dargestellt.



Schema 3-10. Temperaturabhängigkeit der Binodale.³ Die makroskopischen Auswirkungen sind auf der rechten Seite dargestellt.

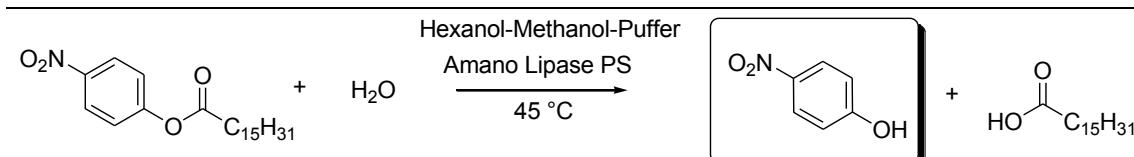
³ Durch die Erhöhung der Temperatur wird die Binodale in Systemen mit oberer kritischer Lösungstemperatur (UCST) in Richtung der heterogenen Phase verschoben. Das System wird einphasig, da der dargestellte Punkt nun im homogenen Gebiet liegt. Beim Abkühlen wird der Punkt von der Binodale wieder überschritten und das System zerfällt in zwei Phasen gemäß den Gesetzmäßigkeiten der Konode (links).

Das Ausnutzen dieses Verhaltens gewährt gegenüber den wässrigen zweiphasigen Systemen den Vorteil, während des Mischens eine homogene Phase zu bilden. Die Extraktion wird durch eine Grenzfläche nicht kinetisch behindert und das Extraktionsgleichgewicht wird schneller erreicht als beim heterogenen Mischen in der konventionellen Lösungsmittlextraktion. [Onghena et al. 2014] Nach Beendigung des Extraktionsvorganges können die Phasen durch Temperaturänderung wieder entmischt und voneinander getrennt werden.

HLLE wurden in den vergangenen Jahrzehnten hauptsächlich zur Extraktion und Vorkonzentrierung von Metallen für analytische Zwecke, jedoch zunehmend auch zur Extraktion organischer Verbindungen und von biologischem Material eingesetzt. [Lamb und Peterson 1995; Schaad und Bart 2003; Ghiasvand und Mohagheghzadeh 2004; Ghiasvand et al. 2005; Ebrahimzadeh et al. 2007; Farajzadeh et al. 2009; Anthemidis und Ioannou 2009; Gao et al. 2011; Golan et al. 2014] So stellten bspw. OHNO und seine Mitarbeiter vor einigen Jahren ein LCST aus Tetrabutylphosphonium N-trifluoromethanesulfonyleucine ($[P_{4444}][Tf\text{-Leu}]$) und Wasser zur Extraktion von Cytochrom c vor. [Kohno, Saita et al. 2011] Anwendungsbeispiele für katalytische Reaktionen sind jedoch selten und verwenden nur molekulare Lösungsmittel. Die Arbeitsgruppe um Behr setzte diese Systeme 2001 erstmals für die Rezyklierung von homogenen Katalysatoren ein. [Behr und Fängewisch 2001] Das Grundprinzip dieser Reaktions- und Extraktionssysteme ist wiederum die temperaturabhängige Mischungslücke von Lösungsmittelgemischen bei Temperaturen, die für die homogene Katalyse geeignet sind. Diese Gemische sind bei geringerer Temperatur zweiphasig und durch Erhöhung der Temperatur bildet sich ein einphasiges Lösungsmittelsystem aus, so dass eine homogene Reaktionsführung ohne Stofftransportlimitierungen stattfinden kann. Nach der Reaktion entmischen sich die Phasen wieder durch Temperaturerniedrigung und können voneinander getrennt werden. Im Idealfall beinhaltet dann die eine Lösungsmittelphase das gewünschte Produkt (Extraktphase) und die andere Phase den Katalysator (Katalysatorphase), der zurückgewonnen und ein weiteres Mal eingesetzt werden kann. Nach diesem Prinzip sind die von Behr entwickelten thermomorphen Lösungsmittelsysteme (engl.: *temperature-dependent multi-component solvent-systems*, Abk.: TMS) gerade für die Trennung von möglichst apolaren Produkten von polaren Katalysatoren geeignet. Dafür werden ein unpolares sowie ein polares Lösungsmittel für die thermomorphen Gemische eingesetzt, die zusammen eine temperaturabhängige Mischungslücke aufweisen. Die Temperatur, ab der das vorliegende System einphasig wird, kann je nach eingesetzten Anteilen an unpolarem bzw. polarem Lösungsmittel variieren. Um die Mischungstemperatur zu beeinflussen, ist es auch möglich einen sogenannten Löslichkeitsvermittler hinzuzufügen, der zumeist mittelpolar ist und sich mit dem unpolaren und dem polaren Lösungsmittel mischt.

Neben der Anwendung der TMS auf homogene Übergangsmetallkatalysen wurde auch die Möglichkeit zur Nutzung für enzymatische Reaktionen von der Arbeitsgruppe Behr getestet. Die Amano Lipase-katalysierte Hydrolyse eines Esters konnte im thermomorphen Lösungsmittelsystem aus 1-Hexanol, Methanol und Puffer mit >95% Ausbeute über fünf Läufe erfolgreich durchgeführt werden (Schema 3-11).

[Behr et al. 2011]



Schema 3-11. Hydrolyse des p-Nitrophenylpalmitats mittels Amano Lipase PS im TMS aus Hexanol-Methanol-Puffer bei 45 °C. [Behr et al. 2011]

BEHR *et al.* postulierten daraufhin, dass die Anwendung thermomorpher Lösungsmittelsysteme in chemischen Prozessen die Effektivität und Wirtschaftlichkeit katalysierter Verfahren erheblich steigert. Die Ausnutzung einer stark temperaturabhängigen Mischungslücke von ausgewählten Lösungsmittelkombinationen ermöglicht eine einphasige Reaktionsführung und eine anschließende Katalysatorabtrennung mittels Flüssig-Flüssig-Zweiphasentechnik. [Schäffner et al. 2009; Dreimann et al. 2017] Dieses elegante Katalyseprinzip wurde sogar vor Kurzem am Beispiel der rhodiumkatalysierten Hydroformylierung von 1-Dodecen in einer kontinuierlich betriebenen Miniplant-Anlage im Langzeitbetrieb aufgenommen. [Zagajewski et al. 2014a]

DUPONT *et al.* fanden heraus, dass auch ionische Flüssigkeiten eine Mischungslücke mit Wasser und organischen Lösungsmitteln ausbilden. [Dupont et al. 2002] So besteht die Möglichkeit dieaktivitäts- und Stabilitätssteigernde sowie löslichkeitserhöhende Wirkung von ILs auf Enzyme und Substrate mit dem beschriebenen Prinzip des effizienten Reaktions- und selektiven sowie sanften Extraktionsprozesses der TMS zu kombinieren. Eine signifikante Kostenersparnis bei den Produktionskosten und eine gleichzeitige Prozessumstellung nach den Prinzipien der „grünen“ Chemie könnten so möglicherweise zu realisieren sein. [Anastas und Eghbali 2010] Nach bestem Wissen wurden thermomorphe Lösungsmittelsysteme mit ionischen Flüssigkeiten als Medium für biokatalytische Reaktionen noch nicht in der Literatur beschrieben.

4 Ergebnisse und Diskussion

Auf der Suche nach einem innovativen Reaktionssystem für biokatalytische Reaktionen wurden die in Schema 4-1 dargestellten Aspekte bearbeitet. Während dieser Arbeit entstand ein umfangreiches Netzwerk an Informationen, die auf Grund der Komplexität in zwei Ergebnisteile aufgetrennt werden sollen. Im Folgenden werden demnach zuerst die Entwicklung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme erläutert und anschließend diese hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit für biokatalytische Reaktionen überprüft.



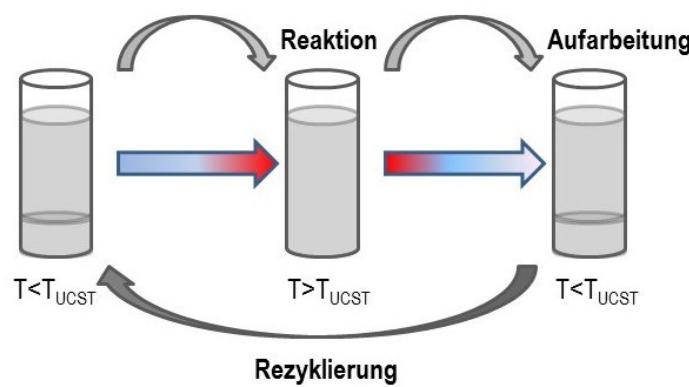
Schema 4-1. Schematische Darstellung der einzelnen Aspekte der entwickelten Reaktionssysteme.

4.1 Die Entwicklung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von thermomorphen Lösungsmittelsystemen auf Grundlage von wässrigen Lösungen. Der Gebrauch von organischen Lösungsmitteln stellte zuerst nur eine Ergänzung im wässrigen TMS, später aber auch eigenständige Systeme dar. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, basieren thermomorphe Lösungsmittelsysteme auf mindestens zwei Lösungsmitteln, die eine temperaturabhängige Mischungslücke aufweisen. Die Konzentration dieser Arbeit lag dabei auf Lösungsmittelmischungen, die eine obere kritische Lösungstemperatur aufweisen (engl.: upper critical solution temperature, UCST). Bei diesem Verhalten sind oberhalb der UCST zwei oder mehrere Stoffe in allen Konzentrationsverhältnissen vollständig mischbar und bilden eine einzige Phase; unterhalb der UCST bildet sich ein Zweiphasensystem aus. [Nič und Jirát 2009] Die Herausforderung lag darin Mischungen aus ionischen Flüssigkeiten, Pufferlösungen und organischen Lösungsmitteln so zu definieren, dass

- i. ihre obere kritische Lösungstemperatur, also die Temperatur bei dem das Zweiphasensystem (2PS) in ein Einphasensystem (1PS) übergeht, den Bereich, in dem potentielle Enzyme eingesetzt werden können ($30\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$), trifft,
- ii. sowohl die Edukte als auch die Produkte in den gewählten Solventien gut löslich sind,
- iii. die zwei Phasen unterhalb der UCST in etwa gleiche Volumina aufweisen
- iv. und vor allem auch der Biokatalysator in der Umgebung stabil und aktiv ist.

Im folgenden Kapitel wird auf die einzelnen bearbeiteten Teilschritte *Reaktion*, *Aufarbeitung* und *Rezyklierung* eingegangen (Schema 4-2).



Schema 4-2. Prinzip der thermomorphen Lösungsmittelsysteme.

Zu Beginn liegt ein biphasisches System unterhalb der kritischen Lösungstemperatur der Mischung vor, welches später die zwei Reservoir für einerseits Edukte und Produkte andererseits für den Katalysator

bietet. Die eine Phase enthält idealerweise eine Komponente mittlerer bis geringer Polarität zur uneingeschränkten Löslichkeit der Substrate; die andere Phase besteht aus einem Solvens, dass nachweislich das Enzym stabilisiert. Mit Erhöhung der Temperatur stellt sich dem Prinzip folgend ein monophasisches Verhalten ein, welches eine Reaktion ohne Phasenlimitierung unter milden Bedingungen ermöglicht. Nach Beendigung der potentiellen Reaktion wird die Temperatur unter die Trübungstemperatur T_{Tr} abgesenkt, damit die Phasen und damit die Produkte und der Katalysator sich wieder voneinander trennen. Dieses vereinfacht die Aufarbeitung aus der einen Phase und ermöglicht die simple Rückführung des Enzyms durch Rezyklierung der anderen Phase. Damit verbindet das Konzept der thermomorphen Lösungsmittelsysteme die Vorteile der klassischen homogenen Enzymkatalyse mit denen der Flüssig-Flüssig-Mehrphasensysteme. Ein wesentlicher Gewinn der TMS liegt in der einfachen Rezyklierbarkeit des Biokatalysators und der erhöhten Löslichkeit der Substrate durch Einsatz von ionischen Flüssigkeiten und organischen Solventien im hochpolaren wässrigen Puffersystem. [Ronde und Vogt 2006; Dreyer und Kragl 2008]

4.1.1 Verwendung von organischen Lösungsmitteln

Der Einsatz organischer Lösungsmittel als Komponenten mittlerer und geringer Polarität neben dem polaren Wasser als Bestandteil thermomorpher Lösungsmittelsysteme entsprang der Annahme und dem Nachweis, dass diese Solventien Enzyme stabilisieren können und vergleichbare oder sogar erhöhte Aktivitäten hervorrufen (vgl. Kapitel 3.3). Des Weiteren überwinden sie die schlechte Löslichkeit organischer Substrate in dem klassischen wässrigen Medium. Damit stellen die organischen Lösungsmittel unterhalb der UCST das Reservoir für Substrate und entstehende Produkte dar und die Pufferphase dient dem Biokatalysator als Reservoir. Weitere Vorteile organischer Lösungsmittel als Medium enzymatischer Reaktionen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen [Sellek und Chaudhuri 1999; Gerhards 2013] beschrieben und können wie folgt zusammengefasst werden:

- i. Spezifität des Biokatalysators kann verändert werden (bspw. bezüglich der Stereoselektivität)
- ii. reduzierte Wasseraktivität verändert das hydrolytische Gleichgewicht
- iii. unerwünschte Nebenreaktionen, die in wässriger Umgebung stattfinden, können minimiert werden
- iv. unpolare organische Lösungsmittel verdrängen das enzymgebundene Wasser nicht
- v. Substrat- und Produktverteilung werden beeinflusst, was zu höheren Ausbeuten führen kann und die Separation erleichtert
- vi. verminderte mikrobielle Kontamination
- vii. erhöhte Stabilität von Katalysatoren in unpolaren organischen Lösungsmitteln möglich

Jedoch bringen laut Sellek und Chaudhuri organische Lösungsmittel auch einige Nachteile mit sich [Sellek und Chaudhuri 1999]:

- i. eventuelle Reduktion der Enzymaktivität
- ii. dadurch höherer Enzymeinsatz nötig
- iii. polare organische Lösungsmittel können Enzyme denaturieren
- iv. im 2PS auftretende Grenzflächen können Katalysatoren inaktivieren
- v. Wasseraktivität muss kontrolliert werden, besonders im Fall von Kondensationsreaktionen

Die Wasseraktivität spielt bei organischen Lösungsmitteln mit minimalem Wassergehalt eine wichtige Rolle, da die Eigenschaften der Enzyme von deren Umgebung abhängig sind. [Gupta und Roy 2004] Es konnte gezeigt werden, dass Biokatalysatoren ein Aktivitätsoptimum in Bezug auf die Wasseraktivität und nicht nur in Bezug auf die Wasserkonzentration zeigen. [Andersson 1980; Grant 2004]. Auch die Stereoselektivität eines Enzyms kann sich je nach Wasseraktivität des Mediums ändern. [Carrea et al. 1995, Klibanov 2003; Dimoula 2009] In diesem Abschnitt der Arbeit wurde nicht in reinen wasserfreien Lösungsmitteln, sondern stets in Mischungen von organischen Lösungsmitteln mit Wasser gearbeitet. Aus diesem Grund kann bei diesen TMS die Wasseraktivität in der Betrachtung der Einflüsse vernachlässigt werden.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen beschränkten sich auf klassische organische Lösungsmittel. In Hinblick auf die Anwendung organischer Lösungsmittel-basierter TMS als Medium biokatalytischer Reaktionen wurde der Einfluss der Polarität der Lösungsmittel auf das Enzym diskutiert. Werden organische Lösungsmittel, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, als Medium für biokatalytische Reaktionen verwendet, so scheint der *logP* des Lösungsmittels entscheidend für den Einfluss auf das Enzym zu sein. [Laane et al. 1985] Laut CARREA UND RIVA seien Einflüsse reiner organischer Lösungsmittel auf eine Interaktion mit dem enzymgebundenen Wasser und nicht auf eine Interaktion mit dem Enzym zurückzuführen. [Carrea und Riva 2000] Es wird erörtert, ob daher ein unpolares Lösungsmittel besser für den Einsatz in der Biokatalyse geeignet ist: Wasser, welches das Enzym umgibt, wird durch ein weniger polares Lösungsmittel nicht verdrängt; ein polares Lösungsmittel hingegen könnte die essentielle Wasserschicht um das Enzym verdrängen und den Biokatalysator somit inaktivieren. Als geeignete organische Lösungsmittel in Kombination mit Biokatalysatoren wurden mehrfach folgende Beobachtungen beschrieben [Laane et al. 1987; Gupta 1992]:

$\log P < 2$	schlechte Aktivität
$\log P 2-4$	unterschiedliche Ergebnisse
$\log P > 4$	gute Aktivität

Dagegen wurde beobachtet, dass in einigen Fällen dieses Prinzip nicht auf alle Biokatalysatoren übertragbar ist und beispielsweise auch die funktionellen Gruppen des Lösungsmittels an sich neben der

Polarität Einfluss auf die Aktivität der Enzyme hat. [Villela Filho et al. 2003] Andere sekundäre Effekte, die zu schlechten Aktivitätswerten führen, können sein:

- i. kompetitive Inhibierung des Enzyms
- ii. irreversible Proteinfällung
- iii. Ausbildung einer nicht aktiven Spezies durch inkorrekte Protein-Faltung (z. B. durch eine Neuordnung von Wasserstoffbrückenbindungen)
- iv. direkte chemische Reaktion zwischen Enzym und Lösungsmittelmolekül

Für Mischungen von Lösungsmitteln untereinander hat sich die empirische $E_T(30)$ -Polaritätsskala von Dimroth und Reichardt bewährt, welche mit Hilfe eines negativ solvatochromen Farbstoffes bestimmt wird. [Reichardt und Dimroth 1968] Diese Skala beschreibt die Übergangsenergie (E_T , kJ/mol) des gelösten Farbstoffes bei 25 °C und 1 bar - je höher der $E_T(30)$ -Wert ist, desto höher ist auch die Polarität des Lösungsmittels. In Hinblick auf die Mischung mit Wasser kann bei den Lösungsmitteln selbstverständlich auch gleichbedeutend von hydrophil (polar) oder hydrophob (unpolar) gesprochen werden. Mit diesem Wissen konnte die Einteilung der Solventien nach ihrer Polarität (Tabelle 4-1) und eine erste Abschätzung möglicher thermomorpher Lösungsmittelgemische vorgenommen werden.

Tabelle 4-1. Verwendete organische Lösungsmittel geordnet nach der $E_T(30)$ -Skala. [Reichardt und Welton 2011]

Lösungsmittel	$E_T(30)$ [kJ/mol]	Lösungsmittel	$E_T(30)$ [kJ/mol]
Wasser	263,8	DMF	183,1
Ethylenglykol	235,3	Aceton	176,4
Methanol	232,0	Dichlormethan	171,8
Ethanol	216,9	Chloroform	163,4
Essigsäure	214,0	Ethylacetat	159,3
1-Propanol	211,9	THF	156,3
1-Butanol	209,8	1,4-Dioxan	150,0
1-Hexanol	204,2	MTBE	145,2
2-Propanol	203,1	Diethylether	144,6
1-Heptanol	202,9	Toluol	141,7
1-Octanol	201,3	Tetra(chlorkohlenstoff)	135,9
1-Nonanol	199,9	Cyclohexan	130,4
1-Decanol	199,6	<i>n</i> -Heptan	130,1
Acetonitril	192,3	Pantan	129,7
DMSO	188,1	<i>n</i> -Hexan	129,2

Das erste Screening sollte Aufschluss darüber geben, wie sich die gewählten Lösungsmittel in der 1:1-Mischung miteinander verhalten. Tabelle A-28 im Anhang bietet eine Übersicht der Ergebnisse.

Generell gilt, dass die Mischbarkeit von Stoffen von der Molekülgeometrie und von den Wechselwirkungskräften zwischen den Teilchen abhängig ist. Mögliche Wechselwirkungskräfte sind:

- i. Coulomb Kräfte, wie sie zwischen entgegengesetzten Ionen wirken,
- ii. Coulomb Kräfte, wie sie zwischen Molekülen mit permanenten Dipolmomenten wirken (Wasserstoffbrückenbindungen) und
- iii. Coulomb Kräfte, die auf zeitlich fluktuierende Dipolmomenten beruhen (Van der Waals-Kräfte)

Für das Mischungsverhalten sind die Differenzen der Wechselwirkungskräfte von entscheidender Bedeutung. Je größer die Differenz der Wechselwirkungskräfte von zwei Stoffen ist, desto unterschiedlicher sind deren physikalische Eigenschaften und damit auch das Auftreten und die Größe einer Mischungslücke. [Hug und Reiser 2013] Aus thermodynamischer Sicht kann die Phasenseparation allgemein mit Hilfe der freien Mischungsenthalpie ΔG_{mix} erklärt werden. Die Änderung der freien Mischungsenthalpie ΔG_{mix} ist definiert als die Differenz aus der Änderung der Mischungsenthalpie ΔH_{mix} und der Änderung der Mischungsentropie ΔS_{mix} pro absolutem Temperaturwert T (Gleichung (4-1)). Bei konstanter Temperatur und konstanten Druck ist ein Zustand dann stabil, wenn seine freie Mischungsenthalpie minimal ist.

$$\Delta G_{\text{mix}} = \Delta H_{\text{mix}} - T \cdot \Delta S_{\text{mix}} \quad (4-1)$$

Ist ΔG_{mix} negativ, so sind zwei Stoffe miteinander mischbar. Wird Mischungswärme von den zwei Stoffen beim Mischungsvorgang aus der Umgebung aufgenommen, handelt es sich um einen endothermen Vorgang ($\Delta H_{\text{mix}} > 0$), wird Mischungswärme abgegeben, verläuft der Prozess exotherm ($\Delta H_{\text{mix}} < 0$). Die Mischungsentropie ΔS_{mix} gibt den Grad der Unordnung aufgrund des Vermischens an. Ist der Term $T\Delta S_{\text{mix}}$ größer als der der Mischungsenthalpie ΔH_{mix} , resultiert daraus ein negativer Wert für ΔG_{mix} und das System wird einphasig. Bei einer Verringerung der Mischungsentropie ΔS_{mix} gegenüber dem Term ΔH_{mix} , wird ΔG_{mix} positiv und das System zerfällt in zwei Phasen. Beim erwünschten UCST-Verhalten eines thermomorphen Systems muss ΔS_{mix} also positiv sein, darf bei niedrigen Temperaturen den Term ΔH_{mix} aber nicht übertreffen. Bei moderater Erhöhung der Temperatur T muss $T\Delta S_{\text{mix}}$ allerdings größer als ΔH_{mix} werden, damit in Folge ΔG_{mix} negativ und das System einphasig wird. [Dreyer 2009] Aufgrund der Anforderung an potentielle enzymatische Reaktionen bewegt sich dieser Bereich nur in einem kleinen ΔT .

Durch diese Kenntnis und die experimentelle Vorarbeit aus Tabelle A-28 konnte weiter wie folgt vorgegangen werden: alle bei 25 °C unmischbaren Lösungen könnten durch

- i. Erhöhung der Temperatur
- ii. Variation der Volumenverhältnisse

- iii. Zusatz eines dritten Lösungsmittels, dass mit beiden ursprünglichen Komponenten mischbar ist (als sogenannter Phasenvermittler)

einphasig werden. Nachdem sich nach Bearbeitung von Punkt i und ii kein thermomorphes System aus 2 Komponenten im Temperaturbereich von 20 °C bis 60 °C mit optimalem Phasenverhältnis finden ließ, konzentrierte sich die Arbeit auf Punkt iii. Da Wasser in der Mischung mit organischen Lösungsmitteln am häufigsten heterogene Phasen ausbildet (siehe Tabelle A-28 im Anhang) und ein Standardmedium für enzymatische Reaktionen darstellt, wurde dies weiter untersucht.

Die Ergebnisse in der Reihe Wasser in Tabelle A-28 zeigen, dass die Ordnung der Lösungsmittel nach $E_T(30)$ -Werten nicht der Polaritätsfolge in den Mischungen entspricht. Die Begründung liegt in den möglichen Wechselwirkungen der Lösungsmittel miteinander gegenüber der errechneten Polarität aus der Wechselwirkung eines Lösungsmittels mit den negativ solvatochromen Farbstoff. Auf Basis dieser Annahme wird die Ordnung der Polarität der verwendeten Lösungsmittel zu Gunsten einer besseren Übersicht geändert und auf Grundlage der Mischbarkeit von Wasser mit den organischen Lösungsmitteln in polar – semi-polar und unpolär unterteilt (Tabelle A-29 im Anhang). Dabei sind die Lösungsmittel der Spalte *unpolar* zugeordnet worden, wenn das Lösungsmittel nicht mit Wasser im Verhältnis 50% (v/v) zu 50% (v/v) bei 25 °C mischbar ist und eine zweite Phase ausbildet; der Spalte *semi-polar* sind alle Solventien zugeordnet, die mit Wasser im genannten Verhältnis bei 25 °C nur eine Phase aufweisen.

Im Hinblick auf die Anwendung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme als Medium für biokatalytische Reaktionen, bei denen ein stabiler pH-Wert essentiell ist, wurde reines Wasser durch einen 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (Abk.: KPi) ersetzt und als Lösungsmittel mit der höchsten Polarität fortan als unveränderbare Komponente mit 40% (v/v) in den organisch-thermomorphen Lösungsmittelsystemen festgelegt. In der Mischung von 40% (v/v) KPi (pH 7,0) mit 60% (v/v) der aufgeführten unpolaren organischen Lösungsmittel aus Tabelle A-29 wurde nun das Phasenverhalten im Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C studiert. In diesem Intervall konnte bei keiner der Mischungen eine makroskopische Veränderung des Phasenzustandes beobachtet werden, so dass die kritische Lösungstemperatur aller zweiphasigen Mischungen oberhalb von 80 °C zu liegen scheint. Da diese Temperatur weit über den Temperatur-Bereich der potentiellen Enzyme liegt, wurde zur Herabsetzung der kritischen Lösungstemperatur eine dritte Komponente als Phasenvermittler eingesetzt. Bei dieser experimentellen Untersuchung wurden zu 40% (v/v) KPi 10-45% (v/v) eines unpolaren Lösungsmittels sowie 15-50% (v/v) der dritten mittelpolaren Komponente zugefügt. Ein Ausschnitt dieses systematischen Vorgehens ist in Tabelle A-30 im Anhang mit ausgewählten Lösungsmitteln und im Temperaturbereich von 20 °C bis 60 °C dargestellt. Im Zuge der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass es einen

höheren Anteil an semi-polaren Lösungsmittel bedarf in Bezug auf die Konzentration der polaren Komponente, um die kritische Lösungstemperatur in den gewünschten Bereich zu zwingen.

Interessant waren eingangs diejenigen Systeme, die im Bereich zwischen 20 °C bis 40 °C (oder darüber) zweiphasig waren und möglicherweise sich bei höheren Temperaturen in den gewählten Zusammensetzungen ein Einphasensystem ausbildete. Da Mischungen mit 1-Butanol, 1-Octanol, Ethylacetat sowie Diethylether fast ausnahmslos einphasig blieben (Ausnahme: THF), wurden diese Systeme nicht weiter betrachtet. Dahingegen konnte bei den sehr unpolaren Lösungsmitteln Hexan, Heptan, Cyclohexan, Tetrachlorkohlenstoff und Toluol in der Mischung mit KPi stets Zweiphasensysteme beobachtet werden, die durch Zusatz keines Phasenvermittlers in den gewählten Volumina im Bereich bis 60 °C einphasig wurden; und auch bei Erniedrigung der unpolaren Komponenten bis auf 10% (v/v) und gleichzeitiger Erhöhung der Phasenvermittler-Konzentration bis auf 50% (v/v) blieben die Systeme aufgrund der zu hohen Polaritätsunterschiede zweiphasig. Um beispielsweise die bekannte ausgedehnte Mischungslücke von Wasser und Toluol [Hooper et al. 1988; Kahlweit et al. 1989] zurückzudrängen, müssten kurzkettige Alkohole (Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol) im großen Überschuss zugesetzt werden. Ebenso bildete sich mit Dichlormethan und Chloroform in der Mischung mit 40% (v/v) KPi und mit in der Tabelle aufgeführten semi-polaren Phasenvermittlern keine einphasige klare Lösung aus.⁴ Die Mischung aus THF und Wasser ist ebenso gut untersucht [Hooper et al. 1988] und zeigt bei einer Zusammensetzung von 50% (v/v) THF und 50% (v/v) Wasser bis zu einer Temperatur von 71,8 °C vollständige Mischbarkeit; oberhalb dieser Temperatur bildet sich eine kleine Mischungslücke aus, die sich bei 137,1 °C wieder schließt. [Matouš et al. 1970] Daher war das System aus KPi, THF und verschiedenen organischen Phasenvermittlern näher zu untersuchen (siehe 4.1.1.1). Weiterhin auffällig in Tabelle A-30 ist die Mischung aus 40% (v/v) KPi mit 20% (v/v) MTBE und verschiedenen semi-polaren Lösungsmitteln. So konnte durch wenige Untersuchungen gezeigt werden, dass KPi und MTBE in Kombination mit 1-Propanol und 2-Propanol unter 30 °C zweiphasig und darüber einphasig sind und die Mischung aus KPi-MTBE-Acetonitril seine kritische Lösungstemperatur im Bereich zwischen 30 °C und 40 °C zu haben scheint.

Auf Grund dieser gewonnenen Erkenntnise wurden im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit die thermomorphen Systeme auf Basis von THF und MTBE als potentielle Medien enzymatischer Reaktionen eingängiger betrachtet und charakterisiert.

⁴ Eine Mischungslücke mit den Komponenten Chloroform-Essigsäure-Wasser ist hingegen literaturbekannt, soll hier aber nicht weiter betrachtet werden. [Gmehling et al. 1995] Nach Möbius [Möbius 1955] zeigt auch eine Mischung aus Wasser-Aceton-Benzol eine Mischungslücke.

4.1.1.1 Charakterisierung der KPi-THF-TMS

Wie bereits erwähnt ist THF mit Wasser unterhalb von 71,8 °C vollständig mischbar. Untersuchungen von 40% (v/v) THF mit 40% (v/v) KPi und 20% (v/v) unpolarer organischer Lösungsmittel (siehe Tabelle A-29) zeigten stets ein Zweiphasensystem auf. Zwei Erklärungen liegen für diese Beobachtung nahe: zum Einen ist durch Zugabe von 20% (v/v) eines unpolaren Lösungsmittels zur Mischung aus KPi und THF der Unterschied der Polaritäten zu groß und es bildet sich ein 2PS; zum Anderen bestand die Mischung nicht aus Wasser als polare Komponente, sondern aus 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, welcher das Phasenverhalten ebenso in Richtung Zweiphasensystem beeinflusst. Da die kritische Lösungstemperatur der reinen Mischung aus Wasser und THF von $UCST = 71,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ für enzymatische Reaktionen zu hoch liegt, war es daraufhin eine Möglichkeit

- i. entweder den Anteil der dritten unpolaren Komponente noch weiter zu erniedrigen (< 20% (v/v)), um im gewählten Temperaturintervall eine Phasenänderung vom Zwei- zum Einphasensystem zu beobachten
- ii. oder dem Gemisch aus 40% (v/v) KPi und THF in veränderlichen Anteilen semi-polare Lösungsmittel zu zusetzen, die eine ähnliche oder höhere Polarität als THF aufweisen, um den Bereich unterhalb der bekannten Mischungslücke zu schmälern und bei niedrigeren Temperaturen vom Einphasen- in das Zweiphasengebiet überzugehen.

In beiden Punkten konnten positive Ergebnisse erzielt werden, welche in Tabelle A-31 dargestellt sind. Es ist zu erkennen, dass der Zusatz semi-polarer organischer Lösungsmittel wie MTBE, Ethylacetat, Chloroform, Dichlormethan und 1-Octanol eine makroskopische Phasenänderung im betrachteten Temperaturintervall bewirkt; jedoch zum Einen ein ungünstiges Verhältnis der Phasen aufweist, zum Anderen erst wieder unter 10 °C einphasig wird und daher für die Anwendung ungünstig ist. Im Bereich stärker polarer Lösungsmittel, wie Methanol und Ethanol, kommt es im Temperaturbereich von 10 °C bis 60 °C zu keiner Phasenänderung, da die Mischung überwiegend polaren Charakter besitzt. Im Bereich der semi-polaren Lösungsmittel 1-Butanol, DMSO und Propanol konnte eine Erniedrigung der kritischen Lösungstemperatur beobachtet werden, die es nicht nur ermöglicht eine Phasenänderung vom 1PS zum 2PS durch Temperaturerhöhung zu steuern (wie bspw. im thermomorphen System aus KPi-THF-Propanol), sondern es konnte ein kleiner Bereich einer geschlossenen Mischungslücke zwischen 20 °C und 50 °C im TMS aus KPi-THF-DMSO gefunden werden. Aceton und Acetonitril haben wie Methanol und Ethanol keinen sichtbaren Effekt im gewählten Konzentrations- und Temperaturbereich und könnten in der Schlussfolgerung in Bezug auf die Ordnung der Polaritäten in Mischungen zu höheren Polaritäten verschoben werden. Das beste System scheint das TMS aus KPi-THF-Butanol zu sein, da es bei

niedrigeren Temperaturen ($< 30^{\circ}\text{C}$) zweiphasig vorliegt und bei Temperaturen über 30°C einphasig wird. Zudem besitzt 1-Butanol einen semi-polaren Charakter, so dass es im Hinblick auf die Interaktion mit Biokatalysatoren das enzymgebundene Wasser nicht verdrängt.

Zur genaueren Charakterisierung des Systems KPi-THF-Butanol wurden die Trübungstemperaturen T_{Tr} veränderlicher Mischungen bestimmt, die jedoch stets 40% (v/v) KPi aufweisen (Abbildung A-2). Das TMS aus KPi, THF und 1-Butanol zeigt erwartungsgemäß mit steigender Konzentration an THF (und damit sinkendem Volumenanteil an 1-Butanol) einen Anstieg der Trübungstemperatur. Der optimalste Übergang vom Zweiphasen- in das Einphasen-Gebiet für biokatalytische Reaktionen liegt bei $T_{Tr} = 21^{\circ}\text{C}$ und weist eine Lösungsmittel-Zusammensetzung von 40% (v/v) KPi, 45% (v/v) THF und 15% (v/v) 1-Butanol auf. Die ebenso möglichen Gemische mit 47,5% (v/v) ($T_{Tr} = 25^{\circ}\text{C}$) und 50% (v/v) THF ($T_{Tr} = 29^{\circ}\text{C}$) liegen zwar im gewünschten Temperaturbereich, zeigen jedoch kein optimales Phasenverhältnis von 1:1 im entmischtten Phasenzustand.

Wasser, THF und 1-Butanol sind in der Einzelanwendung in der Biokatalyse bekannt. Wasser als natürliches Medium und auch die hohe Hydrophobizität des THF ermöglichen eine gute Verträglichkeit mit Enzymen. 1-Butanol und THF mit ihren geringeren logP-Werten von 0,78 und 0,45 bergen nach der Einteilung von LAANE *et al.* die Gefahr der schnellen Enzymdeaktivierung (vgl. Kapitel 4.1.1) Jedoch ist das logP-Konzept nur als ein Faktor bei der Beurteilung der Biokompatibilität eines organischen Lösungsmittels zu verstehen und kann auf Grund der zahlreichen spezifischen Wechselwirkungen nicht auf ein komplexes Mehrphasensystem übertragen werden.

4.1.1.2 Charakterisierung der KPi-MTBE-TMS

Wie schon in Tabelle A-30 dargestellt, konnten mit KPi, MTBE und einer dritten Komponente Lösungsmittelsysteme gefunden werden, die im Temperaturbereich von 20°C bis 60°C thermisch schaltbar sind. Neben den bereits erwähnten erfolgreichen Phasenvermittlern Acetonitril, 1-Propanol und 2-Propanol wurden weiterhin noch die semi-polaren Lösungsmittel Aceton, DMSO, 1,4-Dioxan, Methanol und Ethanol in veränderten Volumina in der Mischung mit KPi und MTBE untersucht. Der Volumenanteil des Puffers wurde dabei konstant bei 40% (v/v) in der Mischung gehalten, die Volumina des MTBE und der Phasenvermittler variierten von 10-50% (v/v). Tabelle A-32 kann entnommen werden, dass in der Mischung mit DMSO und 1,4-Dioxan selbst bei Konzentrationsanteilen von 50% (v/v) der beiden Phasenvermittler keine Trübungstemperaturen unter 60°C erreicht wurden. Möglicherweise kommt hier der löslichkeitsvermittelnde Effekt auf die Mischung KPi-MTBE nicht zum Tragen, da beide Verbindungen weniger elektronegativ sind und somit das Wasserstoffbrücken-Netzwerk des Wassers nicht im übermäßigen Maße stören, um mit den weniger polaren Lösungsmitteln zu interagieren. Alle anderen

Komponenten zeigten den erwünschten Effekt innerhalb von 10 °C bis 60 °C vom 2PS ins 1PS überzugehen. Aufgrund der Tatsache, dass Acetonitril und Aceton gegenüber Methanol, Ethanol und Propanol weniger polar sind – und damit geeigneter für die Biokatalyse - und trotzdem in den gezeigten Zusammensetzungen thermomorphe Lösungsmittelsysteme ausbilden, wurden diese zwei Phasenvermittler näher untersucht.

Nachfolgend wurden die Trübungstemperaturen T_{Tr} der verschiedenen Zusammensetzungen im Bereich von 0 bis 100 °C bestimmt. Abbildung A-3 zeigt den Einfluss von Acetonitril als Phasenvermittler auf das thermomorphe Lösungsmittelsystem bei variierendem Puffervolumen (50 mM, pH 7,0). Das TMS mit einer Zusammensetzung aus 50% (v/v) KPi, 10% (v/v) MTBE und 40% (v/v) Acetonitril hat eine Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 21$ °C und eignet sich für weitere Betrachtungen als potentielles Medium für biokatalytische Reaktionen, da

- i. die kritische Lösungstemperatur unterhalb der bevorzugten Reaktionstemperatur der Enzyme liegt
- ii. Acetonitril und MTBE aufgrund der geringeren Polarität weniger das enzymgebundene Wasser verdrängen
- iii. die organischen Lösungsmittel den Biokatalysator stabilisieren können
- iv. Acetonitril und MTBE in wässriger Lösung die Löslichkeit der Substrate und Produkte erhöhen
- v. Acetonitril und MTBE ohnehin gebräuchliche Extraktionsmittel sind

Das System aus 40% (v/v) KPi, 10% (v/v) MTBE und 50% (v/v) Acetonitril beispielsweise hat eine Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 24$ °C und ist daher ebenfalls als TMS geeignet. Es wurde ebenso das Phasenverhältnis der Komponenten im 2PS studiert: in der Mischung mit nur 40% (v/v) KPi lag dieses bei nahezu 1:1 und wurde als optimal für den anschließenden Aufarbeitungs- und Rezyklierungsschritt angesehen. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem Volumenanteil vorgenommen.

Als ein nächstes phasenvermittelndes organisches Lösungsmittel wurde Aceton im organischen TMS getestet. Es wurden Volumenanteile von 10 bis 50% (v/v) Aceton untersucht und die Ergebnisse im Temperaturbereich von 20 bis 100 °C vergleichend zu Acetonitril in Abbildung A-4 dargestellt. Aceton und Acetonitril zeigen ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die Trübungstemperatur bei Zugabe verschiedener Konzentrationen zu der Mischung aus 40% (v/v) KPi und abhängigen Anteilen an MTBE. Das nach der $E_T(30)$ -Skala polarere Lösungsmittel Acetonitril zeigt anfangs einen geringeren Einfluss als Aceton auf die Mischbarkeit der Phasen KPi-MTBE, jedoch entwickelt sich eine deutlich steilere Kurve mit zunehmendem Volumenanteil des Acetonitrils und damit ein größerer phasenvermittelnder Effekt auf

die zwei unmischbaren Phasen. LANGE et al. [Lange et al. 2011] konnten röntgenspektroskopisch zeigen, dass das Vermischen von Wasser mit Acetonitril zum Aufbrechen des Wasserstoffbrücken-Netzwerks zwischen den Wassermolekülen führt. Das hat zur Folge, dass die Unordnung ΔS_{mix} im System steigt und mit gleichzeitigem Übersteigen des Wertes für ΔH_{mix} die Freie Mischungsenthalpie ΔG_{mix} negativ wird – die Phasen mischen sich. Durch die Erhöhung der Temperatur T erhöht sich in noch größerem Maße der Term $T\Delta S_{\text{mix}}$; ΔG_{mix} nimmt einen negativen Wert an und das thermomorphe System wird demnach einphasig. Bei Betrachtung der Strukturen von Acetonitril und Aceton, ist ersichtlich, dass beide Moleküle nicht aktiv Wasserstoffbrücken ausbilden können. Sie bilden mit den C-N- und C-O-Bindungen den elektronegativen Gegenpart zu den H-Donor Wasser, folglich also den H-Akzeptor-Teil der Bindung. Da Sauerstoff stärker elektronegativ ist als Stickstoff, die Bindungselektronen in der C-X-Bindung also stärker an sich zieht, wird Aceton mit Wasser eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung ausbilden als Acetonitril mit Wasser. Damit kann Aceton in der Mischung mit Wasser die Wasserstoffbrücken innerhalb des Wassers stärker unterbinden, eine größere Entropie erzeugen und daher einen größeren phasenvermittelnden Effekt in der Mischung KPi-MTBE-Aceton ausüben. Diese Überlegung könnte die anfänglich niedriger liegende Kurve des Acetons in Abbildung A-4 erklären. Dass die Kurve des Acetonitrils mit steigender Temperatur T im Vergleich zum Aceton weniger moderat fällt, ist einem thermodynamischen Effekt zuzuschreiben.

Die in diesem Abschnitt entwickelten thermomorphen Lösungsmittelsysteme dienen in Kapitel 4.2 als Vergleichssysteme. Sie sollen das Verhalten der Reaktion zwischen IL-basierten TMS sowie klassischen Zweiphasensystemen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln wiederspiegeln.

4.1.2 Verwendung von Ionischen Flüssigkeiten

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden auch thermomorphe Lösungsmittelsysteme auf Basis von ionischen Flüssigkeiten untersucht. Für das Prinzip der TMS sollten die ILs folgende Anforderungen erfüllen:

- i. Die IL sollte die Löslichkeit der Substrate der Testreaktionen bei Raumtemperatur im Vergleich zu Wasser erhöhen.
- ii. Die IL sollte möglichst frei von Verunreinigungen sein, da diese das Phasenverhalten beeinflussen.
- iii. Die IL sollte bei Raumtemperatur flüssig sein (RTIL).

Nach diesem Ausschlussverfahren entsprachen 40 kommerziell erhältliche bzw. synthetisch leicht zugängliche ionische Flüssigkeiten mit verschiedensten Anionen und mit unterschiedlichen Alkylkettenlängen des Kations

den Anforderungen für weitere Untersuchungen und sind in einer Übersicht in Tabelle A-1 im Anhang zusammengefasst.

Im unverdünnten Zustand liegen ionische Flüssigkeiten hauptsächlich als Ionenpakete vor; diese Clusterbildung konnte von Mitarbeitern um KRAGL bereits 2012 mittels massenspektroskopischen Messungen nachgewiesen werden. [Köddermann et al. 2012] Die Verdünnung einer ionischen Flüssigkeit mit einem Lösungsmittel sollte zu einem Aufbrechen der Ionenpakete in kleinere Pakete und im Idealfall sogar zur Bildung von einzelnen, solvatisierten Ionen führen. Ein detailliertes Verständnis des Lösungsprozesses von ILs in Wasser konnte durch die Arbeiten von ZHANG et al. gewonnen werden, die beschrieben, dass mit zunehmendem Wassergehalt in bspw. [EMIm][BF₄]/Wasser-Gemischen die dreidimensionale Netzwerkstruktur von reinen ILs zunächst schrittweise in ionische Cluster zerlegt wird und dann die Cluster weiter in wasserumschlossene ionische Paare dissoziieren. [Dong et al. 2006; Zhang et al. 2008a] Andererseits haben thermodynamische Untersuchungen von Imidazolium-basierten IL/Wasser-Systemen gezeigt, dass bei kleinen Molenbrüchen der IL ($x_{IL} = 0,013 - 0,015$) bspw. das [BMIm]-Kation und sein Gegenion vollständig dissoziert sind [Katayanagi et al. 2004a; Katayanagi et al. 2004b; Miki et al. 2005] und in Übereinstimmung mit den Arbeiten von MIZUTANI et al. zu größten Teilen die native Konformation beibehalten. [Mizutani et al. 2003] Nach DUPONT et al. ist eine IL nämlich dann mit Wasser mischbar, wenn die wässrige Phase in der Lage ist, die Ionen der IL zu solvatisieren und somit die elektrostatischen Interaktionen zwischen den IL-Ionen aufzuheben. [Dupont et al. 2015] Je polarer die Anionen und Kationen der IL sind, desto besser können diese von Wasser solvatisiert werden und desto hydrophiler ist die IL. Die Hydrophobizität des Anions zeichnet sich durch eine geringe Ladungsdichte aus, wodurch diese Anionen weniger gut hydratisiert werden und eine höhere Affinität zur IL aufweisen. Hydrophile Kationen hingegen besitzen eine große Ladungsdichte und werden besser hydratisiert. Mit steigender Alkylkettenlänge nimmt diese Mischbarkeit mit Wasser allerdings wieder ab.

Wird die Mischbarkeit ionischer Flüssigkeiten mit anderen Lösungsmitteln von Seiten der Polarität betrachtet, so ist die Ionenspezies der IL ausschlaggebend. Polare ionische Flüssigkeiten weisen eine ausgeprägte Asymmetrie ihrer ElektronendichteVerteilung auf. Heteroatome wie O, N und Halogene sind elektrisch negativ polarisiert, die Atome C und H hingegen eher positiv. Bei ILs ist bekannt, dass hochfluorierte und delokalisierte Anionen wie PF₆⁻ und [NTf₂]⁻ dazu neigen, hydrophobe ILs zu bilden; während IL-Anionen wie Halogenide (z.B. Cl⁻ oder Br⁻), Phosphate oder Carboxylate zumeist besser mit Wasser mischbar sind.

Beim Betrachten des Wassergehalts einiger ausgewählter ionischer Flüssigkeiten (Bestimmung siehe Kapitel A.2.8), ist zu erkennen, dass die Ammonium-basierten ILs einen höheren prozentualen Wasseranteil aufweisen als die Imidazolium-basierten ILs.

Tabelle 4-2. Wassergehalt ausgewählter ionischer Flüssigkeiten. (Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen)

IL	Wassergehalt / %
[N _{1112(OH)}][NTf ₂]	16,7 (\pm 0,6)
[N ₂₂₂₀][HSO ₄]	12,9 (\pm 0,5)
[EMIm][NTf ₂]	1,2 (\pm 0,5)
[EMIm][EtSO ₄]	3,6 (\pm 0,2)
[BMIm][NTf ₂]	3,5 (\pm 0,1)
[BMIm][BF ₄]	2,7 (\pm 0,2)
[BMIm][Tmp]	4,3 (\pm 0,9)

Das Wasser in den untersuchten ionischen Flüssigkeiten stammt in der Regel aus der Umgebungsluft. Viele der ausgewählten ILs für TMS sind hygroskopisch und besitzen daher schon einen gewissen Anteil an Wasser – was das Phasenverhalten beeinflusst. Es wurde während der Phasen der Untersuchungen davon ausgegangen, dass die Änderung des Wassergehalts der verwendeten ILs jedoch gering genug ist, so dass sie vernachlässigt werden können. Die Herstellung reproduzierbarer TMS war ein Indiz dafür.

Erstes Ziel war es nun IL-Wasser-Mischungen zu erzielen, die ein UCST-Verhalten im Temperaturbereich von 0 bis 99 °C zeigen. Es wurden dafür die in Tabelle A-1 aufgeführten ionischen Flüssigkeiten mit Reinstwasser in verschiedenen Verhältnissen stichprobenartig untersucht. Tabelle 4-3 gibt einen beispielhaften Überblick über die IL-Reinstwasser-Mischungen im konstanten Verhältnis von 20:80. Es konnte beobachtet werden, dass es beim Mischen von Reinstwasser und ionischer Flüssigkeit zu einer Volumendilatation kommt, das positive Exzessvolumen jedoch vernachlässigbar ist. Daher wurde zur Vereinfachung im Folgenden bei jeder Zusammensetzung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme angenommen, dass das Gesamtvolumen – unabhängig der Dichte – gleich der Summe der Massenprozente (% (w/w)) der eingewogenen IL und der Volumenprozente (% (v/v)) des pipettierten Reinstwassers ist. Somit werden alle Konzentrationsangaben in Bezug auf die Zusammensetzung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme ebenso in % (v/v) angegeben. Neben der hohen Löslichkeit der hydrophoben Testreaktions-Substrate wurde weiterhin auch die Verteilung der zwei heterogenen Phasen beurteilt, die optimalerweise bei 1:1 liegen sollte.

Tabelle 4-3. Untersuchte ionische Flüssigkeiten mit Reinstwasser im Mischungsverhältnis 20:80. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen zwischen 0 und 99 °C.

	Nr.	20% (v/v) IL	80% (v/v) Reinstwasser			
			0 °C	25 °C	50 °C	99 °C
Ammonium-basierte ILs	1	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	1PS
	2	[N _{1122(OH)}][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	2PS
	3	[N _{1132(OH)}][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	2PS
	4	[N _{1142(OH)}][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	2PS
	5	[N _{1152(OH)}][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	2PS
	6	[N ₁₁₀₀][DMC]	1PS	1PS	1PS	1PS
	7	[N ₂₂₂₀][HSO ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	8	Ammoeng TM 100	2PS	2PS	2PS	1PS
	9	Ammoeng TM 101	2PS	1PS	1PS	1PS
	10	Ammoeng TM 102	2PS	2PS	2PS	1PS
	11	Ammoeng TM 110	1PS	1PS	1PS	1PS
	12	Ammoeng TM 111	2PS	2PS	2PS	2PS
	13	Ammoeng TM 112	2PS	2PS	2PS	2PS
	14	Ammoeng TM 120	2PS	2PS	2PS	2PS
	15	Ammoeng TM 130	1PS	1PS	2PS	2PS
	16	Ammoeng TM 520	2PS	2PS	2PS	2PS
Imidazolium-basierte ILs	17	[EMIm][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	2PS
	18	[EMIm][EtSO ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	19	[EMIm][Br]	1PS	1PS	1PS	1PS
	20	[EMIm][BF ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	21	[BMIm][NTf ₂]	2PS	2PS	2PS	2PS
	22	[BMIm][MeSO ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	23	[BMIm][Me ₂ SO ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	24	[BMIm][Me ₂ PO ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	25	[BMIm][Phos]	1PS	1PS	1PS	1PS
	26	[BMIm][Tmp]	1PS	1PS	1PS	1PS
	27	[BMIm][Br]	1PS	1PS	1PS	1PS
	28	[BMIm][Cl]	1PS	1PS	1PS	1PS
	29	[BMIm][NO ₃]	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	[BMIm][BF ₄]	2PS	1PS	1PS	1PS

	31	[BmIm][PF ₆]	2PS	2PS	2PS	2PS
	32	[MPIm][PF ₆]	2PS	2PS	2PS	2PS
	33	[MOIm][Cl]	1PS	1PS	1PS	1PS
	34	[DMIm][Cl]	2PS	2PS	2PS	2PS
	35	Ecoeng 2111P	1PS	1PS	1PS	1PS
	36	Ecoeng 110	1PS	1PS	1PS	1PS
	37	ViEtImLac	1PS	1PS	1PS	1PS
	38	ViBuImLac	1PS	1PS	1PS	1PS
Pyridinium-basierte ILs	39	[BPy][BF ₄]	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	[BMPy][OTf]	1PS	1PS	1PS	1PS

Die Mischbarkeit von ILs mit Wasser ist stark von der Zusammensetzung der ionischen Flüssigkeit abhängig. Hochfluorierte und delokalisierte Anionen wie PF₆⁻ und [NTf₂]⁻ neigen dazu, 2PS mit Wasser auszubilden, während ILs mit hydrophilen Anionen wie Halogeniden (z.B. Cl⁻ oder Br⁻), Phosphaten oder Carboxylaten zumeist mit Wasser mischbar sind. Auch die Kationen der verwendeten IL haben einen Einfluss auf die Hydrophobizität. Generell lässt sich aussagen, dass die Wassermischbarkeit von ILs mit zunehmender Alkylkettenlänge abnimmt. [Gutowski et al. 2003] Die ammoniumbasierten ionischen Flüssigkeiten mit langen Alkylketten neigen daher aufgrund ihrer hydrophoben Natur dazu mit Wasser partiell nicht-mischbare Phasen auszubilden (vgl. Tabelle 4-3). Es ist bereits bekannt, dass die Cholinium-basierten ILs [N_{11n2(OH)}][NTf₂] mit Wasser eine konzentrations- und temperaturabhängige Mischungslücke ausbilden [Domańska et al. 2014b], die jedoch nur bei der [N_{1112(OH)}][NTf₂]-IL im gewählten Mischungsverhältnis und Temperaturintervall zu beobachten war. Dieses Ergebnis zeigt die stärkere Wechselwirkung von Wasser mit der Cholinium-basierten IL aufgrund der polaren Hydroxylgruppe im Kation bei minimaler Alkylkettenlänge. Mit steigender Alkylkettenlänge sinkt die Mischbarkeit der IL mit Wasser.

[N₁₁₀₀][DMC], auch bekannt als DIMCARB (Dimethylammonium-Dimethylcarbamat) wird seit Langem als Lösungs- und Extraktionsmittel in der organischen Chemie verwendet [Schroth et al. 1989] und weist nur sehr begrenzt den üblichen Salzcharakter auf [Radeglia 1989]. Erst in jüngster Zeit wurde es als ionische Flüssigkeit mit schaltbarer Polarität diskutiert [Phan et al. 2008]. DIMCARB ist ein 1:2-Addukt von CO₂ und Dimethylamin, das bei Raumtemperatur flüssig ist und sich ab 60 °C bei Normaldruck in seine gasförmigen Edukte zersetzt [Stark et al. 2010]. Aufgrund des sehr polaren Charakters dieser Verbindung bildete sich in der Mischung mit Wasser kein Zweiphasensystem aus. Sie wurde später in der Untersuchung mit unpolaren Lösungsmitteln erst weiter betrachtet.

Ebenso bleibt die 20:80-Mischung der ionischen Flüssigkeit $[N_{2220}][HSO_4]$ (Nr. 7 Tabelle 4-3) mit Wasser bei jeder Temperatur einphasig. Das besondere dieser ionischen Flüssigkeit ist, dass sie aus der Kombination der Brønsted-Säure H_2SO_4 und der Brønsted-Base Triethylamin entsteht und als so genannte protische IL (PIL) bezeichnet wird. Bei deren sehr einfachen Herstellung [Chen et al. 2014] kommt es zu einem Protonentransfer von der Säure zur Base, wodurch sich Anion (Protonendonator) bzw. Kation (Protonenakzeptor) bilden und sich in Folge dessen ein H-Brücken-Netzwerk aufbaut. [Greaves und Drummond 2008] Protischen ILs werden eine Reihe von Analogien zu den Eigenschaften von Wasser zugeschrieben, was ihre Attraktivität für biokatalytische Reaktionen steigert [Angell et al. 2007].

Die Löslichkeit der Imidazolium-basierten ionischen Flüssigkeiten in Wasser wird ebenso in hohem Maße durch Wasserstoffbrücken bestimmt. Bei diesen ILs mit kurzkettigen Kationen $[C_1-C_4]$ und $[Cl^-]$, $[Br^-]$, $[~SO_4^-]$, $[~PO_4^-]$, $[NO_3^-]$, und $[BF_4^-]$ -Anionen konnte erwartungsgemäß ein Einphasensystem im Temperaturbereich von 0 bis 99 °C beobachtet werden. Insbesondere die $[EMIm][EtSO_4]$ -IL ist als wasserlösliche ionische Flüssigkeit gut untersucht. [Fröba et al. 2008; Schmidt et al. 2014] Sie ist kommerziell gut verfügbar und wäre auf Grund ihrer positiven Eigenschaften (geringes ökotoxisches Potential, hohe Dauertemperaturstabilität und Hydrolysestabilität) ein guter Kandidat für die thermomorphen Lösungsmittelsysteme. Durch Verlängerung der Alkylkettenlänge des Kations dieser (Imidazolium-basierten) ILs wie im Falle des $[DMIm][Cl]$ überwiegt der unpolare Charakter und die Phasen sind nicht länger vollständig mischbar. Die Hydrophobizität der Anionen kann ebenso mit dem logP-Konzept beschrieben werden. ROPEL et al. veröffentlichten 2005 eine Untersuchung des *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten in Bezug auf $[BMIm]^+$ mit verschiedenen Anionen; dabei ergab sich folgende Reihenfolge, gemäß der gemessenen P-Werte: $BF_4^- < Br^- < NO_3^- < Cl^- < PF_6^- < [NTf_2]^-$. [Ropel et al. 2005] Dies bestätigt die experimentelle Beobachtung, dass $[BMIm][Br]$, $[BMIm][BF_4]$, $[BMIm][NO_3]$, und $[BMIm][Cl]$ vollständig mit Wasser mischbar sind, $[BMIm][PF_6]$ und $[BMIm][NTf_2]$ jedoch nicht (vgl. Tabelle 4-3). SEDDON et al. verglichen ILs aus 1-Alkyl-3-methylimidazoliumkationen und BF_4^- -Anionen und postulierten, dass die ILs $[C_1mim][BF_4]$, $[C_2mim][BF_4]$ und $[C_4mim][BF_4]$ vollständig mit Wasser mischbar sind, während ILs mit längerer Alkylkette ($[C_nmim][BF_4]$, $n = 6-10$) mit Wasser ein 2PS bilden. [Holbrey und Seddon 1999b]

In der Mischung aus Reinstwasser und der $[MPIm][PF_6]$ -IL mit Pentylseitenkette am Kation und dem wasserunlöslichen Anion führt eine Reduktion des Wasservolumens auf 75% (v/v) zu einer Erhöhung der Mischbarkeit. Es resultiert eine obere kritische Lösungstemperatur von $UCST = 33$ °C im gewählten Mischungsverhältnis. Ecoeng 2111P (1-Ethyl-3-Methylimidazoliumdimethylphosphat) und Ecoeng 110 (1-

Ethyl-3-Methylimidazoliummethansulfonat) bilden unter den gewählten Bedingungen Einphasensysteme. Auch die ILs der Positionen 37 bis 40 (ViEtImLac, ViBuImLac, [BPy][BF₄], [BMPy][OTf]) der Tabelle 4-3 sind im gezeigten Mischungsverhältnis im gewählten Temperaturbereich aufgrund der hydrophilen Anionen stets einphasig, da auch hier lokal gerichteten Wechselwirkungen wie H-Brückenbindungen einen erheblichen Einfluss auf die Mischbarkeit der ionischen Flüssigkeiten mit Wasser haben. Da in den gewählten Mischungen im gewünschten Bereich von 20 °C bis 50 °C kein thermomorphes Verhalten beobachtet werden konnte, gab es zur Ausbildung der gesuchten Lösungsmittelsysteme weiterführend zwei Ansätze:

- i. Bei zweiphasigen Systemen wurden polare bis semi-polare organische Lösungsmittel als Phasenvermittler eingesetzt bis das System zwischen 30 und 40 °C einphasig wurde.
- ii. Im Falle der wässrigen einphasigen IL-Systeme erfolgte die sukzessive Zugabe von anorganischen und organischen Salzen (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, u.a. siehe Kapitel A.2.3) oder unpolaren organischen Lösungsmitteln bis zur Entmischung der Lösung bei 25 °C.

Bei der Untersuchung der Ammonium-basierten ionischen Flüssigkeiten in der Mischung mit Reinstwasser konnte z.B. bei der [N_{1112(OH)}][NTf₂]-IL nur bei sehr hohen Temperaturen (> 99 °C) der Übergang vom Einphasen- zum Zweiphasensystem festgestellt werden. Durch den Zusatz polarer bis mittelpolarer organischer Lösungsmittel kann die Temperatur erniedrigt werden. Das System wurde für diese Versuche bereits als potentielles System für biokatalytische Reaktionen aufgebaut und somit das Reinstwasser durch 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,0) ersetzt. Die Zugabe von anorganischen Salzen verschiebt die Binodale allerdings erst einmal zu Lasten des Einphasensystems in Richtung unmischbarer Phasen, so dass es einen höheren Anteil der dritten lösungsvermittelnden Komponente bedarf. Diese sorgt gleichzeitig für eine verbesserte Löslichkeit der hydrophoben Substrate, sollte allerdings durch ihre Toxizität auf den Biokatalysator auf eine niedrige Konzentrationen beschränkt werden. In Tabelle A-33 wurden die Ergebnisse der Mischungen mit 10% (v/v) der fünf [N_{11n2(OH)}][NTf₂]-ionischen Flüssigkeiten, 80% (v/v) KPi und 10% (v/v) Löslichkeitsvermittler veranschaulicht. Es ist zu erkennen, dass nicht nur wie erwartet die [N_{1112(OH)}][NTf₂]-IL-KPi-Mischung bei Temperaturen zwischen 20 °C und 60 °C thermomorphe Lösungsmittelsysteme mit UCST-Verhalten ausbildet, sondern durch Zugabe organischer Lösungsmittel auch die ionischen Flüssigkeiten dieser Familie mit n = 2 und n = 3 im gewählten Temperaturbereich ein vergleichbares Verhalten zeigen. Methanol, Ethanol, 1-Propanol, 2-Propanol und 1,4-Dioxan als relativ polare Lösungsmittel sind dabei besonders hervorzuheben, da sie den größten löslichkeitsvermittelnden Effekt in den Mischungen aufweisen. Die Systeme mit 1,4-Dioxan sind interessant, da sie im gewünschten Bereich die Temperatur schalten, so dass beispielweise im [N_{1112(OH)}][NTf₂]-KPi-Dioxan-TMS ein Zweiphasensystem bei Raumtemperatur vorliegt und bei der

erwarteten Reaktionstemperatur von 40 °C das System einphasig ist. Identisches Verhalten zeigt 1-Butanol im System $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi, was auf die ähnliche Polarität des Löslichkeitsvermittlers zurückzuführen ist. Auch 1-Pentanol setzt die kritische Lösungstemperatur in der gewählten Mischung herab, jedoch liegt das System erst ab 60 °C einphasig vor und ist daher für klassische enzymatische Reaktionen nicht geeignet. Bei den stärker polaren Lösungsmitteln der Tabelle (von Methanol bis 2-Propanol) würden schon geringere Konzentrationen in der Mischung mit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi genügen, um die UCST herabzusetzen – was im Verlauf dieser Arbeit nochmal aufgegriffen und diskutiert wird. In der gewählten Mischung mit $[N_{1122(OH)}][Ntf_2]$ -KPi stellen sich 1-Propanol und 2-Propanol als geeignete Löslichkeitsvermittler für die definierten Anforderungen heraus und in der Mischung $[N_{1132(OH)}][NTf_2]$ -KPi sind es Methanol und Ethanol. Jedoch muss bei den letztgenannten Lösungsmitteln der verdrängende Effekt auf das enzymgebundene Wasser bedacht werden, so dass die Systeme der n = 2- und n = 3-IL mit den kurzkettigen Alkoholen nicht weiter betrachtet wurden.

In den Mischungen der $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ - und $[N_{1152(OH)}][NTf_2]$ -IL mit Kaliumphosphat-Puffer überwiegt der unpolare Charakter der C₄- und C₅-Seitenkette am Kation der IL, so dass hier trotz ernormen Überschusses an Puffer im System und Zusatz von 10% (v/v) polarer Lösungsmittel das System bei jeder Temperatur im gewählten Mischungsverhältnis zweiphasig bleibt. Es konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass beispielsweise mindestens 30% (v/v) Methanol zum System $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ -KPi (10:60% (v/v)) zugesetzt werden müssen, um bei 40 °C einphasig vorzuliegen. Dieser hohe Überschuss an organischen Lösungsmittel kann zur Desaktivierung des Biokatalysators führen, weshalb diese Systeme nicht weiter betrachtet wurden.

Der Fokus solle fortan auf dem $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Systemen liegen, da diese im bevorzugten Temperaturbereich schaltbar sind, mit einer geringen Menge an organischen Phasenvermittler auskommen, die zudem noch semi-polar sind und somit nicht unmittelbar mit dem Wasser in der Mischung konkurrieren. In weiteren Versuchen wurden Ammonium-basierte ionische Flüssigkeiten zu 20% (v/v) in der Mischung mit 70% (v/v) KPi und 10% (v/v) organischen Phasenvermittlern eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle A-34 dargestellt. Dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass insbesondere das System $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi ein ausgeprägtes thermomorphes Verhalten mit vielen organischen Lösungsmitteln im gewählten Temperaturbereich zeigt. Durch die Mischung mit den Phasenvermittlern in Kombination mit Wasser konnte nun die ionische Flüssigkeit selbst einer eher geringen Polarität zugeordnet werden. Das zeigt sich dadurch, dass die IL

- i. hydrophob in der Mischung mit Wasser reagiert
- ii. lyophob in der Mischung mit unpolaren Lösungsmitteln wie MTBE

- iii. sich durch Zugabe ähnlich semi-polarer Solventien wie DMSO, Aceton, Acetonitril, 1,4-Dioxan in Wasser lösen lässt.

Die Polarität der ionischen Flüssigkeit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ befindet sich im Bereich von DMSO ($E_T(30) = 188,1 \text{ kJ/mol}$). Eine nähere Charakterisierung der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -basierten thermomorphen Lösungsmittelsysteme folgt in Kapitel 4.1.2.1.

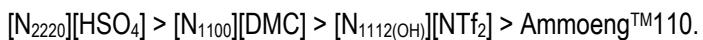
Die ionischen Flüssigkeiten $[N_{1100}][DMC]$ und $[N_{2220}][HSO_4]$ der Tabelle A-34 zeigen in keiner der Mischungen im gewählten Temperaturbereich thermomorphes Verhalten. In Tabelle A-35 wird u.a. ein Ausschnitt der Untersuchungen der Mischungen der beiden wasserlöslichen ILs mit unpolaren bis mittelpolaren organischen Lösungsmitteln im Mischungsverhältnis 1:1 gezeigt. Die wasserlösliche ionische Flüssigkeit AmmoengTM110 bildet mit KPi und MTBE im Mischungsverhältnis 20:70:10 ein TMS, dass zwischen 40 °C und 50 °C seine kritische Lösungstemperatur hat. Es ist damit noch nicht ideal für potentielle biokatalytische Reaktionen und wird in Kapitel 4.1.2.2 noch hinreichend modifiziert und diskutiert. Das Verhalten der AmmoengTM110 in der Mischung mit organischen Lösungsmitteln ist ebenfalls dargestellt.

Witerhin wurde untersucht wie sich die ionische Flüssigkeit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ in der 50:50 Mischung mit polaren bis unpolaren organischen Lösungsmitteln verhält (Tabelle A-36). Es konnte auch hier das zuvor postulierte Verhalten bestätigt werden: $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ löst sich auf Grund seiner mittelpolaren Natur in mittelpolaren bis polaren Alkoholen (1-Butanol, 2-Propanol, 1-Propanol, Ethanol, Methanol) bei jeder Temperatur zwischen 20 °C und 60 °C; bildet jedoch mit Wasser und unpolaren Alkoholen (1-Hexanol, 1-Heptanol, 1-Octanol, 1-Nonanol, 1-Decanol) im gezeigten Temperaturbereich ein 2PS aus. 1-Pentanol stellt den Grenzfall zwischen den Mischbarkeiten dar und zeigt mit der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -IL unter 40 °C ein Zweiphasensystem, darüber hinaus ist es einphasig. Die Aktivitätskoeffizienten bei unendlicher Verdünnung spielen eine Schlüsselrolle für die Wechselwirkung zwischen gelösten Stoffen und Lösungsmitteln und geben grundlegende Informationen für die Realisierung vieler Trennprozesse, welche ionische Flüssigkeiten verwenden. DOMAŃSKA *et al.* untersuchten 2014 die Thermodynamik und Aktivitätskoeffizienten der IL $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ und erklärten, dass die Wechselwirkung zwischen IL und gelöstem Stoff in der Reihenfolge Alkane, aromatische Kohlenwasserstoffe, Thiophen, Alkine, polare Substanzen wie Wasser, Alkohole, Ketone oder Ether zunimmt [Domańska *et al.* 2014a; Domańska und Lukoshko 2014].

$[N_{1100}][DMC]$ und $[N_{2220}][HSO_4]$ sind, wie in Tabelle 4-3 gezeigt, mit Wasser mischbar – daher besitzen sie ebenso hohe Polaritäten und benötigen zur Ausbildung eines Zweiphasensystems ein unpolares organisches Lösungsmittel wie MTBE, Toluol oder eine ausreichend hohe Konzentration an Puffersalzen.

Es konnte gezeigt werden (Tabelle A-34), dass der Zusatz von 10% (v/v) MTBE zu 20% (v/v) der IL und 70% (v/v) 50 mM KPi ausreicht, um die Systeme in das heterogene Gebiet zu drängen. Mit Zusatz der in der Tabelle benachbarten polareren Solventien zu den IL-Puffer-Mischungen konnte dahingegen kein 2PS mehr beobachtet werden; durch Zugabe von Lösungsmitteln, die unpolarer sind als MTBE, bildeten sich im gewählten Mischungsverhältnis mit den ILs $[N_{1100}][DMC]$ und $[N_{2220}][HSO_4]$ ausschließlich 2PS aus (nicht in der Tabelle gezeigt). Da das System aus KPi, IL und MTBE im gewählten Mischungsverhältnis bei Temperaturen zwischen 20 °C und 60 °C kein thermomorphes Verhalten zeigte, wurden weitere Untersuchungen mit veränderten Volumina an KPi und MTBE durchgeführt, die jedoch kein TMS mit optimalen Volumenverhältnissen der oberen und unteren Phase im gewünschten Temperaturbereich hervorbrachten. Die Mischung aus Ammoeng™110 mit KPi und MTBE in Tabelle A-34 ergab hingegen im gezeigten Mischungsverhältnis das erwünschte thermomorphe Lösungsmittelsystem mit einer Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 42$ °C.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die polaren ionischen Flüssigkeiten in polaren Lösungsmitteln wie Wasser sehr gut löslich sind, da die geladenen Teilchen mit den polaren Wassermolekülen über die Wasserstoffbrückenbindungen hydratisiert und stabilisiert werden. In einem hydrophoben Lösungsmittel werden die geladenen Teilchen der IL jedoch nicht dermaßen solvatisiert. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die vier Ammonium-basierten ionischen Flüssigkeiten ebenso im Verhältnis 1:1 mit semi- bis nicht polaren organischen Lösungsmitteln untersucht. Ein Ausschnitt der Ergebnisse ist in Tabelle A-35 dargestellt. Ab einer Polarität ähnlich des Dichlormethans bilden die ionischen Flüssigkeiten $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$, $[N_{1100}][DMC]$ und $[N_{2220}][HSO_4]$ im Mischungsverhältnis 1:1 Zweiphasensysteme aus. Im gewählten Mischungsverhältnis konnte zudem mit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ und Dichlormethan im untersuchten Temperaturintervall ein thermomorphes Lösungsmittelsystem mit einer Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 32$ °C gefunden werden. Die IL Ammoeng™110 ist bis hin zu einer Polarität ähnlich der von MTBE vollständig im Verhältnis 1:1 mischbar und ist somit weniger polar als die drei zuerst genannten ILs. Mit 1-Butanol bildet Ammoeng™110 ein thermomorphes Lösungsmittelsystem mit $T_{Tr} = 34$ °C. Die Unregelmäßigkeit in Tabelle A-35 in Hinblick auf die Tendenz der ionischen Flüssigkeiten mit den untersuchten organischen Lösungsmitteln Zweiphasensysteme auszubilden, lässt sich wiederholt auf den Unterschied in den Polaritäten und damit auf die intermolekularen Wechselwirkungen zurückführen. Demnach können die Ammonium-basierten ionischen Flüssigkeiten auf Grundlage der Untersuchungen dieser Arbeit mit abnehmender Polarität wie folgt geordnet werden:



Auf Grund der hohen Polarität von $[N_{2220}][HSO_4]$ und $[N_{1100}][DMC]$, die nach LAANE *et al.* und GUPTA *et al.* einen Verlust der Enzymaktivität bedeuten kann [Laane et al. 1987; Gupta 1992], sowie der Beobachtung, dass diese beiden ILs keine thermomorphen Lösungsmittelsysteme mit praktikablen Volumenverhältnissen im gewählten Temperaturbereich ausbilden, wurden diese nicht weiter untersucht. Der Einfluss der Anionen auf die Ausbildung eines 2PS wurde als nächstes am Beispiel des $[NTf_2]$ -Anions untersucht und konnte in Tabelle A-36 mit Ammonium- und Imidazolium-Kationen veranschaulicht werden. $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ ist in der Mischung mit 80% (v/v) Wasser vollständig mischbar (vgl. Tabelle 4-3), wird jedoch die IL-Konzentration auf 50% (v/v) in der Mischung erhöht, bildet sich eine zweite Phase (vgl. Tabelle A-36). Ebenso bilden die Imidazolium-basierten ILs mit dem $[NTf_2]$ -Anion mit Puffer in der gezeigten Zusammensetzung bei Temperaturen zwischen 20 °C und 60 °C stets ein Zweiphasensystem.

Dahingegen sind die Mischungen der ILs mit Methanol, Ethanol und 1-Propanol sowie 2-Propanol trotz geringerer Polarität einphasig. Die Ursache dafür liegt in dem Zusatz an Puffersalzen, die das Gleichgewicht der IL-Wasser-Phase stark zum heterogenen Gebiet hin verschieben. Im Hinblick auf die untersuchten Alkohole wird die Wechselwirkung zwischen IL und Lösungsmittel durch den Unterschied der Dipolmomente, jedoch auch durch den Abstand zwischen Ion und Dipol bestimmt. Somit führen kleinere Lösungsmittelmoleküle zu einer stärkeren Mischbarkeit als entsprechend große mit vergleichbarem Dipolmoment. Ab 1-Butanol nimmt die Polarität der organischen Solventien mit der Verlängerung der Kohlenstoffkette ab und es bilden sich bis hin zum 1-Decanol Zweiphasensysteme mit den vergleichsweise polaren ionischen Flüssigkeiten aus. Eine interessante Beobachtung konnte in der nicht abgebildeten Mischung aus 1-Octanol mit den ILs $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ und $[N_{1152(OH)}][NTf_2]$ gemacht werden, die in jedem Mischungsverhältnis durch Sichtkontrolle scheinbar ein Einphasensystem bildeten, jedoch dies nicht der logischen Reihe entsprach. Durch Bestimmung der Brechungsindizes n_{gemessen} (Tabelle 4-4) konnte diese Unregelmäßigkeit in der Mischbarkeitsreihe widerlegt und die Beobachtung durch den fehlenden Unterschied der Lichtbrechung in den zwei Lösungsmitteln begründet werden.

Tabelle 4-4. Bestimmung der Brechungsindizes n von dest. Wasser, 1-Octanol, $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ sowie $[N_{1152(OH)}][NTf_2]$ (Dreifachbestimmung) und Vergleich mit Literaturwerten.

	dest. Wasser	1-Octanol	$[N_{1142(OH)}][NTf_2]$	$[N_{1152(OH)}][NTf_2]$
n_{gemessen}	1,33	1,42	1,42	1,42
$n_{\text{Literatur}}$	1,33	1,42	-	-

Der Einfluss des $[NTf_2]$ -Anions auf die Polarität und damit auf die Mischbarkeit der untersuchten IL-Alkohol-Mischungen scheint gering. Von den in der Tabelle gezeigten thermomorphen Lösungsmittelsystemen liegen die Mischungen aus $[EMIm][NTf_2]$ -Butanol und $[BMIm][NTf_2]$ -Butanol im

gewünschten Temperaturbereich bei einer gemeinsamen Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 39 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Somit scheint die Kohlenstoffkette des IL-Kations keinen großen Einfluss auf die Polarität dieser IL und die Mischbarkeit mit Alkoholen auszuüben. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der vergleichenden Untersuchung Imidazolium- und Pyridinium-basierter ILs mit dem gemeinsamen $[\text{BF}_4]$ -Anion gemacht werden und ist in Tabelle A-37 dargestellt. Der Einfluss des Kations auf die Mischbarkeit der ILs mit den untersuchten polaren bis unpolaren Lösungsmitteln scheint größer zu sein als in den zuvor betrachteten Systemen. So kann dieser Tabelle entnommen werden, dass die Polarität mit steigender Alkylkettenlänge des Kations der Imidazolium-basierten ionischen Flüssigkeiten sinkt und somit beispielsweise in der $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ -1-Propanol-Mischung ein thermomorphes Lösungsmittelsystem mit $T_{Tr} = 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ resultiert. Die Trübungstemperatur der $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ -1-Propanol-Mischung liegt um 10 K über dieser. $[\text{BPy}][\text{BF}_4]$ ist vergleichsweise polarer und entmischt sich mit 50% (v/v) 1-Propanol bei $T_{Tr} = 26 \text{ }^{\circ}\text{C}$. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien zur Mischbarkeit von ILs mit den $[\text{BF}_4]$ -, $[\text{PF}_6]$ - und $[\text{NTf}_2]$ -Anionen mit einwertigen und mehrwertigen Alkoholen initiiert. [Wagner et al. 2004; Shiflett und Yokozeki 2007; Dobryakov et al. 2008; Makowska et al. 2010; Trindade et al. 2010; Payne und Kerton 2010; Forte et al. 2011; Makowska et al. 2011; Freire et al. 2011a; Paduszyński et al. 2011; Conceição et al. 2012; Carneiro et al. 2012; Paduszyński et al. 2013a; Carneiro et al. 2013; Paduszyński et al. 2013b; Lashkarbolooki 2018 u.a.] Diese korrelieren mit den hier gefundenen Ergebnissen. Gewöhnlich wurde auch da der Anstieg von T_{Tr} mit einer Zunahme der Alkylkettenlänge beobachtet.

Der Vergleich des Phasenverhaltens einer wasserlöslichen 1-Ethyl-3-methylimidazolium-basierten ionischen Flüssigkeit ($[\text{EMIm}][\text{EtSO}_4]$) mit einer wasserunlöslichen ($[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$) ist in Tabelle A-38 dargestellt. $[\text{EMIm}][\text{EtSO}_4]$ als vergleichsweise polarere IL ist bis zu einer Polarität ähnlich der von 1,4-Dioxan vollständig im Verhältnis 1:1 mit organischen Lösungsmitteln mischbar. Unpolare Lösungsmittel wie THF, Toluol, MTBE und *n*-Heptan bilden mit der IL ein Zweiphasensystem. Die weniger polare $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ -IL zeigt eine vollständige Mischbarkeit mit kurzkettigen Alkoholen und Zweiphasensystemen in der 1:1-Mischung mit Lösungsmitteln ab einer Polarität ähnlich die des 2-Propanols. Es konnte ein TMS im gewünschten Temperaturbereich mit einem praktikablen Volumenverhältnis der zwei Phasen bei Raumtemperatur aus $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ und 2-Propanol mit einer Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 31 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gefunden werden.

Nach der Vielzahl an grundlegenden Mischbarkeitsuntersuchungen wurde der Fokus auf potentielle Medien für biokatalytische Reaktionen auf Basis von einer Pufferphase (60% (v/v)) und einer Imidazolium-basierten-IL-Phase (30% (v/v)) mit geringen Volumina an Löslichkeitsvermittlern (10% (v/v)) gelegt. Eine Auswahl der Ergebnisse ist in Tabelle A-39 zusammengestellt. $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ und

[BMIm][NTf₂] zeigen in der Mischung mit 50 mM KPi und DMSO thermomorphes Verhalten im gewünschten Temperaturbereich und werden in den Kapiteln 4.1.2.3 und 4.1.2.4 näher charakterisiert. [BMIm][MeSO₄] sowie [BMIm][Me₂PO₄] bilden zwar TMS mit UCST zwischen 40 °C und 50 °C, zeigen jedoch nicht-praktikable Phasenverhältnisse. Weitere Ergebnisse von 3-Komponenten-Mischungen aus 30% (v/v) IL, 60% (v/v) organische Substratphase und 10% (v/v) Löslichkeitsvermittler können Tabelle A-40 entnommen werden.

Es ist bekannt, dass in Abhängigkeit von anorganischen und/oder organischen Salzen einige wassermischbare ionische Flüssigkeiten biphasische Systeme ausbilden können. [Freire et al. 2012a; Bridges und Rogers 2008; Pereira et al. 2013; Gutowski et al. 2003; Ventura et al. 2009; Tomé et al. 2014; Freire et al. 2012b; Bridges et al. 2007; Ventura et al. 2011; Pereira et al. 2010; Pei et al. 2007; Freire et al. 2011b; Shahriari et al. 2012; Najdanovic-Visak et al. 2007; Abraham et al. 2003] Als zweiter Teil der Vorversuche war daher zu prüfen welche IL-Wasser-Mischungen, die in Tabelle 4-3 einphasig vorlagen, durch Zugabe anorganischer oder organischer Salze ein thermomorphes System ausbilden und die Randbedingung erfüllen, unter 40 °C vom 2PS in das 1PS überzugehen. Erste Untersuchungen konzentrierten sich auf den Zusatz von Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat (NaH₂PO₄ und Na₂HPO₄, Abk.: NaPi) zu Imidazolium-basierten IL-Wasser-Mischungen. Ein Ausschnitt der umfangreichen Experimente ist am Beispiel von [BMIm][BF₄] in Tabelle 4-5 zusammengefasst. Es wurde festgestellt, dass bei niedrigen Salzgehalten, damit sind sowohl das anorganische NaPi als auch die ionische Flüssigkeit gemeint, das System bei 25 °C einphasig bleibt. Erst mit steigendem Salzgehalt kann eine Phasentrennung induziert werden.

Tabelle 4-5. Untersuchung des Phasenverhalten der [BMIm][BF₄]-Wasser-Mischung bei Zugabe von Natriumphosphat-Salzen (NaPi). Beurteilung der homogenen (-) und heterogenen (+) Phasen bei 25 °C.

[BMIm][BF ₄] / % (v/v)	NaPi / mM							
	25	50	75	100	125	150	175	200
15	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	+
25	-	-	-	-	-	-	-	+
30	-	-	-	-	-	-	+	+
35	-	-	-	-	-	+	+	+
40	-	-	-	+	+	+	+	+

Nach DUPONT et al. ist eine IL dann mit Wasser mischbar, wenn die wässrige Phase in der Lage ist, die Ionen der IL zu solvatisieren und somit die elektrostatischen Interaktionen zwischen den IL-Ionen aufzuheben. [Dupont et al. 2015] Je polarer die Anionen und Kationen der IL sind, desto besser können diese von Wasser solvatisiert werden und desto hydrophiler ist die IL. In Anwesenheit von Salzen können

neutralisierte Ladungspaare zwischen den IL-Ionen und den Salzionen gebildet werden. Salzionen, die die IL-Ionen besser neutralisieren als Wasser, erniedrigen die IL-Löslichkeit (*salting out*, Bildung eines 2PS). Salzionen, die die Ladung nicht so gut neutralisieren wie Wasser, erhöhen die Löslichkeit (*salting-in*, 1PS). Eine höhere Ladungsdichte resultiert in einem stärkeren Neutralisationspaar. FREIRE *et al.* schlussfolgerten, dass es sich dabei um entropische Prozesse handele. [Freire *et al.* 2012a] Es scheint bei niedrigen Salz-Konzentrationen in der IL-Wasser-Mischung daher nicht schwierig, dass die Wasserstoffbrücken im Zuge des Lösevorgangs in der IL-Wasser-Mischung aufbrechen und die elektrostatischen Kräfte des Salzes überwunden werden. Tabelle A-41 zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung weiterer IL-NaPi-Wasser-Systeme.

Es ist zu beobachten und wurde durch verschiedene Autoren [Dupont *et al.* 2015; Freire *et al.* 2012a; Bridges *et al.* 2007; Kohno und Ohno 2012] bestätigt, dass die Mischbarkeit von ionischen Flüssigkeiten auch mit den Effekten durch chaotrope und kosmotrope Salze beschrieben werden kann. Um die Effekte, die beim Mischen von Wasser und ionischer Flüssigkeit und der Bildung von Mischungslücken durch Hinzufügen eines Salzes entstehen, zu erklären, muss das Konzept des *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten und der Polaritäten um die HOFMEISTER-Reihe in Verbindung mit der freien Hydratisierungsenthalpien ΔG_{hyd} (vgl. Kapitel 3.3) erweitert werden. [Marcus 1991] Aus thermodynamischer Sicht kann die HOFMEISTER-Serie durch die freie Hydratisierungenthalpie ΔG_{hyd} quantifiziert werden. Diese beschreibt die Änderung der freien Enthalpie von einem isolierten, nackten Ion in der Gasphase zum wässrigen solvatisierten Ion in Lösung. Kosmotrope Ionen haben aufgrund ihrer resultierenden strukturierten Wasserhülle um das Ion große negative ΔG_{hyd} -Werte, chaotrope Ionen besitzen weitaus kleinere negative oder sogar positive ΔG_{hyd} -Werte (vgl. Tabelle A-42). [Bridges *et al.* 2007] Die Hydrophobizität des Anions zeichnet sich durch eine geringe Ladungsdichte aus (chaotrop, kleinere negative oder sogar positive ΔG_{hyd} -Werte) während hydrophile Kationen eine große Ladungsdichte besitzen (kosmotrop, größere negative ΔG_{hyd} -Werte). Anionen mit einer geringen Ladungsdichte werden weniger gut hydratisiert und haben daher eine höhere Affinität zur IL. Auch die Kationen der verwendeten ILs haben einen Einfluss auf die Hydrophobizität. Nach Tabelle A-42 ergibt sich für die freie Hydratisierungenthalpie ΔG_{hyd} der Ionen eine Reihenfolge von $\text{BF}_4^- > \text{NO}_3^- \approx \text{Br}^-$. Das BF_4^- -Ion ist also das am stärksten chaotrope Ion. Werden diese Erkenntnisse mit den zu den IL-Wassermischungen zugefügten Mengen an NaPi gleichgesetzt, ergibt sich die Reihenfolge von $[\text{BMIm}][\text{BF}_4] < [\text{BMIm}][\text{Br}] \approx [\text{BMIm}][\text{NO}_3]$ (vgl. Tabelle 4-13). Das bedeutet, dass das $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ -System aufgrund der chaotropen Tendenz des Anions am empfindlichsten auf die Zugabe weiterer Salze reagiert im Vergleich zu den $[\text{BMIm}]$ -Systemen mit eher kosmotropen Anionen. Im Falle von $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ und $[\text{EMIm}][\text{Br}]$ kann dieser Effekt aber nicht beobachtet werden. Festzuhalten sei aber,

dass das Optimum nicht nur die zugefügten Mengen von NaPi, sondern auch die Substrate und das UCST-Verhalten der Systeme mit einbezieht.

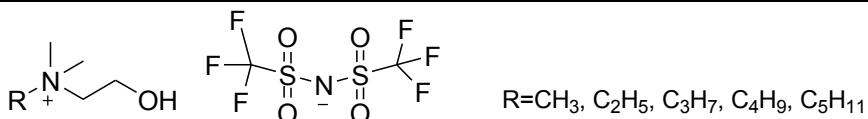
Tabelle 4-13. Charakterisierung von verschiedenen IL-NaPi-Wasser-Systemen

TMS	35% (v/v) IL	Konzentrationsoptimum NaPi	Rangfolge
A	[BMIm][BF ₄]	150 mmol/l	++++
B	[BPy][BF ₄]	233 mmol/l	++++
F	[EMIm][BF ₄]	567 mmol/l	++
E	[BMIm][Br]	333 mmol/l	0
C	[BMIm][NO ₃]	350 mmol/l	0
D	[EMIm][Br]	470 mmol/l	0
-	[BMIm][Cl]	—	—

Zusammenfassend kann aus dem Vergleich der imidazolium- und pyridinium-basierten TMS A-F geschlussfolgert werden, dass zwar das [BMIm][BF₄]- und das [BPy][BF₄]-System schlechtere Raum-Zeit-Ausbeuten im Vergleich zu den übrigen imidazolium-basierten TMS in Tabelle 4-15 zeigen, jedoch überwiegen die vollständige Lösung des Substrates und die optimale Aufspaltung der zwei Phasen bei niedrigen Temperaturen die oben genannten Nachteile.

4.1.2.1 Charakterisierung der [N_{11n2(OH)}][NTf₂]-TMS

Cholin ist das N,N,N-Trimethylhydroxyethylammoniumchlorid, [N_{112OH}][Cl]-Salz, das für mehrere biologische Funktionen entscheidend ist [Meck und Williams 1999; Meck und Williams 2003; Niculescu 2017]. Die Synthese mehrerer Cholin-Derivate und die Wechselwirkung mit Alkoholen, Wasser, Ethern und vielen anderen sind in der Literatur ausführlich dargestellt [Domańska und Bogel-Łukasik 2005a; Domańska und Bogel-Łukasik 2005b; Pernak et al. 2006; Domańska et al. 2007a; Alonso et al. 2008; Nockemann et al. 2009; Westerholt et al. 2009; Pereiro und Rodriguez 2009; Costa et al. 2012b; Costa et al. 2012a; Melo et al. 2013; Costa et al. 2013] und dienten als Grundlage erster Untersuchungen zum Phasenverhalten der hier untersuchten ionischen Flüssigkeiten [N_{11n2(OH)}][NTf₂] (n = 1, 2, 3, 4, 5) (Struktur Schema 4-3).



Schema 4-3. Struktur der [N_{11n2(OH)}][NTf₂]-IL, n = 1, 2, 3, 4, 5.

Am Beispiel der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -IL soll die Untersuchung des Einflusses der IL-, Puffersalz-, Phasenvermittler-, (an-)organischer Salz- und Substratkonzentration sowie der Enzymmenge auf das Phasenverhalten der thermomorphen Lösungsmittelsysteme dargestellt und diskutiert werden.

Die Synthese der $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ -IL ($n = 2, 3, 4, 5$) sowie die Ergebnisse der 1H - und ^{13}C -NMR-Analyse sind in Kapitel A.2.4 dargestellt. Die erhaltenen ionischen Flüssigkeiten zeigen mit Zunahme der Kation-Seitenkette eine Abnahme in der Viskosität. Zudem weisen die Kationen mit höherer Symmetrie auch höhere Schmelzpunkte auf. Daher ist die $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ bei Raumtemperatur teilweise fest, alle anderen ILs der dargestellten Reihe jedoch flüssig.

Zu Beginn wurden die fünf gezeigten Cholinium-basierten ionischen Flüssigkeiten mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer in veränderlichen Volumenverhältnissen miteinander gemischt. Die Löslichkeit von ionischen Flüssigkeiten in molekularen Lösungsmitteln hängt wie zuvor diskutiert von den Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der Mischung ab. Die experimentellen Daten zeigen, dass die Trübungstemperaturen sowohl mit Zunahme der IL-Konzentration in der Mischung als auch mit Zunahme der Alkylkettenlänge des IL-Kations steigen. Im untersuchten Temperaturintervall von 0 bis 99 °C konnten die Mischungen von 10-20% (v/v) $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ mit $n = 1, 2, 3$ in Abbildung 4-1 dargestellt werden; alle anderen nicht abgebildeten Trübungstemperaturen der Mischungen lagen über 99 °C. Es zeigt sich eine Parallelverschiebung der einzelnen linearen Zusammenhänge zwischen Trübungstemperatur T_{Tr} und der IL-Konzentration.

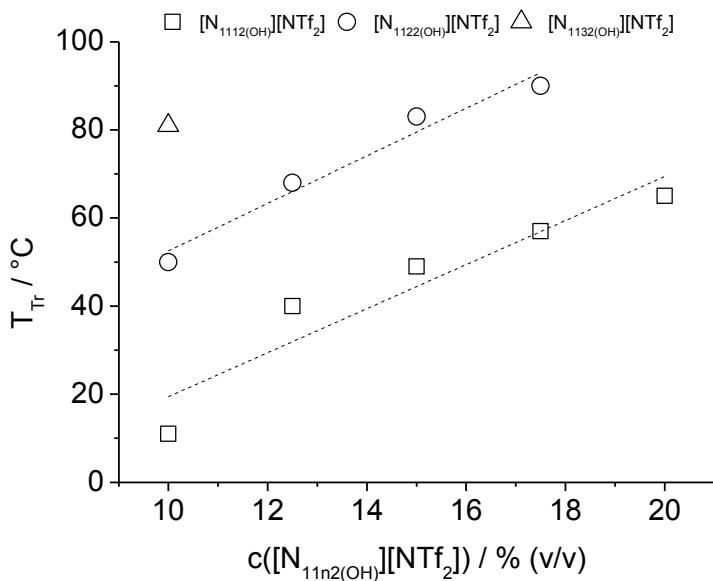


Abbildung 4-1. Trübungstemperaturen T_{Tr} der Mischung aus 10-20% (v/v) an $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ ($n = 1, 2, 3$) mit abhängiger Konzentration an 80-90% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0).

Mit steigender Alkylkettenlänge verringert sich der Bereich des Einphasengebietes im gezeigten Diagramm; ab 12,5% (v/v) $[N_{1132(OH)}][NTf_2]$ mit 87,5% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0) liegen die Trübungstemperaturen über 99 °C und wurden nicht weiter bestimmt. Um die Trübungstemperaturen T_{Tr} in einen für Enzymreaktionen relevanten Temperaturbereich zu erniedrigen, wurden den fünf IL-KPi-Mischungen organische Phasenvermittler zugesetzt und deren Einfluss studiert. Abbildung 4-2 zeigt den Zusammenhang zwischen der Trübungstemperatur T_{Tr} in Abhängigkeit von der $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ -Konzentration ($n = 1, 2, 3$) mit Zusatz von (A) 10% (v/v) 1,4-Dioxan und (B) 10% (v/v) Aceton. Die Trübungstemperaturen der $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Phasenvermittler-TMS mit ($n = 4, 5$) liegen über 99 °C und wurden daher nicht weiter erfasst.

Diese Untersuchungen korrelieren mit den Ergebnissen von DomáNSKA *et al.*, die durch die Bestimmung der Aktivitätskoeffizienten dem 1,4-Dioxan im Vergleich zum Aceton eine ebenso schwächere Wechselwirkung mit der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -IL zuschrieben. [Domańska et al. 2014a]

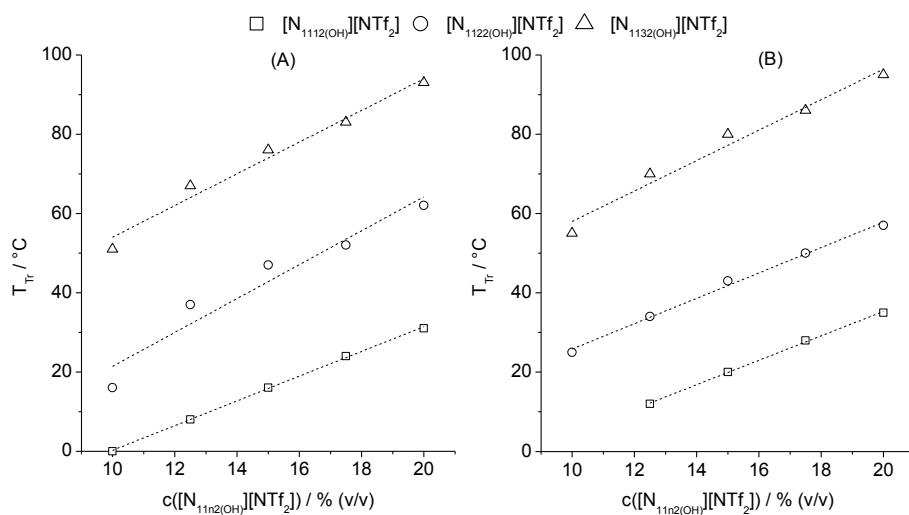


Abbildung 4-2. Einfluss von (A) 10% (v/v) 1,4-Dioxan und (B) 10% (v/v) Aceton als Phasenvermittler in der Mischung aus 10-20% (v/v) $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ ($n = 1, 2, 3$) und KPi (50 mM, pH 7,0) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

Aufgrund der niedrigen UCST in den Systemen mit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ im Vergleich zu den übrigen Cholinium-basierten ILs wurden weitere Untersuchungen basierend auf der kurzkettigen IL vorgenommen. Die Abhängigkeit der Trübungstemperatur zum Einen von der IL-Konzentration und zum Anderen von der Puffersalzkonzentration (10-100 mM) sind in Abbildung 4-3 dargestellt.

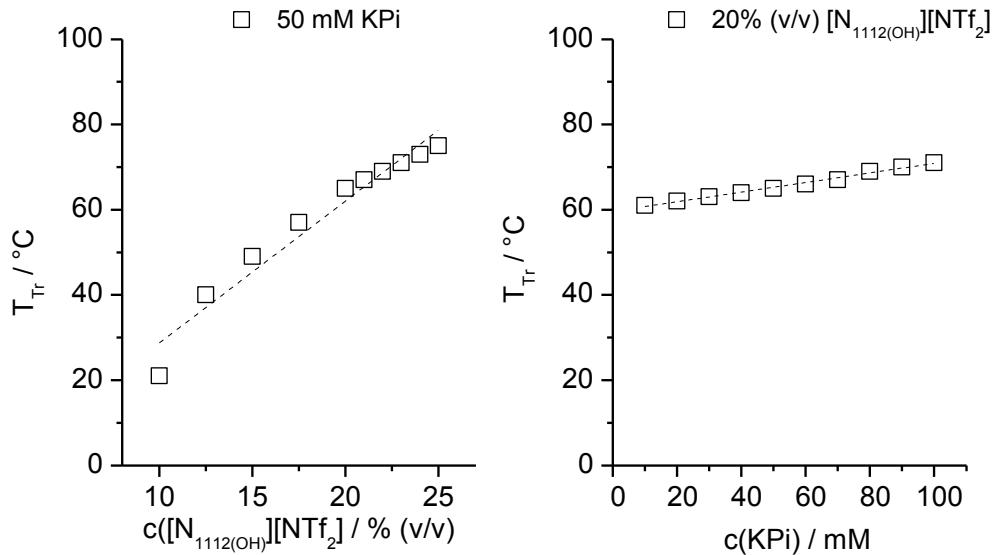


Abbildung 4-3. Einfluss der IL-Konzentration (links) sowie der Pufferkonzentration (rechts) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS. (Dreifachbestimmung)

Den Diagrammen ist zu entnehmen, dass mit steigender Salzkonzentration folglich auch die Trübungstemperatur T_{Tr} steigt. Im untersuchten Temperaturintervall von 0 bis 99 °C konnten Werte mit einer IL-Konzentration von 10-25% (v/v) und einer Puffersalzkonzentration von 10-100 mM bestimmt werden, höhere Konzentrationen lagen über $T_{Tr} = 100$ °C. Das System mit einer Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 65$ °C besitzt eine IL-Konzentration von 20% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$. Dies ist ausreichend um eine genügend große zweite Phase zu bilden und die wässrige Phase enthält eine ausreichend hohe Pufferkapazität von $c = 50$ mM für potentielle Lipase-katalysierte Esterspaltungen.

Um die Trübungstemperatur in einen Bereich milderer Reaktionstemperaturen für Biokatalysatoren zu senken, wurde weiterhin der Einfluss des Phasenvermittlers 1,4-Dioxan auf die Trübungstemperatur in der Mischung aus 20% (v/v) IL mit variierender Pufferkonzentration von 10-100 mM KPi getestet (Abbildung 4-4, links).

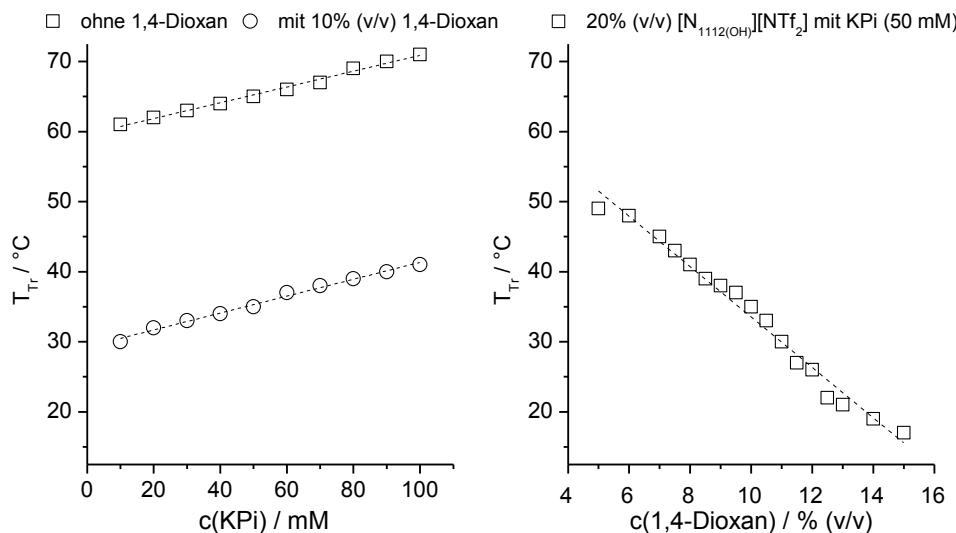


Abbildung 4-4. Links: Einfluss von 10% (v/v) 1,4-Dioxan bei variierender Pufferkonzentration auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 80% (v/v) KPi). Rechts: Einfluss des Phasenvermittlers 1,4-Dioxan in verschiedenen Konzentrationen auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% KPi (50 mM, pH 7,0)). (Dreifachbestimmungen)

Durch Zugabe von 10 Volumenprozent 1,4-Dioxan zu den thermomorphen Systemen lässt sich die Trübungstemperatur um durchschnittlich 30 K senken. Im Beispiel von 20% (v/v) IL mit 50 mM KPi von 65 °C auf 35 °C. Um den Einfluss des Phasenvermittlers genauer zu untersuchen, wurde das 1,4-Dioxan in Konzentrationen von 5–15% (v/v) zum System aus 20% (v/v) IL und 65–75% (v/v) KPi (50 mM) hinzugefügt. Der lineare Zusammenhang zwischen der Zunahme der Dioxan-Konzentration und der Abnahme der Trübungstemperatur ist in Abbildung 4-4 rechts dargestellt. Die Erniedrigung der Trübungstemperatur durch Zugabe von 1,4-Dioxan kann als Parallelverschiebung der Binodalen aufgefasst werden. Für potentielle Lipase-katalysierte Reaktionen sollte die Trübungstemperatur T_{Tr} des TMS nach Zugabe aller Reaktionskomponenten unter 40 °C liegen. Daher wurde ebenso der Einfluss der Substratzugabe näher untersucht (Abbildung 4-5).

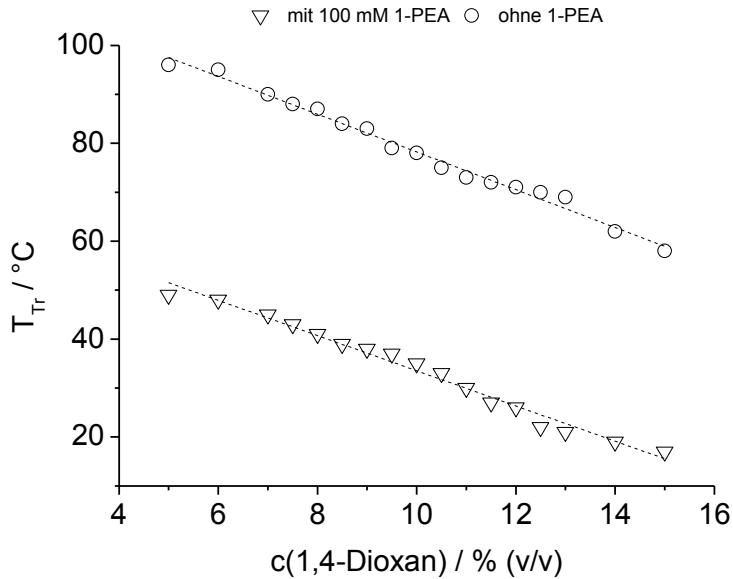


Abbildung 4-5. Parallelverschiebung der Trübungstemperatur T_{tr} durch Zugabe von 100 mM 1-PEA zum $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% (v/v) KPi, 5-15% (v/v) 1,4-Dioxan).

Bei einer Konzentration von 100 mM 1-Phenylethylacetat (Abk.: 1-PEA) zum untersuchten TMS mit variierender 1,4-Dioxan-Konzentration konnte eine Temperaturerhöhung von durchschnittlich 45 °C festgestellt werden. Alle im Diagramm dargestellten Trübungstemperaturen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-Substrat-Systems liegen oberhalb der erwünschten Reaktionstemperatur von 40 °C, so dass eine Feineinstellung der Substratkonzentration nötig war. Der Einfluss der Zugabe von 10-100 mM 1-PEA ist in Abbildung 4-6 dargestellt. Im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS mit 10% (v/v) 1,4-Dioxan liegt die Trübungstemperatur bei 35 °C, nach Zugabe von 10 mM 1-PEA steigt diese auf 39 °C und das System würde gerade noch den Ansprüchen genügen. Mit 30 mM 1-PEA steigt die Trübungstemperatur bereits auf 47 °C und liegt damit über den ans TMS gestellten Bedingungen. Daher wurden zusätzlich die Trübungstemperaturen für das IL-KPi-Dioxan-TMS mit 12% (v/v) 1,4-Dioxan bei Zugabe von 10-100 mM Substrat untersucht (Abbildung 4-6). Mit Zugabe von 10 mM 1-PEA steigt hier die Trübungstemperatur von 26 °C auf 30 °C und bei Zugabe von 30 mM 1-PEA weiter auf 38 °C – was gerade noch dem Anspruch der Schaltbarkeit bei 40 °C entspricht. Um eine höhere Substratkonzentration bei gesetzten Bedingungen (20% (v/v) IL, 50 mM KPi, 40 °C Reaktionstemperatur) zu erreichen, müsste weiterhin auch die Löslichkeitsvermittler-Konzentration erhöht werden.

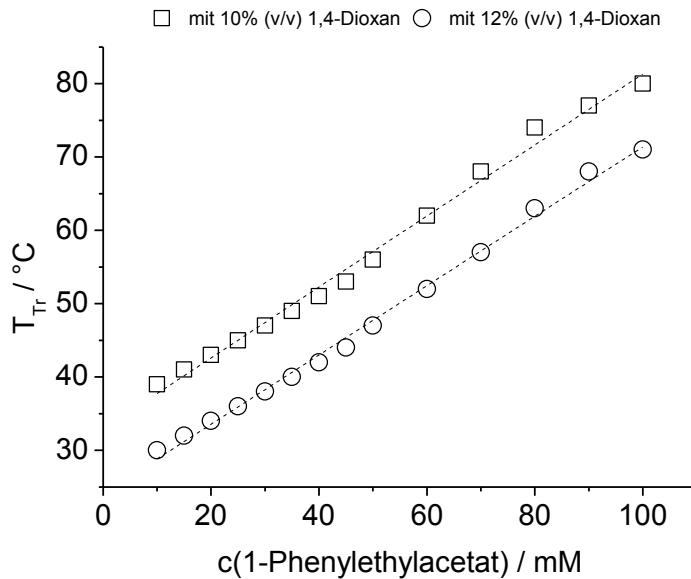


Abbildung 4-6. Einfluss von 10-100 mM Substrat 1-Phenylethylacetat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 68 bzw. 70% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)) mit 10 bzw. 12% (v/v) 1,4-Dioxan.

Ebenso wie das Substrat induziert auch das Enzym ein Phasenverhalten des ternären Systems. Zu dem $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS mit 10% (v/v) sowie 12% (v/v) 1,4-Dioxan wurden daher verschiedene Mengen an Rinderalbumin⁵ (BSA, engl.*bovine serum albumin*) hinzugefügt, um den Einfluss einer Proteinzugabe auf die Trübungstemperatur T_{Tr} zu untersuchen.

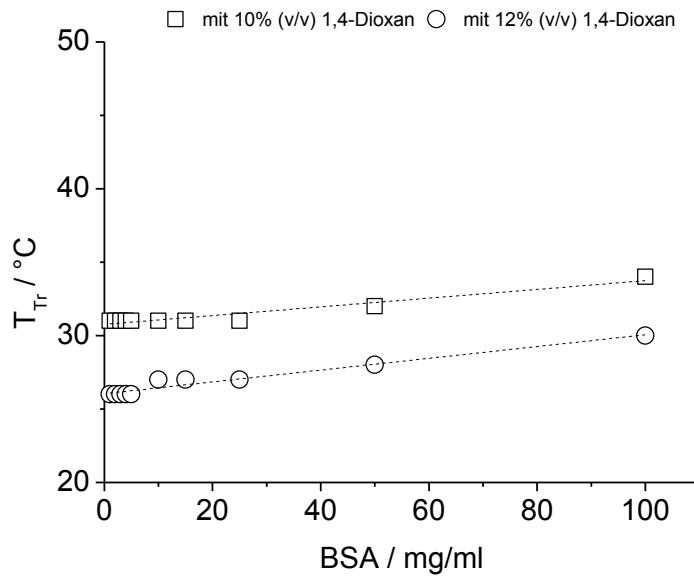


Abbildung 4-7. Einfluss von verschiedenen Mengen BSA auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS. Verglichen werden die TMS mit 10% und 12% v/v 1,4-Dioxan.

⁵ BSA ist ein häufig genutzter Proteinkonzentrationsstandard, welcher im Organismus u.a. wasserunlöslichen Stoffen eine Wasserlöslichkeit vermittelt, indem diese an das Albumin gebunden werden.

Aus Abbildung 4-7 wird ersichtlich, dass auch bei sehr hohen Konzentrationen des globulären Proteins kein signifikanter Anstieg der Trübungstemperaturen zu erkennen ist.

Neben 1,4-Dioxan wurden noch drei weitere organische Lösungsmittel – Aceton, Acetonitril und Dimethylsulfoxid - auf ihre Eignung als Phasenvermittler im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS getestet. Die Trübungstemperatur T_{Tr} ist in Abbildung 4-8 in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Es zeigte sich, dass bei gleicher Konzentration DMSO die stärkste phasenvermittelnde Wirkung auf das $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-System ausübt. So wird die Trübungstemperatur durch Zugabe von DMSO im Vergleich zu Aceton um durchschnittlich 10 K mehr gesenkt. DMSO und Aceton sind sich strukturell zwar sehr ähnlich, jedoch hat DMSO ein viel größeres Dipolmoment und daher eine stärkere Wechselwirkung mit der IL und dem Wasser.

Nach der DIMROTH-REICHARDT-Skala ($E_T(30)$) nimmt die Polarität der vier Löslichkeitsvermittler in wässriger Umgebung in der Reihenfolge 1,4-Dioxan < Aceton < DMSO < Acetonitril zu. [Haak und Engberts 1986] Dies führt in ebenso aufsteigendem Maße zur Verdrängung des enzymgebundenen Wassers und kann infolgedessen eine nachteilige Konformationsänderung im Protein hervorrufen.

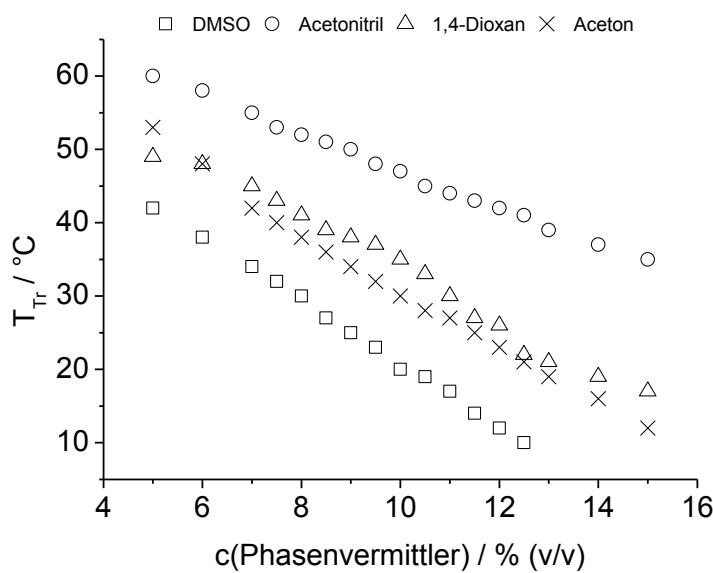


Abbildung 4-8. Einfluss vier verschiedener Phasenvermittler (5-15% (v/v)) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS (20% (v/v) IL, 65-75% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)).

Da Aceton in der Reihe neben 1,4-Dioxan eine vergleichsweise niedrige Polarität bei besserer phasenvermittelnder Wirkung zeigt, wurde im Weiteren das System aus $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton näher betrachtet. Die Untersuchungen zeigen, dass die Trübungstemperatur beispielsweise mit 8% (v/v) Aceton von 65 °C auf 38 °C und mit 10% (v/v) Aceton auf 30 °C gesenkt werden kann und damit eine einphasige Reaktionsführung bei 40 °C gegeben ist. Im Durchschnitt kann die Trübungstemperatur im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi mit Aceton bei gleicher Konzentration um 4 K mehr erniedrigt werden als mit 1,4-

Dioxan, was wiederum auf die größere Wechselwirkung des stärker polaren Acetons mit der ionischen Flüssigkeit und dem Wasser zurückzuführen ist.

Der Einfluss des potentiellen Substrats 1-PEA auf die Trübungstemperatur im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS aus 20% (v/v) IL mit varierender Puffersalz-, Phasenvermittler- und Substratkonzentration ist in Abbildung A-5 und Abbildung A-6 dargestellt. In beiden Diagrammen ist eine Parallelverschiebung des linearen Zusammenhangs zu erkennen. Diagramm 0-21 ist zu entnehmen, dass bei einer TMS-Zusammensetzung von 20% (v/v) IL, 70% (v/v) KPi und 10% (v/v) Aceton bis zu 30 mM Substrat zugesetzt werden können ohne Entmischung der Phasen oberhalb von 40 °C.

Die bisher vorgestellten TMS wurden für weitere potentielle enzymkatalysierte Reaktionen modifiziert und eingehend untersucht. So konnten für eine HNL-vermittelte Reaktion zwei TMS bestehend aus 28,5% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$, 60% (v/v) Citronensäure-Puffer (50 mM, pH 4,0) und 11,5% (v/v) 1,4-Dioxan bzw. Acetonitril gefunden werden, die mit 67 mM Mandelonitril unterhalb von 35 °C noch einphasig vorliegen (vgl. Kapitel 4.2.5.1). Für eine potentielle Reaktion mit einem TPP-abhängigen Enzym konnte beispielsweise mit 20% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ ein TMS mit 69% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0) und nur 11% (v/v) 1,4-Dioxan gefunden werden, dass bei Zugabe von 20 mM Benzaldehyd (Substrat) und 0,1 mM des Co-Faktors ThDP unterhalb von 30 °C noch einphasig vorliegt. Die Zugabe des globulären Proteins BSA hatte in keinem der vorgestellten thermomorphen Lösungsmittelsysteme großen Einfluss auf die Trübungstemperatur. Es konnte lediglich ein Anstieg von durchschnittlich 2 K bei der höchsten Konzentration an BSA (100 mg/ml) in den TMS nachgewiesen werden (vgl. Abbildung A-7).

Zur weiteren Charakterisierung der erhaltenen TMS wurde der IL-Gehalt in der wässrigen Phase am Beispiel des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS nach einem Vorschlag von Dreyer et al. mit Hilfe des Bradford-Tests bestimmt (vgl. Kapitel A.2.11.5). Die Wechselwirkung des Farbkomplexes Coomassie-Brillantblau findet mit kationischen und nicht-polaren, hydrophoben Seitenketten statt und eignet sich daher ebenso zur IL-Gehaltsbestimmung in wässriger Lösung. Bei einer TMS-Zusammensetzung von 20% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$, 70% (v/v) KPi und 10% (v/v) Aceton beträgt die Konzentration an ionischer Flüssigkeit in der wässrigen Phase: $c = (16,33 \pm 0,09)\%$ (v/v).

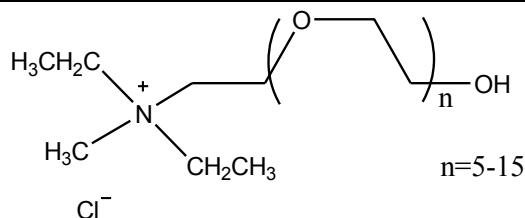
Wie in Tabelle A-34 dargestellt, zeigen die kurzkettigen Alkohole bis 2-Propanol in der Zusammensetzung aus 10% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$, 80% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0) und 10% (v/v) Alkohol ein einphasiges Verhalten bei Temperaturen von 20 bis 60 °C. Ab 1-Butanol war in der genannten Zusammensetzung thermomorphes Verhalten im Temperaturintervall zu beobachten. Da 2-Propanol in einer ADH-vermittelten Redoxreaktion zur Cofaktor-Regenerierung eingesetzt wird, war eines der Ziele den kurzkettigen Alkohol in einem thermomorphen Lösungsmittelsystem gleichzeitig als Phasenvermittler zu nutzen. Durch Erhöhung der IL-Konzentration auf 30% (v/v) konnte dies erreicht werden. Dem 50 mM

Kaliumphosphat-Puffer wurden 10 mM MgCl₂ zur Stabilisierung der Alkoholdehydrogenase zugesetzt. In der Untersuchung des Phasenverhalten von [N_{1112(OH)}][NTf₂] mit diesem Puffer hat sich jedoch kein Einfluss auf die Trübungstemperatur gezeigt, so dass der Zusammenhang zwischen c(IL), c(Puffersalz) und der Trübungstemperatur T_{Tr} sich wie in Abbildung 4-3 darstellt. Der Einfluss variierender Puffer- und Phasenvermittlerkonzentration im [N_{1112(OH)}][NTf₂]-KPi-Propanol-TMS wird in Abbildung A-9 gezeigt. Die beste Zusammensetzung besteht aus 30% (v/v) IL, 55% (v/v) KPi (50 mM mit MgCl₂, pH 7,0) und 15% (v/v) 2-Propanol mit einer Trübungstemperatur von $T_{Tr} = 25$ °C und ungefähr gleich großen Phasen im entmischten Zustand. Der Einfluss des Substrates auf das Phasenverhalten dieses Systems ist in Abbildung A-9 dargestellt. Acetophenon hat im Vergleich zu 1-Phenylethylacetat einen scheinbar geringeren Einfluss auf die Trübungstemperatur, da die Temperatur T_{Tr} bei Zugabe von 100 mM Acetophenon nur um 10 K steigt. Wiederholt hat auch die Zugabe von BSA zu diesem TMS keinen großen Einfluss auf die Trübungstemperatur, da T_{Tr} bei einer (maximalen) Konzentration von 50 mg/ml BSA nur um 1 K steigt (siehe Abbildung A-10). Als potentielles TMS für eine Laccase-vermittelte Reaktion wurde eine Zusammensetzung aus [N_{1112(OH)}][NTf₂] mit 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer (pH 4,0) und ggf. Phasenvermittler gesucht, die der Anforderung entsprach, über 30 °C einphasig vorzuliegen und mindestens 10 mM Substrat lösen zu können. Die Untersuchungen orientierten sich an den Vorversuchen aus Tabelle A-34 und ergaben mehrere praktikable TMS. Eine Auswahl der Ergebnisse ist in Kapitel 4.2.5.3 dargestellt.

Eine weitere Untersuchung konzentrierte sich auf das Phasenverhalten der Cholinium-basierten ionischen Flüssigkeiten [N_{11n2(OH)}][NTf₂] ($n = 1, 2, 3, 4, 5$) mit einwertigen Alkoholen als 2-Komponenten-TMS und ist in der 2:1-Zusammensetzung exemplarisch in Tabelle A-33 dargestellt. Alle fünf ILs zeigen im Temperaturbereich von 20 bis 60 °C mit den kurzkettigen Alkoholen bis 1-Hexanol vollständige Mischbarkeit. Die abnehmende Polarität der Alkohole durch die Erweiterung der Alkylkettenlänge führt zur Entmischung der Phasen mit [N_{11n2(OH)}][NTf₂] ($n = 1, 2, 3$). Die weniger polare [N_{1142(OH)}][NTf₂]-IL zeigt ein thermomorphes Verhalten im untersuchten Temperaturintervall mit den Alkoholen 1-Heptanol, 1-Octanol, 1-Nonanol und 1-Decanol. Die detaillierte Untersuchung des [N_{1142(OH)}][NTf₂]-Octanol-TMS ergab ein ungewöhnliches Phasenverhalten, da mit steigender IL-Konzentration in den untersuchten Mischungen die Trübungstemperatur T_{Tr} nicht linear mit anstieg, sondern annähernd konstant blieb (vgl. Abbildung A-11). Die Zugabe von Vinylacetat als potentielles Substrat in der CaLB-vermittelten Umesterung (vgl. Kapitel 4.2.1.9) zu den [N_{11n2(OH)}][NTf₂]-Octanol-TMS ($n = 3, 4, 5$) zeigte erst eine Erhöhung der Trübungstemperatur T_{Tr} ab 25 mM und ist in Abbildung A-12 dargestellt. Der Effekt des BSA auf das Phasenverhalten ist wie schon zuvor vernachlässigbar und wurde daher nicht dargestellt.

4.1.2.2 Charakterisierung des AmmoengTM110-TMS

Die ionische Flüssigkeit AmmoengTM110, auch bekannt unter den Namen TEGO IL P9 und IoliLyte 221PG, enthält Kationen mit Oligoethylenglykol-Einheiten (siehe Schema 4-4). Sie erwies sich bereits als stabilitätssteigernd gegenüber einiger Alkoholdehydrogenasen und fördert die Löslichkeit hydrophober Substrate. Als IL-basiertes ATPS (vgl. Kapitel 3.4) bewirkte AmmoengTM110 eine signifikante Erhöhung der Umsetzung und volumetrischen Produktivität der ADH-katalysierten Reduktion von Acetophenon. [Dreyer und Kragl 2008]



Schema 4-4. Struktur der ionischen Flüssigkeit AmmoengTM110.

Tabelle 4-3 zeigt eine vollständige Mischbarkeit der AmmoengTM110 mit Wasser im Verhältnis 1:4 bei Temperaturen von 0 bis 99 °C. Um die kritische Konzentration von IL und anorganischem Salz zu finden, die zur Entmischung der Phasen führt, wurden die zwei Komponenten in Konzentrationen von 10-30% (v/v) IL und 100-1000 mM Kaliumphosphat-Puffersalzen miteinander in Wasser gemischt. Eine Auswahl der Ergebnisse ist in Abbildung A-13 dargestellt. Bei geringer IL-Konzentration von 10% (v/v) waren große Konzentrationen an Kaliumphosphatsalzen (KH_2PO_4 / K_2HPO_4) notwendig, um ein Phasenzerfall zu induzieren. Mit zunehmender IL-Konzentration verlagern sich die nötigen Puffersalzkonzentration hin zu kleineren Werten (Abbildung A-14). Ab einer Puffersalzkonzentration von 550 mM liegen die Trübungstemperaturen des 30%-igen IL-Systems oberhalb der 40 °C-Marke, so dass zur Absenkung von T_{Tr} auch eine Reduktion der AmmoengTM110-Konzentration erfolgen muss. Eine nähere Betrachtung des Einflusses der IL-Konzentration lässt Abbildung A-14 zu. Das thermomorphe Lösungsmittelsystem aus 13% (v/v) AmmoengTM110 und 87% (v/v) KPi (950 mM, pH 7,0) hat eine Trübungstemperatur von 26 °C. Abbildung A-15 zeigt, dass mit Zugabe von maximal 20 mM 1-PEA für eine Lipase-vermittelte Reaktion die Trübungstemperatur auf 30 °C und mit Zugabe von maximal 40 mM 1-PEA auf 40 °C ansteigt. Dahingegen konnte bei 10 mM Zugabe des Substrates Benzylalkohol für eine ADH-vermittelte Reaktion beobachtet werden, dass die Trübungstemperatur auf 72 °C steigt. Das Co-Substrat Acetaldehyd dieser potentiellen Reaktion scheint eine phasenvermittelnde Wirkung zu haben und senkt T_{Tr} bei Zugabe von 250 mM wieder um durchschnittlich 13 K (vgl. Abbildung A-17); jedoch liegen die Trübungstemperaturen für die potentielle ADH-Reaktion immer noch mindestens um 30 °C über der gewünschten Reaktionstemperatur. Daher wurde die Puffersalzkonzentration auf $c = 500$ mM erniedrigt und weitere

Untersuchungen unternommen. Mit 10-20% (v/v) AmmoengTM110 und 500 mM KPi liegen die Trübungstemperaturen aller Mischungen unter 0 °C. Mit Zugabe von 20 mM des Substrates Benzylalkohol konnte ab 24% (v/v) IL mit 500 mM KPi ein 2PS über 0 °C beobachtet werden (siehe Abbildung A-18). 250 mM Acetaldehyd setzen im System mit 30% (v/v) IL und 50 mM Benzylalkohol die Trübungstemperatur von 39 °C auf 23 °C herab. Die Zugabe von BSA zu den beiden diskutierten TMS ergab keinen signifikanten Unterschied in der Trübungstemperatur (vgl. Abbildung A-16 und Abbildung A-20). Bei Zugabe von z.B. 100 mg/ml BSA zum 30%-igen AmmoengTM110-KPi-TMS mit Substrat und Cofaktor-Regenerator stieg die Trübungstemperatur lediglich um 4 K auf 27 °C, so dass die ADH-katalysierte Reaktion bei 30 °C Reaktionstemperatur durchgeführt werden und die anschließende Aufarbeitung bei Raumtemperatur stattfinden kann.

4.1.2.3 Charakterisierung der [EMIm][NTf₂]-TMS

Die in Tabelle 4-3 aufgeführten 1-Alkyl-3-methylimidazolium-ILs sind mit Ausnahme der [EMIm][NTf₂] polare Lösungsmittel [Park und Kazlauskas 2003] und daher mit anderen polaren Lösungsmitteln wie Wasser vollständig mischbar. 1-Ethyl-3-methylimidazolium-bis(trifluoromethylsulfonyl)imid ist eine fluorierte weniger hydrophile RTIL [Fujii et al. 2008] und wird neben dem Gebrauch als aprotisches polares Lösungsmittel auch eingesetzt für Reaktionen, die ein Lösungsmittel mit hoher CO₂-Löslichkeit verlangen. Wegen ihres geringen Dampfdruckes, der hohen thermischen Stabilität, guter Leitfähigkeit und einem breiten elektrochemischen Fenster wird sie vor allem in der Elektrochemie untersucht. [Giovanelli et al. 2004; Schilderman et al. 2007] Darüber hinaus wurde [EMIm][NTf₂] als grünes Lösungsmittel für die Synthese von Zinkoxid-Nanopartikeln mit Hilfe von Mikrowellen diskutiert. [Goharshadi et al. 2008] In der vorliegenden Arbeit wurde [EMIm][NTf₂] auf die Eignung zur Ausbildung eines thermomorphen Systems im Temperaturintervall enzymatischer Reaktionen und in der Mischung mit Wasser sowie gängigen organischen Lösungsmitteln untersucht. Erste vertiefende Untersuchungen mit 10-40% (v/v) der IL in der Mischung mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer zeigten, dass alle Trübungstemperaturen über 99 °C liegen. Durch Zugabe der Phasenvermittler DMSO bzw. Acetonitril konnten die T_{Tr} gesenkt werden und bspw. ein optimales TMS aus 40% (v/v) [EMIm][NTf₂], 30% (v/v) KPi (50 mM) und 30% (v/v) DMSO ($T_{Tr} = 27$ °C) sowie eines aus 10% (v/v) [EMIm][NTf₂], 50% (v/v) KPi (50 mM) und 40% (v/v) Acetonitril ($T_{Tr} = 36$ °C) gefunden werden (vgl. Abbildung A-21). In diesen Zusammensetzungen zeigt wiederum DMSO die größere phasenvermittelnde Wirkung und muss daher nur in geringeren Konzentrationen der IL-Puffer-Mischung zugesetzt werden. Es ist in Abbildung A-22 zu erkennen, dass die Zugabe von 1-Phenylethylacetat im [EMIm][NTf₂]-KPi-Acetonitril-TMS einen größeren Einfluss auf die Trübungstemperatur hat als im Vergleichssystem mit DMSO. Die Zugabe einer maximalen Substratkonzentration von 100 mM 1-PEA zum [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS lässt die

Trübungstemperatur lediglich von 27 °C auf 32 °C steigen; im [EMIm][NTf₂]-NaPi-Acetonitril-TMS hingegen um 21 K. Daher ist die Substratkonzentration in diesem System auf maximal 40 mM 1-PEA limitiert, um die T_{Tr} unter der 40 °C-Marke für eine Lipase-katalysierte Reaktion zu halten.

Für eine potentielle Transferase-vermittelte Reaktion musste die Pufferkapazität auf mindestens 200 mM (NaPi pH 7,5) erhöht und zum Ausgleich der Volumenverhältnisse der entmischten Phasen der IL-Gehalt auf 35% (v/v) eingestellt werden. Durch den erhöhten Salzgehalt im Vergleich zu dem bisher genutzten 50 mM Puffer wird die Konode im Phasendiagramm verschoben und es ergeben sich erhöhte Trübungstemperaturen, die nur durch wiederum höhere Konzentrationen der Phasenvermittler in den gewünschten Temperaturbereich von ungefähr 30-40 °C gedrängt werden können. DMSO wurde in diesem TMS als Phasenvermittler aus zwei Gründen bevorzugt: zum Einen weil es die größere Wirkung in Bezug auf die Erniedrigung der T_{Tr} im Vergleich zum Acetonitril besitzt und zum Anderen da es einen nachweislich positiven Einfluss auf die potentielle Tranferase-katalysierte Reaktion ausübt. [Mutti et al. 2011] Es wurden Konzentrationen von 10-40% (v/v) DMSO zu einer Mischung aus 35% (v/v) [EMIm][NTf₂] und NaPi (200 mM, pH 7,5) gegeben und das Verhalten der Trübungstemperatur T_{Tr} in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration ist in Abbildung A-23 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Darstellung der Zugabe von DMSO auf 20-35% (v/v) zum [EMIm][NTf₂]-NaPi-System limitiert ist, da alle anderen Systeme Trübungstemperaturen außerhalb des Bereiches von 10-99 °C aufweisen. Eine Konzentration von 30% (v/v) DMSO zum TMS resultiert in einer Trübungstemperatur von 30 °C und wurde daher für weitere Untersuchungen genutzt. Bei Zugabe verschiedener Konzentrationen des Substrates *rac*-Methylbenzylamin (Abk.: *rac*-MBA) zum [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS kommt es zum Ausflocken; ein weißer sich nicht lösender Niederschlag stört das Phasenverhalten. Die Trübungstemperatur aller Substratkonzentrationen ungeachtet des Niederschlags ergeben 36 °C. Eine Zugabe des Proteinstandards zeigt bei einer maximalen Konzentration von 100 mg/ml BSA eine Temperaturerhöhung um 3 K.

Ein anderer Ansatz war anstelle der hohen Puffersalzkonzentration dem [EMIm][NTf₂]-Phasenvermittler-TMS das relativ unpolare MTBE hinzuzufügen, um einen Phasenzerfall zu induzieren. Es ergab sich ein thermomorphes Lösungsmittelsystem aus 30% (v/v) IL mit 50% (v/v) MTBE und 20% (v/v) 2-Propanol mit einer Trübungstemperatur $T_{Tr} = 38$ °C.(vgl. Tabelle A-44 und Tabelle A-45)

4.1.2.4 Charakterisierung des [BMIm][BF₄]-TMS

[BMIm][BF₄] ist in reinem Wasser bei Raumtemperatur in jedem Verhältnis mischbar (vgl. Tabelle 4-3). Die obere kritische Lösungstemperatur liegt bei UCST = 5 °C bei einem Massenanteil von 0,5037 IL. Unterhalb dieser Parameter zeigt sich eine Mischungslücke im Bereich von

30–75%(v/v) Wasser. [Lin et al. 2007] Durch das Hinzufügen von verschiedenen Mengen an Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) als Puffersalze kann ein Phasenzerfall induziert werden. Voruntersuchungen ergaben, dass sich bei einem $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ -Anteil von 35% (v/v) und einer Puffersalzkonzentration von 125 mM bei 25 °C ein 2PS ausbildet (vgl. Abbildung A-24 bis Abbildung A-26). Mit zunehmender NaPi-Konzentration steigt auch das Volumen der IL-Phase an, da durch die Zunahme an NaPi das Volumenverhältnis der Konode verschoben wird. Das Konzentrationsoptimum von NaPi beträgt für das 35%- $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ -System daher 150 mM bei einer Trübungstemperatur von $T_{\text{Tr}} = 29$ °C. Durch die Zugabe von 100 mM des Substrates 1-PEA erhöht sich die Trübungstemperatur um durchschnittlich 15 °C und kann in Abbildung A-27 als Parallelverschiebung der Binodalen aufgefasst werden. Bei einer Konzentration von 50 mM 1-PEA liegt das Temperaturintervall der Phasenseparation zwischen 30 °C und 40 °C (vgl. Abbildung A-28). Auch bei sehr hohen Konzentrationen des Proteinstandards BSA ist erneut kein signifikanter Anstieg der Trübungstemperatur zu erkennen (s. Abbildung A-29).

Des Weiteren wurde ein Reaktionssystem basierend auf $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ und Natriumacetatpuffer ($p\text{H}$ 5,5) für eine potentielle saure Phosphatase-vermittelte Umsetzung gesucht (vgl. Kapitel 4.2.3). Die Abhängigkeit des Phasenverhaltens von der IL- und Puffersalzkonzentration ist in Abbildung A-34 und Abbildung A-35 dargestellt. Bei Zugabe von 10-100 mM des Substrates 2-Carboxyphenylphosphat (Abk.: 2-CPP) für die Modellreaktion der sauren Phosphatase konnte nur ein marginaler Unterschied in der Trübungstemperatur beobachtet werden. Bei Konzentrationen von 10-90 mM 2-CPP in der Mischung aus $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ und Natriumacetat-Puffer bleibt die Trübungstemperatur konstant bei 29 °C, erst bei Zugabe von 100 mM 2-CPP steigt sie um 1 °C (Abbildung A-36). Bei der Zugabe von 1-50 mg BSA zu dem zuvor beschriebenen System wurde kein Einfluss auf die Trübungstemperatur festgestellt, T_{Tr} bleibt in der Mischung aus 50% IL mit 50% Puffer (500 mM, $p\text{H}$ 5,5) und 50 mM 2-CPP bei konstanten 29 °C.

Laut SECUNDO et al. wirkt $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ stabilisierend im Octanol-Vinylacetat-Reaktionssystem [Secundo et al. 2001; Secundo et al. 2004; Sheldon et al. 2006]. Daher wurde weiterhin getestet, ob sich ein thermomorphes System mit diesen 3 Komponenten analog zum $[\text{N}_{1142}(\text{OH})][\text{NTf}_2]$ -Octanol-Vinylacetat-TMS ausbilden lässt (vgl. Kapitel 4.2.1). Untersucht wurden Zusammensetzungen aus 15–40% (v/v) $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ mit 1-Octanol. Es konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung mit 15 Volumenprozent der IL eine Trübungstemperatur von 85 °C aufweist; die T_{Tr} höherer $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ -Konzentrationen lagen über 100 °C. Durch Zugabe von 50 mM des Substrates Vinylacetat im 15%-igen IL-Octanol-TMS steigt die Trübungstemperatur wieder um durchschnittlich 6 K an, wodurch eine Nutzung als thermomorphes System für enzymatische Reaktionen zwischen 30 °C und 50 °C nicht gegeben ist.

4.1.2.5 Charakterisierung weiterer Imidazolium-basierter 2-Komponenten-TMS

Der einzige Strukturunterschied zwischen [EMIm][BF₄] und [BMIm][BF₄] besteht in der um ein CH₂-Glied verkürzten Seitenkette. In der Mischung aus [EMIm][BF₄] und Puffer kann eine Konzentration von 567 mmol/l NaPi als optimal angesehen werden, um eine Phasenseparation unter 40 °C zu induzieren (siehe Tabelle A-41). Jedoch kommt es bei Zugabe ab Konzentrationen von 30 mM des Substrates 1-PEA zur Emulsionsbildung und das System ist aufgrund dessen für die Problemstellung als nicht mehr vollständig ausreichend zu klassifizieren. [BMIm][Br], [BMIm][NO₃] und [EMIm][Br] zeigen bei bestimmten Konzentrationen an NaPi (333 mmol/l, 350 mmol/l und 470 mmol/l) ein 1PS bei 40 °C und ein 2PS unterhalb von 40 °C mit 1-PEA. Leider zeigen diese drei ILs ebenso einige Nachteile, wie die Emulsionsbildung durch das Substrat und außerdem ein ungünstiges Verhältnis der Phasenvolumina. Nichtsdestotrotz finden alle TMS in Kapitel 4.2.1 Anwendung, die Umsetzung der Rezyklierung und Aufreinigung durch Trennung der Phasen scheint jedoch nicht praktikabel. [BMIm][Cl], eine in der Literatur vielfach untersuchte ionische Flüssigkeit [Bösmann et al. 2001; Saha et al. 2003; Madeira Lau et al. 2004; Salvador et al. 2010], konnte die in der Problemstellung formulierten Anforderungen nicht erfüllen: bei keinen Konzentrationsverhältnissen von NaPi konnte ein Phasenübergang vom heterogenen in den homogenen Bereich beobachtet werden. Daher schied [BMIm][Cl] für die Durchführung der Modellreaktion aus.

Die Mischungen Imidazolium-basierter ILs mit polaren bis unpolaren Lösungsmitteln und der Vergleich des Einflusses der Anionen sind in Tabelle A-36 bis A-40 dargestellt.

4.1.2.6 Charakterisierung des [BPy][BF₄]-TMS

Bei [BPy][BF₄] handelt es sich um eine pyridiniumbasierte ionische Flüssigkeit, die ein interessantes Mischungslückenverhalten mit Wasser zeigt (siehe Abbildung A-30). Nur bei sehr kleinen Mengen der IL bildet sich eine Mischungslücke aus. [Vreekamp et al. 2011]

Das Konzentrationsoptimum von NaPi beträgt für [BPy][BF₄] 233 mM (vgl. Tabelle A-41). Bei einer Konzentration von 267 mM zeigt das System noch die gewünschten Eigenschaften, bei der Zugabe des Substrates jedoch liegt die Trübungstemperatur über 40 °C. Bei einer Konzentration von 333 mM NaPi findet auch ohne 1-PEA keine Phasentrennung mehr statt.

4.2 Biokatalyse in thermomorphen Lösungsmittelsystemen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die neu entwickelten thermomorphen Lösungsmittelsysteme auf ihre Eignung als Medium für biokatalytische Reaktionen untersucht. Während Wasser als Komponente in höheren Konzentrationen viele enzymatische Reaktionen unterstützt, ist der große Vorteil der Verwendung organischer Lösungsmittel und/oder ionischer Flüssigkeiten als weitere Komponente die verbesserte Löslichkeit der hydrophoben Substrate und Produkte. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, möglichst selektive Systeme zu finden, die gleichzeitig noch gute katalytische Aktivitäten erlauben. Dabei wurde die Auswahl der Modellreaktionen nicht streng auf eine Enzymklasse limitiert, sie sollte jedoch den folgenden Anforderungen genügen:

- i. Die Edukte und Produkte sollten sich in ihren Löslichkeitseigenschaften (in den zwei Phasen) möglichst unterscheiden, so dass eine vereinfachte Aufarbeitung und selektive Trennung nach der Reaktion gewährleistet werden kann.
- ii. Das Enzym sollte kommerziell verfügbar sein.
- iii. Das Enzym sollte möglichst kein Co-Enzym oder Co-Faktor benötigen.
- iv. Das Enzym sollte gute Verträglichkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen.
- v. Das Enzym sollte als Lyophilisat oder Lösung und in möglichst reiner Form erhältlich sein; unaufgereinigte Proteine beeinflussen das Phasenverhalten ungünstig (immobilisierte Enzyme sollen hier nicht untersucht werden).

Nach Überprüfung einer Vielzahl von erhältlichen Enzymen soll in dieser Arbeit eine Auswahl von Biokatalysatoren mit sowohl positiven als auch negativen Ergebnissen vorgestellt werden. Am besten sind Lipasen geeignet, die zur Gruppe EC 3.1.1. Hydrolasen gehören.

4.2.1 Lipasen

In den letzten Jahren gab es eine deutliche Zunahme der Zahl an Publikationen auf dem Gebiet der Lipase-katalysierten Reaktionen, die in üblichen organischen Lösungsmitteln, ionischen Flüssigkeiten oder sogar nicht-konventionellen Lösungsmitteln durchgeführt wurden. Ein ziemlich großer Prozentsatz dieser Publikationen ist aus dem Gebiet der organischen Synthese hervorgegangen, die das Potenzial der Biokatalyse erkannt haben. [Bornscheuer und Kazlauskas 2006; Anderson et al. 2009; Wong und Whitesides 2010]

Lipasen spielen eine wichtige Rolle als Zusatz in Reinigungsmitteln, in Synthesen von Feinchemikalien und in pharmazeutischen und agrochemischen Produktionen im großtechnischen Maßstab. [Jaeger et al. 2006; Osterath et al. 2007; Pagliaro et al. 2007] Die Hydrolyse mit Hilfe einer Lipase ist daher gut untersucht und stellt auf Grund dessen eine gut geeignete Testreaktion für die TMS dar. Der große Vorteil dieser Enzymklasse ist die Unabhängigkeit von empfindlichen und teuren Cofaktoren. [Bommarius und Riebel 2010] Lipasen sind zudem hochwirksam und stabil, sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln. [Hult und Berglund 2007] Sie sind leistungsfähige Werkzeuge für Biotransformationen, die entweder die Veresterung von Carbonsäuren und Alkoholen in organischen Solventien oder die Hydrolyse in wässrigen Medien katalysieren. [Boland et al. 1991, 1991; Hult und Berglund 2007]

Verschiedene handelsübliche Lipasen wurden hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber der Umsetzung des *p*-Nitrophenylacetats untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle A-46 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die verschiedenen Formen der Lipase B der *Candida antarctica* (CaLB) bei den bestehenden Systemparametern (in KPi pH 7,0 und 30 °C) die höchsten Aktivitäten zeigen. Zum anderen kann auch erkannt werden, dass die Enzyme in flüssiger Form gegenüber denen in fester Form aktiver sind. Dieses Ergebnis kommt den thermomorphen Lösungsmittelsystemen zu Gute, die sehr empfindlich auf die Zugabe von Feststoffen reagieren und ihr Phasenverhalten infolgedessen ändern. Die Struktur des aktiven Zentrums des Biokatalysators hat bei der Interpretation der Aktivitäten wohl die größte Bedeutung, da sie dafür verantwortlich ist, wie gut nicht natürliche Substrate von ihm umgesetzt werden. Die CaLB besitzt einen Kanal, in dem das katalytisch aktive Serin (Ser 105) sitzt. Das Substrat ist gezwungen durch diesen tiefen Kanal zur katalytischen Triade zu gelangen. [Uppenberg et al. 1994a; Uppenberg et al. 1994b; Uppenberg et al. 1995b; Trodler und Pleiss 2008a] Trotz der Beschaffenheit des aktiven Zentrums erwiesen sich sowohl Novozym® 435 als auch die nicht immobilisierte CaLB mit den höchsten ermittelten Aktivitäten als geeignete Biokatalysatoren. Es ist zu vermuten, dass der fehlende Deckel der CaLB die Umsetzung des *p*-Nitrophenylacetats positiv beeinflusst, denn dieser Lipase fehlt damit die übliche Grenzflächenaktivität. [Trodler und Pleiss 2008a] Die CaLB liquid wurde daher für die Untersuchung der enzymatischen Reaktion in thermomorphen Lösungsmittelsystemen genutzt und vor dem Einsatz als

Katalysator mittels der 1D-Gelelektrophorese näher charakterisiert. Das Coomassie-gefärbte NuPage® Novex® 4–12% Bis-Tris-Gel der CaLB ist in Abbildung A-31 dargestellt. Je reiner ein Enzympräparat ist, desto größer ist die Enzymaktivität pro Milligramm Protein. [Präve 1994] Daher sollte als nächstes die spezifische Aktivität der CaLB in zehn verschiedenen Medien photometrisch ($T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\lambda = 400\text{ nm}$) ermittelt werden (Tabelle A-47). Abbildung 4-9 zeigt die relativen Aktivitäten im Vergleich zum Ergebnis in 50 mM KPi. Es sind deutliche Unterschiede in den Aktivitäten der CaLB bezogen auf unterschiedliche Medien zu erkennen. Die Änderung der Umgebung des Enzyms, wie etwa eine erhöhte Konzentration an organischen Lösungsmitteln, Ionenstärke, pH oder Temperatur beeinflussen die strukturelle und funktionale Integrität und können bis zur Denaturierung des Biokatalysators führen. [Präve 1994] Die Aktivitätsdifferenz zwischen dem 100 mM NaPi und dem 50 mM KPi ist sehr gering und lässt sich einerseits mit der doppelten Salzkonzentration in NaPi diskutieren, andererseits scheint der minimale Unterschied von 1,6 U/ml im Bereich der Fehlerbalken zu liegen.

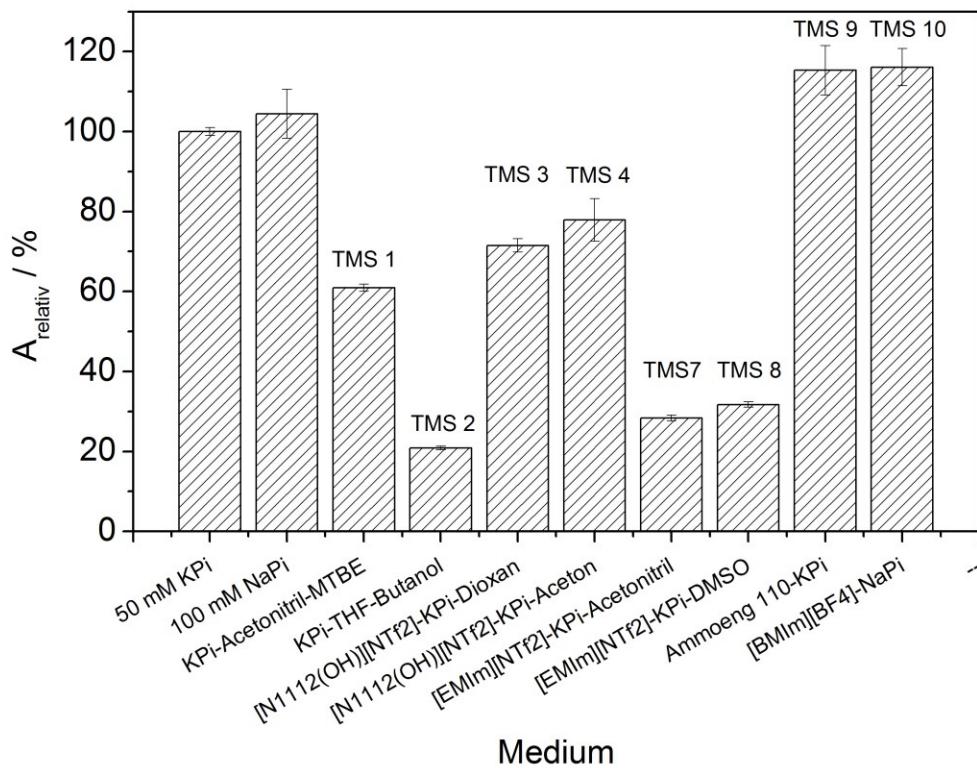
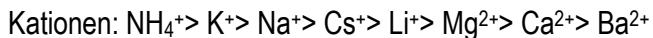
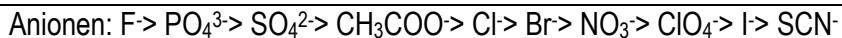


Abbildung 4-9. Relative Aktivität der CaLB in den verschiedenen Medien bezogen auf 50 mM KPi bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mittelwerte aus Fünffachbestimmung).

Wie schon in Kapitel 4.1.2 erläutert, stabilisiert das kosmotrope Ion Na^{+} die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch die Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen. Dabei ist Na^{+} kosmotroper als K^{+}

(siehe Schema 4-5) und hat einen größeren positiven Effekt auf die CaLB, womit sich ebenfalls die erhöhte Aktivität im Natriumphosphat-Puffer erklären ließe.



Schema 4-5. Die Hofmeister-Reihe geordnet nach der Stärke des chaotropen Effekts der Anionen und Kationen. [Zhang und Cremer 2006]

Neben diesen beiden Puffern wurde die Aktivität der CaLB ebenso in den thermomorphen Lösungsmitteln getestet. Die Aktivität der CaLB im [BMIm][BF₄]- und AmmoengTM110-System übertrifft sogar den in reinen Puffer ermittelten Wert und kann auf ähnliche Weise interpretiert werden. Das thermomorphe Lösungsmittelsystem [BMIm]BF₄]-NaPi besteht aus 35% (v/v) der IL mit einer Natriumphosphatkonzentration von 150 mM. Der hohe Anteil an stabilisierenden Salzen führt daher offensichtlich zu einer erhöhten Aktivität der CaLB. AmmoengTM110 ist bereits bekannt für seinen positiven Einfluss auf Alkoholdehydrogenasen [Dreyer und Kragl 2008] und entspricht damit den Erwartungen an diese ionischen Flüssigkeit. Zudem enthält das AmmoengTM110-KPi-TMS 950 mM Kaliumphosphatpuffer, welcher scheinbar die stabilisierende Wirkung verstärkt. Ein nützlicher Aspekt der Stoffklasse der ionischen Flüssigkeiten ist die Fähigkeit - neben der Einstellung der Polarität und Hydrophobizität durch die Variation von Kation und Anion - Ionen zu kombinieren, die nach HOFMEISTER die Bindungsstrukturen verbessern oder zerstören. Das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen ist dabei als Hauptursache zu nennen. Im Hinblick auf [BMIm][BF₄] und AmmoengTM110 besitzen beide ILs relativ kleine (kosmotrope) Anionen mit hoher Ladungsdichte und wechselwirken damit stark mit Wasser. Die beste Kombination von Ionen, um eine hohe Stabilität des Proteins in wässrigen Lösungen zu gewährleisten, ist allerdings laut Literatur die Kombination aus kosmotropem Anion und chaotropem Kation. [Zhao et al. 2006; Bridges et al. 2007] In Anlehnung an das ausführlich untersuchte Cholin-Dihydrogenphosphat, als ein solches Beispiel gelungener Kombination [Weaver et al. 2012], wurde die Aktivität der CaLB im TMS mit der ähnlich strukturierten IL [N_{1112(OH)}][NTf₂] untersucht. Diese trägt dasselbe Kation wie das Cholin-Dihydrogenphosphat-System, jedoch ein anderes Anion, welches einen hydrophoberen Charakter aufweist und daher die IL mit Wasser partiell unmischbar macht (Schema A-2). Es kann vermutet werden, dass die Aktivität der CaLB im [N_{1112(OH)}][NTf₂]-KPi im Vergleich zum reinen Puffer geringer ausfällt, da das Enzym durch den chaotropen Effekt der IL-Ionen zunehmend in seiner Aktivität gemindert bis denaturiert wird. Sowohl das Kation als auch das Anion der [N_{1112(OH)}][NTf₂]-IL sind groß mit geringer Ladungsdichte und bewirken daher das Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen und eine zunehmende Denaturierung des Proteins in Folge der Abschwächung hydrophober Wechselwirkungen. Zum Anderen

liegt die Erklärung wohlmöglich in der Verwendung der Phasenvermittler 1,4-Dioxan und Aceton im TMS, die ebenso einen negativen Einfluss auf die CaLB haben können, da sie mit dem Wasser um die Solvatisierung des Enzyms konkurrieren und damit die Sekundär- und Tertiärstruktur verändern können.

Ebenso verhält es sich möglicherweise in den organisch-basierten TMS 1 und TMS 2, in denen noch niedrigere Werte gemessen wurden. Die volumetrische Aktivität der CaLB liegt in diesen Systemen sogar nur bei $A_{vol} = (22,6 \pm 0,8)$ U/ml (TMS 1) und $A_{vol} = (20,8 \pm 0,4)$ U/ml (TMS 2). Diese geringe Stoffumsetzung liegt vermutlich begründet in der Inaktivierung des Proteins durch den hohen Anteil an Acetonitril bzw. THF. Diese polaren organischen Lösungsmittel vermögen es, die zur Aufrechterhaltung der Struktur erforderlichen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen zu stören und destabilisieren somit im hohen Maße die CaLB. Vergleichsweise geringe Aktivitäten weist die CaLB in den [EMIm][NTf₂]-KPi-TMS (TMS 7: $A_{vol} = (28,3 \pm 0,8)$ U/ml und TMS 8: $A_{vol} = (31,7 \pm 0,7)$ U/ml) auf. Auch hier können zwei Vermutungen diskutiert werden: zum Einen handelt es sich bei der ionischen Flüssigkeit um eine Kombination aus zwei weniger chaotropen Ionen, was in der vorherigen Erklärung die Wasserstoffbrückenstruktur und damit die Stabilität des Enzyms stört und zudem nicht der idealen Zusammensetzung entspricht. Zum Anderen wurden wiederum polare organische Lösungsmittel (Acetonitril und DMSO) als Phasenvermittler eingesetzt, die wie schon erwähnt sich negativ auf das Enzym auswirken.

Neben der volumetrischen Aktivität der CaLB konnte mit Hilfe des BRADFORD-Tests auch die spezifische Aktivität, also die Aktivität pro Masse Enzym, ermittelt werden (Berechnung siehe Anhang Kapitel A.2.11.5). Die spezifische Enzymaktivität der CaLB in Natriumphosphat-Puffer beträgt nach BRADFORD $A_{spez} = (1,65 \pm 0,01)$ U/mg. In Korrelation mit der 1D-Gelelektrophorese der CaLB (Abbildung A-31) kann mit dieser niedrigen spezifischen Aktivität geschlussfolgert werden, dass das hier untersuchte Enzym nicht hochrein ist; also Begleitproteine in der Lösung mit vorliegen, die möglicherweise das gewünschte Phasenverhalten - aufgrund der höheren erforderlichen Zugabe des Biokatalysators zur Reaktionslösung – negativ beeinflussen können.

Neben der schon erwähnten Wahl des Substrates und des Lösungsmittels kann durch die Umgebungsfaktoren Temperatur und pH-Wert ebenso Einfluss auf die Aktivität und Stabilität des Enzyms genommen werden. Eine Auswahl der Messungen zur temperatur- und pH-abhängigen Aktivität im Standardmedium Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) ist in Abbildung 4-10 dargestellt und weitere in Kapitel A.3 aufgeführt. Im Intervall von 10 °C bis 45 °C ist ein exponentieller Anstieg der volumetrischen Aktivität entsprechend ARRHENIUS zu beobachten, bei steigender Temperatur wieder dieser durch die Deaktivierung während der Messzeit überlagert, wodurch sich scheinbar ein Maximum ergibt. Bei den

typischen Einsatztemperaturen der CaLB von 30 bis 45 °C steigt die photometrisch ermittelte Aktivität von $(37,2 \pm 0,1)$ U/ml bis zu einem Maximalwert von $(46,7 \pm 0,3)$ U/ml an.

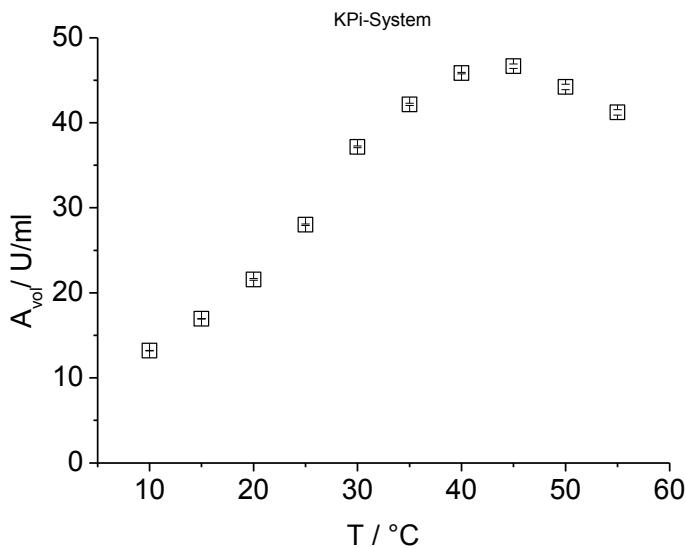


Abbildung 4-10. Temperatur-Abhängigkeit der CaLB im Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0). (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).

Durch Erhöhung der Temperatur ändert sich die Enzymkonformation und somit auch die Struktur des aktiven Zentrums. Bei andauernder Temperaturerhöhung sinkt die Enzymaktivität und es folgt nach der Inaktivierung der CaLB die irreversible Denaturierung des Proteins. Abbildung 4-11 zeigt die Stabilität der CaLB über 14 Tage in 50 mM KPi.

Wie schon in vorherigen Aktivitätsmessungen kann beobachtet werden, dass bei zunehmender Temperatur auch anfänglich die Aktivität der CaLB zunimmt. Laut RGT-Regel wird grob angenähert, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis vervierfacht, wenn sich die Temperatur um 10 K erhöht. [Holleman et al. 2007] Die gemessenen volumetrischen Aktivitäten der CaLB in Kaliumphosphat-Puffer in Minute 0 ergeben $(37,2 \pm 0,1)$ U/ml bei 30 °C, $(38,9 \pm 0,1)$ U/ml bei 40 °C und $(41,1 \pm 0,4)$ U/ml bei 50 °C. Es ist weder eine Verdopplung noch eine Vervierfachung der Aktivität zu beobachten, die über die Arrhenius-Gleichung mit der Reaktionsgeschwindigkeit zusammenhängt, lediglich eine moderate Erhöhung um 14-16%. Bei weiterer Verfolgung der Aktivität über die Zeit kann schon nach 20 min ein Unterschreiten der A_{vol} bei 50 °C ($(33,1 \pm 0,3)$ U/ml) unter die Werte bei 30 °C ($(38,0 \pm 0,7)$ U/ml) und 40 °C ($(40,9 \pm 0,8)$ U/ml) beobachtet werden. Im untersuchten Zeitraum konnte zudem festgestellt werden, dass die CaLB bei 40 °C die höchste Stabilität aufweist, da die Aktivitäten bei 30 °C und 50 °C sowohl früher als auch stärker abfallen. Nach 14 Tagen verzeichnet die CaLB bei 30 °C noch $(20,0 \pm 0,5)$ U/ml, bei 40 °C noch $(24,2 \pm 0,1)$ U/ml und bei 50 °C nur noch $(2,1 \pm 0,0)$ U/ml Restaktivität.

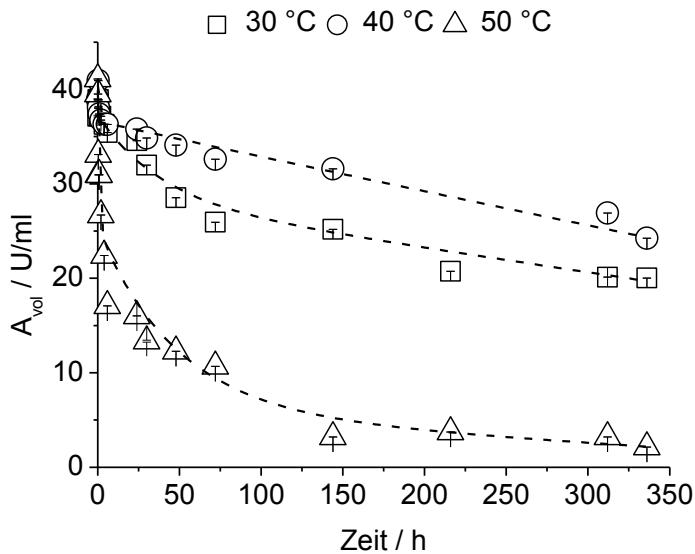
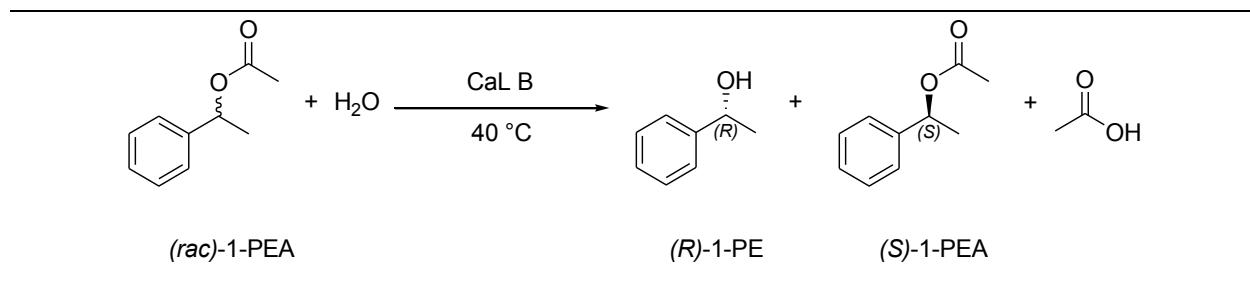


Abbildung 4-11. Stabilität der CaLB in KPi (50 mM, pH 7,0) über 14 Tage bei 30 °C, 40 °C und 50 °C. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung).

Das lässt den Schluss zu, dass höhere Temperaturen die Stabilität des Enzyms verringern, selbst wenn sie anfänglich mit höheren Aktivitäten einhergehen. Auf Grund der guten Aktivität und Langzeitstabilität der CaLB bei 40 °C wurde diese Temperatur für alle weiteren Reaktionen gewählt. Die höchste thermisch stabile Proteinkonformation in der Umsetzung des *p*-Nitrphenylacetats in KPi bedeutet jedoch wiederum nicht notwendigerweise, dass die Funktion des Biokatalysators gegenüber anderer Substrate in anderen Medien ebenso maximal ist. Daher wird das Enzym nun im Weiteren in der Funktion als Biokatalysator in verschiedenen Modellreaktionen untersucht.

4.2.1.1 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB in reinem Puffer

Entscheidend für die Bewertung der thermomorphen Reaktionssysteme ist der Vergleich einer bereits ausführlich untersuchten Reaktion in gängigen Lösungsmittelsystemen. Konventionell wird die enzymatische kinetische Racematspaltung im wässrigen Medium [Moreno et al. 1995; Steenkamp und Brady 2003] oder im Zweiphasensystem aus Wasser und organischen Lösungsmittel durchgeführt [Shen et al. 2008; Petucci et al. 2007; Kirschner et al. 2004]. Als Modellsubstrat wurde das racemische 1-Phenylethylacetat (Abk. (rac)-1-PEA) gewählt, das unter den zuvor festgelegten Reaktionsbedingungen mit Hilfe der CaLB durch Hydrolyse stereospezifisch zum gewünschten (*R*)-1-Phenylethanol (Abk.: (*R*)-1-PE) umgesetzt wird (Schema 4-6). Zurück bleibt das Enantiomer (*S*)-1-Phenylethylacetat (Abk.: (*S*)-1-PEA) sowie Essigsäure als Produkt der Hydrolyse. Durch den Einsatz von Puffer als Reaktionsmedium kann der benötigte pH-Wert von 7,0 für diese Reaktion über die Zeit konstant gehalten werden. Der Verlauf und die Selektivität der kinetischen Racematspaltung wurden mittels GC mit chiraler stationärer Säule verfolgt.



Schema 4-6. Kinetische Racematspaltung des 1-Phenylethylacetats ((rac) -1-PEA) in reinem Puffer bei 40 $^\circ\text{C}$ mit Hilfe der CaLB.

Die Reaktion im Kaliumphosphat-Puffer (50 mM) verläuft minimal schneller als im Natriumphosphat-Puffer (100 mM), was TRANHA *et al.* schon 2005 mit der Annahme begründeten, dass sich das Substrat in Gegenwart von monovalenten Kationen im Reaktionsmedium einfacher dem aktiven Zentrum des Enzyms annähern kann. [Tranha et al. 2005] Im Folgenden wird daher nur die Reaktion im KPi dargestellt. Generell sei an dieser Stelle auch bemerkt, dass Blindversuche ohne Enzym für jedes Experiment durchgeführt wurden. In keinem dieser Versuche war eine Reaktion ohne den Biokatalysator detektierbar.

In der in Abbildung 4-12 gezeigten Modellreaktion wurden 50 mM (rac) -1-PEA als Substrat mit Hilfe von 97 U/ml CaLB umgesetzt. Die Reaktion verläuft stark enantioselektiv und liefert nach nur 30 min das enantiomerenreine Produkt (R) -1-PE (ees = 99,5%). Die Abnahme der Substratkonzentration und die Zunahme der Produktkonzentration verläuft exponentiell mit der Zeit und ist somit eine Reaktion 1. Ordnung. In den ersten Minuten ist der Reaktionsumsatz nur von der Enzymkonzentration und nicht von der Konzentration des Substrates abhängig. Hier gilt ein Zeitgesetz 0. Ordnung, da das Substrat relativ zur konstanten Enzymkonzentration in großem Überschuss vorliegt und die Enzymkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Die hohe Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion (rote Linie skizziert in Abbildung 4-12) spricht für eine hohe Funktionalität des Biokatalysators, was zum Einen in der Wahl des Lösungsmittels begründet liegt und zum Anderen in der Nutzung des Temperatur-Optimums bei 40 $^\circ\text{C}$. Die Auswertung der Anfangskonzentration in Bezug auf die Zeit (vgl. Kapitel A.2.2.7) erlaubt die Abschätzung der Aktivität der CaLB im Hinblick auf das verwendete Substrat und das verwendete Lösungsmittelsystem. Es wird für alle folgenden Reaktionssysteme in Tabelle 4-15 (Kapitel 4.2.1.10) zusammengefasst.

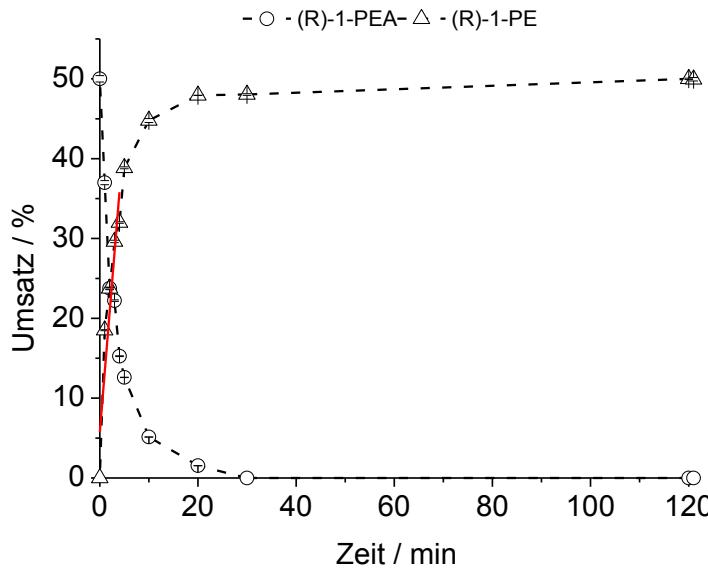


Abbildung 4-12. Kinetische Racematspaltung von 50 mM 1-Phenylethylacetat mit 97 U/ml CaLB in Kaliumphosphat-Puffer (KPi 50 mM, pH 7,0) bei 40 °C. (Mittelwerte aus Sechsachbestimmung).

Ein klarer Vorteil dieser Reaktion im 1PS aus Kaliumphosphat-Puffer ist die hohe Reaktivität; das Medium birgt jedoch auch den gleichzeitigen Nachteil der begrenzten Löslichkeit des Substrates. Daher soll nachfolgend die Reaktion im klassischen Zweiphasensystem aus Kaliumphosphat-Puffer und organischem Lösungsmittel vorgestellt und mit dem 1PS verglichen werden.

4.2.1.2 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im Zweiphasensystem aus Phosphatpuffer und MTBE

Binäre Reaktionssysteme, bestehend aus zwei meist flüssigen Phasen, werden in der Biokatalyse ebenfalls oftmals als Reaktionssystem verwendet. [Foresti et al. 2008] Hierbei bilden z.B. organische Lösungsmittel, die mit Wasser nur gering mischbar sind, definierte Zweiphasensysteme (2PS). Sie haben den Vorteil, dass sie aufgrund ihres lipophilen Charakters schlecht wasserlösliche Substanzen lösen. Da die Lösungsmittel nur zu einem geringen Teil in die wässrige Phase übergehen, wirken sie auf das Enzym weniger denaturierend als der Zusatz wassermischbarer organischer Lösungsmittel. [Ganske und Bornscheuer 2005b; Swarts 2007; Molinari et al 2007] Durch die geringe Wasserlöslichkeit wird die Wasseraktivität in der enzymtragenden wässrigen Phase nur gering herabgesetzt und die Biokompatibilität des eingesetzten organischen Lösungsmittels ist vielmehr von entscheidender Bedeutung, wobei $\log P$ -Werte > 4 , wie in Kapitel 3.3 erwähnt, nur einen geringen negativen Effekt auf die biokatalytische Reaktion haben. Die Verteilung der Substrate und Produkte in solchen Systemen ist wichtig, denn durch sie können Inhibitierungen unterdrückt und Massentransferlimitierungen ermittelt werden. Wie schon in Kapitel 3.3 beschrieben, konnte bereits gezeigt werden, dass viele Enzyme ihre Aktivität in organischen

Lösungsmitteln behalten [Zaks und Klibanov 1985b] und interessante katalytische Eigenschaften wie höhere Thermostabilität und veränderte Stereoselektivität [Wescott und Klibanov 1994; Zaks und Klibanov 1985b; Russell und Klibanov 1989; Staahl et al. 1991] aufweisen; was ebenso bei der CaLB beobachtet werden konnte [Kirk und Christensen 2002; Magnusson et al. 2005]. Im Vergleich zum Wasser bieten organische Lösungsmittel der Biokatalyse daher neue Möglichkeiten: in organischen Lösungsmitteln werden beispielsweise enzymkatalysierte Veresterungen durchführbar und können aufgrund der hohen Löslichkeit von hydrophoben Substraten effizient eingesetzt werden. Trotz dieser Vorteile ist die katalytische Aktivität in den meisten Fällen um Größenordnungen geringer als in wässrigen Systemen [Kitaguchi et al. 1989; Clark 2004; Overbeeke et al. 2000]. Ausgehend von experimentellen Daten wurden drei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen, wie organische Lösungsmittel mit Enzymen interagieren: die Permittivität ($\log P$, Hydrophobizität) des Solvens [Affleck et al. 1992], das molekulare Volumen [Ottosson et al. 2002] und die Wasseraktivität [Lee und Kim 1995].

Enzyme, die in organischen Lösungsmitteln aktiv sind, behalten ihre native Struktur bei der Übertragung von Wasser zum organischen Lösungsmittel bei [Kitaguchi et al. 1989; Zaks und Klibanov 1988; Trodler und Pleiss 2008b]. Allerdings ist es wichtig, kleine Mengen an Wasser hinzuzufügen, um die Stabilität und Flexibilität von Enzymen in organischem Lösungsmittel aufrechtzuerhalten (vgl. a_w Kapitel 3.3). Der Effekt von fünf verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Permittivitäten auf proteingebundenes Wasser wurde bereits anhand der CaLB (mit 286 gebundenen Wassermolekülen) untersucht. [Trodler und Pleiss 2008a] Die Arbeiten von TRODLER UND PLEISS ergaben, dass die simulierte Kristallstruktur der CaLB in Abhängigkeit vom Lösungsmittel nur geringe Abweichungen zeigt. Allerdings sank die hydrophile Oberfläche von CaLB in unpolaren Lösungsmitteln um 10% im Vergleich zu Wasser, während die hydrophobe Oberfläche leicht um 1% erhöht wurde. In Abhängigkeit von der Dielektrizitätskonstanten ϵ des Lösungsmittels fanden sie einen großen Einfluss auf die Flexibilität der Struktur. Mit abnehmender Dielektrizitätskonstante ($\epsilon_{\text{Wasser}} = 80,08$ (bei 20 °C); $\epsilon_{\text{MTBE}} = 4,5$ (bei 20 °C)) erhöhte sich sowohl die Flexibilität der Kristallstruktur als auch die Anzahl der oberflächengebundenen Wassermoleküle deutlich und es wurde ein überspannendes Wassernetz mit zunehmender Größe um die CaLB beobachtet. [Trodler und Pleiss 2008b] Enzymgebundenes Wasser ist für die Katalyse daher essentiell [Zaks und Klibanov 1988], vollständig trockene Enzyme sind inaktiv [Griebenow und Klibanov 1996]. Das hier vorgestellte Zweiphasensystem bietet daher eine wässrige Phase als optimale Umgebung für das Enzym und eine zweite partiell unmischbare organische Phase für die hohe Löslichkeit des Substrates. Klassischerweise bildet Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) die zweite Phase des Systems, da es der CaLB nachweislich hohe Aktivität und Stabilität garantiert. [Woudenberg-van Oosterom et al. 1996]

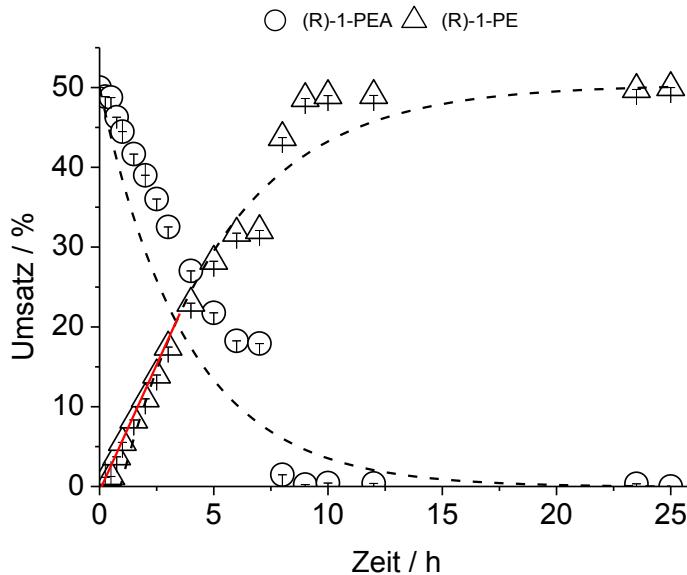
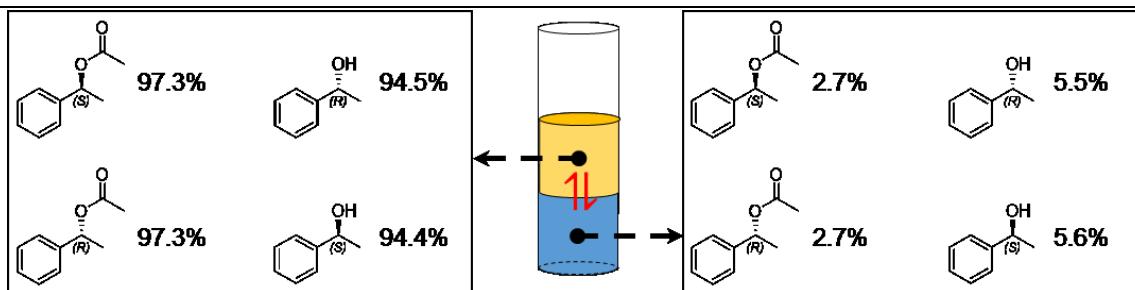


Abbildung 4-13. Kinetische Racematspaltung von 50 mM 1-Phenylethylacetat mit 97 U/ml CaLB im Zweiphasensystem aus Phosphatpuffer und MTBE bei 40 °C. (Mittelwerte aus Sechsfachbestimmung)

Dem Reaktionsverlauf der kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat im Zweiphasensystem aus 50% (v/v) Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) und 50% (v/v) MTBE ist zu entnehmen, dass erst nach 12 Stunden ein maximaler Umsatz erreicht wird. Es entsteht zu $(49,0 \pm 0,1)\%$ der (R)-Alkohol, womit das Produkt einen Enantiomerenüberschuss von $ee_P = 96,34\%$ aufweist. Im Vergleich konnten nach zwei Stunden im Einphasensystem aus KPi ein voller Umsatz, im Zweiphasensystem erst $(10,9 \pm 0,1)\%$ des präferierten (R)-1-Phenylethanol per GC nachgewiesen werden. Diese Beobachtung lässt sich mit der Verteilung des Substrates in den zwei Phasen begründen: die Wahrscheinlichkeit in das aktive Zentrum der CalB zu gelangen für das 1-PEA im Vergleich zum 1PS gesunken, da es sich im nicht-wässrigen Lösungsmittel besser löst als in Wasser. Dadurch steigt der K_M -Wert und die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt. RAKELS *et al.* postulierten schon Mitte der 1990er, dass die erfolgreiche enzymatische Hydrolyse in zweiphasigen Medien weiterhin durch zwei wesentliche Kriterien limitiert wird: zum Einen durch die Abnahme der Lipase-Enantioselektivität aufgrund des organischen Lösungsmittels, zum Anderen durch die Schwierigkeit, den pH -Wert der wässrigen Lösung während des Hydrolyseverfahrens zu kontrollieren. [Rakels *et al.* 1994] Der pH -Schnelltest des Reaktionssystems zeigt eine Färbung im pH -neutralen Bereich, so dass höchstens ein geringer pH -Shift durch die Entstehung der Essigsäure vermutet werden kann. Dieser und die mögliche Phasentoxizität des MTBE [Klibanov 1997] könnte eine minimale Konformationsänderung der CalB und in Folge dessen eine Verringerung der Stabilität und Aktivität des Biokatalysators im Zweiphasensystem verursacht haben. Es wurde bereits gezeigt, dass der Übergang zwischen zwei Proteinkonformationen von der Anwesenheit einer Grenzfläche getrieben wird. [Turner *et al.* 2001] Während sich in unpolaren organischen Lösungsmitteln mit einem hohen $\log P$ -Wert das Wasser

fast ausschließlich an der Proteinoberfläche befindet, können polare organische Lösungsmittel das Wasser von der Proteinoberfläche abziehen [Yang et al. 2004; Micaêlo und Soares 2007]. Mit einem *logP*-Wert von 0,94 [Hansch et al. 1995] zeigt MTBE eine gewisse Affinität zu Wasser, allerdings verhindert die *tert*-Butyl-Gruppe das MTBE in die Proteinstruktur eindringen kann..

Die Abnahme der Substratkonzentration und die Zunahme der Produktkonzentration in Abbildung 4-13 verläuft exponentiell mit der Zeit und entspricht somit einer Reaktion 1. Ordnung. Die skizzierte rote Linie zeigt eine vergleichsweise geringe Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, die in den 1980er Jahren noch verbreitet mit der Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die Phasengrenze begründet wurde. [Brink et al. 1988] ZIMMERMANN et al. konnten jedoch die Annahme, die Überwindung der Phasengrenze im 2PS wäre der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, in jüngerer Zeit widerlegen. [Zimmermann und Kragl 2008; Zimmermann et al. 2008] Der Reaktion der Hydrolyse findet an der Grenzfläche der beiden Phasen statt. [Janes und Kazlauskas 1997; Kazlauskas und Weber 1998; Carrea und Riva 2000] Die exponierten Proteingruppen kommen dadurch mit den beiden Phasenkomponenten in Berührung und bestimmen das Partitionierungsverhalten. Dieses oberflächenabhängige Phänomen ist sehr komplex, da ein Protein mit den umgebenden Molekülen innerhalb einer Phase über Wasserstoffbrücken, Ladungswechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkungen und sterische Effekte in Wechselwirkung treten kann. [Franco et al. 1996] Der Nettoeffekt dieser Wechselwirkungen unterscheidet sich in den Phasen von KPi und MTBE, das Protein verteilt sich jedoch ausschließlich in der wässrigen Phase. Eine mögliche Ursache für die schlechte Umsetzung des 1-Phenylethylacetats im 2PS könnte daher mit dem Michaelis-Menten-Modell erklärt werden, wonach die Substratkonzentration in der wässrigen Phase kleiner als die entsprechende Michaelis-Konstante K_M zu sein scheint (vgl. Kapitel 3.2) und daher die halbmaximale Geschwindigkeit nicht erreicht wurde. Die Verteilung des Substrates 1-Phenylethylacetat sowie des Produktes 1-Phenylethanol zwischen der oberen MTBE-Phase (gelb) und der unteren KPi-Phase (blau), wobei nur der (*R*)-Alkohol während der gezeigten Modellreaktion entsteht, ist in Schema 4-7 veranschaulicht.



Schema 4-7. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) im Zweiphasensystem aus KPi (blau) und MTBE (gelb) bei 20 °C. (Mittelwerte aus Doppelbestimmung)

Der NERNSTsche Verteilungssatz besagt, dass sich eine Substanz in einem zweiphasigen System anhand der Differenz des chemischen Potentials beider Phasen verteilt. [Haase 1956] Eine solche Potentialdifferenz ist charakteristisch für ein gegebenes System und stellt bei festgelegtem Druck sowie Temperatur ($p = p_{\text{Atm}}$, $T = 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) eine Konstante dar. Die Verteilungskoeffizienten wurden experimentell bestimmt und bilden die Grundlage für die spätere präparative oder technische Stofftrennung während der Aufarbeitung des Produktes z.B. durch die Extraktion von 1-PEA aus dem Mehrstoffgemisch oder durch verteilungschromatographische Methoden. Es konnte gezeigt werden, dass sich der racemische Ester zu 97,3% und das präferierte (*R*)-Phenylethanol zu 94,5% in der oberen MTBE-Phase befindet, so dass in diesem Reaktionssystem eine extractive Trennung des homogenen Biokatalysators (aus der KPi-Phase) vom Substrat und Produkt im Vergleich zum Einphasensystem vereinfacht durchgeführt werden kann. Dieser beachtliche Vorteil der biphasischen Reaktionsführung steht der geringen Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber, die den Prozess weniger attraktiv macht. Dazu kommt im Fall der CaLB, dass diese als Ausnahme unter den Lipasen nicht grenzflächenaktiv ist und es deshalb für einen möglichst hohen Umsatz nicht zwingenderweise notwendig ist, die Reaktion im Zweiphasensystem durchzuführen.

Daher wurde zu Beginn dieses Jahrhunderts von der Arbeitsgruppe um Arno Behr ein Lösungsansatz in Form Temperatur-gesteuerter Mehrkomponenten-Lösungsmittel-Systeme (engl.: *thermomorphic multi-component solvent system*, Abk.: TMS) vorgestellt [Behr und Fängewisch 2001], der bisher erfolgreich in der homogenen Übergangsmetallkatalyse eingesetzt werden konnte [Behr et al. 2006; Zagajewski et al. 2014b; Gaide et al. 2016]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nur eine Publikation für die Anwendung thermomorpher Mehrkomponenten-Lösungsmittel-Systeme als Medium für eine biokatalytische Reaktion erschienen. Der Artikel beschreibt die Hydrolyse des *p*-Nitrophenylpalmitats mittels der Amano Lipase PS in einem Lösungsmittelgemisch aus Wasser, Hexanol und Methanol. [Behr et al. 2011] Angelehnt an diese Arbeit wird im Folgenden die kinetische Racematspaltung des 1-Phenylethylacetats in einem organischen-Lösungsmittel-basierten TMS gezeigt.

4.2.1.3 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im organischen TMS

Die Verwendung von thermomorphen Lösungsmittelsystemen für die Biokatalyse weist gegenüber anderen Verfahren einige entscheidende Vorteile auf: so erfolgt die Reaktion im Gegensatz zum vorher gezeigten 2PS ohne Phasengrenze zwischen Katalysator und Substrat; zudem können nach der Reaktion das Enzym und Produkt durch einfache Phasenseparation voneinander getrennt werden. Es können günstige, kommerziell erhältliche Lösungsmittel verwendet werden, deren positiver Einfluss auf den Biokatalysator belegt ist. Außerdem müssen die Enzyme nicht weiter modifiziert werden, da eine Immobilisierung bei diesem Reaktionssystem nicht von Nöten ist. [Gaide et al. 2016] Der Einsatz der TMS

ermöglicht somit die einfache Umsetzung nicht wasserlöslicher Substrate in Kombination mit einem simplen und effizienten Katalysatorrecycling.

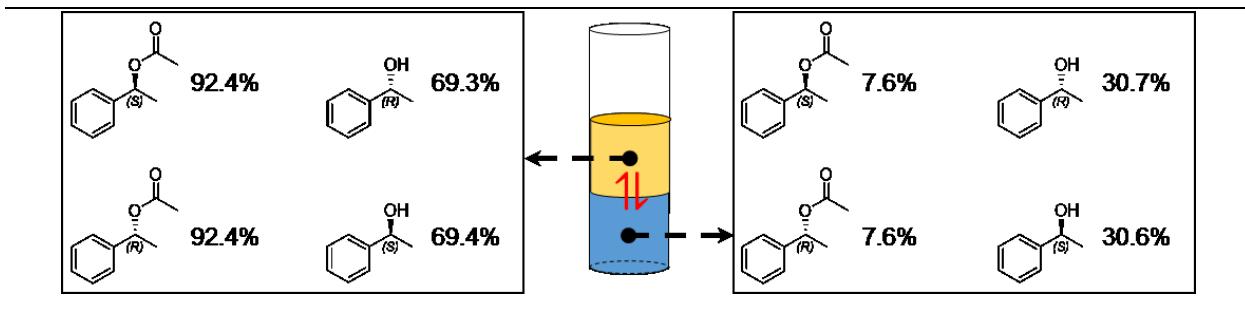
Die in Kapitel 4.1.1 entwickelten TMS auf Basis organischer Lösungsmittel (siehe Tabelle 4-6) sollen hier als Medium für die Reaktion der CaLB dienen. Es werden die Einflüsse diskutiert, die Umsatz, Verteilung und Rezyklierung des Produktes bestimmen. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse mit den Reaktionen im klassischen Ein- und Zweiphasensystem verglichen werden.

Tabelle 4-6. Zusammensetzung der organischen TMS 1 und 2 mit Angabe der Trübungstemperaturen T_{Tr} .

TMS 1	TMS 2
40% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)	50% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)
45% (v/v) THF	40% (v/v) Acetonitril
15% (v/v) 1-Butanol	10% (v/v) MTBE
$T_{Tr} = 21 \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 21 \text{ } ^\circ\text{C}$

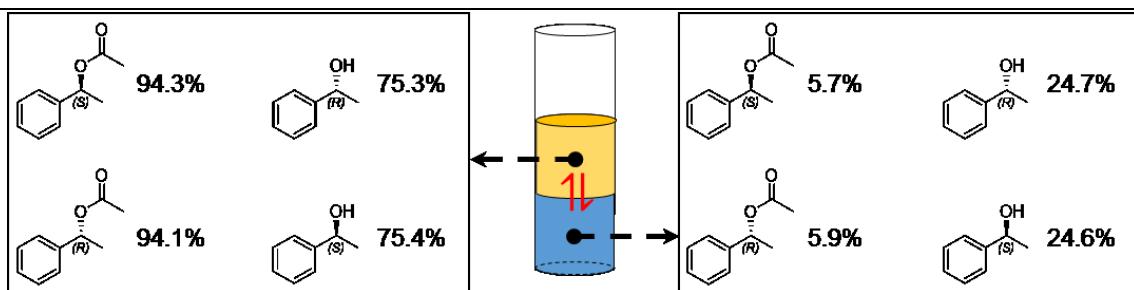
Im Grunde wird die Substratkonzentration immer durch eine Sättigung des Enzyms oder durch die geringe Löslichkeit in der Lösung definiert. Bei den thermomorphen Lösungsmittelsystemen hat das Substrat direkten Einfluss auf das Phasenverhalten und wird dadurch in seiner Konzentration limitiert. Auf Grund dessen wurde die Substratkonzentration in allen nachfolgenden TMS auf $c = 30 \text{ mM}$ reduziert.

Um die Systeme weiterhin näher zu charakterisieren, wurden vor der Reaktion die Verteilung von Substrat und Produkt bei $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ nach 30 minütiger Inkubation bei $40 \text{ } ^\circ\text{C}$ im TMS 1 (Schema 4-8) und TMS 2 (Schema 4-9) ermittelt.



Schema 4-8. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den zwei Phasen des KPi-THF-Butanol-TMS (TMS 1) bei $20 \text{ } ^\circ\text{C}$. (blau: wässrige Phase, gelb: organische Phase, Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

So konnte im TMS 1 gezeigt werden, dass sich wie erwartet die obere organische Phase als Reservoir für ~92% des racemischen Substrates anbietet und das Produkt zu ~69% aus dieser Phase nach Umsetzung gewonnen werden kann.



Schema 4-9. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den zwei Phasen des KPi-Acetonitril-MTBE-TMS (TMS 2) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: organische Phase, Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Im TMS 2 verteilen sich Substrat und Produkt in Hinblick auf eine spätere vereinfachte Aufarbeitung sogar noch günstiger. Bei einphasiger Reaktionsführung kann das Substrat ungehindert an das Enzym binden, da keine Phasengrenzen überwunden werden müssen und die CaLB nicht grenzflächenaktiv ist.⁶ Wie schon zuvor erwähnt, liegt das Enzym CaLB nach Beendigung der Reaktion und Absenken der Temperatur auf Raumtemperatur zu großen Teilen in der unteren wässrigen Phase vor (s. Schema 4-9), so dass eine effektive Katalysatorabtrennung und –rezyklierung gegeben ist.

Bei optischer Betrachtung der beiden TMS erscheint das TMS 1 bei 40 °C leicht trüb, das TMS 2 ist dagegen völlig klar. Die Umsetzung des Modellsubstrats mittels CaLB ist in beiden thermomorphen Lösungsmittelsystemen gering; so können nach 30 Stunden im TMS 1 nur $(12,1 \pm 0,1)\%$ und im TMS 2 lediglich $(10,7 \pm 0,1)\%$ Umsatz des racemischen Esters nachgewiesen werden (Abbildung A-32). Der Geschwindigkeitsverlust gegenüber dem wässrigen Einphasensystem kann den kombinierten Effekten der Destabilisierung des Übergangszustands⁷, der Konformationsänderung und dem Flexibilitätsverlust zugeschrieben werden. [Halling 2004; Clark 2004]

Der Enantiomerenüberschuss des Produktes liegt bei beiden TMS bei $>99\% \text{ ee}_P$ und es entstehen keine im Chromatogramm ersichtlichen Nebenprodukte. Im Vergleich zum Einphasensystem aus Kaliumphosphat-Puffer und auch zum Zweiphasensystem aus KPi und MTBE schneiden die organischen TMS in der Gegenüberstellung der Raum-Zeit-Ausbeuten (siehe Tabelle 4-15) wesentlich schlechter ab und können als nicht produktiv angesehen werden. SHELDON *et al.* berichteten 2002 über einen Umsatz von 98% eines racemischen Esters mittels CaLB in reinem MTBE mit einem Enantiomerenüberschuss von $>43\%$ [Sheldon *et al.* 2002], und einige andere Arbeitsgruppen wiesen für die kinetische Racematspaltung mit der CaLB in reinem THF moderate Umsätze nach [Danieli *et al.* 1997; Ottosson *et al.* 2002; Li *et al.*

⁶ Die fehlende Grenzflächenaktivierung wird auf die Größe des Deckels zurückgeführt, da Lipasen wie die CaLB nur einen kleinen Deckel besitzen, welcher das aktive Zentrum nicht ausreichend abschirmt. [Martinelle *et al.* 1995]

⁷ Die Destabilisierung des Übergangszustands wird durch die niedrige Dielektrizitätskonstante der meisten organischen Lösungsmittel verursacht, die die Energie des stark polarisierten Übergangszustands im Vergleich zu Wasser erhöht. [Clark 2004]

2010]. Wäre auch im TMS 1 und TMS 2 ein ausreichend hoher Umsatz gegeben, könnte das Produkt zumindest in kleinem Umfang optisch rein isoliert werden; doch auch die Ausbeute ist in diesen Systemen viel zu gering bei gleichzeitig sehr kleiner Reaktionsgeschwindigkeit. Weitere Versuche auf die Reaktion mittels Temperatur, Lösungsmittelzusammensetzung oder Schüttelmethode Einfluss zu nehmen, ergaben keine Verbesserung. Der unveränderte Umsatz nach 30 Stunden in beiden TMS lässt eine Deaktivierung des Enzyms vermuten, die zum Einen durch die Toxizität der organischen Lösungsmittel ausgelöst worden sein könnte, zum Anderen wurde bereits nachgewiesen, dass Enzyme in organischen Lösungsmitteln mit hohen Mengen an Wasser sogar eine Denaturierung zeigen [Griebenow und Klibanov 1996]. Darüberhinaus berichteten GARCIA-ALLES und GOTOR über die kompetitive Inhibierung der CaLB, genauer des Novozyms®435, durch den Alkohol 1-Butanol, der dem TMS 1 als Phasenvermittler zugesetzt wurde und auch hier ursächlich sein kann. [García-Alles und Gotor 1998a; García-Alles und Gotor 1998b] Die niedrigen Ausbeuten könnten kinetisch mit der Zunahme von K_M durch die erhöhte Löslichkeit erklärt werden und normalerweise durch eine Konzentrationserhöhung ausgeglichen werden, wenn keine weiteren störenden Effekte vorliegen. [Klibanov 1997; Halling 2004] Im Falle der thermomorphen Lösungsmittelsysteme bedeutet jedoch eine Erhöhung der Substratkonzentration auch gleichzeitig eine Verschiebung der Binodalen im Phasendiagramm und resultierend eine ungünstige Erhöhung der Trübungstemperatur.

Um zu belegen, dass das Enzym seine anfängliche Aktivität im Verlauf der Zeit einbüßt, wurde die CaLB exemplarisch über 72 Stunden im TMS 2 bei 40 °C inkubiert und die Stabilität studiert (Abbildung 4-14).

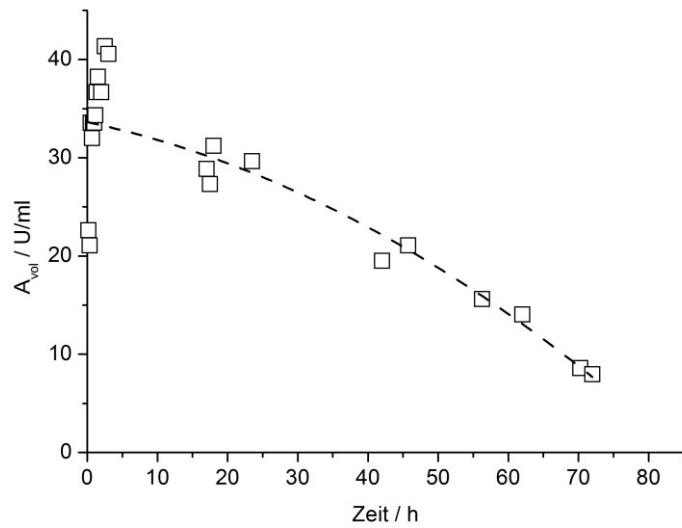


Abbildung 4-14. Stabilität der CaLB über 72 Stunden im TMS 2 bei 40 °C. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Im gezeigten TMS aus KPi-Acetonitril-MTBE erreicht die CaLB nach 2,5 Stunden ein Aktivitätsmaximum von 41,4 U/ml. Bis zu diesem Zeitpunkt zeigt sich auch im Umsatz-Zeit-Diagramm ein kontinuierlicher Umsatz des 1-Phenylethylacetat, der jedoch nach ca. fünf Stunden stagniert. Diese Beobachtung korreliert mit der Abnahme der Aktivität im thermomorphen System; ergo muss von einer anhaltenden Inhibierung des Biokatalysators im Reaktionssystem ausgegangen werden.

Daher sollte als nächstes der Einfluss des wasserlöslichen Acetonitrils in der 1:1-Mischung im 50 mM Kaliumphosphat-Puffer auf das Enzym getestet werden, da die erfolgreiche Reaktion im KPi-MTBE-System in Kapitel 4.2.1.2 schon belegt werden konnte. Die Hydrolyse des 1-Phenylethylacetats zeigte im KPi-Acetonitril-System auch nach zwölf Stunden keinen Umsatz, was auf eine hohe Toxizität des Acetonitrils gegenüber der CaLB schließen lässt und die geringe theoretische Ausbeute im TMS 2 erklärt.

Im TMS 1 aus KPi, THF und 1-Butanol überwiegt im Vergleich zum TMS 2 und auch im Vergleich zum klassischen Zweiphasensystem mit 60 Volumenprozenten die organische Komponente, welche auf Grund der geringen Polarität einen negativen Einfluss auf das Enzym haben wird. KULSCHEWSKI *et al.* wiesen mit molekulardynamischer Simulation nach, dass in ternären Systemen mit Wasseraktivitäten a_w von nahe eins der Anteil der mit Wasser bedeckten Oberfläche der CaLB bei 25-30% liegt. Im Gegensatz dazu war die Proteinoberfläche bei Alkoholaktivitäten von nahe eins fast vollständig mit dem entsprechenden Alkohol bedeckt und hatte eine Inaktivierung des Enzyms zur Folge. [Kulschewski et al. 2013] Auf Grund der schlechten Umsätze der CaLB in den organischen TMS und der stabilisierenden Wirkung von ILs auf Enzyme sollen im Folgenden TMS mit verschiedenen ionischen Flüssigkeiten auf ihre Eignung als Medium für die kinetische Racematspaltung mit CaLB vorgestellt und validiert werden.

4.2.1.4 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -TMS

Die $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -IL ist laut standardisierten Tests, die von der OECD vorgeschlagen werden, eine der umweltfreundlichsten ionischen Flüssigkeiten. [Ranke et al. 2007; Morandeira et al. 2017b] Schon vor fast 50 Jahren konnte nachgewiesen werden, dass das Kation Cholinium von den meisten Mikroorganismen assimiliert wird. Es wurde 1998 sogar als Vitamin B4 in die Liste der menschlichen Vitamine aufgenommen, gilt jedoch aktuell nur noch als vitaminähnliche Substanz, da die Verbindung vom menschlichen Organismus synthetisiert werden kann. [Biesalski 2015] In der Historie wurde dieses Molekül aufgrund seiner Rolle als Coenzym, als Vorläufer von Strukturelementen der Zellwand und als Neurotransmitter ausführlich untersucht. [Bohnet und Ullmann 2003] Wegen seiner unbedenklichen Natur etablierte sich das Cholinium zu einem attraktiven Bestandteil für die Entwicklung neuer Salzschmelzen [Rengstl et al. 2014; Mohd Zaid et al. 2017] und wurde gepaart mit pharmazeutisch-aktiven Wirkstoff-Anionen oder Aminosäuren zur ionischen Flüssigkeit. [Mu et al. 2015; Deive 2015; Carquigny et al. 2016; To 2017] Auf dem Gebiet der homogenen Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl.: *homogeneous liquid-liquid*-

extraction; Abk.: HLLE) durch temperaturabhängiges Phasenverhalten wurde die ionische Flüssigkeit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ in einem binären Gemisch mit Wasser 2014 von ORGHENA *et al.* als sehr vielversprechend für die Extraktion von Neodym beschrieben [Onghena *et al.* 2014] sowie 2017 von CESARI *et al.* als Extraktionsmittel für phenolische Komponenten genutzt [Cesari *et al.* 2017]. Es wird erwartet, dass Cholinium eine vorherrschende Rolle in zukünftigen Forschungsarbeiten im Labor- und industriellen Maßstab einnehmen wird. [Gadilohar und Shankarling 2017; Morandeira *et al.* 2017a] Beispiele für eine biokatalytische Reaktion unter Nutzung ionischer Flüssigkeiten mit anschließender Extraktion aus dem thermomorphen Lösungsmittelsystem und Rezyklierung des Katalysators sind jedoch nach bestem Wissen noch nicht bekannt und können daher als neuartig angesehen werden.

Die in Kapitel 4.1.2 entwickelten TMS auf Basis der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -IL sollen hier als Medium für die Reaktion der CaLB dienen. Es werden wiederum die Einflüsse diskutiert, die Umsatz, Verteilung und Rezyklierung bestimmen. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse mit den Reaktionen im klassischen Ein- und Zweiphasensystem verglichen werden. Tabelle 4-7 zeigt die Zusammensetzungen der vier TMS.

Tabelle 4-7. Zusammensetzung der $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS 3 bis 6.

TMS 3	TMS 4	TMS 5	TMS 6
20% (v/v) IL	20% (v/v) IL	20% (v/v) IL	20% (v/v) IL
68% (v/v) KPi	70% (v/v) KPi	65% (v/v) KPi	72,5% (v/v) KPi
12% (v/v) 1,4-Dioxan	10% (v/v) Aceton	15% (v/v) Acetonitril	7,5% (v/v) DMSO
$T_{Tr} = 26 \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 30 \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 35 \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 32 \text{ } ^\circ\text{C}$

Auch mit jeweiliger Zugabe von 30 mM 1-Phenylethylacetat als Substrat lagen die Trübungstemperaturen unter 40 °C und die Reaktion konnte somit einphasig beim CaLB-Temperaturopimum durchgeführt werden. Um sicherzustellen, dass keine unerwünschten Effekte während der Umsetzung auftreten, wurden die pH-Werte der TMS sowohl vor als auch nach jeder Reaktion überprüft. Sie ergaben stets einen neutralen pH.

Wie in Tabelle A-47 gezeigt, erfährt die CaLB in den zwei Systemen TMS 3 und TMS 4 eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zum reinen Puffer, welche – wie bereits diskutiert – vermutlich in der Stabilisierung des Enzyms durch die ionische Flüssigkeit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ begründet liegt. Da die Mischung aus $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ und Wasser eine Trübungstemperatur von 72 °C aufweist, mussten den Systemen verschiedene Löslichkeitsvermittler hinzugefügt werden, die in ihrer Wirkung diskutiert werden können. Neben der vermittelnden Wirkung zwischen der IL und dem Wasser dienen sie dem Substrat zur Erhöhung der Löslichkeit. Die CaLB steht in den thermomorphen Lösungsmittelsystemen oberhalb der T_{Tr} im 1PS in direkten Kontakt zur IL, dem Puffer und auch dem organischen Lösungsmittel. Folglich ist die

Wahl des Lösungsmittels nicht nur anhand der Aufgabe, welches es im Reaktionssystem leisten soll, sondern auch anhand der Wirkung auf das Enzym, zu treffen. Die Lösungsmittel 1,4-Dioxan, Aceton, Acetonitril und DMSO besitzen alle einen $\log P < 2$, daher ist eine Reduktion des enzymgebundenen Wassers oder eine Wechselwirkung mit dem Protein zu erwarten.

Die volumetrische Aktivität im TMS 3 ($A_{vol}(\text{TMS } 3) = (26,58 \pm 0,17) \text{ U/ml}$) ist nur geringfügig niedriger als im TMS 4 ($A_{vol}(\text{TMS } 4) = (28,95 \pm 0,53) \text{ U/ml}$). Wie schon zuvor diskutiert, werden die Löslichkeitsvermittler 1,4-Dioxan und Aceton durch ihre unterschiedliche Polarität diese Differenz bewirken. Im Hinblick auf die durchzuführende Reaktion ist allerdings auch an dieser Stelle die Stabilität der CaLB in den Systemen von größerer Bedeutung. In der Literatur wird nicht nur über eine erhöhte Enzymaktivität, sondern auch über eine erhöhte Enzymstabilität in ionischen Flüssigkeiten im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln berichtet. [Lozano et al. 2001] Die CaLB wurde dafür über 30 Stunden bei 40 °C im Einphasensystem der TMS inkubiert und zu definierten Zeitpunkten bei 30 °C die Aktivität gegenüber der Umsetzung des *p*-Nitrophenylacetats ermittelt. In Abbildung 4-15 kann gezeigt werden, wie sich die volumetrische Aktivität des Enzyms in den TMS 3 bis TMS 6 über die Zeit verhält.

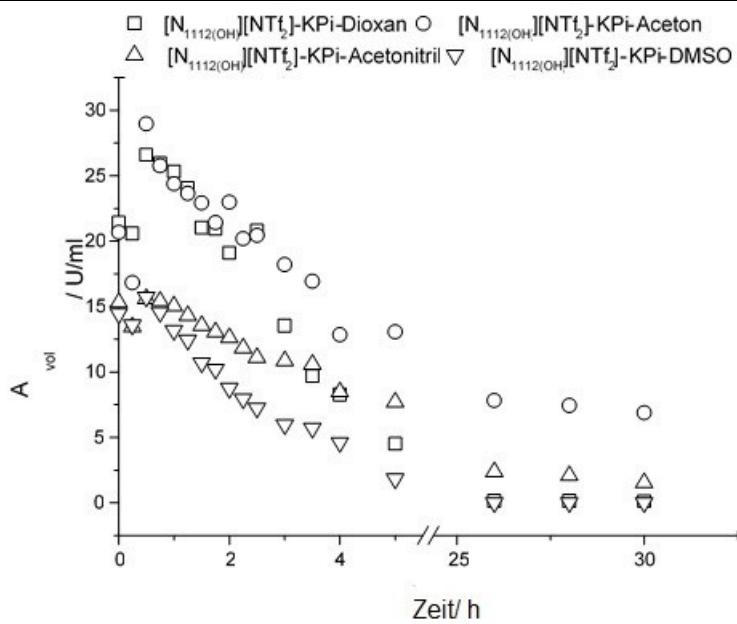


Abbildung 4-15. Stabilität der CaLB über 30 h bei 40 °C in den TMS 3 bis 6.

Das TMS 4 aus $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton bietet der CaLB in Hinblick auf die Stabilität die beste Umgebung und macht daher die Anwendung mit rezyklierbarem Katalysator sehr vielversprechend. Dahingegen verliert die CaLB in den TMS 3, 5 und 6 relativ schnell an Aktivität und fällt nach 26 Stunden in den Systemen mit 1,4-Dioxan als auch mit DMSO als Phasenvermittler sogar bis auf 0 U/ml ab. Um zu sehen, ob sich die vergleichsweise schlechten Stabilitäten des Enzyms auch in der Umsetzung des Modellsubstrates 1-Phenylethylacetat wiederspiegeln, werden im Folgenden die Umsatz-Zeit-Diagramme

in den vier TMS vorgestellt (Abbildung 4-16). Es ist anzumerken, dass bei der optischen Beurteilung der thermomorphen Systeme die Phasen des TMS 3, 4 und 6 vollständige Mischbarkeit bei 40 °C zeigten, im TMS 5 jedoch eine starke Trübung zu beobachten war. Dies deutet auf eine schlechtere Löslichkeit des Substrates und später auch des Produktes durch das Reaktionsmedium hin.

Die vier Diagramme zeigen, dass die Reaktion in TMS 3, 4 und 6 nach zwei Stunden den maximal erreichbaren Umsatz liefern. Lediglich im TMS 5 war die Umsetzung nicht vollständig. In keinem der untersuchten Reaktionssysteme wurden in der GC detektierbare Nebenprodukte festgestellt.

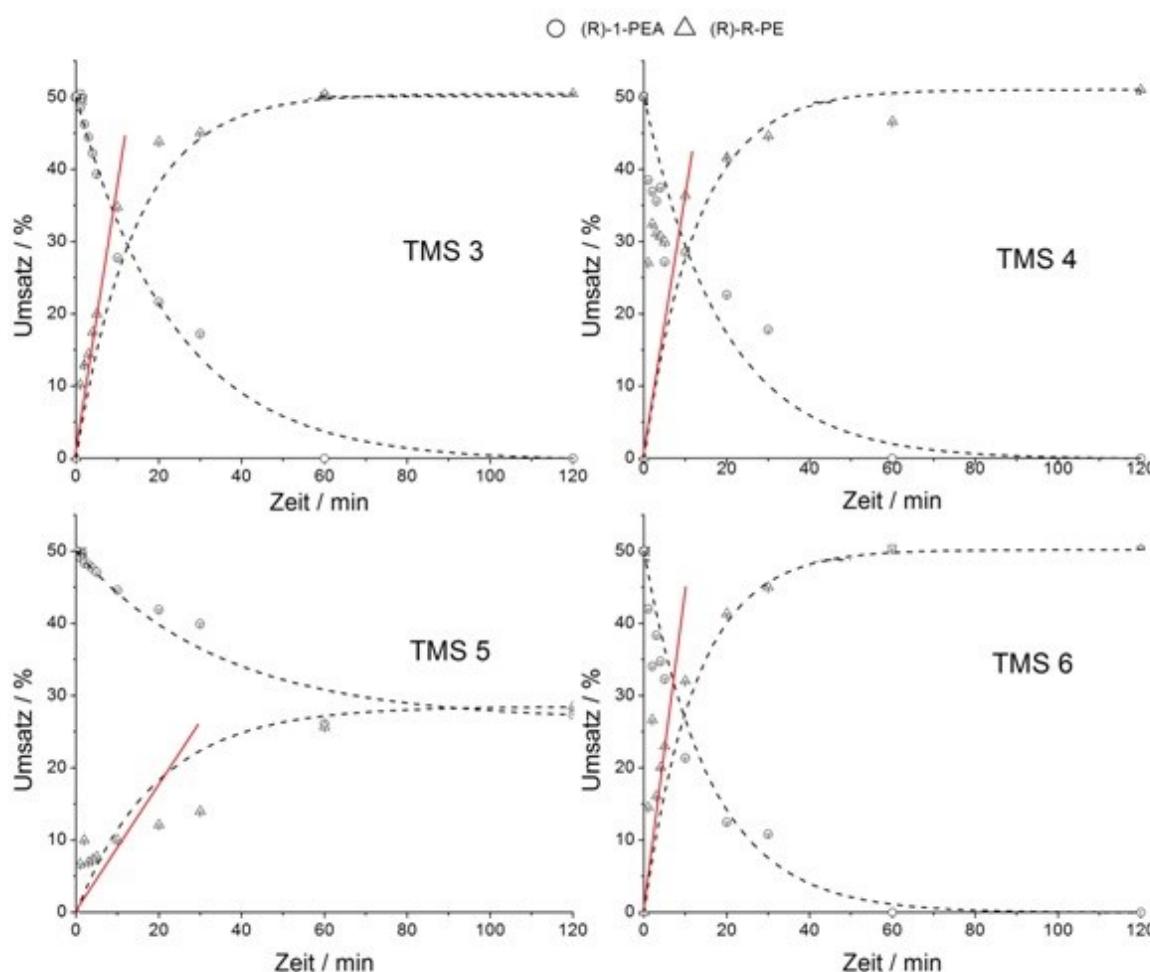


Abbildung 4-16. Umsatz-Zeit-Diagramme der kinetischen Racematspaltung von 1-PEA im TMS 3, TMS 4, TMS 5 und TMS 6 (20% (v/v) $[N_{1112(OH)}]_2[N\text{ Tf}_2]$, 50 mM KPi pH 7,0, 30 mM Substrat, Enzymaktivität 97 U/ml, $T = 40^\circ\text{C}$).

Bei Betrachtung der Raum-Zeit-Ausbeuten der Reaktionen (Tabelle 4-15), so ist erkennbar, dass das TMS 4 die effektivste Umsetzung des 1-PEA zeigt. Die TMS 3 und 6 liegen annähernd im Bereich der Raum-Zeit-Ausbeute im Einphasensystem, TMS 5 schneidet schlechter ab. Die Enantiomerenüberschüsse für das entstandene Produkt liegen in allen TMS wie im 1PS-Vergleichssystem bei über 99%. Der Enantiomerenüberschuss ees im TMS 5 liegt aufgrund des nicht vollständigen Umsatzes bei einem

geringen Wert von 31% und ist daher vergleichbar mit den *e*_{es} der vorhergegangenen organischen TMS 1 und 2. Die geringe Proteinstabilität und Stereoselektivität kann wieder mit der Verwendung des Acetonitrils, wie im TMS 2, begründet werden. Alles, was die Struktur des aktiven Zentrums auch nur geringfügig ändert, verringert die Enzymaktivität. (vgl. Abbildung 4-15). Da Acetonitri eine vergleichsweise hohe Polarität aufweist, ist es in der Lage, das enzymgebundene Wasser zu verdrängen und die Konformation des Proteins damit zu verändern. Eine Inhibierung ist die Folge. Zum Einen kann es zur Strukturänderung der Substratbindestelle allein durch die Lösungsmittel-Umgebung gekommen sein oder einzelne Moleküle des Lösungsmittel-Systems können an die Substratbindestelle binden und mit dem 1-Phenylethylacetat konkurrieren. Zum Anderen kann die Selektivitätsänderung auch durch eine Änderung in der lokalen Flexibilität der CaLB hervorgerufen worden sein. [Kulszewski et al. 2013; Sasso et al. 2015] Die Reaktionsgeschwindigkeit im TMS 5 ist am geringsten, da vermutlich das Substrat am besten solubilisiert ist. Der *K_M*-Wert steigt damit an, weil die Verfügbarkeit des Substrates für das Enzym verringert wird. Dazu muss angemerkt werden, dass das TMS 5 mit 15% den höchsten volumetrischen Anteil eines Phasenvermittlers, dem Acetonitri, hat; was einen erheblichen Einfluss gegenüber den anderen IL-Lösungsmittelsystemen mit 7,5% (v/v) DMSO bis 12% (v/v) 1,4-Dioxan haben wird. Damit reduziert sich nämlich wiederum gleichzeitig der Anteil der wässrigen Phase. Die Änderung des Reaktionsmediums in Hinblick auf die Erniedrigung des Puffer-Anteils und Erhöhung des Anteils an semipolaren Lösungsmitteln führt ergo zur Verschlechterung des Reaktionsergebnisses. Zudem war zu beobachten, dass in denjenigen TMS, in denen das organische Lösungsmittel eine hohe Produktlöslichkeit zeigt, auch die Ausbeuten höher als im TMS 5 mit geringer Löslichkeit sind.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Erniedrigung der Reaktionstemperatur oftmals zur Erhöhung der Enantioselektivität führt (wobei aber auch gegenteilige Beispiele existieren) [Bornscheuer und Kazlauskas 1999]. Daher sollte am Beispiel des TMS 4 untersucht werden, wie sich die Enantiomerenüberschüsse mit der Erniedrigung und auch Erhöhung der Temperatur verändern. Abbildung 4-17 zeigt die Bildung des gewünschten Produktes (*R*)-Phenylethanol der kinetischen Racematspaltung bei 30 °C, 40 °C und 50 °C. Laut RGT-Regel von VAN'T HOFF führt eine Temperaturerhöhung von 10 °C zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit. Dies ist im Falle der Temperaturerhöhung von 30 °C zu 40 °C auch in Abbildung 4-17 zu beobachten, jedoch zeigt die Grafik bei 50 °C einen deutlichen Abfall des Umsatzes. Dies bedeutet, dass es neben der RGT-Regel noch mindestens einen weiteren Faktor gibt, der die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität beeinflusst und somit der Regel entgegenwirkt. Dieser Faktor könnte zum Einen eine thermische Deaktivierung durch Proteinentfaltung oder Denaturierung der CaLB mit steigender Temperatur sein. Zum Anderen steigt mit der Temperatur auch die Löslichkeit der

Komponenten ineinander und das Enzym ist hierdurch in noch höherem Maße dem organischen Lösungsmittel Acetonitril ausgesetzt.

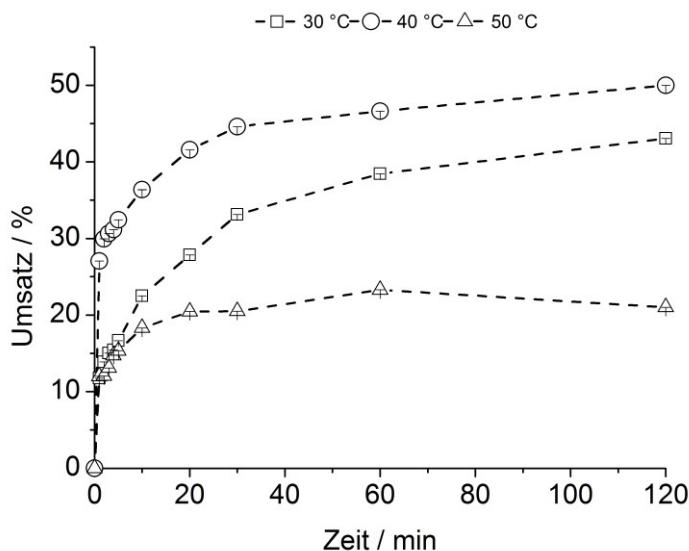


Abbildung 4-17. Umsatz-Zeit-Diagramm der CaLB-Reaktion im $[N_{112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS bei 30°C, 40 °C und 50 °C im Vergleich.

Die Verschlechterung in der Umsetzung des 1-PEA könnte daher dem Zusammenspiel aus veränderter Enzymkonformation bei höheren Temperaturen und dem negativen Einfluss des Acetonitrils auf diese geschuldet sein. Im Detail betrachtet zeigt Abbildung 4-17 lediglich bei 40 °C nach zwei Stunden einen vollen Umsatz von ~50 % des 1-PEA. Die Reaktion bei 30 °C im TMS 4 erreicht nach zwei Stunden einen Umsatz von ~43% und bei 50 °C nur ~23%. Die in Tabelle 4-8 aufgeführten Raum-Zeit-Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der veränderten Reaktionsbedingungen spiegeln dasselbe Bild wieder.

Tabelle 4-8. Raum-Zeit-Ausbeute und Stereoselektivität der CalB im TMS 4 bei variierender Temperatur.

System	Temperatur / °C	Raum-Zeit-Ausbeute / mmol/l/h	Enantiomerenüberschuss / %
TMS 4	30	66 ± 8	86
	40	145 ± 18	>99
	50	60 ± 11	31

Es konnte somit bisher gezeigt werden, dass sowohl das Enzym in seiner Umgebung als auch die Temperatur die Kinetik und Selektivität der Reaktion beeinflussen. Als nächstes war die Frage wie sich der Umsatz mit Steigerung der Enzymkonzentration verhält. In der Charakterisierung der vier TMS in Kapitel 4.1.2.1 konnte gezeigt werden, dass bis zu 50 mg BSA in einem 1 ml System einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Phasenverhalten der thermomorphen Lösungsmittelsysteme hat. Daher wurden Enzymvolumina von 2,5 µl bis zu 50 µl in einem 1,5 ml System untersucht, die das Phasenverhalten der

einzelnen TMS nicht beeinflussten. Abbildung 4-18 und Tabelle 4-9 zeigen den Verlauf des Umsatzes an 30 mM 1-Phenylethylacetat und die Raum-Zeit-Ausbeuten mit den variierenden Enzymkonzentrationen anhand des Beispiels TMS 3.

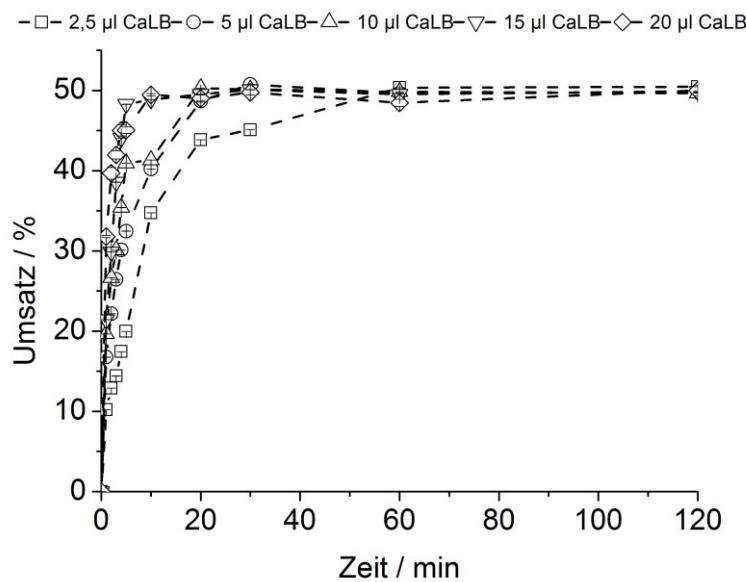


Abbildung 4-18. Umsatz-Zeit-Diagramm der Umsetzung von 1-PEA mit veränderlichen CaLB-Konzentrationen über zwei Stunden bei 40 °C im TMS 3. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Die Reaktion konnte wie erwartet mit Zunahme der Enzymkonzentration beschleunigt werden. Während der volle Umsatz von 50% in der kinetischen Racematspaltung des 1-Phenylethylacetats bei der geringsten Enzymkonzentration von 2,5 µl (97 U/ml) pro 1,5 ml Reaktionssystem erst nach 60 Minuten erreicht werden konnte, so könnte bei Verdopplung der Enzymmenge auf 5 µl die Reaktionszeit auf die Hälfte verkürzt werden. Wiederum bei Verdopplung der Enzymmenge auf 10 µl und auch im System mit 15 µl CaLB wird ein voller Umsatz schon nach 20 Minuten erreicht. Im System mit 20 µl CaLB ist die Reaktion sogar schon nach zehn Minuten vollständig. Diesem Trend folgend steigen die Raum-Zeit-Ausbeuten logarithmisch zur Enzymmenge.

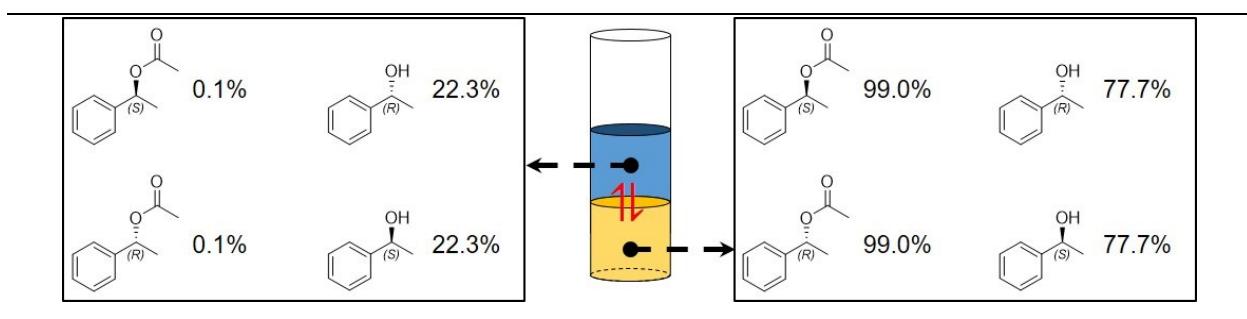
Tabelle 4-9. Raum-Zeit-Ausbeute der CaLB in der kinetischen Racematspaltung von 1-PEA mit veränderlicher Enzymkonzentration im TMS 3.

Enzymmenge / µl je 1,5 ml TMS	Enzymaktivität / U/ml	Raum-Zeit-Ausbeute / mmol/l/h
2,5	97	124 ± 4
5	194	389 ± 32
10	388	491 ± 35
15	582	579 ± 19
20	776	593 ± 50

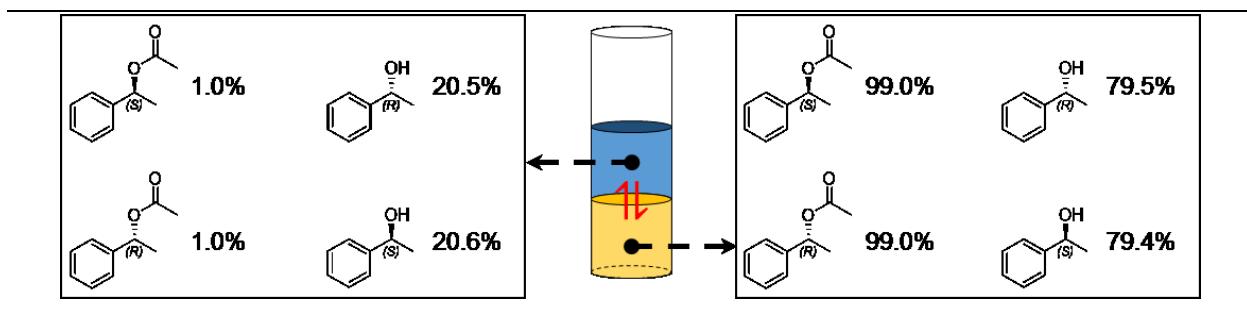
Der Vergleich der in Tabelle 4-9 aufgeführten Raum-Zeit-Ausbeuten lässt schlussfolgern, dass die Enzymaktivität ungeachtet des umgebenden Mediums, des eingesetzten Substrates und der Temperatur ähnliche Ergebnisse liefert und daher die in der Einführung des Kapitels genannten Vorteile der CaLB wiederspiegeln. Dies spricht noch dazu für die Attraktivität des thermomorphen Lösungsmittelsystems, da zusammenfassend bisher festgestellt werden konnte, dass die Aktivität und Stabilität der CaLB vergleichbare Werte wie im klassischen Einphasensystem und ebenfalls ein enantiomerenreines Produkt liefern.

Da ionische Flüssigkeiten teurer sind als organische Lösemittel (im Schnitt 800-mal teurer laut Fluka-Katalog), wird eine Chance für ihre industrielle Nutzung ihre effiziente Rückgewinnung, Produktisolierung und Wiederverwendung sein. Ebenso sind diese Fragen der Schlüssel zum "grünen" Lösungsmittel. Um dem weiteren Verlauf des eingangs vorgestellten Prinzips der thermomorphen Lösungsmittelsysteme (Schema 4-2) zu folgen, schließt sich an den Schritt der Reaktion daher die Aufarbeitung an. Dieses schließt neben dem Wissen über die Verteilung des Substrates und des Produktes in den separierten Phasen mit ein, dass über die gaschromatographische Bestimmung der Ausbeute der Reaktion auch eine real isolierte Ausbeute ermittelt wird.

Die Ergebnisse der Verteilung der Reaktionsteilnehmer sind in Schema 4-10 bis 4-13 dargestellt.

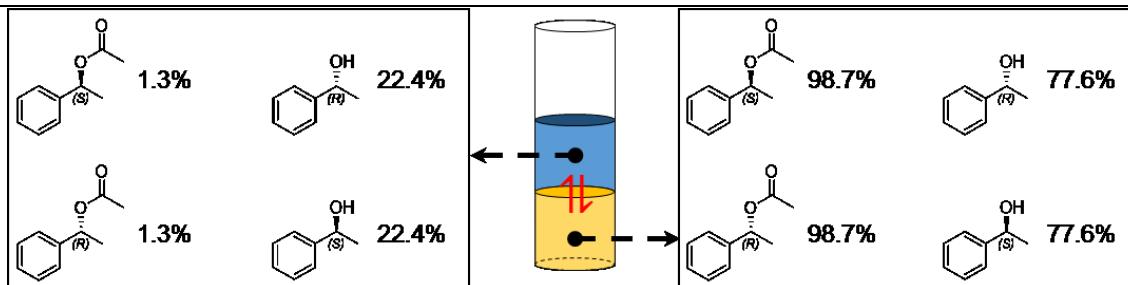


Schema 4-10. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den zwei Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS (TMS 3) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

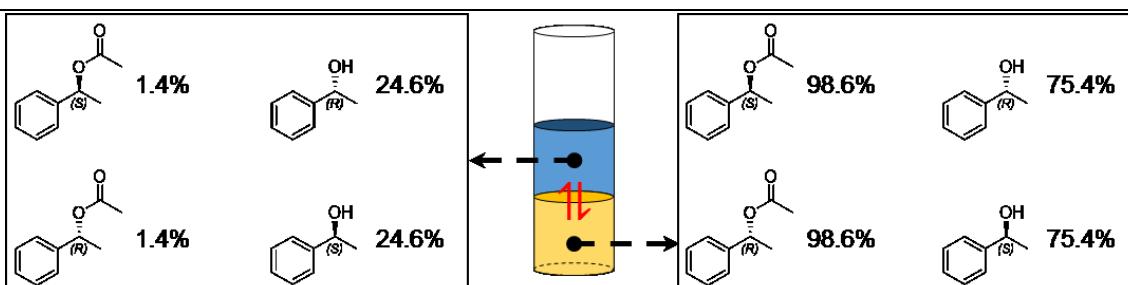


Schema 4-11. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den 2 Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS (TMS 4) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

Für eine effektive Aufarbeitung sollten die Randbedingungen, die die Potentialdifferenz der Phasen bedingen, so gewählt werden, dass eine hohe Enzymkonzentration in der wässrigen Phase und eine hohe Substrat- und Produktkonzentration in der IL-Phase vorliegt. Dieses Verhalten lässt sich effektiv durch die Wahl der Temperatur und des Phasenvermittlers steuern, wie die Schemata zeigen. Wie anzunehmen war, verändert ein Wechsel von einem organischen Phasenvermittler zum anderen in den thermomorphen Lösungsmitteln nicht nur die Aktivität der Lipase, sondern es kommt in den TMS 3 bis 6 auch zu einer nuancierten Verteilung des racemischen Substrates und der Produkte.



Schema 4-12. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den 2 Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Acetonitril-TMS (TMS 5) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)



Schema 4-13. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den 2 Phasen des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-DMSO-TMS (TMS 6) bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

Systeme wie das TMS 5 und 6 weisen eine vergleichsweise geringere Affinität der IL-Phase zum Substrat und Produkt auf, weshalb diese Systeme nicht für eine effektive Aufarbeitung in Betracht kommen. Das TMS 4 aus $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton zeigt in Hinblick auf das Extraktionsvermögen der unteren IL-Phase die optimale Verteilung der Edukte und Produkte. Unter der Annahme, dass sich der Großteil der CaLB in der oberen wässrigen Phasen befindet, kann eine effektive Produkt-Katalysator-Trennung erfolgen. Daher wurde die Aufarbeitung nachfolgend an diesem Beispiel näher untersucht. Die Destillation des Produktes aus der ionischen Flüssigkeit schien möglich, da diese Lösungsmittel eine extrem niedrige Flüchtigkeit besitzen und die Siedepunkte der zu trennenden Komponenten 1-Phenylethylacetat ($T_{Sdp} = 95$ °C) und (R)-Phenylethanol ($T_{Sdp} = 204$ °C) zudem weit genug auseinander liegen. Nach Trennung der wässrigen von der IL-Phase durch Pipettieren wurde eine Vakuumdestillation der IL-Phase des $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS mit ~99% des Phenylethylacetats und ~80% des

Phenylethanols durchgeführt. Nach beendeter Prozedur wurde sowohl das Destillat als auch der Sumpf chromatographisch und NMR-spektroskopisch untersucht und es konnte in keiner der beiden Proben ein isoliertes Produkt nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für die Vielzahl an erhaltenen Signalen ist die Zersetzung der ionischen Flüssigkeit während der Destillation. Dafür wurden bereits mehrere mögliche Mechanismen nachgewiesen [Kreher et al. 2004; Wasserscheid und Welton 2008a], die u.a. beinhalten, dass die Dequaternierung ionischer Flüssigkeiten unter harschen Bedingungen nicht sehr selektiv stattfindet und in der Folge Produktgemische erhalten werden. Dieses sogenannte „Scrambling“ verhindert zudem die Rückbildung der Ausgangs-IL. [Earle et al. 2006]

In einem zweiten Ansatz wurde die Isolierung des Produktes (*R*)-Phenylethanol durch klassische Säulenchromatographie über Kieselgel vorgenommen. Die detaillierte Arbeitsweise wird in Kapitel A.2.2.9 ausführlich erklärt und soll daher hier nicht weiter vertieft werden. Es konnten 88,6% des bei der Reaktion entstandenen (*R*)-Alkohols isoliert werden. Dies stellt damit einen effektiven und erfolgreichen Reaktions- und Aufarbeitungsprozess dar.

Als letzter Prozess für die Validierung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme als geeignetes Medium für die Biokatalyse sollte die Wiederverwendbarkeit des Enzyms über mehrere aufeinanderfolgende Reaktionen gezeigt werden. Da die höchste Stabilität der CaLB in den TMS 3 und TMS 4 nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 4-15), sollten diese zwei Systeme verwendet werden. Es wurden die Systeme zu diesem Zweck auf einen 5 ml-Maßstab erhöht, um mögliche Probleme schneller erkennen zu können und die Handhabung bei der Rezyklierung der enzymreichen wässrigen Phase zu erleichtern. Zu Beginn wurden 150 U/ml CaLB hinzugefügt. Nach 30 Minuten Reaktionszeit konnten die Phasen jedes Experiments nach fünf-minütigem Zentrifugieren bei 5 °C unter Pipettieren getrennt werden. Eine frische IL-Phase und die Katalysatorphase wurden vereinigt und wiederum auf 40 °C für den nächsten Lauf erwärmt. Es wurde jeder einzelnen Rezyklierung 30 mM 1-Phenylethylacetat in der neuen 20% (v/v) IL-Phase zugegeben, um die Reaktion einzuleiten. Die detaillierte Arbeitsweise ist auch hierfür in Kapitel A.2.2.8 beschrieben.

Nach den ersten Versuchen wurde klar, dass eine Abreicherung der wässrigen Phase zu beobachten ist (siehe Abbildung A-33) und sich ab dem dritten Rezyklierungslauf kein monophasisches Verhalten der beiden TMS mehr einstellt. Da die Reduzierung der Substratmenge pro Rezyklierungslauf keinen Erfolg zeigte, wurde der IL-Phase zusätzlich mit jedem Rezyklierungslauf ein geringes Volumen an dem entsprechenden Löslichkeitsvermittler des Systems zugesetzt.

Abbildung 4-19 (A) veranschaulicht die Entwicklung des Umsatzes von sechs Einzelreaktionen mit rezyklierter CaLB. Lauf 0 zeigt den vollen Umsatz von 50% des (*R*)-Phenylethylacetats zum entsprechenden (*R*)-Alkohol. Die Reaktionsläufe 1 und 2 zeigen eine geringe Abnahme des Umsatzes auf

41%, jedoch kann auch bemerkt werden, dass das Enzym über diese beiden Rezyklierungen identisch aktiv bleibt. Ab dem dritten Rezyklierungslauf ist eine moderate Abnahme des Umsatzes zu beobachten, wobei immer noch mehr als die Hälfte der Ursprungsausbeute erreicht werden kann. Mögliche Ursachen sind: zum Einen verliert das Enzym von Natur aus über die Zeit an Aktivität und dies könnte sich auch hier in der Abnahme des Umsatzes wiederholen. Zum Anderen geht mit jedem Rezyklierungslauf ein Teil der wässrigen Phase und damit auch der CaLB verloren, da nicht 100% der oberen Phase sauber abpipettiert werden können und der geringe gelöste Teil in der alten IL-Phase verbleibt. In der Folge steht dem Reaktionssystem weniger Katalysator zur Verfügung und der Umsatz wird reduziert. Zudem wird mit jeder Übertragung der wässrigen Enzymphase gelöstes 1,4-Dioxan auf eine neue IL-Phase verschleppt, die zwar der Mischbarkeit der Phasen bei 40 °C zuträglich ist, jedoch gleichzeitig das Enzym negativ verändert. Ein weiterer Grund könnte mit der schon erwähnten Anreicherung der IL-Phase gegenüber der KPi-Phase einhergehen, die gleichzeitig auch eine Konzentrationssteigerung des Substrates gemessen auf das Gesamtvolumen des Systems bedeutet. Das kann zu einer Substratüberschussinhibition der CaLB führen. Es könnte durch die Überkonzentration zu einer Bindung eines zweiten Substratmoleküls an das Enzym gekommen sein und der so entstandene ESS-Komplex ist nicht in der Lage in Produkt und Enzym zu zerfallen. Auch zu bedenken ist die mögliche Deaktivierung der CaLB durch entstehendes und zunehmendes Acetat in der wässrigen rezyklierten Phase. Diese könnte im aktiven Zentrum an die Basen (Ser, His, Asp) binden und somit einen weiteren Umsatz des Substrates durch Blockierung verhindern. Zu guter Letzt stellt auch das über die Zyklen entstandene Produkt (R)-Phenylethanol einen Überschuss und damit Störfaktor dar. Wenn nicht in erster Linie für das Enzym, so aber für das Phasenverhalten des thermomorphen Lösungsmittelsystems. Ohne die Anreicherung des 1,4-Dioxans durch die zusätzliche Gabe zu jedem Rezyklierungslauf, würde das System sich anderenfalls durch die Anreicherung des Produktes bei 40 °C entmischen und die Reaktion könnte nicht mehr monophasig durchgeführt werden.

Als nächstes sollte die Rezyklierung der CaLB im TMS 4 aus $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton untersucht werden. Da das Enzym in diesem System sowohl höhere Aktivitäten und Stabilitäten als auch eine erhöhte Raum-Zeit-Ausbeute gegenüber dem TMS 3 zeigt, war hier auch eine höhere Produktivität der CaLB über die Rezyklierungsläufe zu erwarten. Wie schon erwähnt, zeigte sich auch in diesem System nach dem dritten Rezyklierungslauf kein Mischen der zwei Phasen bei 40 °C mehr aufgrund der stetigen Entziehung eines Teils des gelösten Acetons in der IL-Phase. So musste ebenfalls zusätzlicher Löslichkeitsvermittler jeder neuen IL-Phase mit jedem Lauf hinzugefügt werden. In Abbildung 4-19 (B) wurden die zwei untersuchten Rezyklierungen der CaLB mit unterschiedlicher Zugabe an Aceton zu jedem Lauf dargestellt.

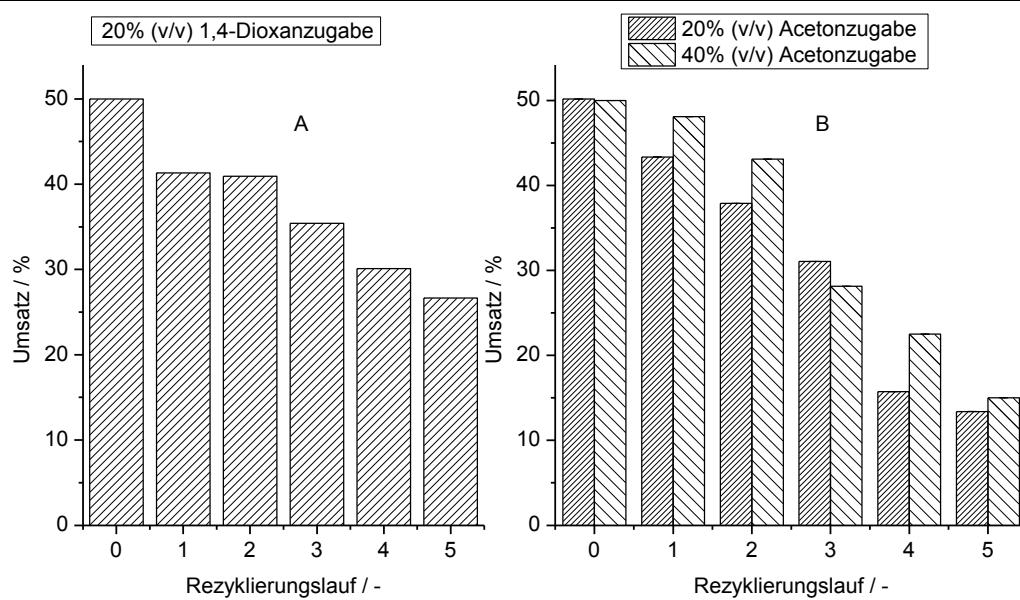


Abbildung 4-19. Rezyklierung der CaLB im (A) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Dioxan-TMS mit 20% (v/v) 1,4-Dioxan-Zugabe über 5 Läufe und (B) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Aceton-TMS mit 20% (v/v) und 40% (v/v) Aceton-Zugabe über 5 Läufe. (jeweils Mittelwerte aus Sechsachbestimmung)

Auch hier kann generell wieder eine Abreicherung der wässrigen enzymtragenden Phase beobachtet werden, die die bereits diskutierten Nachteile mit sich bringt. Jedoch scheint anders als im System mit 1,4-Dioxan die entstandene Anreicherung des Acetons durch Querlöslichkeit in beiden Phasen des TMS und durch die zusätzliche Zugabe zu jedem Lauf keinen ausgeprägten negativen Einfluss auf die CaLB haben. Es ist zu erkennen, dass sogar mit 40% (v/v)-Zugabe des Löslichkeitsvermittlers die Umsätze an 1-Phenylethylacetat im Mittel immer größer sind als diejenigen im System mit weniger Aceton. Auch wenn dieses Phänomen bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde, lässt sich vermuten, dass das Aceton im Zusammenspiel mit der ionischen Umgebung einen stabilisierenden Effekt auf das Enzym ausübt.

Im Vergleich zum TMS 3 zeigt die CaLB bis zum zweiten Rezyklierungslauf im TMS 4 mit 40% (v/v) Aceton einen höheren Umsatz (vgl. Abbildung 4-19 (A) und (B)). Ab dem dritten Lauf ist ein starker Abfall der Umsetzung des 1-PEA in den gezeigten Aceton-Systemen zu verzeichnen, die wiederum auf die zuvor genannten Faktoren zurückgeführt werden können. Erstens verliert auch in diesen Rezyklierungsuntersuchungen die CaLB an Aktivität; zweitens geht auch hier der Biokatalysator durch die unvollständige Übertragung der wässrigen Phase und dem Verbleib einer geringen Menge in der abgetrennten IL-Phase mit jedem Lauf mehr verloren und es kommt zu einer ungünstigen Verschiebung von Enzym-zu-Substrat-Verhältnis, dass durch die Anreicherung des nicht umgesetzten Substrates noch verschlechtert wird. Eine Substratüberschussinhibition kann also auch in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden und ist gleichwohl mit der Anreicherung der entstehenden Essigsäure (abgepuffert) vermutlich eines der Hauptursachen für die Abnahmes der Enzymproduktivität. In

Folgeuntersuchungen konnte durch weitere Erhöhung der Substratkonzentration herausgefunden werden, dass dieser Überschuss im Reaktionssystem für eine Deaktivierung der CaLB verantwortlich ist, da schon ab dem dritten Rezyklierungslauf kein Umsatz mehr zu beobachten war. Mit steigendem Substratvolumen erhöht sich auch der inhibierende Effekt von entstehendem Phenylalkohol auf die CaLB. Bereits GARCÍA-ALLES UND GOTOR berichteten 1998 über die kompetitive Inhibierung der Lipase durch die Blockierung der Bindungsstelle für den Acylteil des Substrates durch den Alkohol [García-Alles und Gotor 1998a]. Darüber hinaus konnten ROMERO *et al.* sowie die Arbeitsgruppe um PATRICK ADLERCREUTZ eine Inhibierung durch kurzkettige Säuren, wie der Essigsäure, nachweisen, welche zu einem Teil auf das Substrat selbst zurückgeführt wurde und zum anderen durch den Einfluss hoher Säurekonzentrationen auf den pH-Wert [Romero *et al.* 2007; Nordblad und Adlercreutz 2008]. Weiterhin kommt es auch im TMS 4 zur Anreicherung des Produktes über die Läufe durch das Mitführen von immerhin nachgewiesenen ~21% Phenylethanol in der wässrigen Phase (siehe Schema 4-11).

Eine Möglichkeit zur Vermeidung dieser Effekte könnte die sukzessive Abnahme in der Zugabe von Substrat sowie Phasenvermittler über die Läufe sein, damit es nicht zur Überkonzentration dieser zwei Komponenten kommt. Zum Anderen sollte man das Produkt nach jeder Reaktion bereits abtrennen, um ebenfalls eine Anreicherung zu vermeiden. Das Enzym würde damit weniger gehemmt und könnte vermutlich über mehr als die gezeigten fünf Rezyklierungsläufe seine Aktivität erhalten. Ein weiterer, jedoch zugegebener unwirtschaftlicher Ansatz, wäre die Erhöhung der Enzymmenge. Um das Absenken des pH-Wertes zu Verhindern müsste das Reaktionssystem in höherem Maße gepuffert oder nachtitriert werden, was jedoch wieder direkten Einfluss auf das Phasenverhalten hin zur Entmischung hat und die maximal mögliche Konzentration der übrigen Reaktionskomponenten bedingt.

4.2.1.5 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im [EMIm][NTf₂]-TMS

Aufgrund der positiven physikochemischen Eigenschaften [Eckstein *et al.* 2002a; Eckstein *et al.* 2002b; Persson und Bornscheuer 2003] sollte als nächstes die Klasse der *N,N'*-Dialkylimidazoliumkation-ILs untersucht werden (vgl. Kapitel 3.1.2). Bei der Auswahl der Anionen hat sich das Bis(trifluormethylsulfonyl)imid [NTf₂] herauskristallisiert, da es besonders thermisch stabile Salze bildet und aufgrund seiner geringen Basizität Enzyme stabilisiert. [Anderson *et al.* 2002; Habulin und Knez 2009] In vielen Publikationen wurde es oft als eines der am besten geeigneten Anionen für die Biokatalyse beschrieben. [Park und Kazlauskas 2003; Nara *et al.* 2006; Lozano *et al.* 2010; los Ríos *et al.* 2011; Lozano *et al.* 2013] POHAR *et al.* wiesen der CaLB eine erhöhte Aktivität und Stabilität in der IL [EMIm][NTf₂] nach und begründeten dieses Ergebnis mit einer Konformationsänderung, die zu einer kompakteren, flexibleren und aktiveren Enzymkonfiguration führte. [Pohar *et al.* 2009] Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die in Kapitel 4.1.2 entwickelten und charakterisierten TMS auf Basis von 1-Ethyl-3-

methylimidazolium-IL ein vielversprechendes Medium für die biokatalytische Racematspaltung des 1-Phenylethylacetats darstellen. Die Zusammensetzung der untersuchten TMS 7 und TMS 8 ist in Tabelle 4-10 zusammengefasst.

Tabelle 4-10. Zusammensetzung der TMS 7 und TMS 8.

TMS 7	TMS 8
40% (v/v) [EMIm][NTf ₂]	10% (v/v) [EMIm][NTf ₂]
30% (v/v) KPi (50 mM)	50% (v/v) KPi (50 mM)
30% (v/v) DMSO	40% (v/v) Acetonitril
$T_{Tr} = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{Tr} = 36\text{ }^{\circ}\text{C}$

Wegen des hohen Anteils an ionischer Flüssigkeit und Kaliumphosphat-Puffer in TMS 7 wurde anfangs angenommen, dass dieses System aus bekannten Gründen die CaLB stabilisieren würde. Jedoch spricht die ermittelte Aktivität von $(11,79 \pm 0,07)$ U/ml gegenüber *p*-Nitrophenylacetat nicht für solch einen Effekt. Noch geringere Aktivität ($(10,53 \pm 0,08)$ U/ml) weist die Lipase im TMS 8 auf. Da niedrige Aktivität und niedrige Stabilität nicht unmittelbar miteinander einhergehen, wurde die Aktivität der CaLB in den zwei Medien bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 24 Stunden verfolgt (Abbildung 4-20)

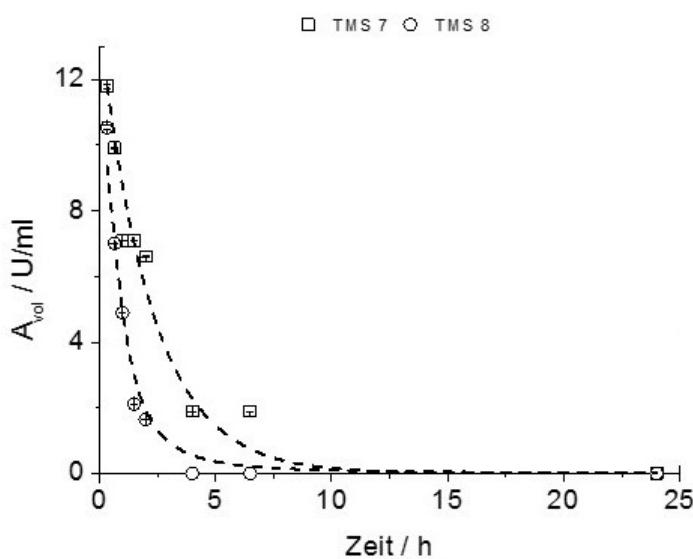


Abbildung 4-20. Stabilität der CaLB im TMS 7 und TMS 8 bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 24 Stunden.

Die Abbildung zeigt die rasche Abnahme der Aktivität des Enzyms mit der Zeit. In keinem der beiden Systeme kann der sonst auftretende Effekt der CaLB einer anfänglichen Aktivitätssteigerung beobachtet werden. Im TMS 7 mit DMSO verliert die CaLB nach ca. 6,5 Stunden ihre Fähigkeit das *p*-Nitrophenylacetat umzusetzen; im TMS 8 sogar schon nach knapp über zwei Stunden. Anzunehmen für diese Deaktivierung ist der Zusatz der Löslichkeitvermittler DMSO und Acetonitril. Lösungsmittel wie

DMSO und Acetonitril, die stark mit Proteinen interagieren und sie sogar lösen, neigen nach VAN RANTWIJK UND SHELDON dazu, einen irreversiblen Aktivitätsverlust hervorzurufen. [van Rantwijk und Sheldon 2007] Acetonitril ist vergleichsweise polar und übt mit einem Anteil von 40% (v/v) im TMS 8 einen stärker negativen Effekt auf die CaLB aus als DMSO. Im TMS 8 kann zudem mit nur 10% (v/v) die IL mit ihren stabilisierenden Eigenschaften nicht ausreichend dieser Schwächung entgegenwirken (Abbildung 4-21).

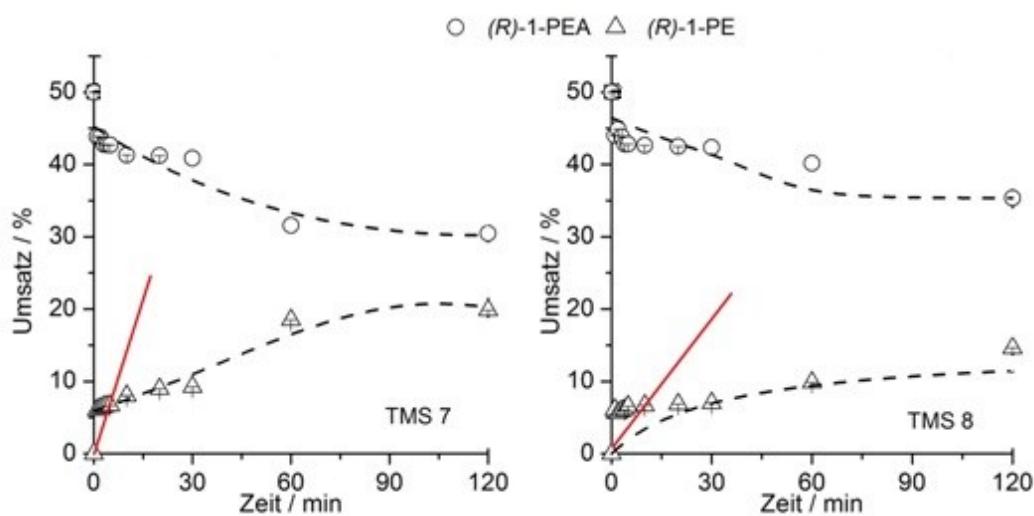


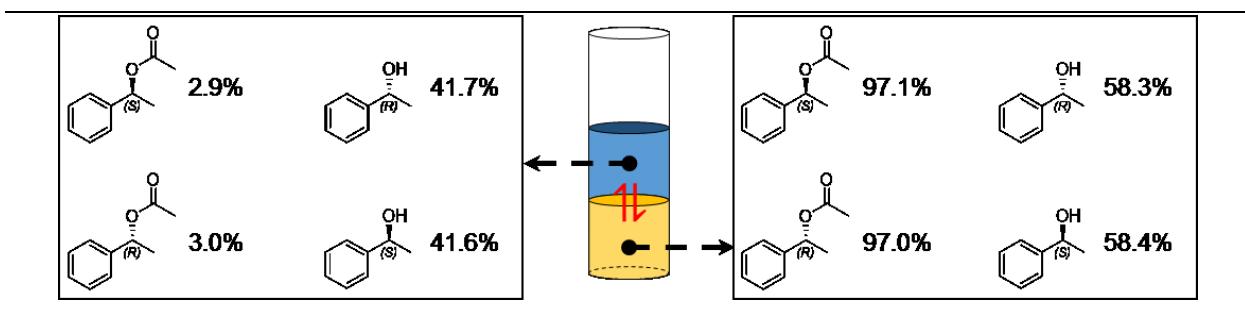
Abbildung 4-21. Umsatz-Zeit-Diagramme der CaLB-Reaktion im $[EMIm][NTf_2]$ -KPi-DMSO-TMS (TMS 7, links) und $[EMIm][NTf_2]$ -KPi-Acetonitril-TMS (TMS 8, rechts) mit 30 mM 1-PEA, 97 U/ml CaLB bei 40 °C.

Werden die Umsatz-Zeit-Diagramme der TMS 7 und TMS 8 mit deren Stabilitätskurven verglichen, so lässt sich erkennen, dass die CaLB im TMS mit ihrer Restaktivität von $(6,60 \pm 0,01)$ U/ml noch einen Umsatz von immerhin knapp 20% generieren konnte. Da die CaLB im theromorphen Lösungsmittelsystem TMS 8 nach zwei Stunden nur noch eine Restaktivität von $(1,64 \pm 0,05)$ U/ml aufweist, wurde das 1-Phenylethylacetat auch nur zu rund 15% umgesetzt. Die geringen Raum-Zeit-Ausbeuten sind in Tabelle 4-15 dargestellt. Von vergleichbar schlechten Ergebnissen berichteten 2009 bereits HABULIN UND KNEZ, die die kinetische Racematspaltung des 1-Phenylethanol mittels CaLB in reiner $[EMIm][NTf_2]$ untersuchten. Sie begründeten den Misserfolg bzgl. des Umsatzes mit einer Konformationsänderung der CaLB in Gegenwart der IL-Matrix. [Habulin und Knez 2009] Differenzierter betrachtet ist die geringe Proteinstabilität vermutlich mit den globalen Änderungen des Enzyms im thermomorphen Medium verbunden und kann laut KULSCHEWSKI *et al.* vermutlich auf Veränderungen in der Substratbindetasche zurückgeführt werden. [Kulschewski et al. 2013; Sasso et al. 2015]

Ebenso kann die polare Natur der Löslichkeitsvermittler und auch der ionischen Flüssigkeit die Ionisation von Säuren erhöhen, wodurch ihre Acidität gesteigert wird. Die möglicherweise enthaltene Säure HNTf₂ aus $[EMIm][NTf_2]$ kann somit die CaLB in den Systemen deaktivieren. [Thomazeau et al. 2003] Wenn in diesem Fall die Pufferkapazität von 50 mM in den beiden TMS ohnehin schon nicht ausreichten, würde der

pH-Wert durch die Entstehung der Essigsäure noch zusätzlich erniedrigt, was ebenfalls eine Deaktivierung der CaLB zur Folge hat. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Dialkylimidazolium-Kationen dazu neigen zu C2-Molekülen zu deprotonieren und mit den Puffersalzen Ylide zu bilden. Diese Ylide sind starke Nucleophile und können eine Deaktivierung der CaLB bewirken. [Singh et al. 2004] Jedoch konnten weder erniedrigte pH-Werte noch saure Nebenreaktionen im Reaktionsverlauf in den Chromatogrammen detektiert werden. Der Vergleich der Raum-Zeit-Ausbeuten der TMS mit klassischen Reaktionssystemen ergibt ein Bild geminderter Produktivität.

Trotz der geringen Umsätze sollte das TMS 7 hinsichtlich der Rezyklierbarkeit des Biokatalysators im Reaktionssystem untersucht werden – insbesondere als Vergleichsmöglichkeit zu den schon diskutierten Systemen. Dazu wurde zuvor ebenfalls die Verteilung des 1-Phenylethylacetats und der 1-Phenylethanols studiert und ist in Schema 4-14 dargestellt.



Schema 4-14. Verteilung von 1-Phenylethylacetat (1-PEA) und 1-Phenylethanol (1-PE) in den Phasen des TMS 7. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

Das 1-Phenylethylacetat verteilt sich ähnlich wie in TMS 3 bis 6, jedoch ist ein starker Unterschied in der Verteilung des Alkohols zu verzeichnen. Da sich über 41% des Phenylethanols nach Abkühlung des Systems in der oberen wässrigen Phase lösen, ist die von GARCÍA-ALLES UND GOTOR beobachtete kompetitive Inhibition und damit ein stark verminderter Umsatz ab der ersten Rezyklierung zu erwarten [García-Alles und Gotor 1998a]. Um über die untersuchten fünf Rezyklierungsläufe das monophasige Verhalten zu garantieren, wurde wie zuvor jeder neuen IL-Phase 20% (v/v) DMSO als Phasenvermittler zugesetzt.

Im TMS 7 lässt sich die CaLB unter den gewählten Bedingungen nur über drei Läufe mit maximal 10% Umsatz rezyklieren. Neben dem schon angesprochenen hohen Anteil an Phenylethanol wird das Enzym mit großer Wahrscheinlichkeit zusätzlich durch die steigende Konzentration an DMSO deaktiviert. Obendrein zeigte die CaLB im [EMIm][NTf₂]-KPi-DMSO von vornherein keine hohe Aktivität sowie Stabilität, so dass das Ergebnis den Erwartungen entspricht. Eine Verbesserung in der Aktivität der CaLB könnte geschaffen werden, indem man das Enzym bereits im TMS gefriertrocknet, damit sich die CaLB schon in bestimmter Konformation vor Gebrauch stabilisieren kann. Es konnte nämlich bereits festgestellt

werden, dass die Behandlung eines Enzyms vor der Anwendung entscheidenden Einfluss auf die Aktivität und Stabilität hat. [Colaço et al. 1992; Dang et al. 2007; Gao et al. 2015b]

Um den großen Negativ-Faktor – die zugesetzten organischen Phasenvermittler – zu vermeiden, wurden im weiteren Verlauf thermomorphe Lösungsmittel untersucht, die ausschließlich auf ionischen Flüssigkeiten und Salzlösungen basieren. Obwohl polare organische Lösungsmittel Enzyme deaktivieren [Chin et al. 1994; Park und Kazlauskas 2001], wird das bei polaren ionischen Flüssigkeiten nicht beobachtet.

4.2.1.6 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im AmmoengTM110-TMS

DREYER et al. zeigten bereits 2009 die aktivitäts- und stabilitiessteigernde Wirkung von AmmoengTM110 im wässrigen Zweiphasensystem auf zwei verschiedene Alkoholdehydrogenasen. Zusätzlich weist die IL eine löslichkeitsvermittelnde Wirkung auf hydrophobe Verbindungen auf, so dass die Umwandlung von organischen Substraten verbessert und dadurch die Produktivität der enzymkatalysierten Reaktion erhöht werden konnte. [Dreyer et al. 2009] Ausgehend von diesen positiven Ergebnissen sollte die AmmoengTM110 in der vorliegenden Arbeit als ionische Flüssigkeit im thermomorphen Lösungsmittelsystem eingesetzt und ihre Wirkung auf das Enzym hinsichtlich des Umsatzes, der Stereoselektivität und der Rezyklierbarkeit getestet und diskutiert werden. Das AmmoengTM110-KPi-TMS wurde in Kapitel 4.1.2.2 hinreichend optimiert, charakterisiert und setzt sich, wie in Tabelle 4-11 gezeigt, zusammen.

Tabelle 4-11. Zusammensetzung des AmmoengTM110-TMS.

TMS 9
30% (v/v) Ammoeng TM 110
70% (v/v) KPi (500 mM, pH 7,0)
$T_{Tr} = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Um die zwei mischbaren Phasen von Wasser und der AmmoengTM110 in das heterogene Gebiet zu drängen, bedarf es 500 mM an Kaliumphosphat-Salzen. Bei einer Zusammensetzung von 30:70% (v/v) liegt die Trübungstemperatur T_{Tr} des Systems bei 25 °C und liefert daher optimale Voraussetzungen als Reaktionssystem in Hinblick auf die Pufferkapazität als auch auf die einphasige Reaktionsführung bei dem Temperatur-Optimum der CaLB bei 40 °C. Die Löslichkeit des Substrates 1-Phenylethylacetat ergibt bei der in der Reaktion eingesetzten Konzentration von 30 mM eine Erhöhung der Trübungstemperatur von 8 K auf $T_{Tr} = 33 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abbildung A-15). In der Untersuchung des Einflusses des Modellproteins BSA (siehe Abbildung A-16) auf das TMS 9 konnte gezeigt werden, dass die Trübungstemperatur bei einer Zugabe von 100 mg BSA lediglich um 5 K ansteigt. Daraus lässt sich schließen, dass sich im System mit 30 mM 1-

Phenylethylsubstrat bei maximaler Enzymkonzentration die Trübungstemperatur immer noch unter der Reaktionstemperatur befinden würde und daher ein einphasiger Prozess und eine Aufarbeitung aus dem Zweiphasensystem bei Raumtemperatur garantiert werden kann.

In Tabelle A-47 ist die Aktivitätssteigerung der CaLB im AmmoengTM110-KPi-TMS ($A_{vol} = 42,86 \pm 0,62$ mU/ml) mit einer Erhöhung um 15,9% im Vergleich zum reinen Puffer (50 mM KPi) dargestellt. Als nächstes sollte die Stabilität des Biokatalysators im TMS 9 untersucht werden. Die CaLB verliert im AmmoengTM110-KPi-TMS über beinahe 200 h inkubiert bei 40 °C im Vergleich zum reinem Puffer erheblich an Aktivität (Abbildung 4-22). Im Kaliumphosphat-Puffer konnte ein moderater Aktivitätsverlust über 200 h von 24,8% der Ursprungsaktivität ermittelt werden, dahingegen im AmmoengTM110-KPi-TMS um 89,2%.

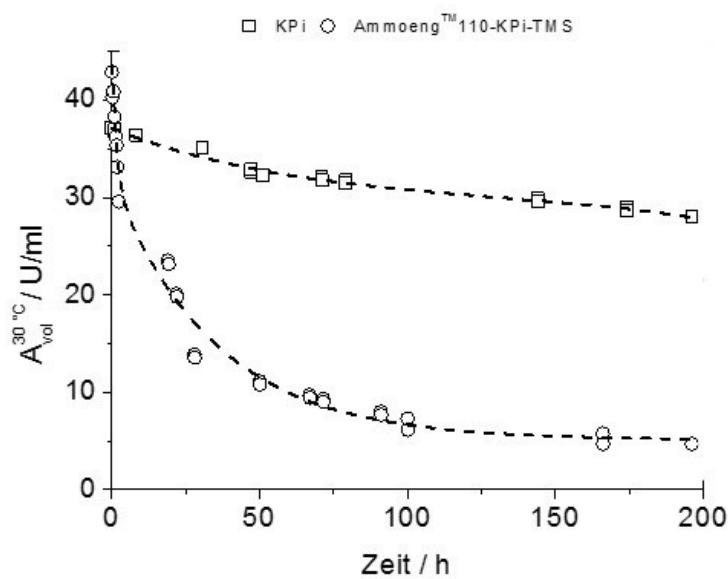


Abbildung 4-22. Langzeitstabilität der CaLB in reinem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,0) und dem AmmoengTM110-KPi-TMS.

Bei der kinetischen Racematspaltung von 1-Phenylethylacetat mittels CaLB im AmmoengTM110-KPi-TMS wurde ein voller Umsatz von 50% nach nur 60 Minuten und ein ausgezeichneter Enantiomerenüberschuss von >99% erreicht (Abbildung 4-23 und vgl. Tabelle 4-15). Diese erfolgreichen Ergebnisse können auf die außergewöhnlichen Lösungsmittel-eigenschaften der IL zurückgeführt werden, die sowohl im Vergleich zum 1PS KPi zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führen, als auch ein enantiomerenreines Produkt generieren. Frühere Studien berichteten, dass eine niedrige Wasserstoffbindungs-Basizität wie in AmmoengTM110 die Interferenz mit den internen Wasserstoffbrücken des Enzyms minimiert und somit den

Biokatalysator nicht deaktiviert. [Kaar et al. 2003; Habulin und Knez 2009] Aufgrund der hohen Effektivität der CaLB im TMS 9 bleibt die spätere Destabilisierung unerheblich.

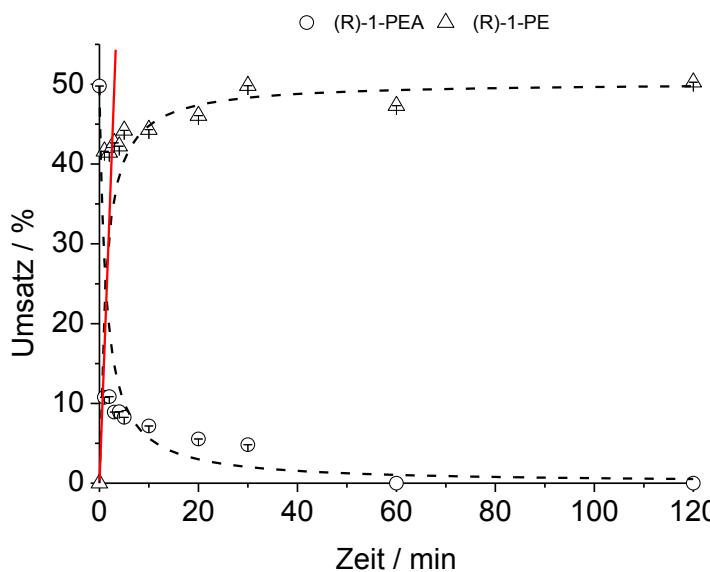
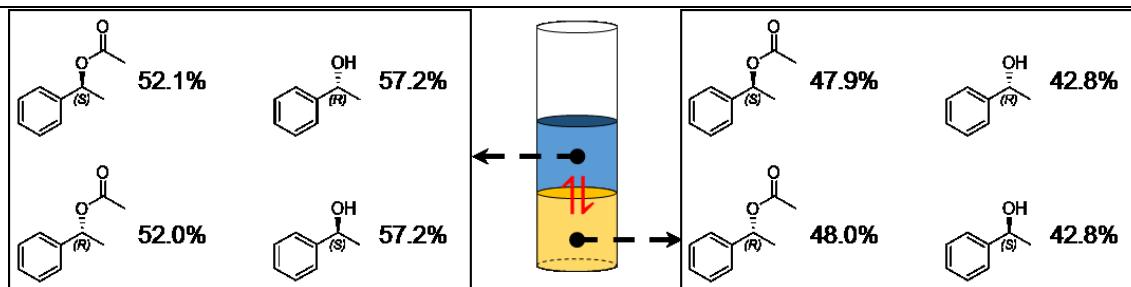


Abbildung 4-23. Umsatz-Zeit-Diagramm der kinetischen Racematspaltung von 30 mM 1-PEA mit 97 U/ml CaLB bei 40 °C im TMS 9. (Mittelwerte aus Sechsachbestimmung)

Im Hinblick auf die Aufarbeitung zeigte sich bei der Bestimmung der Verteilung des 1-Phenylethylacetats und des 1-Phenylethanol in den Phasen des TMS 9 jedoch eine ungünstige Voraussetzung (Schema 4-15). Substrate und Produkt verteilen sich annähernd gleich in der wässrigen sowie der IL-Phase und können somit nicht vereinfacht vom Katalysator und voneinander abgetrennt werden.



Schema 4-15. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den zwei Phasen des Ammoeng™110-KPi-TMS bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

Dreyer et al. studierten 2009 die Interaktion mehrerer Modellproteine wie BSA mit der Ammoeng™110-IL und folgerten, dass sich negativ geladene Proteine durch die direkte elektrostatische Interaktion mit dem Ammoeng™110-Kation bevorzugt in der IL-Phase und positiv geladene Proteine durch die Wechselwirkung mit den Anionen der Pufferphase bevorzugt in der Pufferphase verteilen. [Dreyer et al. 2009] So könnte auch das die Abtrennung und Wiederverwendung der CaLB aus einer Phase

erschweren. Doch entgegen dieser Annahme zeigt das TMS 9 eine sehr gute Rezyklierbarkeit der CaLB über die ersten drei Läufe. Ab Rezyklierungslauf vier sinkt der maximal erreichbare Umsatz von 50% des 1-Phenylethylacetats auf unter die Hälfte. Diese Beobachtung liegt zum Einen in der geminderten Stabilität der CaLB begründet und zum Anderen könnte die Anreicherung der Edukte und Produkte in der wiedergenutzten wässrigen Phase über die Zyklen zu einer zusätzlichen Inhibition des Enzyms führen.

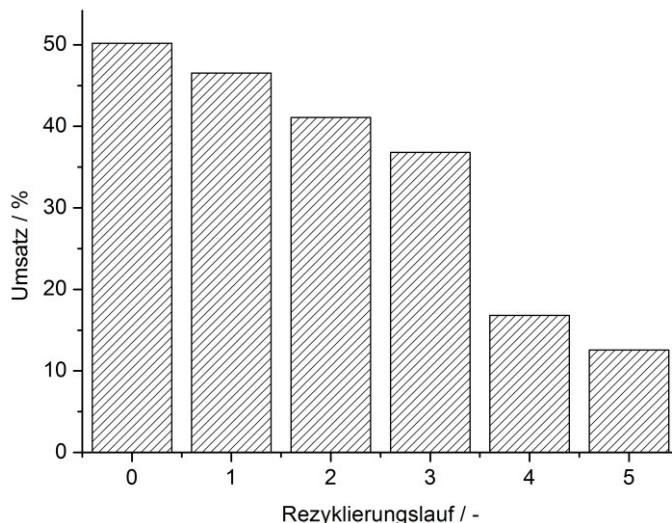


Abbildung 4-24. Rezyklierung der CaLB im AmmoengTM110-KPi-TMS über fünf Läufe.

4.2.1.7 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im [BMIm][BF₄]-TMS

Ionische Flüssigkeiten, die das [BF₄]-Anion enthalten, sind starke Chaotropen und schwache Wasserstoffbindungsakzeptoren. [van Rantwijk und Sheldon 2007] Die hohe thermische und oxidative Stabilität, bedingt durch die sehr stabilen C-F-Bindungen, komplettieren das hervorragende Eigenschaftsprofil dieser Verbindungsklasse. [Jain et al. 2005] ZGAJNAR GOTVAJN et al. wiesen 2014 der IL [BMIm][BF₄] eine geringe Toxizität zu, jedoch auch eine Resistenz gegen biologischen Abbau unter anaeroben Bedingungen. [Zgajnar Gotvajn et al. 2014] In der Literatur sind seit Beginn des jetzigen Jahrhunderts erfolgreiche Lipase-katalysierte Reaktionen in Gegenwart von [BMIm][BF₄] und ihren Wasser- bzw. Lösungsmittelmischungen bekannt. [Park und Kazlauskas 2003; van Rantwijk und Sheldon 2007]

Um das Spektrum der neuartigen Lösungsmittelsysteme für die Biokatalyse zu erweitern, wurde daher ebenfalls die gut untersuchte Ionische Flüssigkeit [BMIm][BF₄] eingesetzt und wiederum ihre Wirkung auf das Enzym hinsichtlich des Umsatzes, der Stereoselektivität und der Rezyklierbarkeit getestet und diskutiert. Das [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS wurde in Kapitel 4.1.2.4 hinreichend optimiert, charakterisiert und setzt sich schlussendlich, wie in Tabelle 4-12 gezeigt, zusammen.

Tabelle 4-12. Zusammensetzung des [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS.

TMS 10
35% (v/v) [BMIm][BF ₄]
65% (v/v) NaPi (150 mM, pH 7,0)
$T_{Tr} = 29\text{ }^{\circ}\text{C}$

Die Binodalverschiebung durch das Substrat ist in Abbildung A-27 dargestellt und lässt für eine einphasige Reaktionsführung bei 40 °C eine 1-PEA-Konzentration von 30 mM im TMS 10 zu. Die Stabilität der CaLB im [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS bei 40 °C über 180 Stunden weist im Vergleich zum reinen NaPi-System höhere Aktivitätsverluste auf (Abbildung 4-25).

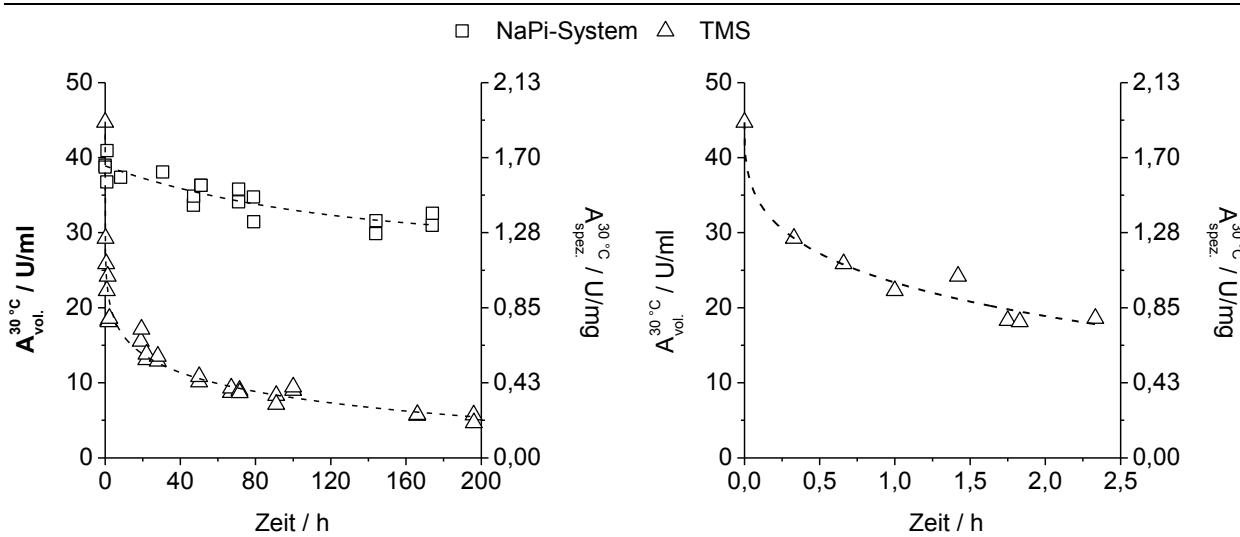


Abbildung 4-25. Vergleich der Stabilität von CaLB bei 40 °C über 200 h in NaPi (150 mM, pH 7,0) und im [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS (rechts ein Ausschnitt der ersten 2,5 h im TMS 10).

Die Abnahme der Aktivität wurde zur näheren Interpretation in zwei Bereiche unterteilt: zum Einen findet eine Halbierung der Aktivität in den ersten 2,5 Stunden im TMS 10 statt; danach ist die Geschwindigkeit der Aktivitätsabnahme mit der im wässrigen vergleichbar. Es lassen sich somit zwei verschiedene Halbwertszeiten für die CaLB im TMS 10 definieren. Erklären lässt sich dieses Phänomen dadurch, dass das Enzym durch das Vorhandensein der IL teilweise entfaltet werden könnte. Bis zu einem gewissen Grad könnten die chaotropen Ionen der IL die Wasserstoffbrückenbindungen im Enzym aufbrechen, die Struktur verändern und so zu einem Aktivitätsverlust führen. Da die Ionen jedoch nicht in der Lage sind, das Enzym komplett zu denaturieren (ΔG_{hyd} nicht groß genug), bleibt eine gewisse Aktivität erhalten. SHELDON *et al.* verglichen 2004 IR-spektroskopisch die CaLB in mehreren ionischen Flüssigkeiten mit dem Spektrum des Proteins in Wasser. [Madeira Lau *et al.* 2004] Es konnte beobachtet werden, dass die CaLB

in den ILs - ähnlich wie das lyophilisierte Protein - ein anderes Sekundärstrukturmuster aufweist als die in Wasser gelöste CaLB [Vecchio et al. 1999].

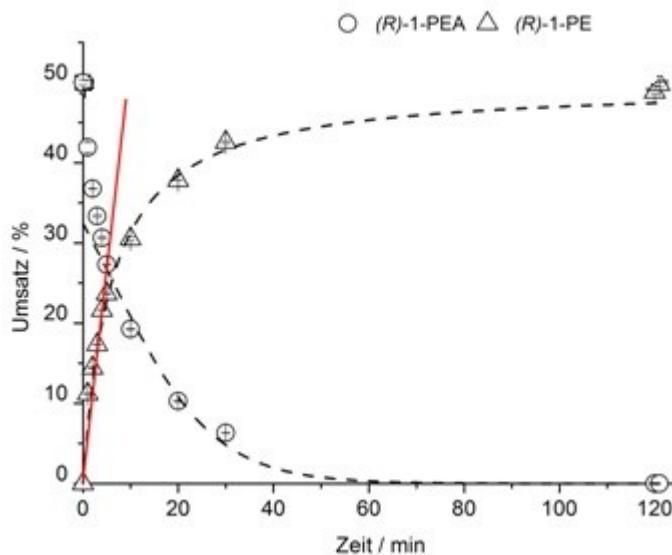


Abbildung 4-26. Umsatz-Zeit-Diagramm der kinetischen Racematspaltung von 30 mM 1-PEA mit 97 U/ml CaLB bei 40 °C im TMS 10. (Mittelwerte aus Sechsbestimmung)

Das Umsatz-Zeit-Diagramm (Abbildung 4-26) zeigt eine 50%ige Umsetzung des 1-Phenylethylacetats zum (R)-1-Phenylethanol mit einem Enantiomerenüberschuss von >99%. Im Vergleich zum gepufferten wässrigen System liegt die Aktivität der CaLB zwar um das 1,7-fache über der im TMS 10, jedoch zeigte das Substrat 1-PEA im Wässrigen eine Emulsionsbildung; die durch den Einsatz der IL vermieden werden konnte.

Die niedrigeren Reaktionsraten im $[B\text{MIm}][\text{BF}_4]$ -System verglichen mit dem gepufferten wässrigen System lassen sich vermutlich mit der Interaktion der ionischen Flüssigkeit mit dem Enzym erklären. 2013 konnten YOSHIMURA et al. zeigen, dass das Tetrafluoroboratanion in Wasser in der Lage ist, schwache H-F-Bindungen mit bis zu vier Wassermolekülen einzugehen. [Yoshimura et al. 2013] Dies lässt den Schluss zu, dass die für die Struktur der CaLB wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen durch die Tetrafluoroboratanionen wahrscheinlich teilweise dissoziiert werden. Dadurch wird die Strukturintegrität der α -Helices und β -Faltblätter geschwächt, was vermutlich zum teilweisen Entfalten des Enzyms führt. [van Rantwijk et al. 2006]

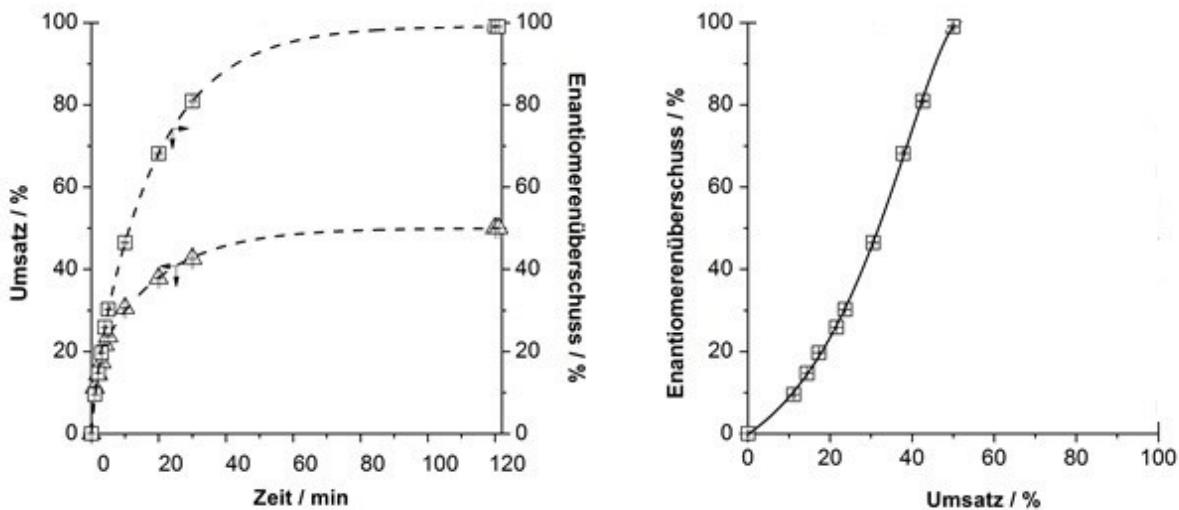


Abbildung 4-27. Links: Umsatz-Zeit-Enantiomerenüberschuss-Diagramm. Rechts: Enantiomerenüberschuss-Umsatz-Diagramm der kinetischen Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB im TMS 10 (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Die in der Literatur oftmals beschriebene Hydrolyse von $[\text{BF}_4^-]$ -basierten ILs in Anwesenheit von Wasser [Freire et al. 2012a] konnte während der Experimente nicht beobachtet werden. Das Testen mit pH-Papier zeigte auch über lange Reaktionszeiten (>24 h) keine signifikante Änderung des pH-Wertes. Auch die Reaktionsgefäße zeigten nach längerem Benutzen keine Trübungen des Glases, was auf die Abwesenheit von Fluorwasserstoff (HF) schließen lässt. Der negative Einfluss von Hydrolyseprodukten auf das Enzym kann jedoch auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Möglicherweise entstehen kleine Mengen HF, welche einen negativen Einfluss auf das Enzym haben und den Aktivitätsverlust erklären.

Im Vergleich zum organischen 2PS aus KPi und MTBE war dagegen eine 17-fache Erhöhung der Aktivität im $[\text{BmIm}][\text{BF}_4^-]$ -System zu beobachten.

Um nachfolgend die Rezyklierung des Enzyms sowie die Isolierung der Reaktionsprodukte zu evaluieren, wurden zur Abschätzung der Verteilung der CaLB eine 1D-Gelelektrophorese sowie ebenso eine Bestimmung der Verteilungskoeffizienten der Substrate und Produkte vorgenommen. Das resultierende Coomassie-gefärbte Gel ist in Abbildung 4-28 dargestellt. Für eine grundlegende Abschätzung der Enzymaktivität sind die Markierungen **C** und **D** von Bedeutung. Bei der Beprobung der unteren IL-reichen Phase zeigt das Gel eine schwache Bande (**C**), während die Intensität der Bande der oberen wässrigen Phase (**D**) der Intensität des 1PS (**B**) entspricht. Werden die Bandenintensitäten mit denen aus Abbildung A-31 verglichen, kann festgestellt werden, dass die Enzymverdünnung in der IL-reichen Phase zwischen 1:100 und 1:1000 liegen muss. Der wesentliche Enzymanteil befindet sich also in der wässrigen und nicht in der IL-reichen Phase.

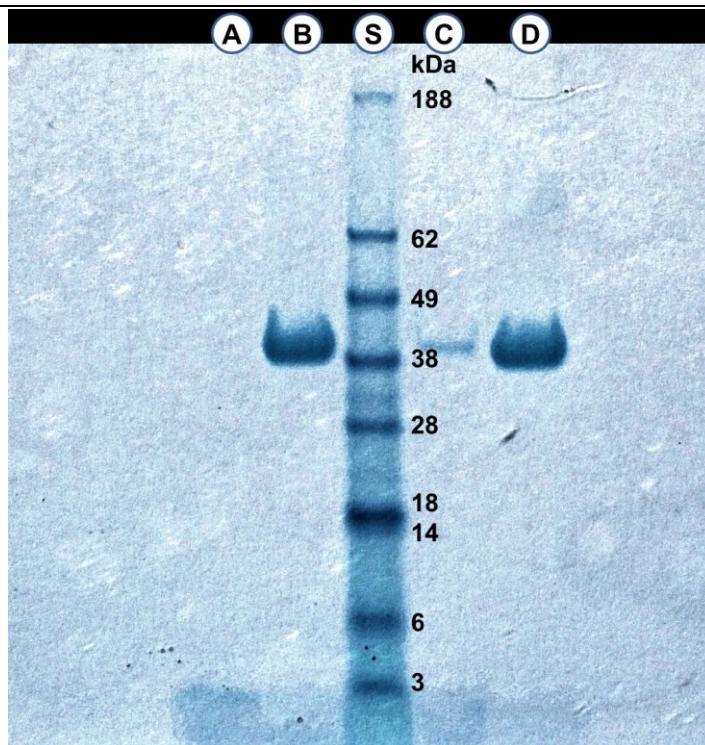
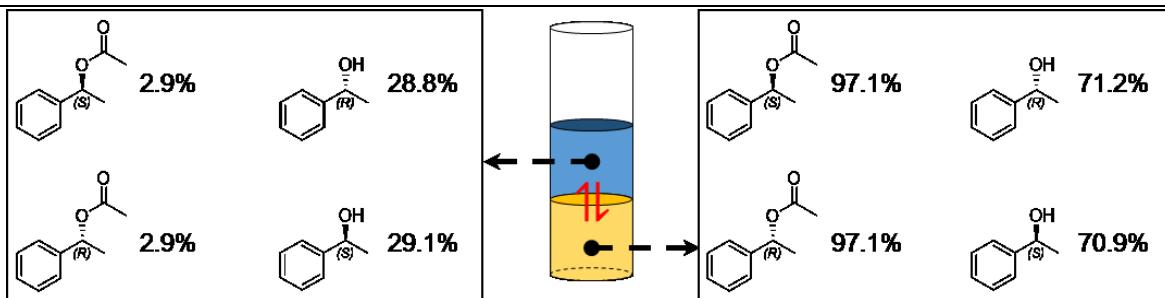


Abbildung 4-28. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel der CaLB im [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS. S=Proteinstandard SeeBlue®; A=reiner Puffer, B=1PS des TMS, C=untere Phase des TMS, D=obere Phase des TMS.

Die Verteilung des 1-Phenylethylacetats und des 1-Phenylethanols ist in Schema 4-16 dargestellt. Signifikante Mengen des 1-PEA lassen sich in der unteren IL-reichen Phase wiederfinden, der Alkohol befindet sich zu ~29% in der wässrigen Phase. Der Verteilungskoeffizient von 1-PEA ist damit um das 14-fache größer als der Verteilungskoeffizient von 1-PE.



Schema 4-16. Verteilung von 1-Phenylethylacetat und 1-Phenylethanol in den zwei Phasen des [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS bei 20 °C. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

Zwar ist es nicht gelungen, die Stoffe durch die Phasenseparation vollständig voneinander zu trennen, jedoch zeigen die Verteilungskoeffizienten, dass zumindest eine signifikante Anreicherung des Eduktes in der wässrigen Phase zu realisieren ist. Die untere IL-reiche Phase könnte destilliert werden, wodurch die Stoffe voneinander getrennt werden könnten ($T_{\text{Sdp}}(1\text{-PEA}) = 225 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{Sdp}}(1\text{-PE}) = 204 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

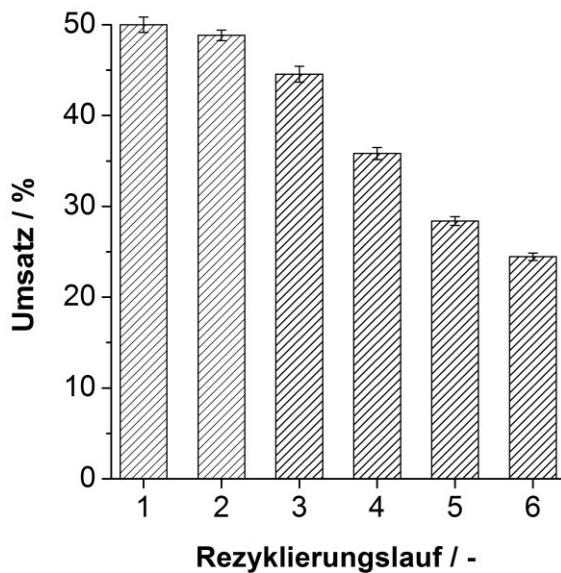


Abbildung 4-29. Umsatz je Rezyklierungslauf bei der Rezyklierung der CaLB im [BmIm][BF₄]-TMS.

Wie in Abbildung 4-29 zu erkennen ist, kann das Enzym mehrmals wiedereingesetzt werden. Bei bis zu drei Rezyklierungsläufen zeigt sich dabei nur ein geringer Umsatzverlust. Dieser vergrößert sich bei jedem weiteren Rezyklierungslauf und fällt sukzessive auf 50% des ursprünglichen Umsatzes bis zum sechsten Rezyklierungslauf ab. Der pH-Wert veränderte sich dabei nicht und blieb konstant bei pH 7. Die Ergebnisse der abnehmenden Aktivität im IL-System (Abbildung 4-25) legen nahe, dass die Reduzierung des Umsatzes mit der Reduzierung der Enzymaktivität korreliert. Wie gezeigt werden konnte, fällt die Enzymaktivität in den ersten zwei Stunden stärker ab, danach verbleibt diese auf dem Niveau des Aktivitätsverlustes im wässrigen System. Ein Lösungsansatz wäre das Hinzufügen von größeren Mengen an Enzym.

4.2.1.8 Kinetische Racematspaltung von 1-PEA mit CaLB in weiteren imidazolium- und pyridiniumbasierten-IL-TMS

Ionische Flüssigkeiten sind "maßgeschneiderte Lösungsmittel", da ihre Struktur und damit ihre Lösungsmittelleigenschaften leichter zu verändern sind als bei herkömmlichen organischen Lösungsmitteln. Es ist bekannt, dass kleine Änderungen des Alkylsubstituenten des 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Kations die Löslichkeit der Substrate verbessern, wodurch die Regioselektivität oder der Umsatz erhöht werden kann. [Park und Kazlauskas 2001] Weiterhin hat sich CaLB bereits bei anderen Imidazolium-ILs als thermisch stabil erwiesen [Jain et al. 2005], wobei die Aktivität und die Löslichkeit jedoch vom IL-Anion abhängig sind. [Pohar et al. 2009]

Daher wurden nachfolgend weitere verschiedene imidazolium- und pyridinium-basierte ionische Flüssigkeiten in der Mischung mit Wasser und anorganischen Salzen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit untersucht. Die Randparameter für die Suche nach dem Konzentrationsoptimum an Natriumphosphat

betrugen $UCST = 40^\circ\text{C}$ bei einem IL-Gehalt von 35% (v/v). Die Zusammensetzungen der TMS A bis F sowie Konzentration-Zeit-Verläufe sind in Tabelle 4-13 sowie Abbildung 4-30 dargestellt. Die Ergebnisse der Raum-Zeit-Ausbeuten und der Enantiomerenüberschüsse sind in Tabelle 4-15 zusammengefasst. Die Aktivität des Enzyms in den Lösungsmittelkombinationen der ILs aus Tetrafluoroboratanionen steigt in der Reihenfolge $[\text{BmIm}][\text{BF}_4] < [\text{BPY}][\text{BF}_4] < [\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ an. Im Vergleich zum $[\text{BmIm}][\text{BF}_4]$ hat die um ein CH_2 -Glied verkürzte Kation-Seitenkette des $[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ vermutlich einen positiveren Einfluss auf die Struktur der CaLB. Bei variierenden Kationen und Anionen ergibt sich die Reihenfolge $[\text{BmIm}][\text{BF}_4] < [\text{BmIm}][\text{Br}] < [\text{BmIm}][\text{NO}_3]$ und $[\text{EMIm}][\text{Br}] < [\text{EMIm}][\text{BF}_4]$ in Bezug auf die Enzymaktivität. Auf der Seite der Butylmethylimidazoliumkationen ist somit eine direkte Korrelation mit der HOFMEISTER-Reihe erkennbar. Das NO_3^- -Ion scheint dabei die Struktur der CaLB weniger stark zu stören als das Br^- - und BF_4^- -Anion. Interessanterweise wurde bei den Ethylmethylimidazoliumkationen ein umgekehrtes Verhalten beobachtet. Hier scheint das Br^- -Ion einen stärker negativen Effekt auf das Enzym auszuüben als das BF_4^- -Ion.

Die CaLB scheint in den TMS B-F durch die Erhöhung der Substratkonzentration einen schnelleren Umsatz zu generieren als in den bisher betrachteten Systemen; das Substrat ist in den TMS vermutlich besser solvatisiert und folglich führt die erhöhte Aktivierungsenergie für die Umsetzung zu einer Erniedrigung der Reaktionsgeschwindigkeit. Die Werte für die Raum-Zeit-Ausbeute liegen im Bereich des TMS 9 und des Einphasensystems aus KPi (vgl. Tabelle 4-15).

Tabelle 4-13. Charakterisierung von verschiedenen IL-NaPi-Wasser-Systemen

TMS	35% (v/v) IL	Konzentrationsoptimum NaPi	Rangfolge
A	$[\text{BmIm}][\text{BF}_4]$	150 mmol/l	++++
B	$[\text{BPy}][\text{BF}_4]$	233 mmol/l	++++
F	$[\text{EMIm}][\text{BF}_4]$	567 mmol/l	++
E	$[\text{BmIm}][\text{Br}]$	333 mmol/l	0
C	$[\text{BmIm}][\text{NO}_3]$	350 mmol/l	0
D	$[\text{EMIm}][\text{Br}]$	470 mmol/l	0
-	$[\text{BmIm}][\text{Cl}]$	—	—

Zusammenfassend kann aus dem Vergleich der imidazolium- und pyridinium-basierten TMS A-F geschlussfolgert werden, dass zwar das $[\text{BmIm}][\text{BF}_4]$ - und das $[\text{BPy}][\text{BF}_4]$ -System schlechtere Raum-Zeit-Ausbeuten im Vergleich zu den übrigen imidazolium-basierten TMS in Tabelle 4-15 zeigen, jedoch überwiegen die vollständige Lösung des Substrates und die optimale Aufspaltung der zwei Phasen bei niedrigen Temperaturen die oben genannten Nachteile.

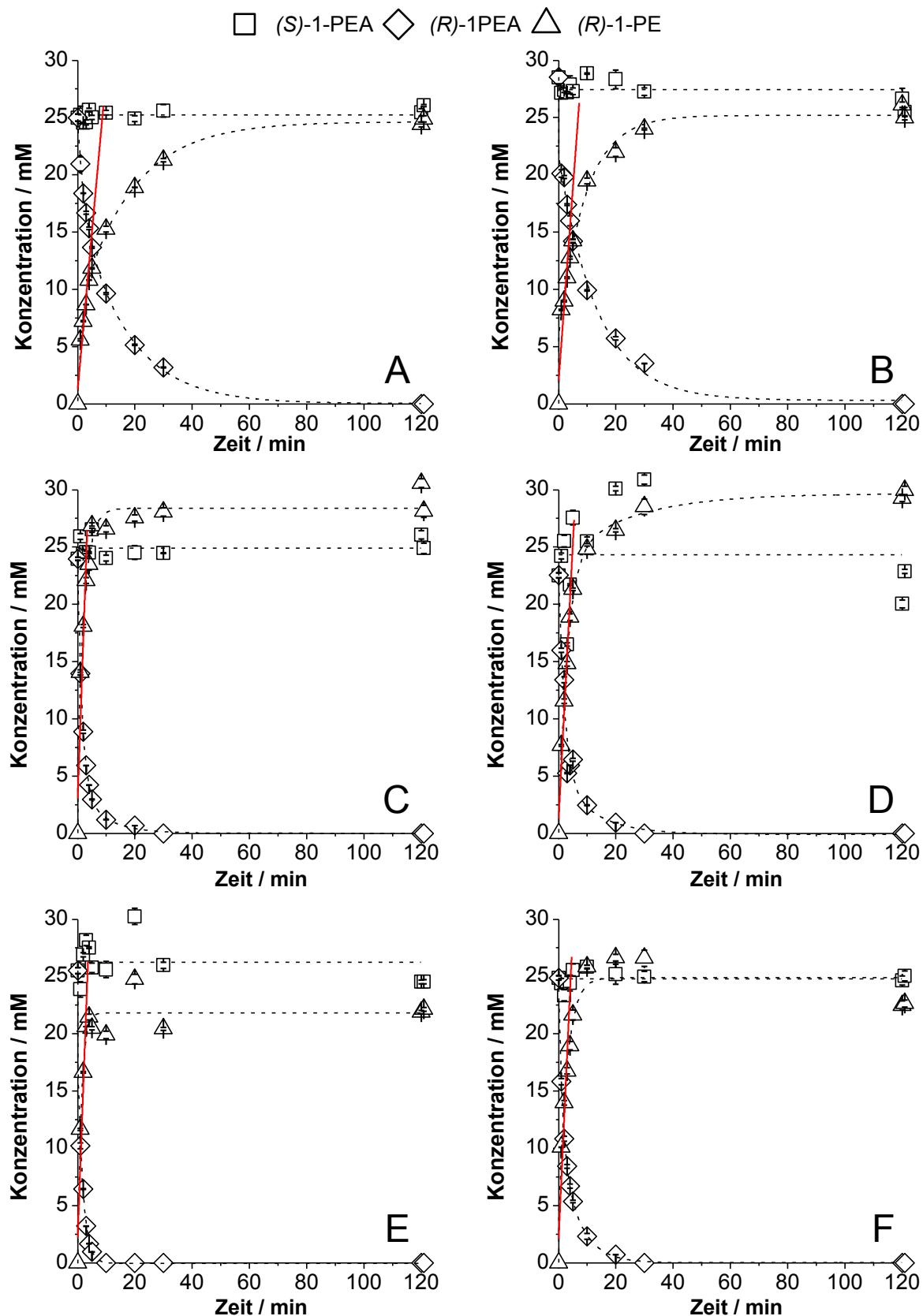
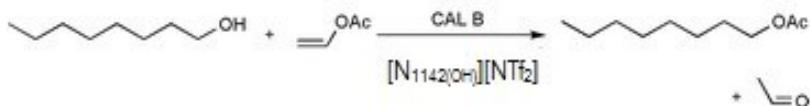


Abbildung 4-30. Übersicht der Konzentrations-Zeit-Diagramme der kinetischen Racematspaltung von 1 PEA in den untersuchten TMS A-F (verschiedene Konzentrationen von NaPi, 35% (v/v) IL, 50 mM Substrat, Enzymaktivität = 64,7 U/ml, $T = 40^\circ\text{C}$).

4.2.1.9 Veresterung von 1-Octanol und Vinylacetat mit CaLB im $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ -TMS

Ergänzend wurde die CaLB-vermittelte Reaktion in einem thermomorphen Lösungsmittelsystem ohne Wasserzusatz untersucht. Zudem stellt das TMS 11 (Tabelle 4-15) eine Sonderform der thermomorphen Lösungsmittelsysteme dar, in dem das Substrat Vinylacetat gleichzeitig als Phasenvermittler fungiert



Schema 4-17. Reaktion von 1-Octanol mit dem Phasenvermittler und Substrat Vinylacetat im TMS11.

In erster Näherung bewirkt der Austausch von Wasser durch wasserfreie organische Lösungsmittel eine drastische Verringerung der Flexibilität des Enzyms. Dadurch wird sowohl die Konformation der CaLB fixiert als auch der Protonierungszustand der titrierbaren Gruppen. Zudem haben organische Lösungsmittel einen direkten Einfluss auf die biochemischen Eigenschaften, wie katalytische Aktivität und Stereoselektivität (vgl. Kapitel 3.3). Wiederum sollte die Interaktion des Mediums mit dem Enzym erörtert und mit den vorangegangenen TMS verglichen werden. Die Zusammensetzung des thermomorphen Lösungssystems ist in Tabelle 4-14 aufgeführt.

Tabelle 4-14. Zusammensetzung des $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$ -Octanol-TMS.

TMS 11

30% (v/v) $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$

69% (v/v) 1-Octanol

1% (v/v) Vinylacetat

$T_{Tr} = 26 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Bei der enzymatischen Umsetzung in rein organischen Lösungsmittelsystemen spielen die Permittivität ($\log P$, Hydrophobizität) des Solvens [Affleck et al. 1992], das molekulare Volumen [Ottosson et al. 2002] und die Wasseraktivität [Lee und Kim 1995] eine entscheidende Rolle. Die Eignung eines organischen Lösungsmittels für die Biokatalyse sinkt mit zunehmender Hydrophilie und Polarität. 1-Octanol stellt als hydrophobes, unpolares Lösungsmittel mit 69% (v/v) daher ein optimales Medium dar. Die hohe Vinylacetat-Konzentration im TMS 11 ermöglicht anfänglich eine hohe Enzymaktivität, da keine Substratinhibierung auftritt. Die geringe Hydrophobizität des Vinylacetats ($\log P = 0,8$) wirkt sich dagegen vermutlich negativ auf die Enzymstabilität aus, da es die Tendenz aufweist, das für die Enzymaktivität essentielle Wasser aus der Hydrathülle des Proteins zu entfernen. Dies spiegelt die Abbildung 4-31 wieder, die in den ersten 60 Minuten einen kontinuierlichen Anstieg des Umsatzes zeigt und ein anschließendes Stagnieren.

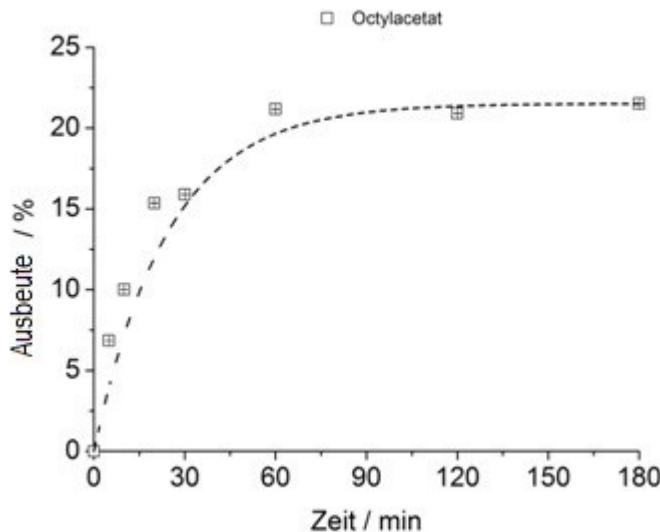


Abbildung 4-31. Reaktion von 1-Octanol und Vinylacetat mit CaLB in 30% (v/v) $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$, 70% (v/v) 1-Octanol, 100 mM Vinylacetat, ~ 100 U/ml CaLB).

Um die optimale Enzymaktivität in nicht-wässrigen Medien zu entfalten, muss das Medium eine gewisse Wasseraktivität a_w aufweisen. [Khmelnitsky et al. 1991; Gorman und Dordick 1992; Gupta 1992; Schmitke et al. 1996] Mit einer durchschnittlichen Wasseraktivität von $a_w = 0,41$ des TMS 11 (Dreifachbestimmung siehe Kapitel A.2.9) liegt das Lösungsmittelsystem in einem guten Bereich, da Lipasen zumeist erst ab Werten zwischen 0,3 und 0,2 inaktiviert werden. [Ducret et al. 1998; Valivety et al. 1992] In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Vinylacetat-Konzentration die katalytische Aktivität der CaLB immer weiter abnimmt.

4.2.1.10 Zusammenfassung der Reaktionen mit CaLB

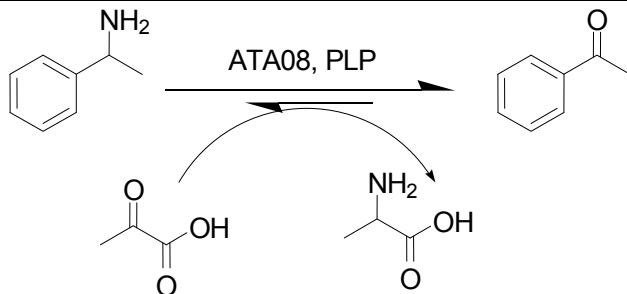
Die Raum-Zeit-Ausbeuten der TMS 1-11 wurden auf Grundlage der Umsetzung von 30 mM 1-PEA berechnet. Mit Erhöhung der Substratkonzentration und/ oder Enzymmenge war auch ein Ansteigen der Raum-Zeit-Ausbeuten vermerkbar. 1PS, 2PS und TMS B-F basieren auf der Umsetzung von 50 mM 1-PEA. Der Enantiomerenüberschuss wurde für das jeweils entstandene Produkt betrachtet und zeigt in allen TMS Werte >99% - die thermomorphen Lösungsmittelsysteme haben damit Einfluss auf die Aktivität, nicht aber auf die Stereoselektivität der CaLB.

Tabelle 4-15. Raum-Zeit-Ausbeute und Enantiomerenüberschüsse der TMS 1 – 11 und B-F im Vergleich zu klassischen Reaktionssystemen für die CaLB.

System	Zusammensetzung	Raum-Zeit-Ausbeute / mmol/l/h	ee _P / %
1PS	KPi	234 ± 16	>99
2PS	KPi-MTBE	9 ± 0,1	96
TMS 1	KPi-THF-Butanol	0,2 ± 0,0	>99
TMS 2	KPi-Acetonitril-MTBE	0,2 ± 0,1	>99
TMS 3	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]-KPi-Dioxan	124 ± 4	>99
TMS 4	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]-KPi-Aceton	145 ± 18	>99
TMS 5	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]-KPi-Acetonitril	9 ± 0,5	>99
TMS 6	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]-KPi-DMSO	140 ± 5	>99
TMS 7	[EMIm][NTf ₂]-KPi-DMSO	42 ± 7	>99
TMS 8	[EMIm][NTf ₂]-KPi-Acetonitril	41 ± 8	>99
TMS 9	Ammoeng™110-KPi	235 ± 53	>99
TMS 10	[BMIm][BF ₄]-NaPi	132 ± 15	>99
TMS 11	[N _{1142(OH)}][NTf ₂]-Octanol	23 ± 7	-
TMS B	[BPy][BF ₄]-NaPi	205 ± 58	>99
TMS C	[BMIm][NO ₃]-NaPi	425 ± 71	>99
TMS D	[EMIm][Br]-NaPi	291 ± 19	>99
TMS E	[BMIm][Br]-NaPi	403 ± 40	>99
TMS F	[EMIm][BF ₄]-NaPi	327 ± 44	>99

4.2.2 Aminotransferase

Aminotransferasen oder Transaminasen (E.C. 2.6.1.X) katalysieren die Übertragung der Aminogruppe eines primären Amins auf ein prochirales Keton oder Aldehyd und umgekehrt. [Koszelewski et al. 2010] Aminotransferasen benötigen als prosthetische Gruppe Peridoxal-5-phosphat (PLP), das während der Reaktion kovalent an die Aminogruppe bindet und zu Pyridoxamin-5-phosphat (PMP) umgewandelt wird. An der Reaktion nehmen jeweils ein Amin-Donor und ein Amin-Akzeptor teil. Die in dieser Arbeit verwendete Aminotransaminase ATA08 zählt zur Untergruppe der ω -Transaminasen und kann auch Amin-Donoren ohne Carboxylfunktion umsetzen. Sie ist (*S*)-selektiv, wurde aus *Silicibacter pomeroyi* isoliert und in *E. coli* exprimiert. Das von Enzymical^(s) zur Verfügung gestellte Enzym wurde eingangs via Gelelektrophorese auf dessen Reinheit (siehe Abbildung A-37) und Enzymaktivität getestet. Auf Grund der hohen Enantioselektivität ermöglicht das Enzym die Anwendung in der Racematspaltung von racemischen Aminen oder der Synthese von chiralen Aminen aus günstigen Ketonen.[Hirotsu et al. 2005] Als Testreaktion für die entwickelten thermomorphen Lösungsmittelsysteme wurde die kinetische Racematspaltung von α -Methylbenzylamin (MBA) zum Acetophenon mittels der ATA08 gewählt. BORNSCHEUER et al. postulierten 2009, dass durch den Einsatz von Pyruvat als Amin-Akzeptor die Gleichgewichts-Konstante $K \gg 1$ liegt und die Produktbildung bevorzugt ist. [Höhne und Bornscheuer 2009] Daher wurde auch hier das Pyruvat eingesetzt. (siehe Schema 4-18)



Schema 4-18. Testreaktion von α -Methylbenzylamin und Pyruvat zu Acetophenon und Alanin mittels ATA08.

Für die photometrische Bestimmung der volumetrischen Enzymaktivität ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 8,0$ und $\lambda = 245\text{ nm}$) der Aminotransaminase ATA08 in reinem Natriumphosphat-Puffer (50 mM) wurde daher dieselbe Reaktion zu Grunde gelegt und beträgt $A_{\text{vol}} = (156,7 \pm 0,2)\text{ mU/ml}$. Durch Zugabe von 0,03 μM DMSO zum Natriumphosphatpuffer konnte die volumetrische Aktivität auf $A_{\text{vol}} = (231,3 \pm 0,1)\text{ mU/ml}$ gesteigert werden. Der BRADFORD-Test ergab schließlich eine spezifische Enzymaktivität von $A_{\text{spez}} = (582,2 \pm 0,4)\text{ mU/mg}$. Die Temperaturabhängigkeit der volumetrischen Aktivität der ATA08 ist in Abbildung A-38 dargestellt.

Die volumetrische Aktivität der Aminotransaminase steigt nach RGT-Regel mit der Temperatur. Bei 30-35 °C ist in der Abbildung A-38 ein Artefakt bei (334,3 ± 0,3) mU/ml bis (337,6 ± 0,4) mU/ml zu erkennen. Bis 50 °C steigt die Enzymaktivität stetig bis auf ein Maximum von (705,4 ± 0,2) mU/ml an, anschließend verliert die ATA08 an Aktivität. Für die nachfolgenden Untersuchungen der Eignung thermomorpher Lösungsmittelsysteme als Medium für eine Aminotransferase-vermittelte Reaktion wurde als Reaktionstemperatur 40 °C gesetzt. Die Stabilität der ATA08 konnte in Natriumphosphat-Puffer bei $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $pH = 8,0$ untersucht werden und ist in Abbildung 4-32 dargestellt. Jedoch konnten die photometrischen Messungen zur Aktivitäts- und Stabilitätsbestimmung sowie der BRADFORD-Test der ATA08 in den thermomorphen Lösungsmitteln nicht ausgewertet werden, da als Resultat von möglicher Protein- und IL-Aggregation eine diffuse Streuung des Lichtes auftrat. Die Anfangsgeschwindigkeit steigt jedoch entsprechend der ARRHENIUS-Gleichung auch im thermomorphen Reaktionssystem mit der Temperatur an und die optimale Reaktionstemperatur ist damit die gleiche wie im Wässrigen.

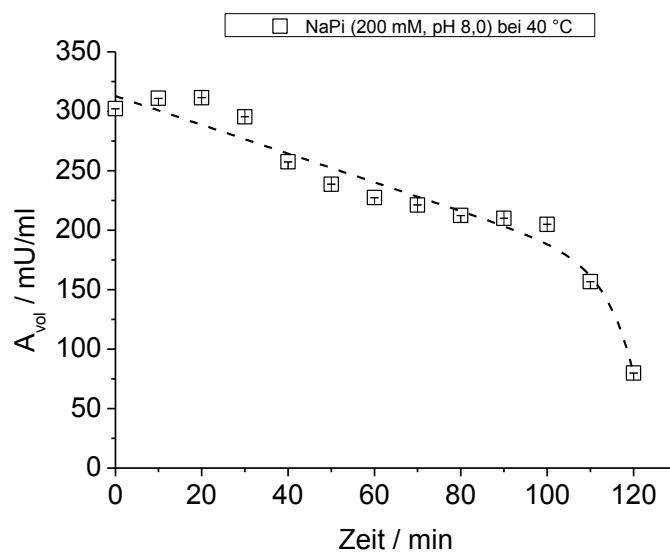


Abbildung 4-32. Stabilität der ATA08 in Natriumphosphat-Puffer (200 mM) bei $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $pH = 8,0$.

Beispiele für Transferase-katalysierte Umsetzungen in nicht-konventionellen Reaktionssystemen sind selten und zeigen eine Abnahme der Enzymaktivität mit Zunahme der Konzentration an polaren organischen Lösungsmitteln wie Ethanol und 1,4-Dioxan. [Singer 1963; Wu und Yang 1970; Shin und Kim 1997] Die Eignung der TMS als Medium für biokatalytische Reaktionen wird daher nachfolgend vorgestellt und bewertet.

4.2.2.1 Reaktion von α -MBA mit ATA08 in thermomorphen Lösungsmittelsystemen

Da schon im Vorfeld bei der Bestimmung der volumetrischen Aktivität der ATA08 in reinem Natriumphosphatpuffer eine Aktivitätssteigerung durch Zugabe von DMSO nachgewiesen werden

konnte, wurde DMSO im TMS 12 für die Testreaktion der ATA08 als Phasenvermittler gewählt. Das entwickelte System wird durch eine 200 mM NaPi-Lösung ausreichend gegen das stark basische Substrat gepuffert und ist oberhalb von $T_{Tr} = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ einphasig (siehe Tabelle 4-16).

Tabelle 4-16. Zusammensetzung des TMS 12.

TMS 12
35% (v/v) [EMIm][NTf ₂]
35% (v/v) NaPi (200 mM, pH 8,0)
30% (v/v) DMSO
$T_{Tr} = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$

20 mM MBA sollten im TMS mit Hilfe von 5 mM PLP und 1 U ATA08 mit 10 mM Pyruvat als Amin-Akzeptor bei 40 °C umgesetzt werden. Durch mehrmalige Extraktionsversuche der Edukte und Produkte aus dem TMS 12 konnte festgestellt werden, dass das α -Methylbenzylamin eine geringe Wiederfindungsrate von nur 22,7% und das Acetophenon von 28,3% aufweist. Die Ergebnisse der gaschromatographischen Messungen zur Reaktionsverfolgung im TMS 12 wurden somit um den Faktor 3,5 für das Acetophenon korrigiert.

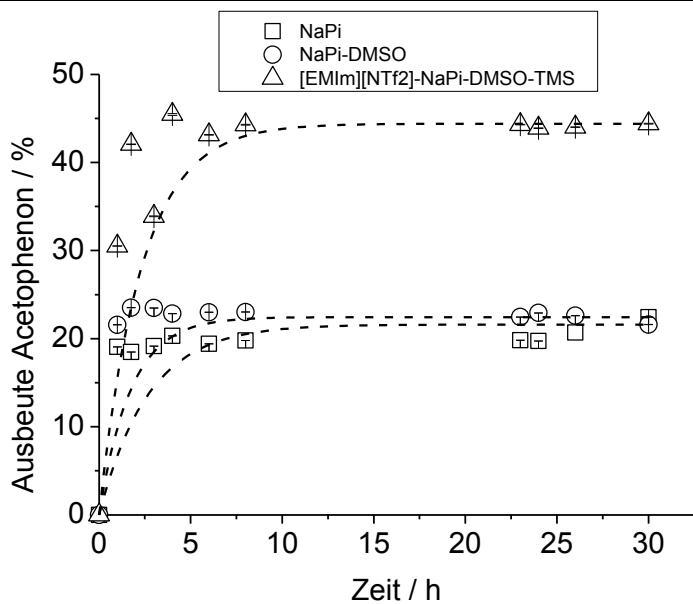
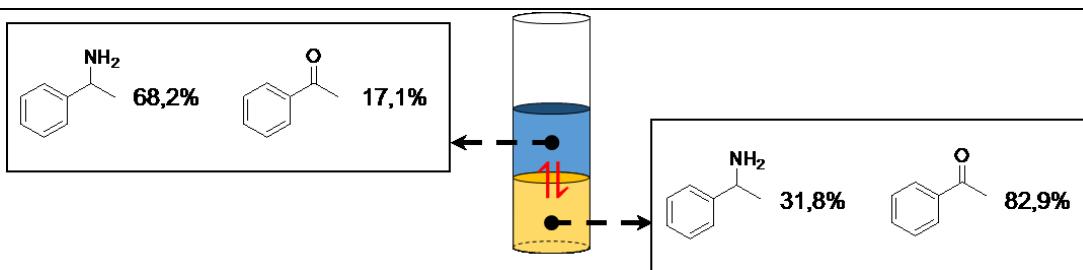


Abbildung 4-33. Ausbeute-Zeit-Diagramm der Reaktion von α -Methylbenzylamin mittels ATA08 zu Acetophenon in Natriumphosphat-Puffer (200 mM, pH 8,0), NaPi mit 0,03 μM DMSO und [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS im Vergleich bei 40 °C. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

Die Auswertung des Diagramms ergibt einen maximalen Umsatz von 22% α -Methylbenzylamin zum Acetophenon im reinen Natriumphosphat-Puffer (200 mM, pH 8,0), 24% im Natriumphosphat-Puffer versetzt mit 0,03 μM DMSO und 45% entstandenes Acetophenon im [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS

(siehe Abbildung 4-33). Während es im reinen Natriumphosphat-Puffer sowie im NaPi-DMSO-System zu einer Umsatzstagnation kommt, kann diese im TMS 12 durch Einsatz der ionischen Flüssigkeit und eines größeren Volumens an DMSO scheinbar aufgehoben werden. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit kann durch die Zunahme der Hydrophobizität im Reaktionsraum begründet werden, die die Affinität der ATA08 zum Substrat verringert. Nach zwei Stunden kann in allen drei Systemen kein steigender Umsatz mehr detektiert werden. Diese Beobachtung korreliert mit der abnehmenden Stabilität der ATA08 nach zwei Stunden in Abbildung 4-32, die offensichtlich auch auf das thermomorphe Lösungsmittelsystem übertragbar ist. Zusätzlich kam es nach einigen Stunden zur sichtbaren Aggregation der ATA08 im TMS 12 bei 40 °C. Daraufhin wurde die ATA08-vermittelte Reaktion bei 30 °C im TMS 12 wiederholt und zeigt ein ähnliches Verhalten. Bei 30 °C Reaktionstemperatur wurde zwar keine Aggregation des Enzyms beobachtet, jedoch geht die Reduktion der Temperatur auch mit einer Reduktion des Umsatzes von α -Methylbenzylamin einher, was auf eine Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstante hindeutet. Die Verteilung des Substrates und Produktes in den zwei Phasen des [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS ist in Schema 4-19 und die Verteilung des Enzyms in den Phasen in Abbildung A-39 dargestellt.



Schema 4-19. Verteilung des α -Methylbenzylamin und Acetophenon in den Phasen des [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS. (blau: wässrige Phase, gelb: IL-Phase)

Es wurde ein höherer Verteilungskoeffizient für das Produkt als für das Substrat ermittelt. Bei der sich anschließenden Aufarbeitung könnte daher das Acetophenon – nach Separierung der zwei Phasen des TMS 12 – zum großen Prozentsatz aus der ionischen Flüssigkeit destilliert werden. Das α -Methylbenzylamin kann in der wässrigen Phase mit Hilfe einer 10 kDa-Filters vom Enzym abgetrennt und weiter aufgearbeitet werden. Die ATA08 stünde einem weiteren Reaktionszyklus zur Verfügung. Damit würde im Vergleich zur Aufarbeitung aus einem klassischen 1PS bereits ein Extraktionsschritt gespart werden.

STEFFEN-MUNSERG et al. berichteten von einer Inaktivierung der ATA08 durch die Wahl nicht geeigneter Amin-Akzeptoren wie das Pyruvat. [Steffen-Munsberg et al. 2013; Steffen-Munsberg et al. 2015] Daher wurde als nächstes das strukturell ähnliche Aceton als Amin-Akzeptor und gleichzeitig als

Löslichkeitsvermittler in thermomorphe Lösungsmittelsysteme auf Grundlage der [EMIm][NTf₂]-NaPi(200 mM)-Mischung und anderer IL-Mischungen eingesetzt. Wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben, konnten keine praktikablen TMS auf Grundlage von 10-30% (v/v) IL mit 200 mM Natriumphosphat-Puffer entwickelt werden, da alle Trübungstemperaturen mit Zusatz von bis zu 30% (v/v) Aceton über 70 °C lagen. Daher wurde die Pufferkonzentration auf 50 mM reduziert und die in Tabelle 4-17 dargestellten TMS 13 und TMS 14 wurden für weitere Untersuchungen definiert.

Tabelle 4-17. Zusammensetzung der TMS 13 und TMS 14.

TMS 13	TMS 14
10% (v/v) [EMIm][NTf ₂]	20% (v/v) [N _{1112(OH)}][NTf ₂]
60% (v/v) NaPi (50 mM, pH 8,0)	70% (v/v) NaPi (50 mM, pH 8,0)
30% (v/v) Aceton	10% (v/v) Aceton
$T_{Tr} = 34^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 28^\circ\text{C}$

Das Ausbeute-Zeit-Diagramm der ATA08-vermittelten Reaktion von α -MBA in den TMS 13 und TMS 14 zeigt eine deutliche Einbuße des Umsatzes und ist wiederum vergleichbar mit der Reaktion im Natriumphosphat-Puffer (50 mM, pH 8,0) mit Zusatz von 0,2 M Aceton (Abbildung 4-34).

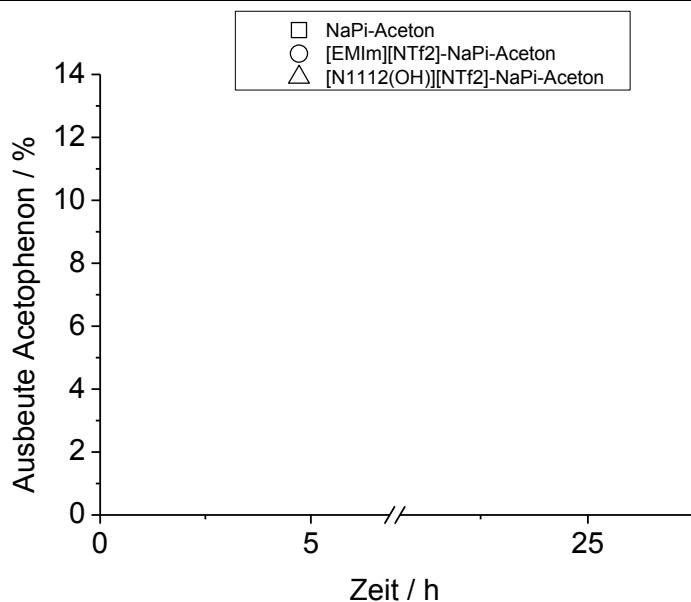


Abbildung 4-34. ATA08-vermittelte Reaktion von α -Methylbenzylamin in NaPi (50 mM) mit 0,2 mM Aceton, im [EMIm][NTf₂]-NaPi-Aceton-TMS und im [N_{1112(OH)}][NTf₂]-NaPi-Aceton-TMS bei 40 °C, 2 mM PLP. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)

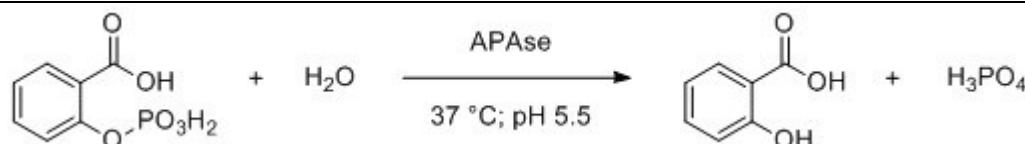
Schon nach fünf Minuten ist eine Stagnation des Substatumsatzes in allen Systemen zu erkennen und daher liegt der Schluss nahe, dass Aceton als Amin-Akzeptor für die ATA08 weniger geeignet ist.

4.2.3 Saure Phosphatase

Phosphatasen sind als Hydrolasen in die EC-Klasse 3 einzuordnen und katalysieren die Spaltung von Phosphatestern zu Phosphat und dem korrespondierenden Alkohol. Klassisch erfolgt die Einteilung der Phosphatasen nach ihrem *pH*-abhängigen Wirkungsoptimum in saure und alkalische Phosphatasen. Saure Phosphatasen (Abk.: APasen, engl.: acid phosphatases) zeigen ein ubiquitäres Vorkommen in allen lebenden Systemen und werden grob in pflanzliche und tierische APasen unterteilt. So unterschiedlich ihr Vorkommen ist, so hoch ist auch die Diversität in Bezug auf ihre biologische Funktion, ihr Substratspektrum, das Molekulargewicht, die DNA-Sequenz und die Struktur. [Duff et al. 1994; Bull et al. 2002; Wang et al. 2008] Die meisten Phosphatasen besitzen im aktiven Zentrum zwei Metallzentren, von denen eines ein Eisenion ist. [Rane et al. 2009; Schenk et al. 2013] Diese werden, aufgrund ihrer charakteristischen Farbe, als „purple“ Phosphatasen (Abk.: PAPasen) bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die enzymkatalysierten Testreaktionen in den thermomorphen Lösungsmittelsystemen die saure Phosphatase aus der Kartoffelknolle verwendet, welche ein monomeres Glykoprotein ist. [Olczak et al. 2003] Diese zeigt keine bis sehr geringe Präferenzen für bestimmte Substrate [Duff et al. 1994] und gehört daher zu den unspezifischen APasen [Alvarez 1962].

Literaturbekannt sind bisher nur Untersuchungen der alkalischen Phosphatase in wässrigen Gemischen der ersten ionischen Flüssigkeit $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$, die eine aktivierende Wirkung bei niedrigen Konzentrationen (1,1 M IL (10% (v/v)) zeigte. [Magnuson et al. 1984] Nachfolgend sollen daher erstmalig die entwickelten thermomorphen Lösungsmittelsysteme auf ihre Wirkung auf die Aktivität und Stabilität der sauren Phosphatase untersucht werden.

Die saure Phosphatase dephosphoryliert Verbindungen mit hohem Phosphatgruppen-Übertragungspotenzial [Anand und Srivastava 2012], daher wurde das 2-Carboxyphenylphosphat als Substrat für die enzymkatalysierte Reaktion gewählt (siehe Schema 4-20).



Schema 4-20. Modellreaktion der sauren Phosphatase.

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der sauren Phosphatase wurde zunächst der dekadische molare Extinktionskoeffizient für Salicylsäure bei $T = 25^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,5$ und $\lambda = 300 \text{ nm}$ bestimmt. Er beträgt $\epsilon_{300\text{nm}} = (3,491 \pm 0,003) \text{ l}/\text{mmol}/\text{cm}$. Die photometrisch ($\lambda = 300 \text{ nm}$) bestimmte volumetrische Aktivität der APase in 150 mM Natriumacetatpuffer gegenüber 2-Carboxyphenylphosphat (Abk.: 2-CPP) bei $T = 25^\circ\text{C}$ und $\text{pH} = 5,5$ ergibt $A_{\text{vol}} = (6,2 \pm 0,2) \text{ U}/\text{ml}$. Nach BRADFORD-Assay beträgt die spezifische Aktivität

$A_{spez} = (17,3 \pm 0,1)$ U/mg. Die temperaturabhängige Enzymaktivität der sauren Phosphatase verhält sich wie in Abbildung A-41 entsprechend ARRHENIUS. Bei 22 °C beträgt $A_{vol} = 4,5$ U/ml. Bei 30 °C konnte ein Aktivitätsmaximum von $A_{vol} = 9,8$ U/ml bestimmt werden und hat sich somit bei einer Temperaturerhöhung um 8 K verdoppelt. Bei Temperaturen über 30 °C sinkt dieser Wert wieder; dieses konnte bei den beiden vorangegangenen Enzymen CaLB und ATA08 erst bei 55 °C festgestellt werden. Bei Variation der pH-Werte ergeben die Messungen wiederum bei 30 °C ein Aktivitätsmaximum von 9,8 U/mg bei einem pH-Wert von 5,5 (siehe Abbildung A-41 rechts). Daher wurden für die Reaktionssysteme folgende Parameter festgelegt: $T = 30$ °C und $pH = 5,5$.

4.2.3.1 Reaktion von 2-Carboxyphenylphosphat mittels saurer Phosphatase

Die APase-katalysierte Dephosphorylierung des 2-Carboxyphenylphosphats wurde sowohl in reinem Natriumacetatpuffer (750 mM, pH 5,5) als auch im entwickelten TMS 15 (Tabelle 4-18) bei 37 °C und pH 5,5 durchgeführt.

Tabelle 4-18. Zusammensetzung des TMS 15.

TMS 15
50% (v/v) [BMIm][BF ₄]
50% (v/v) Natriumacetat-Puffer (750 mM, pH 5,5)
$T_{Tr} = 22$ °C

Es wurden zwei verschiedene Substratkonzentrationen ($c_1 = 3,65$ mM; $c_2 = 1,825$ mM) gewählt und die Reaktionen durch die Zunahme der entstehenden Salicylsäure bei $\lambda = 300$ nm photometrisch verfolgt. Abbildung 4-35 zeigt den Verlauf der Reaktionen im Vergleich.

Im linken Diagramm der Abbildung 4-35 ist gezeigt, dass der nach 15 Minuten erreichte Umsatz von 24,6% im reinen NaAc-Puffer und 12,5% des 3,65 mM 2-Carboxyphenylphosphats im TMS 15 nicht weiter gesteigert werden konnte. Das rechte Diagramm zeigt die Umsetzung von 1,825 mM 2-CPP in den Medien. Eine geringe Produktivitätssteigerung bei Erniedrigung der Substratkonzentration konnte sowohl im Natriumacetat-Puffer als auch im TMS 12 beobachtet werden. Diese Beobachtung widerspricht der Michaelis-Menten-Kinetik und lässt sich im ersten Ansatz nur durch eine Inhibition des Enzyms durch eine hohe Substratkonzentration erklären. Für weitere Untersuchungen sollte die Michaelis-Menten-Konstante K_M bestimmt werden, um eine Aussage über die Affinität der sauren Phosphatase zum 2-CPP und über den Einfluss der Medien treffen zu können. Darin liegen die Ansätze zur Optimierung dieses TMS.

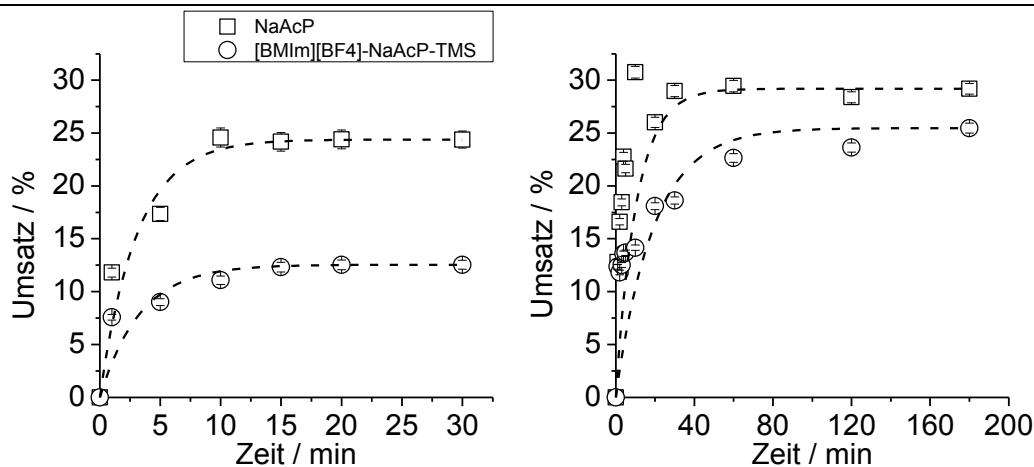


Abbildung 4-35. Umsatz-Zeit-Diagramme der photometrisch verfolgten Reaktionen von 2-Carboxyphenylphosphat (links: $c_1 = 3,65 \text{ mM}$; rechts: $c_2 = 1,825 \text{ mM}$) mittels saurer Phosphatase im Natriumacetatpuffer (750 mM , $pH = 5,5$) und im $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$ -NaAcP-TMS bei 37°C .

4.2.4 Alkoholdehydrogenasen

Die Alkoholdehydrogenasen (Abk.: ADH) gehören zur EC-Klasse 1.1.1. der Oxidoreduktasen. Sie sind die Biokatalysatoren der Wahl, wenn es um die Synthese chiraler Alkohole geht, da sie im Unterschied zu Racematspaltungen hohe Ausbeuten und ein breites Substratspektrum an prochiralen Ketonen oder Aldehyden ermöglichen. [Waldmann und Drauz 2002] Die Kristallstruktur, der katalytische Mechanismus und die molekularen Eigenschaften dieser Enzymgruppe sind bereits ausführlich untersucht und in der Literatur beschrieben worden. [Hummel und Kula 1989; Reid und Fewson 1994; Hummel 1997; Edenberg und Bosron 2010] In der Natur oxidieren diese Enzyme bspw. im Zuge des Alkoholabbaus in der Leber (Bsp.: horse liver alcohol dehydrogenase, Abk.: HL-ADH) die Umwandlung von Ethanol zu Acetaldehyd [Dalziel und Dickinson 1966; Ernst et al. 2005]. Umgekehrt wird Acetaldehyd mit Hilfe der ADH in der Hefe (engl.: yeast alcohol dehydrogenase, Abk.: Y-ADH) im letzten Schritt der alkoholischen Gärung zu Ethanol reduziert [Miroliaei und Nemat-Gorgani 2002]. Die Alkoholdehydrogenasen benötigen für ihre katalytische Wirkung die Nicotinamid-Cofaktoren β -1,4-Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) oder β -1,4-Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH), die als Redoxäquivalente fungieren und während der Reaktion in stöchiometrischen Mengen verbraucht werden. Sie sind ein wichtiger Kostenfaktor der Reaktion. [Kragl et al. 1996]

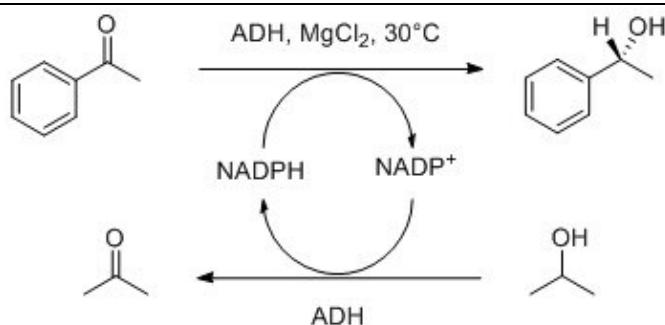
Um die Eignung der entwickelten thermomorphen Lösungsmittel als Medium für ADH-katalysierte Reaktionen zu untersuchen, wurden die drei erfolgreichsten TMS aus dem Kapitel 4.2.1 gewählt, an die Systembedürfnisse angepasst und nachfolgend diskutiert. (siehe Tabelle 4-19)

Tabelle 4-19. Modifizierte TMS (mTMS) für ADH-katalysierte Reaktionen.

mTMS 3	mTMS 9	mTMS 10
30% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	13% (v/v) Ammoeng TM 110	35% (v/v) $[BmIm][BF_4^-]$
55% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)	87% (v/v) KPi (950 mM, pH 7,0)	65% (v/v) NaPi (150 mM, pH 7,0)
15% (v/v) 2-Propanol		
$T_{Tr} = 29 \text{ }^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 29 \text{ }^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 22 \text{ }^\circ\text{C}$

4.2.4.1 Reduktion von Acetophenon mit Lb-ADH und Lk-ADH im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -TMS

Neben den eingangs erwähnten typischen Vertretern der ADHs wurden Mitte der 1990er auf der Suche nach neuen biotechnologisch interessanten Enzymen auch zwei hochaktive ADHs in Bakterien-Stämmen (*Lactobacillus brevis* und *Lactobacillus kefir*) gefunden. [Hummel 1997] Die *Lb*-ADH sowie die *Lk*-ADH sind NADPH- bzw. NADP- und Mg^{2+} -abhängige Alkoholdehydrogenasen mit (*R*)-spezifischer Aktivität [Niefind et al. 2000; Niefind et al. 2003]. Sie zeichnen sich durch hohe Selektivität (meist >99%) und hohe Stabilität gegenüber thermischer Inaktivierung und organischen Lösungsmitteln aus. Ihr Substratspektrum umfasst aliphatische und aromatische Ketone sowie β -Ketoester. [Schumacher et al. 2006; Tan et al. 2006] Die substratgekoppelte Cofaktorregenerierung durch 2-Propanol [Kragl et al. 1996; Wichmann und Vasic-Racki 2005] wurde im Zuge der TMS-Entwicklung auf elegante Weise gelöst, indem der Alkohol gleichzeitig als Phasenvermittler im mTMS 3 integriert wurde (vgl. Tabelle 4-19).

**Schema 4-21.** Modellreaktion der ADH.

Die Reduktion von Acetophenon diente als Modellreaktion (siehe Schema 4-21) und erzielte mittels *Lb*-ADH in reinem KPi (50 mM, pH 7,0) einen Umsatz von ~41% und mittels *Lk*-ADH ~65%. Bei gleichzeitiger Cofaktor-Regenerierung durch die Oxidation von 2-Propanol konnte mittels *Lk*-ADH im mTMS 3 ein Acetophenon-Umsatz von nahezu 94% erzielt werden. Damit steigerte sich die Effizienz des Enzyms durch die Anwesenheit von $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$. Im Vergleich dazu wurde bei der Reduktion von Acetophenon mit der *Lb*-ADH nur ein Umsatz von 23% erreicht (Abbildung 4-36). Die Stereoselektivität der beiden Enzyme beträgt >99,5% ee für den entstehenden chiralen Alkohol.

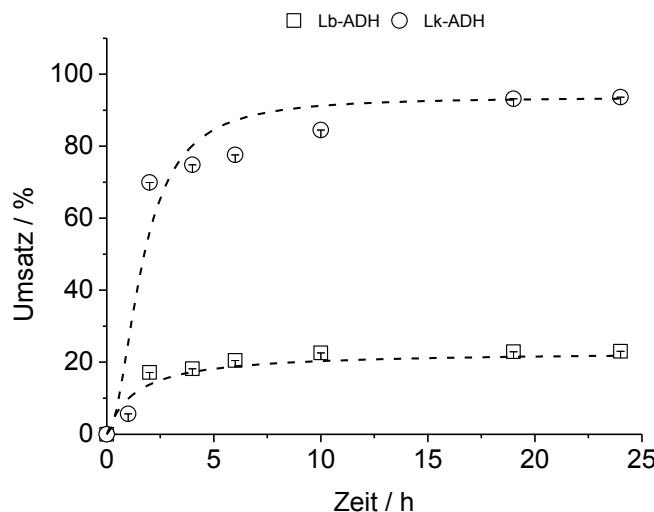
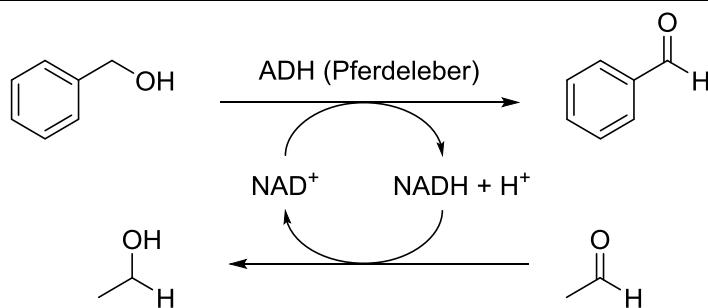


Abbildung 4-36. Umsatz-Zeit-Diagramm der enzymatischen Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels *Lb*-ADH und *Lk*-ADH im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Isopropanol-TMS (mTMS 3) bei 30 °C.

4.2.4.2 Die Oxidation von Benzylalkohol mit Pferdeleber-ADH in modifizierten TMS

Die Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase benötigt im Gegensatz zu den vorherigen ADHs aus Bakterienstämmen kein $MgCl_2$ und wurde in den modifizierten TMS 9 und 10 zur Oxidation von Benzylalkohol zu Benzaldehyd eingesetzt. Das Enzym verwendet NAD^+ als Cofaktor und die Regenerierung dessen wurde mittels Acetaldehyd realisiert (siehe Schema 4-22).



Schema 4-22. Enzymatische Oxidation von Benzylalkohol zu Benzaldehyd mittels Pferdeleber-ADH ($T = 40$ °C, pH 7,0).

Die Reaktion konnte in wässrigen Systemen bereits mit einem Umsatz von ca. 50% erfolgreich durchgeführt werden. Leider konnten unter den gewählten Reaktionsbedingungen im $[BMIm][BF_4]$ -TMS nur sehr geringe Umsätze erzielt werden und ein Denaturieren des Enzyms war zu erkennen. Vermutlich hat die IL hier einen ähnlich negativen Einfluss auf das Enzym wie der $[BMIm][PF_6]$ -IL bereits in Bezug auf ADHs nachgewiesen werden konnte. [Zhang et al. 2008b] Neben direkten Wechselwirkungen der IL mit der Pferdeleber-ADH kann im mTMS 10 auch eine veränderte Substrat- bzw. Produktsolubilität oder eine Veränderung des pH-Wertes ursächlich sein.

DREYER et al. beschrieben 2008 hingegen einen stabilisierenden Effekt der AmmoengTM110 gegenüber ADHs sowie eine Umsatzsteigerung in AmmoengTM110-basierten ATPS. [Dreyer und Kragl 2008] Die Reaktion im mTMS 9 ergab eine Umsetzung von ~92% des Benzylalkohols zum Benzaldehyd und damit ebenso eine Steigerung des Umsatzes um das 1,8-fache. (Abbildung 4-37)

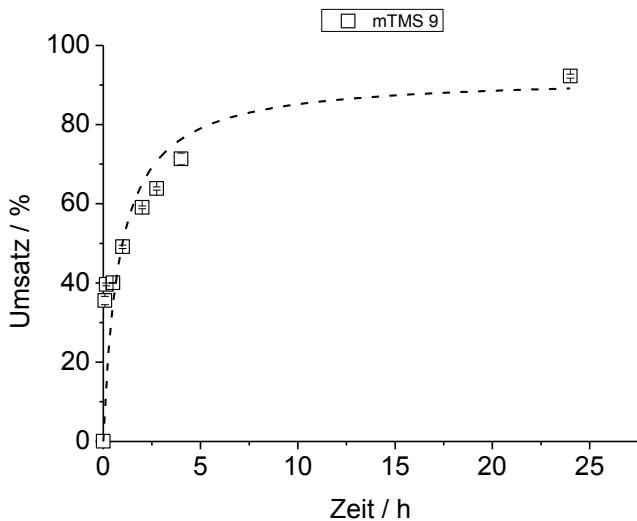


Abbildung 4-37. Pferdeleber-ADH-vermittelte Reaktion von 50 mM Benzylalkohol, 250 mM Acetaldehyd und $1,5 \cdot 10^{-6}$ M NAD⁺ im AmmoengTM110-KPi-TMS (mTMS 9) bei 30 °C.

4.2.5 Weitere Enzyme

4.2.5.1 Reaktion von Mandelonitril mit Hydroxynitril Lyase MeHNL

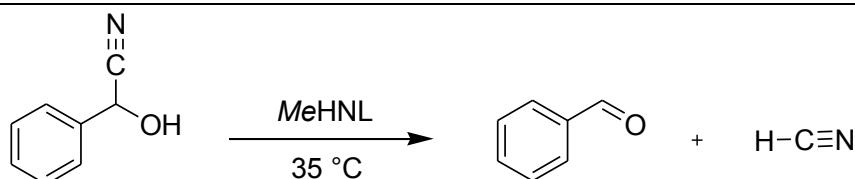
Die Hydroxynitril Lyase (Abk.: HNL) gehört zur Gruppe der Lyasen (E.C. 4) und katalysiert die reversible Spaltung von Cyanhydrinen zu Ketonen bzw. Aldehyden, wobei Blausäure frei wird (Schema 0-6). [Effenberger et al. 2000] In umgekehrter Richtung erfolgt die Synthesereaktion und ermöglicht den Aufbau von enantiomerenreinen Cyanhydrinen [Becker et al. 1965; Hasslacher et al. 1997; Langermann et al. 2008]. Ein wichtiger Vertreter innerhalb dieser Enzymgruppe ist die Hydroxynitril Lyase aus *Manihot esculenta* (MeHNL; EC 4.1.2.37). Obwohl noch nicht abschließend geklärt werden konnte aus wie vielen Komplexen dieses Enzym besteht [Hughes et al. 1994], so ist bekannt, dass eine einzelne Enzymuntereinheit aus 258 Aminosäuren aufgebaut ist und eine Molekulmasse von 28,5 kDa aufweist. [Ollis et al. 1992; Hughes et al. 1994] Die MeHNL ist als rekombinantes Protein in großen Mengen verfügbar, weist eine hohe Stereoselektivität und Prozessstabilität auf [McMahon et al. 1995; Lauble et al. 2002; Langermann et al. 2008], setzt sowohl Aldehyde als auch Ketone unter milden Bedingungen mit hohen Reaktivitäten um [Förster et al. 1996; Wajant und Effenberger 1996; Bühler et al. 2000] und konnte daher bereits in der Herstellung von Produkten für die Pharmazie und Landwirtschaft im Tonnenmaßstab eingesetzt werden. [Persson et al. 2002; Schmid et al. 2002; Wisdom 2007; von

Langermann und Wapenhensch 2014] Neben den genannten Vorteilen ist die MeHNL auch FAD-unabhängig und katalysiert vor allem die Umsetzung von sperrigen und großen Substraten zu Cyanhydrinen, was sie zu einem geeigneten Kandidaten für die Reaktion in den thermomorphen Lösungsmittelsystemen macht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die MeHNL unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln neben der gesteigerten Löslichkeit der Substrate auch erhöhte Stabilität sowie Umsätze zeigt. [Langermann et al. 2007] Daher konnten die Zusammensetzungen der TMS wie in Tabelle 4-20 gewählt werden.

Tabelle 4-20. Zusammensetzung der TMS 16 und TMS 17.

TMS 16	TMS 17
28,5% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	28,5% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$
60% (v/v) Citronensäure-Puffer (50 mM, pH 5,5)	60% (v/v) Citronensäure-Puffer (50 mM, pH 5,5)
11,5% (v/v) Acetonitril	11,5% (v/v) 1,4-Dioxan
$T_{Tr} = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{Tr} = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$

Als Testreaktion wurde die Umsetzung von 67 mM Mandelonitrit zum Benzaldehyd mittels 3 U/ml MeHNL gewählt. Das Enzym arbeitet in einem pH-Bereich von ca. 3-6, wobei laut PERSSON et al. das Optimum bei 5,5 liegt und daher auch für die Reaktion festgelegt wurde. Aufgrund der Feineinstellung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme konnte die Reaktion bei 35 °C nahe des Temperaturoptimums durchgeführt werden, da die Trübungstemperaturen der beiden TMS unterhalb dieser Marke liegen. [Persson et al. 2002]



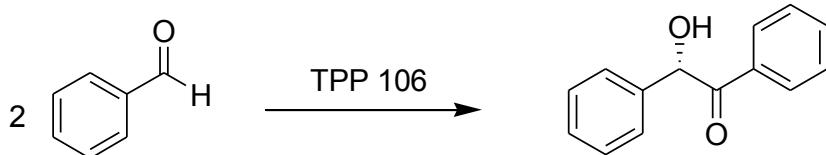
Schema 4-23. Reaktion von Mandelonitrit zu Benzaldehyd und Blausäure mittels MeHNL bei 35 °C und pH 5,5.

Leider konnte weder photometrisch ($\lambda = 280\text{ nm}$) noch gaschromatographisch (nach Derivatisierung der Probe mit TFAA, Pyridin in MTBE) ein Umsatz in den thermomorphen Lösungsmittelsystemen detektiert werden.

4.2.5.2 Reaktion von Benzaldehyd mit Lyase TPP 106 im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -TMS und $[EMIm][NTf_2]$ -TMS

TPP-Enzyme gehören wie die HNLs zur Klasse der Lyasen (E.C. 4.) und katalysieren sowohl die Bildung als auch die Spaltung von C-C Bindungen zwischen Carbonylverbindungen (Schema 4-24). Sie nutzen

dabei Thiamin Pyrophosphat (TPP) als Cofaktor, welcher den Enzymen Ihren Namen gibt. [Hawkins et al. 1989] Das TPP 106 (E.C. 4.1.2.38) setzt beispielsweise Benzaldehyd (*R*)-selektiv zu Benzoin um, welches im Vergleich zur herkömmlichen Cyanid-katalysierten Addition eine ungefährliche Alternative darstellt [Stetter 1976] und ein interessantes Zwischenprodukt für die chemische und pharmazeutische Industrie generiert. [Hoyos et al. 2006; Yadav und Kadam 2012]



Schema 4-24. Reaktion von Benzaldehyd zu (*R*)-Benzoin mittels TPP 106 bei 30 °C und pH 7,5.

Im Hinblick auf die Aufarbeitung wurde die Umsetzung zum Benzoin gewählt, da dieser als Feststoff vereinfacht von der Reaktionslösung abgetrennt werden kann. Die photometrischen Untersuchungen zur Temperatur- und pH-Abhängigkeit des TPP106 ergaben die in Abbildung A-42 dargestellten Ergebnisse. Das erste thermomorphe Lösungsmittelsystem TMS 18 für die Reaktion wurde so eingestellt, dass es mit einem 50 mM Kaliumphosphat-Puffer sowie 0,8 mM MgCl₂ beim pH-Optimum von 7,5 arbeitet und unterhalb des Temperaturoptimums von 30 °C schaltbar ist. DEMIR et al. berichteten 2002 von einer Umsatz- und Reinheitssteigerung durch Einsatz eines Puffer-DMSO-Mediums (50 mM KPi mit 2,5 mM MgCl₂, pH 7,0) [Demir et al. 2002], so dass als zweites Medium für die TPP-vermittelte Reaktion ein TMS mit hohen Anteilen an IL, Puffer und DMSO getestet wurde (TMS 19). Die Zusammensetzungen der resultierenden TMS sind in Tabelle 4-21 dargestellt.

Tabelle 4-21. Zusammensetzung der TMS 18 und TMS 19.

TMS 18	TMS 19
20% (v/v) [N _{1112(OH)}][NTf ₂]	35,75% (v/v) [EMIm][NTf ₂]
69% (v/v) KPi mt MgCl ₂ (50 mM, pH 7,5)	32,125% (v/v) KPi mit MgCl ₂ (50 mM, pH 7,5)
11% 1,4-Dioxan (v/v)	32,125% (v/v) DMSO
T _{Tr} = 26 °C	T _{Tr} = 22 °C

In beiden Reaktionssystemen TMS 18 und 19 konnte die Abnahme des Benzaldehyds sowie die Zunahme des Benzoins photometrisch sowie via GC und HPLC detektiert werden. Jedoch konnte keine eindeutige quantitative Aussage getroffen werden und bedarf daher weiterer Untersuchungen.

4.2.5.3 Oxidation von ABTS mit Laccase Novozym® 51003

Laccasen (E.C. 1.10.3.2) sind Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 50-130 kDa, zählen zu den Oxidoreduktasen mit vier Kupfer-Ionen im aktiven Zentrum und katalysieren Reaktionen unter Einbeziehung der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. [Morozova et al. 2007] Sie zeigen ein großes Potenzial für die Synthese wertvoller Zwischenprodukte für Pharmaka oder Naturstoffe. [Witayakran et al. 2007; Ncanana et al. 2007; Jeon et al. 2012] und werden bereits in industriellen Prozessen wie der Abwasseraufbereitung oder dem Bleichen von Zellstoff und Papier eingesetzt. [Rodríguez Couto und Toca Herrera 2006; Fernández-Fernández et al. 2013] Laccasen haben in den letzten Jahren aufgrund ihres breiten Substratspektrums auch zunehmend Interesse in der organischen Synthese geweckt. Im Sinne der grünen Chemie erlaubt diese Enzymklasse die biokatalytische Oxidation von Homo- und Heterokupplungen unter definierten Bedingungen, wobei nur Sauerstoff als Oxidationsmittel benötigt wird und Wasser als Nebenprodukt entsteht. [Roduner et al. 2013; Abdel-Mohsen et al. 2014]

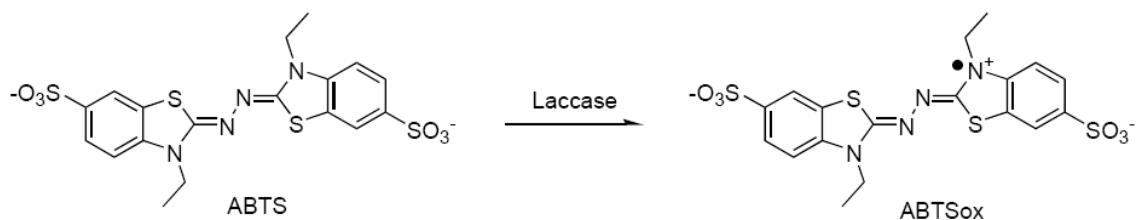
Nach weitreichenden Untersuchungen der Laccase in Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln sowie Wasser und ionischen Flüssigkeiten [Mozhaev et al. 1989; Hinckley et al. 2002; Shipovskov et al. 2008], fanden ILLNER et al. 2014, dass die Laccase sogar in Gegenwart von bis zu 90% (v/v) Methanol stabil ist [ILLNER et al. 2014], was sie zu einem geeigneten Kandidaten für die thermomorphen Lösungsmittelsysteme unter Nutzung organischer Lösungsmittel macht. Die drei nachfolgenden TMS sollten auf ihre Eignung als Medium für die Laccase-katalysierte Oxidationsreaktion untersucht werden (Tabelle 4-22).

Tabelle 4-22. Zusammensetzung der TMS 20 bis TMS 22 für die Laccase-katalysierte Oxidationsreaktion.

TMS 20	TMS 21	TMS 22
27% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	27% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	27% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$
55% (v/v) Phosphat-Citrat-Puffer (50 mM, pH 4,0)	55% (v/v) Phosphat-Citrat-Puffer (50 mM, pH 4,0)	55% (v/v) Phosphat-Citrat-Puffer (50 mM, pH 4,0)
18% (v/v) Methanol	18% (v/v) Acetonitril	18% (v/v) 1,4-Dioxan
$T_{Tr} = 27 \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 28 \text{ } ^\circ\text{C}$	$T_{Tr} = 24 \text{ } ^\circ\text{C}$

Die drei entwickelten TMS folgen dem UCST-Verhalten und ihre Trübungstemperaturen liegen alle unter 30 °C, so dass die Testreaktion bei 30 °C unter homogenen Bedingungen durchgeführt werden kann. Die Zugabe des Substrates (5 mM ABTS) machte bei allen drei TMS einen Temperaturunterschied von +1 K aus. Die Testreaktion für die Laccase-katalysierte Untersuchung in den thermomorphen Lösungsmittelsystemen wurde an den Standardassay von ROY-ARCAND et. al. [Roy-Arcand und Archibald

1991] angelehnt. Bei dieser Methode wird die Aktivität des Enzyms photometrisch ($\lambda = 420 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 60 \text{ s}$) durch die Oxidation des Farbstoffes 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)Diammoniumsalz (ABTS) zu dessen intensiv blaugrün gefärbten kationischen Radikal (ABTS_{ox}) bestimmt (Schema 4-25).



Schema 4-25. Laccase-vermittelte Oxidation von ABTS bei 30 °C.

Die Aktivitätsbestimmung der Laccase in den drei TMS erwies sich als schwierig. Zwar kam es beim Zusammensetzen der Komponenten zur Reaktion, welche durch eine intensive Grünfärbung angezeigt wurde, jedoch konnte diese nicht photometrisch verfolgt werden. Bei dem recht hohen Anteil von 27% (v/v) an $[\text{N}_{1112}(\text{OH})][\text{NTf}_2]$ in den TMS-Lösungen lässt sich eine verstärkte Streuung des durchstrahlten Lichtes im UV/Vis-Spektrometer vermuten, die den regulären Anstieg der Extinktion im Reaktionsverlauf überdeckt. Zudem konnte im weiteren Verlauf der Reaktion eine Entmischung der Phasen bei 30 °C beobachtet werden und das Aufsteigen der Grünfärbung in die obere Phase. Es ist also zu erwarten, dass sich das Produkt der Testreaktion zusammen mit der Laccase vorzugsweise im Wässrigen verteilt, was den eigentlichen TMS-Vorteil der Aufarbeitung aus verschiedenen Phasen verhindert. Darüber hinaus wird durch die Entmischung wieder eine Phasengrenze während der Reaktion generiert, die mit einer Stofftransportlimitierung einhergeht.

Aufgrund der Tatsache, dass die Reaktion scheinbar stattfindet, aber via UV/VIS im IL-basierten TMS nicht verfolgt werden kann, wurde zusätzlich die ATR-IR-Messtechnik herangezogen, die zur Untersuchung von undurchsichtigen Lösungsmittelgemischen geeignet ist. [Fahrenfort 1961; Cha et al. 2014] Im Fingerprint-Bereich ($<1500 \text{ cm}^{-1}$) lassen sich allerdings bereits so viele Schwingungen der Ionenischen Flüssigkeit nachweisen (Abbildung A-43), dass diese die charakteristischen C-C-Schwingungen des Substrates und Produktes der Testreaktion überlagern.

Daher können bis dato keine genauen Aussagen über den Verlauf der Laccase-katalysierten Reaktion in IL-basierten thermomorphen Lösungsmitteln getroffen werden und bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neuartige Lösungsmittelsysteme auf Basis von wässrigen Lösungen, ionischen Flüssigkeiten (Abk.: IL) oder organischen Lösungsmitteln mit einem *UCST*-Verhalten (*upper critical solution temperature*) entwickelt und erfolgreich als Medium enzymkatalysierter Reaktionen eingesetzt werden.

Der erste Teil der Arbeit konzentrierte sich dabei auf die Entwicklung der thermomorphen Lösungsmittelsysteme (Abk.: TMS) im geeigneten Temperaturintervall für die Biokatalyse. Dabei wurde ein Cross-Screening von 30 organischen Lösungsmitteln und 40 ionischen Flüssigkeiten in der Mischung mit Wasser und Puffersalzen durchgeführt. Es konnten zwei Systeme auf Grundlage von organischen Lösungsmitteln sowie 14 Systeme auf Grundlage von ionischen Flüssigkeiten gefunden und näher charakterisiert werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Einfluss von Löslichkeitsvermittlern, Substraten sowie eines Modellproteins auf das Phasenverhalten der thermomorphen Lösungsmittelsysteme (Kapitel 4.1). Neben der gezeigten Vielseitigkeit dieser alternativen Lösungsmittelsysteme sollte auch der Beweis für einen (vergleichbar) hohen Umsatz, eine vereinfachte Aufarbeitung der Produkte sowie für die Rezyklierbarkeit des Biokatalysators erbracht werden.

Daher wurden im zweiten Teil der Arbeit diese thermomorphen Lösungsmittelsysteme als Medium für ausgewählte enzymkatalysierte Reaktionen eingesetzt. Im Mittelpunkt der Betrachtungen stand der Vergleich der Aktivität, Stabilität und Selektivität der *Candida antarctica* Lipase B (Abk.: CaLB) in den TMS mit gängigen Lösungsmittelsystemen. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur hohe Umsätze mit enantiomerenreinen Produkten in vielen TMS erzielt werden können, sondern auch die bis zu fünffache Rezyklierung des Biokatalysators gegeben ist. Insbesondere die Ammonium-basierten IL-TMS 9 und 10 zeigten dabei herausragende Reaktionsgeschwindigkeiten in Gegenwart hoher IL-Konzentrationen. Dahingegen konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz organischer Solventien als Löslichkeitvermittler die Stabilität der CaLB im Vergleich zu reinen IL-Puffer-Systemen verringert (Kapitel 4.2.1).

Neben den vielversprechenden Ergebnissen der Lipase im Hinblick auf den Einsatz von thermomorphen Lösungsmittelsystemen wurde die Untersuchung auf die Enzyme Transaminase ATA08, saure Phosphatase aus der Kartoffel, Alkoholdehydrogenasen (Abk.: ADH) aus *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* und der Pferdeleber, Hydroxynitrillyase aus *Manihot esculenta*, Lyase TPP 106 sowie Laccase Novozym® 51003 erweitert. Es konnten sowohl Umsatzsteigerungen als auch Umsatzeinbußen mit den genannten Enzymen in den verschiedenen TMS beobachtet werden (Kapitel 4.2.2 bis 4.2.5). Zudem konnte gezeigt werden, dass ADHs in Gegenwart von Ammonium-basierten IL-TMS stabilisiert und in Gegenwart von Imidazolium-basierten IL-TMS destabilisiert werden (Kapitel 4.2.4).

Der eindeutige Vorteil der Reaktionsführung im TMS liegt jedoch in der anschließenden Aufarbeitung: durch die temperaturabhängige Separation der Phasen sowie die selektive Verteilung von Produkt und Enzym kann im Vergleich zum klassischen Einphasensystem bereits ein Extraktionsschritt gespart werden. Der Biokatalysator kann zudem ohne großen Aufwand wiederverwendet werden (Kapitel 4.2.1). Damit ist es gelungen ein aktivitäts- und stabilitätssteigerndes Reaktionssystem einschließlich hervorragender Löslichkeit der Substrate und Enzyme mit einem biokompatiblen Extraktions- und Rezyklierungsprozess zu kombinieren.

Zusätzlich zu den thermomorphen Lösungsmittelsystemen wurden zehn reaciomorphe Lösungsmittelsysteme (Abk.: RMS) für die Lipase-katalysierte Umsetzung von 1-Phenylethylacetat sowie zwei RMS für die Phosphatase-katalysierte Umsetzung von 2-Carboxyphenylcarbonat entwickelt und bezüglich des Umsatzes sowie der Entstehung eines heterogenen Phasensystems untersucht (Kapitel A.4). Dabei konnten zwar die gewünschten Produkte generiert, jedoch nicht die Phasenseparation im erwarteten Temperaturbereich nachgewiesen werden.

Die vorgestellte Arbeit zeigt das große Potenzial und die Flexibilität der IL-basierten thermomorphen Lösungsmittelsysteme als alternative Lösungsmittel für die Biokatalyse. Aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen ergeben sich noch verschiedene Ansatzpunkte für zukünftige Untersuchungen:

Der Einsatz thermophiler Enzyme in den thermomorphen Lösungsmittelsystemen wäre bspw. denkbar. Die mit der Erhöhung der Reaktionstemperatur einhergehende mögliche Verschiebung der UCST könnte zur volumetrischen Reduktion von Löslichkeitsvermittlern und Erhöhung der Substratkonzentration im TMS führen. Eine Erhöhung des IL-Gehalts könnte sich zudem positiv auf die Stabilität des Enzyms und den Umsatz auswirken.

Weiterhin könnte das Repertoire an geeigneten ionischen Flüssigkeiten erweitert werden. Eine wesentliche Triebkraft für die Auswahl der IL sollte der Wunsch nach einem verbesserten, umweltfreundlicheren Verfahren sein. In dieser Arbeit dominieren ILs mit $[BF_4^-]$, $[PF_6^-]$ und $[NTf_2^-]$ -Anionen, jedoch ist die Handhabung von Salzen halogenierter Anionen in größeren Mengen oft problematisch, da beispielsweise $Na[BF_4]$ und $Na[PF_6]$ korrosiv sind und $Li[NTf_2]$ als toxisch eingestuft wurde. Die Entsorgung fluorhaltiger ILs wird erschwert durch die Tatsache, dass bei der Verbrennung durch thermische Zersetzung Fluorwasserstoff (HF) entsteht und die Anionen in der Regel nicht biologisch abgebaut werden können.⁸ Wegen ihres geringen Dampfdrucks emittieren die ILs zwar selbst keine gefährlichen Gase in die Umwelt, dennoch können sie beim Eintrag in den Boden oder Gewässer große

⁸ Auch die Herstellung von bspw. $[BMIM][BF_4]$ ist kein ökonomisches und umweltfreundliches Verfahren. Es werden erhebliche Mengen an Energie und Lösungsmittel wie Aceton und Ethylacetat benötigt. [Zhang et al. 2007]

Schäden anrichten. Insbesondere hydrophobe ionische Flüssigkeiten besitzen eine ausgeprägte Toxizität für aquatische Mikroorganismen. [Freire et al. 2007; Stolte et al. 2007] Dies würde den Produktionsprozess und die Entsorgung der halogenhaltigen ionischen Flüssigkeiten im technischen Maßstab schwierig gestalten und zu hohen Investitionskosten führen. Nur bei einer sehr hohen Wertschöpfung im Prozess oder einer effizienten Rezyklierung der IL im TMS wäre der Einsatz dieser Verbindungen im größeren Maßstab wirtschaftlich sinnvoll. Die Übertragung der hier gezeigten Versuche auf einen halbtechnischen Maßstab (1-2 l Satzreaktor) und eine Ökoeffizienzanalyse wären daher ein erster Ansatz. Um die genannten Limitierungen der halogenhaltigen ionischen Flüssigkeiten zu überwinden, könnte der Einsatz halogenfreier Systeme untersucht werden. Beispiele für unbedenkliche Kationen sind das in dieser Arbeit genutzte Cholin-Kation, das für die biologische Abbaubarkeit entwickelte 3-Methyl-1-(propyloxycarbonyl)imidazolium-Kation [Gathergood et al. 2006] und ionische Flüssigkeiten auf Basis von Aminosäuren. [Fukumoto et al. 2005; Tao et al. 2006; Qian et al. 2017]

Ein weiterer Ansatz für ein nachhaltiges Lösungsmittelsystem wäre die vereinfachte Aufarbeitung und vollständige Rezyklierbarkeit⁹ der eingesetzten Komponenten. Neben der in dieser Arbeit vorgestellten chromatographischen und destillativen Abtrennung der Edukte und Produkte sind noch eine Reihe moderner Methoden möglich. Die Extraktion der nichtflüchtigen organischen Verbindungen aus der ionischen Flüssigkeiten könnte bspw. mit überkritischem Kohlendioxid, Mikrowellen oder Ultraschall erleichtert werden. [Blanchard et al. 1999; Dai et al. 2013] Magnetische ionische Flüssigkeiten sind zwar schwermetallhaltig und demnach ebenso umweltbedenklich, ließen sich jedoch mit Elektromagneten aus dem thermomorphen Reaktionssystem entfernen. [Pimerzin 2011; Santos et al. 2014] Des Weiteren könnten ionische Flüssigkeiten, die bei Raumtemperatur fest sind, durch Umkristallisation wieder aufgereinigt werden. [Wasserscheid und Welton 2008b]. Einen produkt schonenderen Prozess der Rezyklierung stellten WELLNER et al. 2015 mit der effizienten Entwässerung ionischer Flüssigkeiten in einem Fallfilmverdampfer vor. [Wellner et al. 2015]

⁹ Rezyklierte ionische Flüssigkeiten werden bereits für verschiedene organische Reaktionen eingesetzt, bspw. für Hydroformylierungen, Carbonylierungen, selektive Hydrierungen oder Oligomerisierungen. [Earle et al. 1999; Clarke et al. 2004; Haumann und Riisager 2008; Wang et al. 2015; Hajipour und Rafiee 2015; Vafaeenezadeh und Alinezhad 2016]

A Anhang

A.1 Material

A.1.1 Verwendete Chemikalien und Biokatalysatoren

Tabelle A-1. Übersicht verwendeter ionischer Flüssigkeiten.

Systematischer Name	Abkürzung	Herstellung
<i>N,N,N-trimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammonium-bis(trifluormethansulfonyl)imid</i>	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]	lolitec
<i>N-ethyl-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammonium-bis(trifluormethansulfonyl)imid</i>	[N _{1122(OH)}][NTf ₂]	Synthese Kapitel A.2.4
<i>N-propyl-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammonium-bis(trifluormethansulfonyl)imid</i>	[N _{1132(OH)}][NTf ₂]	Synthese Kapitel A.2.4
<i>N-butyl-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammonium-bis(trifluormethansulfonyl)imid</i>	[N _{1142(OH)}][NTf ₂]	Synthese Kapitel A.2.4
<i>N-pentyl-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammonium-bis(trifluormethansulfonyl)imid</i>	[N _{1152(OH)}][NTf ₂]	Synthese Kapitel A.2.4
Dimethylammoniumdimethylcarbamat	[N ₁₁₀₀][DMC]	Sigma-Aldrich
Triethylammoniumhydrogensulfat	[N ₂₂₂₀][HSO ₄]	Synthese Kapitel A.2.4
Cocosalkylpentaethoxymethylammoniummethylsulfat	Ammoeng™100	Solvent Innovation GmbH
Cocosalkylpentaethoxymethylammoniumchlorid	Ammoeng™101	Solvent Innovation GmbH
Cocosalkylpentaethoxymethylammoniummethylsulfat	Ammoeng™102	Solvent Innovation GmbH
quaternäres Ammoniumchlorid	Ammoeng™110	lolitec
Poly[oxy(methyl-1,2-ethanediyl)]-alpha-[2-diethylhydroethylammonio]ethyl]-acetat	Ammoeng™111	Solvent Innovation GmbH
Poly-[oxy(methyl-1,2-ethanediyl)]-alpha-[2-(diethylhydroxy- ethylammonium)ethyl]-dihydrogenphosphat	Ammoeng™112	Solvent Innovation GmbH
quaternäres Ammoniumsulfat	Ammoeng™120	Solvent Innovation GmbH
1-Octadecanaminium, <i>N,N</i> -dimethyl- <i>N</i> -octadecyl-chloride (1:1)	Ammoeng™130	Solvent Innovation GmbH
1-Ethyl-3-methylimidazoliumbis(trifluormethansulfonyl)imid	Ammoeng™520 [EMIm][NTf ₂]	Solvent Innovation GmbH IoLiTec
1-Ethyl-3-methylimidazoliummethylsulfat	[EMIm][EtSO ₄]	Sigma-Aldrich
1-Ethyl-3-methylimidazoliumbromid	[EMIm][Br]	Solvent Innovation GmbH
1-Ethyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat	[EMIm][BF ₄]	Solvent Innovation GmbH
1-Butyl-3-methylimidazoliumbis(trifluormethansulfonyl)imid	[BMIm][NTf ₂]	Solvent Innovation GmbH

1-Butyl-3-methylimidazoliummethylsulfat	[BMIm][MeSO ₄]	Sigma-Aldrich
1-Butyl-3-methylimidazoliumdimethylsulfat	[BMIm][Me ₂ SO ₄]	Sigma-Aldrich
1-Butyl-3-methylimidazoliumdimethylphosphat	[BMIm][Me ₂ PO ₄]	Sigma-Aldrich
1-Butyl-3-methylimidazoliumphosphat	[BMIm][Phos]	Synthese Kapitel A.2.4
1-Butyl-3-methylimidazoliumtrimethylphosphat	[BMIm][Tmp]	Synthese Kapitel A.2.4
1-Butyl-3-methylimidazoliumbromid	[BMIm][Br]	IoLiTec
1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid	[BMIm][Cl]	Solvent Innovation GmbH
1-Butyl-3-methylimidazoliumnitrat	[BMIm][NO ₃]	IoLiTec
1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat	[BMIm][BF ₄]	IoLiTec
1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat	[BMIm][PF ₆]	Sigma-Aldrich
1-Methyl-3-pentylimidazoliumhexafluorophosphat	[MPIm][PF ₆]	Sigma-Aldrich
1-Methyl-3-octylimidazoliumchlorid	[MOlm][Cl]	IoLiTec
1-Decyl-3-methylimidazoliumchlorid	[DMIm][Cl]	IoLiTec
1-Ethyl-3-Methylimidazoliumdimethylphosphat	Ecoeng 2111P	Solvent Innovation GmbH
1-Ethyl-3-Methylimidazoliummethansulfonat	Ecoeng 110	Sigma-Aldrich
Vinylethylimidazoliumlactat	ViEtImLac	Arbeitsgruppe KRAGL
Vinylbutylimidazoliumlactat	ViBuImLac	Arbeitsgruppe KRAGL
1-Butylpyridiniumtetrafluoroborat	[BPy][BF ₄]	IoLiTec
1-Butyl-1-butylpyrrolidiniumtrifluormethylsulfonyl	[BMPy][OTf]	Arbeitsgruppe WELTON

Tabelle A-2. Übersicht verwendeter Enzyme.

Protein	Hersteller
<i>Lactobacillus brevis</i> Alkoholdehydrogenase	Jülich Fine Chemicals
<i>Lactobacillus kefir</i> Alkoholdehydrogenase	evocatal
Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich
Laccase from <i>Myceliphthora thermophila</i> (Novozym® 51003)	Novozymes
Transaminase ATA08	Enzymicals
Amano Lipase PS	Aldrich
Amano CA Lipase	Jülich Chiral Chemicals
Lipase TL	Meito Sangyo Co., LTD
<i>Candida antarctica</i> Lipase B Lipozym	Cognis
<i>Candida antarctica</i> Lipase B liquid	c-lecta

<i>Candida antarctica</i> Lipase B powder	Sigma
<i>Candida antarctica</i> Lipase B Novozym® 435	Novozymes
Saure Phosphatase from potato	Roche
Hydroxynitril Lyase	evoxx
Lyase TPP 106	evocatal

Tabelle A-3. Übersicht verwendeter Hilfschemikalien.

Substanz	Art	Hersteller
Bradford-Solution	-	AppliChem
PreCast Gel®	4%-12%- BisTris	NuPAGE®
LDS Probenpuffer	4-fach konzentriert	NuPAGE®
MES-SDS Laufpuffer	20-fach konzentriert	NuPAGE®
Novex®, SeeBlue™	Protein-Standard	NuPAGE®
SimplyBlue™ SafeStain	-	NuPAGE®

A.1.2 Verwendete Geräte

Tabelle A-4. Übersicht verwendeter Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Gaschromatograph	Trace 1310 Series GC	Thermo
Nuklearmagnetresonanzspektroskop	AVANCE 250 II AVANCE 300 III AVANCE 500	Bruker
ATR-Infrarotspektroskop	Nicolet 380 FT-IR	Thermo Electronic Corporation
Pipetten	10-100 µl, 100-1000 µl 1000-5000 µl	Eppendorf
UV/Vis-Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena
pH-Messgerät	WTW pH 320 mit Elektrode SenTix 81	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten
Karl Fischer-Coulometer	831 KF Coulometer	Metrohm
Messgerät Wasseraktivität	AW SPRINT TH-500	Novasina
Kryostat	Compatible Control CC1	Huber
Rotationsverdampfer	Laborota 4001	Heidolph
Vakuumpumpe	5 Rv5	Edwards

Ultraschallgerät	Sonorex TK 52	Bandelin
Thermoschüttler	Thermomixer	Eppendorf
Waage	BP 121 S	Sartorius
Gelelektrophoreseeinheit	Vertical Mini-Gel System	Sigma
Mikrowelle	MARS Xpress	CEM
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf
Tischzentrifuge	MINI CENTRIFUGE C-1200	National Labnet Co.
Vortex	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Refraktometer	r ² mini Handheld Refractometer	Reichert

A.2 Methoden

A.2.1 NMR Messungen

Die ¹H-NMR-Spektren (250,13 MHz; 300,13 MHz; 500,13 MHz) und die ¹³C-NMR-Spektren (62,89 MHz; 75,47 MHz; 125,76 MHz) wurden mit Geräten der Firma BRUKER (AVANCE 250 II, AVANCE 300 III und AVANCE 500) bei 20 °C gemessen. Ca. 20 mg Probe wurden in 600 µl entsprechendem Lösungsmittel gelöst. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in ppm angegeben und sind auf die Lösungsmittelsignale (DMSO: δ ¹H = 2,50 ppm, δ ¹³C = 39,5 ppm; CDCl₃: δ ¹H = 7,27 ppm, δ ¹³C = 77,0 ppm; MeOD: δ ¹H = 3,31 ppm, δ ¹³C = 49,15 ppm) kalibriert. Die verwendeten NMR-Geräte sowie die Lösungsmittel sind bei den analytischen Daten der einzelnen Verbindungen angegeben. Die Auswertung der ¹H-NMR-Spektren erfolgte nach den Regeln für Spektren erster Ordnung.

A.2.2 Gaschromatographische Messungen

Die gaschromatographischen Messungen wurden mit dem Trace 1310 Series GC von Thermo durchgeführt. Die Kalibrierung für die Bestimmung der jeweiligen Probenkonzentrationen erfolgte über entsprechende Verdünnungsreihen und wurde in regelmäßigen zeitlichen Abständen wiederholt. Die resultierenden Peakflächen wurden zur Auswertung gegen die Konzentration aufgetragen.

Säulenparameter: CP Chirasil Dex CB (Länge: 25 m, Innendurchmesser: 0,25 mm)

Column Part No.:	CP7502
Column Serial No.:	1023871
Retentionsfaktor k (<i>n</i> -Tridecan)	5,9
Theoretische Bodenzahl (<i>n</i> -Tridecan)	107349 > 93325
Theoretische Bodenzahl pro Meter (<i>n</i> -Tridecan)	4294
Schichtdicke	0,25 µm
Phasenverhältnis	250,3
AS10 Tailing factor ((2S, 3S)-(+)-2,3-Butanediol)	1,53 < 2,20
Lineare Gasgeschwindigkeit	31,9 cm s ⁻¹

A.2.2.1 Verwendete Methoden des GC

Die zur Messung entwickelten Methoden sind nachfolgend tabellarisch zusammengefasst.

Ofen-Methode zur Analyse der CaLB-Reaktionen

Initial temperature	60,0 °C
Initial hold time	0,00 min
Number of ramps	3
Ramp 01 rate	10,0 °C min ⁻¹
Ramp 01 final temperature	110,0 °C
Ramp 01 hold time	2,00 min
Ramp 02 rate	10,0 °C min ⁻¹
Ramp 02 final temperature	130,0 °C
Ramp 02 hold time	2,00 min
Ramp 03 rate	10,0 °C min ⁻¹
Ramp 03 final temperature	160,0 °C
Ramp 03 hold time	1,00 min

Ofen-Methode zur Analyse der ATA08-Reaktionen

Initial temperature	90,0 °C
Initial hold time	0,00 min
Number of ramps	2
Ramp 01 rate	2,0 °C min ⁻¹
Ramp 01 final temperature	110,0 °C
Ramp 01 hold time	2,00 min
Ramp 02 rate	2,0 °C min ⁻¹
Ramp 02 final temperature	130,0 °C
Ramp 02 hold time	2,00 min

Ofen-Methode zur Analyse der ADH-Reaktionen

Initial temperature	90,0 °C
Initial hold time	0,00 min
Number of ramps	1
Ramp 01 rate	2,0 °C min ⁻¹
Ramp 01 final temperature	130,0 °C
Ramp 01 hold time	2,00 min

S/SL-Frontmethode für CaLB-Reaktionen

S/SL mode	Split
Temperature	250 °C
Split flow	42,0 ml min ⁻¹
Purge flow	3,0 ml min ⁻¹
Carrier flow	1,200 ml min ⁻¹
Carrier gas saver flow	20,0 ml min ⁻¹

S/SL-Frontmethode für ATA08-Reaktionen

S/SL mode	Split
Temperature	250 °C
Split flow	35,0 ml min ⁻¹
Purge flow	3,0 ml min ⁻¹
Carrier flow	1,200 ml min ⁻¹
Carrier gas saver flow	20,0 ml min ⁻¹

S/SL-Frontmethode für ADH-Reaktionen

S/SL mode	Split
Temperature	250 °C
Split flow	50,0 ml min ⁻¹
Purge flow	5,0 ml min ⁻¹
Carrier flow	1,500 ml min ⁻¹
Carrier gas saver flow	20,0 ml min ⁻¹

FID-Frontmethode für alle Analysen

Temperature	250 °C
Air flow	350,0 ml min ⁻¹
Hydrogen flow	35,0 ml min ⁻¹

A.2.2.2 Probennahme

Eine direkte Probennahme des Analyten für die GC-Messungen ist unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten nicht möglich, da es zur Überladung und auf lange Sicht zur Beschädigung der Säule kommen kann. Daher musste ein Extraktionsschritt zwischengeschaltet werden. Die Probennahme war für alle Systeme identisch. Es wurden je 100 µl des Analyten (aus dem Einphasen-System) mit 500 µl des geeigneten Extraktionsmittels gemischt, per Vortex eine Minute durchmengt und fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. 200 µl der Extraktionsphase wurden anschließend mit 50 µl des internen Standards *n*-Decan (25 mM) direkt im GC-Vial zusammengegeben, so dass eine Endkonzentration des Standards von 5 mM resultiert.

A.2.2.3 Auswahl des geeigneten Extraktionsmittels

Zur Extraktion der Substrate sowie Produkte aus den jeweiligen Reaktionsmedien wurde vorab die Extraktionseffizienz mit MTBE und *n*-Heptan getestet. Dafür wurden die Lösungsmittelsysteme mit jeweils 50 mM Substrat sowie 50 mM Produkt angesetzt, bei der systemeigenen Reaktionstemperatur für 30 Minuten geschüttelt und wie in A.4.2.1 beschrieben das Einphasen-System beprobt. Das Extraktionsmittel mit der höheren Extraktionseffizienz wurde anschließend für das jeweilige System weiter genutzt.

A.2.2.4 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten im Lösungsmittelsystem

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten in den Zweiphasensystemen und thermomorphen Lösungsmittelsystemen wurden je nach System die entsprechenden Mengen der System-Lösungsmittel zusammengegeben und je 50 mM der Substrate und Produkte hinzugefügt. Die Lösungsmittelsysteme wurden für 30 Minuten im temperierten Schüttler bei charakteristischer Mischungstemperatur und 500 rpm geschüttelt und anschließend für fünf Minuten bei 4000 U/min und 5 °C zentrifugiert. Aus den entstandenen zwei Phasen wurden je 100 µl entnommen und wie in A.2.2.2 weiter vorgegangen.

A.2.2.5 Bestimmung der Wiederfindungsrate im Lösungsmittelsystem

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte nach gleichem Muster wie die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten: die Lösungsmittelsysteme wurden mit je 50 mM Substrat und Produkt versetzt und anschließend 30 Minuten temperiert und geschüttelt. Aus dem 1PS bei gegebener Temperatur wurden dann 100 µl entnommen und in 500 µl *n*-Heptan oder MTBE gegeben, mit Vortex geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Aus der obersten Phase wurde abschließend 200 µl Extrakt entnommen und per GC vermessen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich hier stets auf das 1PS. Nach Auswertung der GC-Chromatogramme konnte ein Faktor für die Anpassung der Konzentrationswerte nach Gleichung (A-1) bestimmt werden.

$$F = \frac{c_{\text{soll}}}{c_{\text{ist}}} \quad (\text{A-1})$$

A.2.2.6 Reaktionsverfolgungsexperimente

Für die Verfolgung der verschiedenen Reaktionen wurden die unterschiedlichen Lösungsmittelsysteme in 2 ml Eppendorf-Gefäße bzw. in 8 ml Gewindeflaschen vorgelegt und 30 Minuten bei der entsprechenden Reaktionstemperatur im Eppendorf Thermomixer bzw. im temperierten Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Substrate zugegeben, weitere fünf Minuten geschüttelt und die Blindprobe entnommen. Nach Zugabe des Enzyms erfolgte die Probennahme abhängig von der Reaktionsgeschwindigkeit mindestens bei $t = \{1; 2; 3; 4; 5; 10; 20; 30; 60; 120; 180, 240\}$ min. Dazu wurde bei der entsprechenden Reaktionstemperatur aus dem 1PS wie in A.2.2.2 beschrieben vorgegangen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich stets auf das 1PS.

A.2.2.7 Bestimmung von Umsatz und ee-Wert

Zur Bewertung der Effizienz und Stereoselektivität eines Katalysators sind die Ausbeute und der Enantiomerenüberschuss ee wichtige Kenngrößen. Die Auftrennung der Racemate erfolgte über eine Trennsäule mit chiraler stationärer Phase (vgl. A.2.2.1) und ermöglichte somit bei guter Trennleistung eine

differenzierte Auswertung der enantiomeren Substrat- und Produktpeakflächen. Der Umsatz ergibt sich nach Gleichung (A-2), wobei U der Umsatz, $c_{(R)}$ die Konzentration des (R)-Enantiomers des Substrates und $c_{(S)}$ die Konzentration des (S)-Enantiomers des Substrates ist.

$$U = \frac{c_{(R)}}{c_{(R)} + c_{(S)}} \cdot 100 \quad (\text{A-2})$$

Der Enantiomerenüberschuss ee kann aus den Peakflächen der chromatografischen Analyse der beiden Enantiomere $x_{(R)}$ und $x_{(S)}$ gemäß Gleichung (A-3) berechnet werden. [Baumann et al. 2001]

$$\%ee = \frac{x_{(R)} - x_{(S)}}{x_{(R)} + x_{(S)}} \cdot 100 \quad (\text{A-3})$$

A.2.2.8 Rezyklierung des Systems

Zur Untersuchung der Rezyklierung der entsprechenden thermomorphen Lösungsmittelsysteme wurde ein Upscaling auf ein Gesamtvolumen von ~ 5 ml vorgenommen. Nach dem Zusammenfügen der Lösungsmittel und des Substrates wurde die 8 ml Gewindeflasche bei der entsprechenden Reaktionstemperatur und 180 rpm horizontal zur Schüttalebene geschüttelt. Anschließend erfolgte die Entnahme der Blindprobe. Dazu wurden bei Reaktionstemperatur aus dem 1PS 100 µl entnommen und in 500 µl Extraktionsmittel (*n*-Heptan oder MTBE) gegeben und eine Minute via Vortex vermengt. Aus der oberen Extraktionsphase wurden anschließend 200 µl gemäß A.2.2.2 entnommen. Danach wurde das entsprechende Enzym hinzugefügt und das Reaktionsgefäß bei Reaktionstemperatur im temperierten Schüttler für 30 Minuten bei 180 rpm horizontal zur Schüttalebene geschüttelt. Anschließend wurde das 1PS analog zur Blindprobennahme beprobt, das Reaktionsvial im Eisbad für fünf Minuten heruntergekühlt und zentrifugiert. Von den separierten Phasen wurde die Obere vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und auf eine neue IL-Phase, die eine definierte Menge Substrat enthielt, gegeben. Diese Rezyklierung mit anschließender 30-minütiger Reaktion wurde mindestens sechsmal wiederholt. Nach jedem Versuch wurde der pH-Wert mittels pH-Papier bestimmt.

Tabelle A-5. Zusammensetzung der TMS für die Rezyklierungsversuche.

TMS 3	TMS 4	TMS 7
20% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	20% (v/v) $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	40% (v/v) $[EMIm][NTf_2]$
68% (v/v) KPi (50 mM)	70% (v/v) KPi (50 mM)	30% (v/v) KPi (50 mM)
12% (v/v) 1,4-Dioxan	10% (v/v) Aceton	30% (v/v) DMSO
30 mM (<i>rac</i>)-1-PEA	30 mM (<i>rac</i>)-1-PEA	30 mM (<i>rac</i>)-1-PEA
~150 U CaLB	~150 U CaLB	~150 U CaLB

TMS 9	TMS 10
30% (v/v) Ammoeng TM 110	35% (v/v) [BMLm][BF ₄]
70% (v/v) KPi (500 mM)	65% (v/v) NaPi (150 mM)
30 mM (rac)-1-PEA	30 mM (rac)-1-PEA
~150 U CaLB	~150 U CaLB

A.2.2.9 Isolierung des Reaktionsproduktes

Als Beispiel einer Separierung des gewünschten Produktes von den übrigen Reagenzien der thermomorphen Lösungsmittelsysteme wurde nach missglückter Destillation die Säulenchromatografie gewählt. Tabelle A-6 zeigt die Zusammensetzung des TMS.

Tabelle A-6. Zusammensetzung des TMS 4 zur Isolierung des Reaktionsproduktes.

TMS 4
20% (v/v) [N _{1112(OH)}][NTf ₂]
70% (v/v) KPi
10% (v/v) Aceton
30 mM 1-Phenylethylacetat
~150 U CaLB

Die Reaktion im TMS 4 wurde im 25 ml-Ansatz 16 Stunden durchgeführt, abgekühlt und fünfmal mit *n*-Heptan extrahiert. Die extrahierte Lösung wurde anschließend im Abdampfblock vorsichtig bei 45 °C unter Argonstrom eingeengt.

Für die Säulenchromatographie wurden zwei 1 ml-Spritzen genommen. Bei einer Spritze wurde die Spitze, bei der anderen das obere Ende abgeschnitten. Danach wurden die Enden mittels Heißluftöfen zusammengeschmolzen. Die entstandene Säule wurde wie gewohnt mit Kieselgel gepackt und wie in Abbildung A-1 aufgebaut.

Als Eluent wurde eine *n*-Heptan-Essigsäureethylester-Lösung im Verhältnis 70:30 verwendet. Die Säule wurde mit dem Eluenten konditioniert und im Anschluss das zu isolierende Produkt aufgegeben.

Um eine Rückvermischung zu vermeiden und das Produkt möglichst effizient zu trennen, wurde zügig gearbeitet und immer zwei Tropfen Lösung in ein Vial gegeben. Nach dem Säulen wurden mittels Dünnschichtchromatographie-UV-Screening Edukt- und Produkt-Vials ausgemacht. Der Inhalt aller Produkt-enthaltenden Vials wurde zusammengegeben und in eine 1 ml-Spritze aufgenommen. Die Spritze wurde auf exakt 1 ml mit *n*-Heptan aufgefüllt. Zur GC-Analyse wurden je 0,2 ml dieser Lösung verwendet und doppelt vermessen.



Abbildung A-1. Isolierung des Reaktionsproduktes mittels selbstgebauter Säule.

A.2.3 Herstellung der Puffer- und Salzlösungen

Für die Untersuchungen der Lösungsmittelsysteme wurden drei verschiedene Pufferlösungen und drei verschiedene Salzlösungen verwendet. Am Anfang jedes Screenings wurde eine 1 mol/l Puffer-Stammlösung hergestellt und für die jeweiligen System-Bedürfnisse verdünnt. Die Feststoffe (und Flüssigkeiten) wurden dazu in 50 ml Messkolben eingewogen und mit dest. Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Im Falle der Pufferlösungen wurden die *pH*-Werte mit Hilfe einer *pH*-Elektrode überprüft und gegebenenfalls mit HCl bzw. NaOH eingestellt.

Tabelle A-7. Einwaagen und *pH*-Werte der hergestellten Pufferlösungen.

	Salz 1	Salz 2	c	Dest. Wasser	<i>pH</i> -Wert
Kaliumphosphat-Puffer	8,71 g K ₂ HPO ₄	6,80 KH ₂ PO ₄	50 mM	1000 ml	7,0
Natriumphosphat-Puffer	3,55 g Na ₂ HPO ₄	3,45 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1 M	50 ml	7,5
Natriumacetat-Puffer	10,67 g NaCOOCH ₃	1,12 ml CH ₃ COOH	150 mM	1000 ml	5,5
Citronensäure-Puffer	0,48 g C ₆ H ₈ O ₇	-	50 mM	50 ml	4,0

Tabelle A-8. Einwaagen der Salzstammlösungen.

	m (Salz) [g]	V (dest. H ₂ O)
1 M Natriumacetat NaCOOCH ₃	4,10 g	50 ml
1 M Natriumphosphat Na ₂ HPO ₄ · NaH ₂ PO ₄	3,55 g · 3,45 g	50 ml
1 M Ammoniumsulfat (NH ₄) ₂ SO ₄	6,61 g	50 ml

A.2.4 Synthese ionischer Flüssigkeiten

**N-alkyl-N,N-dimethyl-N-(2-hydroxyethyl)ammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imid,
[N_{11n2(OH)}][NTf₂] mit n = 2, 3, 4, 5**

Diese ammonium-basierten ionischen Flüssigkeiten werden in zwei Stufen synthetisiert.

1,1 Moläquivalent des jeweiligen Alkylhalogenids (C_nH_{2n+1}Br, n = 2, 3, 4, 5) werden mit 1 Moläquivalent 2-Dimethylaminoethanol in n-Heptan gelöst, kontinuierlich gerührt und unter Rückfluss und Argon-Atmosphäre bei 80 °C für drei Stunden im Rundkolben umgesetzt. Das Abscheiden einer zweiten Phase vom n-Heptan zeigt die Entstehung des Produktes, überprüft mit ¹H-NMR. Nach Beendigung der Reaktion wird die Mischung gekühlt, die obere Lösungsmittel-Phase abdekantiert und der entstandene Feststoff filtriert und mehrfach mit n-Heptan gewaschen. Ist dies nicht zielführend wird der Feststoff mit Ethylacetat gewaschen, abdekantiert, in Methanol gelöst, das Lösungsmittel im ersten Schritt am Rotationsverdampfer wieder abgezogen und anschließend der Feststoff unter Vakuum getrocknet.

Für die anschließende Metathese wird das entstandene [N_{11n2(OH)}][Br] (n = 2, 3, 4, 5) mit 1 Moläquivalent ohne weitere Aufarbeitung in Wasser vorgelegt und bei Raumtemperatur gerührt. Das LiNTf₂ wird in geringem Überschuss (1,05 Moläquivalent) hinzugefügt und für 30 Minuten weiter gerührt. Zur Aufarbeitung wird dreimal mit Dichlormethan extrahiert und weiter dreimal mit Wasser gewaschen. Die Lösungsmittel werden abrotiert und das erhaltene Produkt im Vakuum getrocknet.

[N_{1122(OH)}][NTf₂]

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 5,26 (t, J = 4,8 Hz, 1H, OH); 3,83 (br m, 2H, CH₂); 3,44 – 3,33 (m, 4H, 2 x CH₂); 3,03 (s, 6H, NCH₃); 1,25 (tt, J = 7,3 Hz, J = 1,9 Hz).

[N_{1132(OH)}][NTf₂]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 5,25 (t, J = 5,1 Hz, 1H, OH); 3,81 (m, 2H, CH₂); 3,43 – 3,29 (m, 4H, 2 x CH₂); 3,09 (s, 6H, 2 x NCH₃); 1,68 (m, 2H, CH₂); 0,87 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CH₃).

[N_{1142(OH)}][NTf₂]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 5,25 (t, J = 5,0 Hz, 1H, OH); 3,82 (m, 2H, CH₂); 3,38 – 3,27 (m, 4H, 2 x CH₂); 3,04 (s, 6H, 2 x NCH₃); 1,66 (m, 2H, CH₂); 1,30 (m, 2H, CH₂); 0,93 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CH₃).

[N_{1152(OH)}][NTf₂]

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 5,29 (t, J = 5,0 Hz, 1H, OH); 3,82 (m, 2H, CH₂); 3,39 – 3,26 (m, 4H, 2 x CH₂); 3,04 (s, 6H, 2 x NCH₃); 1,67 (m, 2H, CH₂); 1,42 – 1,17 (m, 4H, 2 x CH₂); 0,89 (t, J = 7,1 Hz, 3H, CH₃).

Triethylammoniumhydrogensulfat, [N₂₂₂₀][HSO₄]

In einem Rundkolben werden 1276 mmol Triethylamin bei 4 °C (Eisbad) vorgelegt und 1250 mmol einer 5 M Schwefelsäure-Lösung langsam mit Hilfe eines Tropftrichters über eine Stunde zugetropft. Die Lösung wird drei weitere Stunden bei 4 °C gerührt und anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Bei 45 °C und unter 30 mbar wird die ionische Flüssigkeit anfangs zwei Stunden am Rotationsdampfer und weiterhin unter Hochvakuum (0,02 mbar) bei 45 °C über Nacht getrocknet.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 6,17 (br); 2,98 (q, J = 7,3 Hz, 6H, CH₂); 1,17 (t, J = 7,3 Hz, 9H, CH₃).

1-Butyl-3-methylimidazolium-Diisooctylphosphat, [BMIm][Phos]

In zwei Stufen kann die Imidazolium-basierte ionische Flüssigkeit [BMIm][Phos] hergestellt werden. In der ersten Stufe wird dafür 1 Moläquivalent 1-Butylimidazol unter N₂-Atmorphäre mit Spritze im Rundkolben vorgelegt und auf Eis gekühlt. Unter Rühren wird sehr langsam unter N₂-Atmosphäre 1 Moläquivalent Trimethylphosphat zugetropft. Anschließend wird das Eisbad entfernt, die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt und weiterhin mit Ölbad langsam bis 100 °C erhitzt und 14 Stunden lang gekocht. Die Precursor-ionische Flüssigkeit [BMIm][Tmp] wird schließlich durch Vakuumdestillation erhalten.

Für die Synthese der zweiten Stufe wird zu der gekühlten Lösung aus 1 Moläquivalent der Precursor-II und 1,2 Moläquivalent Triethylamin 1,1 Moläquivalent Diisooctylphosphorsäure gegeben und vier Stunden im Eisbad unter N₂-Atmosphäre gerührt. Anschließend wird dest. Wasser im Überschuss zugegeben und intensiv über drei Tage weitergerührt. Im Scheidetrichter wird die organische Phase durch dreimaliges Waschen mit einer 1:1-Triethylamin-Wasser-Lösung und finalem dreimaligem Waschen mit reinem Wasser abgetrennt. Die erhaltene ionische Flüssigkeit wird unter Vakuum getrocknet.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 9,73 (t, J = 1,5 Hz, 1H); 7,91 (t, J = 1,8 Hz, 1H); 7,83 (t, J = 1,8 Hz, 1H); 4,19 (t, J = 7,2 Hz, 2H, NCH₂); 3,88 (s, 3H, NCH₃); 3,29 (s, 3H, CH₃); 3,26 (s, 3H, CH₃); 1,76 (m, 2H, CH₂); 1,24 (m, 2H, CH₂); 0,87 (t, J = 7,4 Hz, 3H, CH₃).

A.2.5 Screening geeigneter thermomorpher Systeme unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln

Es wurde eine Reihe organischer Lösungsmittel auf ihre Eignung als thermisch schaltbare Mischungen getestet. Ziel war es ein System aus mindestens zwei Lösungsmitteln zu finden, die im Temperaturintervall zwischen 20 °C und 60 °C ein UCST-Verhalten zeigen. Für Vortests wurde hier das Prinzip von Arno Behr [Leitner et al. 2008] ausgenutzt, Komponenten mit polaren, nicht polaren und semi-polaren Eigenschaften zu mischen. Als polares Lösungsmittel wurde immer eine wässrige Lösung (KPi 50 mM pH 7,0) als beste Basis für biokatalytische Reaktionen gewählt. Die zugesetzten organischen Lösungsmittel dienen der besseren Löslichkeit der Substrate und der Stabilisierung der Enzyme. Die untersuchten organischen Lösungsmittel sind in Tabelle A-9 zusammengefasst.

Tabelle A-9. Zusammenfassung der untersuchten organischen Lösungsmittel für thermomorphe Lösungsmittelsysteme unterteilt in polar - nicht polar - semi-polar.

Komponenten	polar	nicht polar	semi-polar
	KPi 50 mM	1-Butanol	1,4-Dioxan
		Chloroform	1-Propanol
		Cyclohexan	2-Propanol
		Dichlormethan	Aceton
		Diethylether	Acetonitril
		Ethylacetat	DMSO
		n-Heptan	Ethanol
		n-Hexan	Methanol
		MTBE	THF
		Tetra(chlorkohlenstoff)	
		Toluol	

Alle Lösungsmittel wurden in Kombinationen von 20-80% (v/v) der drei Komponenten bei 20 – 30 – 40 – 50 – 60 °C auf ihre Eignung als TMS gescreent. Dazu wurden die Komponenten in 2 ml Eppendorf-Gefäße gefüllt und bei den entsprechenden Temperaturen bei 500 rpm im Eppendorf Thermomixer comfort geschüttelt und nach zehn Minuten jeweils einer Sichtprobe unterzogen, ob das System einphasig oder zweiphasig ist. Geeignete Systeme wurden weiter untersucht und sind in Kapitel 4.1.1 beschrieben.

A.2.6 Screening geeigneter thermomorpher Systeme unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten

Ebenso wurden 40 ionische Flüssigkeiten in Kombination mit Wasser und anorganischen/organischen Salzen und/oder organischen Lösungsmitteln auf ihre Eignung als thermomorphe Lösungsmittelsysteme untersucht. Diesbezüglich wurden eine Reihe von ionischen Flüssigkeiten erworben oder synthetisiert (Tabelle A-1).

A.2.6.1 Untersuchungen zum Phasenverhalten

Für alle Untersuchungen wurde die jeweilige IL in 2 ml Eppendorf-Gefäße eingewogen und anschließend mit den weiteren Komponenten versetzt. Trübungstemperatur-Bestimmungen (T_{Tr}) wurden durchgeführt, indem das Lösungsmittelgemisch im Kühlschrank bei 3 °C gelagert sowie im Eppendorf Thermomixer comfort bei 500 rpm bei Temperaturen von 8 – 99 °C geschüttelt wurde bis das Gemisch homogen wurde. Die Transparenz der Mischung wurde anschließend bei Raumtemperatur visuell überwacht und die Temperatur, bei der die homogene Mischung trüb wurde, wurde als Trübungstemperatur T_{Tr} dokumentiert. Die Bestimmung dieser Trübungspunkttemperatur wurde dreimal wiederholt, um ein genaues Ergebnis zu erhalten.

Die Untersuchungen zum Phasenverhalten sind in die folgenden Punkte untergliedert.

A.2.6.1.1 Das Phasenverhalten in Bezug auf die IL-Konzentration

Untersucht wurde eingangs die Mischbarkeit der ionischen Flüssigkeit mit Wasser bzw. mit organischen Lösungsmitteln im Volumenverhältnis 20:80% (v/v) und 50:50% (v/v). Tabelle A-10 zeigt die verwendeten Chemikalien.

Tabelle A-10. Verwendete ionische Flüssigkeiten sowie verschiedene Lösungsmittel für das Screening nach IL-basierten thermomorphen Lösungsmittelsystemen.

Nr.	Ionische Flüssigkeit	2. Lösungsmittel
1	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]	Wasser
2	[N _{1122(OH)}][NTf ₂]	Essigsäure
3	[N _{1132(OH)}][NTf ₂]	Ethylenglykol
4	[N _{1142(OH)}][NTf ₂]	Diethylenglykol
5	[N _{1152(OH)}][NTf ₂]	Methanol
6	[N ₁₁₀₀][DMC]	Ethanol
7	[N ₂₂₂₀][HSO ₄]	1-Propanol
8	Ammoeng 100	2-Propanol
9	Ammoeng 101	1-Butanol

Ammonium-basierte ILs

10	Ammoeng 102	1-Pentanol
11	Ammoeng 110	1-Hexanol
12	Ammoeng 111	1-Heptanol
13	Ammoeng 112	1-Octanol
14	Ammoeng 120	1-Nonanol
15	Ammoeng 130	1-Decanol
16	Ammoeng 520	Cyclohexanol
17	[EMIm][NTf ₂]	DMSO
18	[EMIm][EtSO ₄]	Acetonitril
19	[EMIm][Br]	Ethylacetat
20	[EMIm][BF ₄]	THF
21	[BMIm][NTf ₂]	1,4-Dioxan
22	[BMIm][MeSO ₄]	Aceton
23	[BMIm][Me ₂ SO ₄]	Diethylether
24	[BMIm][Me ₂ PO ₄]	Dichlormethan
25	[BMIm][Phos]	Chloroform
26	[BMIm][Tmp]	Toluol
27	[BMIm][Br]	Tetrachlorkohlenstoff
28	[BMIm][Cl]	MTBE
29	[BMIm][NO ₃]	1,4-Butandiol
30	[BMIm][BF ₄]	Isopropylacetat
31	[BMIm][PF ₆]	Vinylacetat
32	[MPIm][PF ₆]	<i>n</i> -Heptan
33	[MOIm][Cl]	Cyclohexan
34	[DMIm][Cl]	<i>n</i> -Hexan
35	Ecoeng 2111P	
36	Ecoeng 110	
37	ViEtImLac	
38	ViBuImLac	
39	Pyridinium-	[Bpy][BF ₄]
40	basierte ILs	[BMPy][OTf]

Imidazolium-basierte ILs

Die Mischungen wurden sukzessiv von 3 °C (im Kühlschrank) bis 99 °C (ab 8 °C im Eppendorf Thermomixer bei 500 rpm) in 1 K-Schritten aufgeheizt und jeweils nach fünf Minuten einer Sichtkontrolle zur Beurteilung des Phasenverhaltens unterzogen.

A.2.6.1.2 Das Phasenverhalten in Bezug auf die Pufferkonzentration

Die Puffersalze wurden in verschiedenen Konzentrationen mit den ionischen Flüssigkeiten in 2 ml Eppendorf-Gefäßen gemischt und wie in A.2.6.1.1 geschüttelt, in 1 K-Schritten von 8 °C bis 99 °C erhitzt, zwischenzeitlich einer Sichtkontrolle unterzogen und die Trübungstemperatur bestimmt. Ziel war es ein biphasisches Verhalten bei 25 °C und ein monophasisches Verhalten bei höheren Temperaturen zu beobachten. Tabelle A-7 zeigt die hergestellten Puffer-Stammlösungen.

A.2.6.1.3 Das Phasenverhalten in Bezug auf eine dritte Komponente

Sollte das Lösungsmittelsystem beim Mischen von IL und Puffer bei 25 °C einphasig bleiben, wurden verschiedene Konzentrationen an Salzen hinzugefügt, um die Mischung in das heterogene Phasengebiet zu drängen. Dafür wurden bspw. in 99 2 ml Eppendorf-Gefäße 0,525 g [BMIm][BF₄] und in 99 2 ml Eppendorf-Gefäße 0,6 g AmmoengTM110 eingewogen. Zu diesen ILs wurden verschiedene Mengen der Puffer- und Salz-Stammlösungen (Tabelle A-7 und Tabelle A-8) zugefügt, um verschiedene Konzentrationen einzustellen. Die Gefäße wurden dann bei 25 °C im temperierten Schüttler für 30 Minuten bei 500 rpm horizontal zur Schüttellebene geschüttelt und anschließend einer Sichtkontrolle unterzogen. Zeigt die Lösung eine Trübung, so befindet sich das System im heterogenen Gebiet und garantiert bei höheren Temperaturen ein Einphasen- und bei niedrigeren Temperaturen ein Zweiphasensystem.

Sollte das Lösungsmittelsystem beim Mischen von IL und Puffer bei 40 °C zweiphasig sein, so wurden verschiedenste organische Lösungsmittel (Tabelle A-11) auf ihre Eignung als Phasenvermittler in unterschiedlichen Konzentrationen überprüft, bis eine Zusammensetzung gefunden wurde, die bei 40 °C homogen und bei 25 °C heterogen ist. Auch hier wurden die ILs in 2 ml Eppendorf-Gefäße eingewogen, Puffer und organisches Lösungsmittel hinzugefügt, bei 8-99 °C und 500 rpm geschüttelt und durch Sichtkontrolle die Trübungstemperatur bestimmt.

Tabelle A-11. Verwendete (organische) Lösungsmittel als Phasenvermittler, geordnet nach ihrer Polarität.

polar	semi-polar	nicht polar
Essigsäure	1-Butanol	Toluol
Glycerol	1-Pentanol	MTBE
Ethylenglykol	1-Hexanol	Cyclohexan
Diethylenglykol	1-Heptanol	n-Hexan
Methanol	1-Octanol	n-Heptan

Ethanol	1-Nonanol	Tetra
1-Propanol	1-Decanol	Diisopropylether
2-Propanol	Cyclohexanol	
DMSO	1,4-Dioxan	
Ammoeng 110	Acetonitril	
	Aceton	

A.2.6.1.4 Das Phasenverhalten in Bezug auf die Substratkonzentration

Um eine Reaktion im Einphasengebiet der thermomorphen Lösungsmittelsysteme zu gewährleisten, musste untersucht werden, in wie weit die Zugabe der verschiedenen Substrate das Phasenverhalten irritiert. Dazu wurden Konzentrationen von 10-100 mM Substrat zu den für die Reaktion vorgesehenden TMS gegeben. Ziel war es ein 50 mM Substrat hinzufügen zu können, ohne dass sich bei der gewünschten Reaktionstemperatur eine zweite Phase bildet.

A.2.6.2 Das Phasenverhalten in Bezug auf die Enzymkonzentration

Letztendlich wurde noch der Einfluss der Enzyme auf das Phasenverhalten untersucht. Dazu wurden in 2 ml Eppendorf-Gefäße die ILs eingewogen, Puffer und Phasenvermittler/Salze im zuvor gefundenen optimalen Verhältnis ergänzt, das Substrat in einer Konzentration von 50 mM hinzugefügt und abschließend verschiedene Mengen an BSA ($\{1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50; 100\}$ mg/ml) zugegeben. Die Lösungen wurden dann im Eppendorf Mixer comfort bei 500 rpm und bei Temperaturen von 8-99 °C in 1 K-Schritten erwärmt und alle fünf Minuten einer Sichtkontrolle unterzogen und die Trübungstemperatur aller Mischungen bestimmt.

A.2.7 Screening geeigneter reactiomorpher Systeme unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten

A.2.7.1 Untersuchungen zum Phasenverhalten

Die Untersuchungen zum Phasenverhalten der reactiomorphen Systeme liefen analog zu den thermomorphen Lösungsmittelsystemen ab. Die ILs wurden eingangs mit Wasser und anschließend mit verschieden konzentrierten Pufferlösungen gemischt, geschüttelt und im Bereich von 3-99 °C die Trübungstemperaturen bestimmt. Das System sollte die Anforderung erfüllen bei der jeweiligen optimalen Reaktionstemperatur des Enzyms (Tabelle A-12) gerade noch einphasig zu sein und im Verlaufe der Reaktion durch entstehendes Salz in das heterogene Phasengebiet überzugehen, um zur Aufarbeitung bei 25 °C in zwei Phasen vorzuliegen.

Tabelle A-12. Genutzte Enzyme mit den zugehörigen optimalen Reaktionstemperaturen.

Enzym	optimale Reaktionstemperatur
CaLB	40 °C
Saure Phosphatase	37 °C

A.2.7.2 Das Phasenverhalten in Bezug auf additive Salze

Zu den IL-Puffer-Mischungen, deren Trübungstemperaturen unter den jeweiligen optimalen Reaktionstemperaturen liegen, wurden die in Tabelle A-13 aufgeführten Salze in 1 mg-Schritten hinzugefügt bis das System bei der gewünschten Reaktionstemperatur gerade noch einphasig blieb.

Tabelle A-13. Zugesetztes Salz zu den jeweiligen Lösungsmittelsystemen.

System	optimale Reaktionstemperatur	zugesetztes Salz
[BMIm][BF ₄]-NaPi	40 °C	CH ₃ COONa
Ammoeng™110-NaAcP	37 °C	(NH ₄) ₂ SO ₄

A.2.7.3 Das Phasenverhalten bei simulierter Reaktion

Ziel war es eine homogene Mischung durch bei der Reaktion entstehendes Salz in das Zweiphasengebiet zu drängen. Hierfür wurde die Reaktion durch Zugabe von Substrat, Produkt und entstehendem Salz in veränderten Konzentrationen simuliert und die optimale Anfangskonzentration des Substrates ermittelt, bei dem die IL-Puffer-Mischung noch einphasig bleibt, jedoch durch die Entstehung des Produktes und des äquimolaren Salzes zweiphasig wird. Tabelle A-14 bietet eine Übersicht der Simulation..

Tabelle A-14. Reaktionsmedium und chemische Verbindungen der simulierten Reaktionen bei optimalen pH-Werten.

System	zugesetztes Salz	Substrat	Produkt	entstandenes Salz	pH
[BMIm][BF ₄]-NaPi	CH ₃ COONa	1-PEA	(R)-1-PE	Salz der Essigsäure	7,0
Ammoeng™110-NaAcP	(NH ₄) ₂ SO ₄	2-CPP	Salicylsäure	Salz Phosphorsäure	5,5

A.2.8 Karl-Fischer-Coulometrie

Zur Bestimmung des Wassergehalts in der unteren IL-Phase der thermomorphen Lösungsmittelsysteme wurde die Karl-Fischer-Coulometrie mit dem 831 KF Coulometer der Firma Metrohm genutzt. Diese beruht auf der elektrochemischen Reaktion von elementarem Iod und Schwefeldioxid zu Iodid und Sulfat und findet nur in Gegenwart von Wasser statt. Grenzen dieser Messtechnik liegen bei 10% (v/v) Restwasser im Analyten.

Zur Bestimmung wird eine Probe entsprechend des vermuteten Wassergehaltes eingewogen (Tabelle

A-15) und in das gerührte Gefäß mit der Titrationslösung (CombiCoulomat fritless) gegeben, die Starttaste betätigt und die Einwaage über das Keyboard eingegeben. Iod reagiert quantitativ mit Wasser und der Endpunkt wird voltametrisch erkannt. Als Ergebnis wird der Wassergehalt in ppm sowie die absolute Menge des bestimmten Wassers angezeigt. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle A-15. Abschätzung der Probeneinwaage zur Bestimmung des Wassergehaltes mittels 831 KF Coulometer.

Wassergehalt Probe		Einwaage	Bestimmtes Wasser
[ppm]	[%]	[mg]	[µg]
100000	10	50	5000
10000	1	10-100	100-1000
100	0,01	1000	100
10	0,001	5000	50

A.2.9 Bestimmung der Wasseraktivität

Die Wasseraktivität des thermomorphen Lösungsmittelsystems TMS 11 wurde mittels AW SPRINT TH-500 gemessen. 5 mg Probe wurden dazu in eine luftdichte Kammer gegeben und das Erreichen des Gleichgewichtzustands der Luft über der Probe abgewartet.

Tabelle A-16. Zusammensetzung des TMS 11 zur Bestimmung der Wasseraktivität.

TMS 11
30% (v/v) $[N_{1142(OH)}][NTf_2]$
69% (v/v) 1-Octanol
1% (v/v) Vinylacetat

Tabelle A-17. Ergebnisse der Messungen zur Wasseraktivität am AW SPRINT TH-500.

Messung	aw
1	0,413
2	0,410
3	0,410

A.2.10 1D-Gelelektrophorese der Enzyme

Zur Molmassen- und Reinheitsbestimmung sowie zur Einschätzung der Verteilung der eingesetzten Enzyme in den zwei Phasen der thermomorphen Lösungsmittelsysteme wurden Gelelektrophoresen durchgeführt. Da Proteine Ampholyte sind, also außerhalb ihres isoelektrischen Punktes eine Ladung tragen und somit in Abhängigkeit der Ladungsdichte durch ein elektrisches Feld wandern können, konnten

die auf das Gel aufgetragenen Proteine durch Anlegen einer Spannung nach ihrer Masse aufgetrennt werden. Bei dieser Methode erfolgt die räumliche Auftrennung der Proteine durch ihre unterschiedliche Mobilität entlang eines Gradienten im elektrischen Feld. In Relation zu kommerziell erhältlichen Standards kann eine Auswertung der molaren Massen erfolgen und die Reinheit und Verteilung der Enzyme anhand der sichtbaren Banden interpretiert werden.

Untersucht wurden die Proteine in reinem Puffer und in der oberen sowie unteren Phase der thermomorphen Lösungsmittelsysteme nach folgendem Vorgehen: die Reaktionssysteme wurden im 2 ml Eppendorf-Gefäße nach Tabelle A-18 vorbereitet, auf die systemeigene Temperatur im temperierten Schüttler erwärmt und aus dem 1PS eine Probe entnommen. Die verbleibende Lösung wurde im Eisbad abgekühlt, bei 4000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und je eine Probe aus der oberen und unteren Phase der heterogenen Mischung entnommen.

Tabelle A-18. Zusammensetzung der IL-basierten TMS für die 1D-Gelelektrophorese.

CaLB	ATA08	Saure Phosphatase
0,525 g [BMIm][BF ₄]	0,4 g [EMIm][NTf ₂]	0,5 g [BMIm][BF ₄]
975 µl NaPi (150 mM, pH 7,0)	360 µl NaPi (200 mM, pH 8,0)	500 µl NaAcP (100 mM, pH 5,5)
	360 µl DMSO	50 mg (NH ₄) ₂ SO ₄
150 µl Cal B	5 mg ATA 08	2,5 mg Saure Phosphatase
40 °C	30 °C	37 °C

Damit das Protein in seiner Primärstruktur vorliegt, wurden zur Denaturierung der 10 µl Probelösung 4 µl des NuPAGE® Reducing Agent (10X), 10 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) und 16 µl Reinstwasser zugegeben und die Lösung für 20 Minuten bei 70 °C erhitzt.

Das Polyacrylamidgel („NuPage® Novex® 4 – 12 % Bis-Tris, 1.0 mm x 10 well“) wurde mit Laufpuffer blasenfrei gespült und in die Anlage gespannt. Das obere und untere Reservoir wurde mit Laufpuffer gefüllt, bis die Elektroden bedeckt waren. Von den vorbereiteten denaturierten Proben wurden je 10 µl entnommen und auf das Gel aufgetragen. Bei einer Spannung von $U = 150$ V trennte sich die Proteinmischung in ca. 30 Minuten auf. Nach der Beendigung des Laufes wurde das Gel aus der Kassette gelöst und mit 100 ml Reinstwasser gewaschen. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden 20 ml SimplyBlue™ SafeStain (Coomassie® G-250 Färbelösung) hinzugefügt und anschließend in der Mikrowelle erhitzt. Nach mehreren Waschgängen mit jeweils 100 ml Reinstwasser wurde das Gel vorsichtig auf einen hellen Untergrund gelegt und für die weitere Auswertung fotografiert.

A.2.11 Absorptionsmessungen zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme

Für die genutzten Enzyme wurden zur Bestimmung der Aktivität Messungen am Spektralphotometer Specord 50 der Firma Analytik Jena durchgeführt. Diese analytische Methode beruht auf dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz, welches die Abschwächung der Intensität einer Strahlung bei dem Durchgang durch ein Medium mit einer absorbierenden Substanz in Abhängigkeit von der Konzentration der absorbierenden Substanz und der Schichtdicke beschreibt (Gleichung (A-4)).

Für die Konzentrationsbestimmung von Lösungen einer absorbierenden Verbindung durch photometrische Messungen wird die logarithmierte Form des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes verwendet:

$$E = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (\text{A-4})$$

Für die experimentelle Anwendung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes muss berücksichtigt werden, dass der molare Extinktionskoeffizient ε von der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke der Testlösung abhängig ist. Streulichteffekte, die durch Staub oder ungelöste Partikel hervorgerufen werden, erhöhen die Absorption artifiziell, da der Streulichtanteil in der Bilanz des transmittierten Lichts fehlt.

A.2.11.1 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten

Um die Aktivität der Enzyme bestimmen zu können, ist daher vorerst die Ermittlung des Extinktionskoeffizienten notwendig. Dazu wurde unter Ausnutzung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes die Extinktion verschiedener Substratkonzentrationen bei gewählter Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Wellenlänge ermittelt (Gleichung (A-5)). Eine lineare Auftragung der Konzentration gegen die Extinktion liefert über den Anstieg der Geraden den Extinktionskoeffizienten.

$$\varepsilon_\lambda^T = \frac{\Delta E}{\Delta c \cdot d} \quad (\text{A-5})$$

i. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von 4-Nitrophenol

Für die Aktivitätsbestimmung der Lipase aus *Candida antarctica* (CaLB) wurde als Modellreaktion die Umsetzung von 4-Nitrophenylacetat zu 4-Nitrophenol verfolgt. Da das 4-Nitrophenol photometrisch detektiert werden kann, wurde der Extinktionskoeffizient dieser Substanz bestimmt. Dazu wurde eine 50 mM 4-Nitrophenol-Stammlösung bestehend aus 13,91 mg 4-Nitrophenol und 2 ml einer 50 mM NaPi-Pufferlösung (pH 7,0) hergestellt und zu einer 1 mM 4-Nitrophenol-Stammlösung verdünnt. Aus dieser 1 mM Lösung wurde weiter eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Messung der Extinktionen der Verdünnungsreihe bei $T = 30^\circ\text{C}$ und $\lambda = 400\text{ nm}$ durchgeführt.

ii. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Acetophenon

Sowohl für die Aktivitätsbestimmung der Amintransferase ATA08 als auch für die Alkoholdehydrogenasen *Lb*-ADH und *Lk*-ADH wurde der Extinktionskoeffizient des Acetophenons bestimmt. Für den erstgenannten Fall wurde eine 10 mM Stammlösung aus 5,83 µl Acetophenon und 5 ml K-/NaPi-Puffer (50 mM, pH 8,0) hergestellt und zu einer 1 mM Lösung verdünnt. Aus dieser 1 mM Lösung wurde weiter eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Messung der Extinktionen der Verdünnungsreihe bei $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\lambda = 245\text{ nm}$ durchgeführt.

Für die Untersuchung der Alkoholdehydrogenasen wurde ebenso eine 10 mM Stammlösung aus 58,33 µl Acetophenon in 50 ml KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0) vorbereitet, eine Verdünnungsreihe mit höchster Konzentration von 1 mM hergestellt und die Messung der Extinktionen der weiteren Verdünnungen bei $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\lambda = 340\text{ nm}$ durchgeführt.

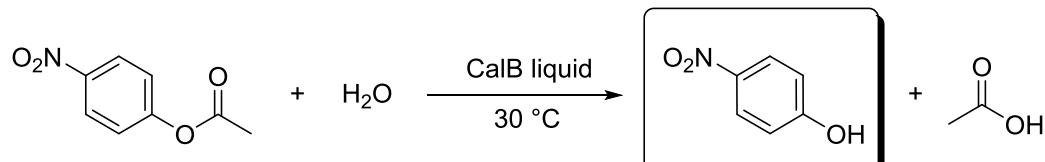
iii. Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Salicylsäure

Für die Aktivitätsbestimmung der sauren Phosphatase war der Extinktionskoeffizient der Salicylsäure von Nöten. Die 3,65 mM Stammlösung wurde aus 0,0016 g 2-Carboxyphenylphosphat in 2 ml Acetatpuffer (150 mM, pH 5,5) hergestellt und zu einer 1 mM Stammlösung verdünnt. Die Messung der Extinktion der weiteren Verdünnungsreihe wurde bei $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $\lambda = 300\text{ nm}$ durchgeführt.

A.2.11.2 Photometrischer Assay zur Aktivitätsbestimmung der Enzyme

i. CaLB

Eine Modellreaktion zur Bestimmung der Aktivität von Lipasen ist die Umsetzung von 4-Nitrophenylacetat zu 4-Nitrophenol (Schema A-1). Diese Reaktion wurde zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität von CaLB in Phosphatpuffer, deren pH- und Temperaturabhängigkeit und für Stabilitätsuntersuchungen derselben in thermomorphen Lösungsmittelsystemen genutzt.



Schema A-1. Umsetzung von 4-Nitrophenylacetat zu 4-Nitrophenol mit CaLB liquid.

Im Vorfeld der Messung wurde die Lipase CaLB liquid im Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine Stunde inkubiert. Für den photometrischen Assay wurde eine 10 mM Substratlösung aus 9,06 mg

4-Nitrophenylacetat in 5 ml DMSO hergestellt. Daraus wurden eine Referenzprobe und eine Enzym-Substrat-Mischung angefertigt. Nach Enzymzugabe wurde die photometrische Messung bei $T = 30^{\circ}\text{C}$ umgehend gestartet und die Bildung des 4-Nitrophenols über eine Minute durch Verfolgung der Absorption bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ detektiert. Die Probenzusammensetzung ist in Tabelle A-19 zusammengefasst.

Tabelle A-19. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der *Candida antarctica* Lipase B.

	Probe	Referenz
50 mM Phosphatpuffer ($\text{pH } 7,0$)	890 μl	990 μl
10 mM 4-Nitrophenylacetat in DMSO	10 μl	10 μl
Vorverdünnte Enzymlösung	100 μl	-

ii. ATA08

Eine Modellreaktion zur Bestimmung der Aktivität von Amintransferasen ist die Reaktion von *rac*-Methylbenzylamin und Pyruvat zu Acetophenon und Alanin (Schema 4-18). Diese Reaktion wurde zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität der ATA08 in Phosphatpuffer, deren pH - und Temperaturabhängigkeit und für Stabilitätsuntersuchungen derselben in thermomorphen Lösungsmittelsystemen genutzt.

Im Vorfeld der Messung wurde die Amintransferase ATA08 mit 0,1 mM Pyridoxalphosphat in Phosphatpuffer (50 mM, $\text{pH } 8,0$) gelöst und auf Eis gelagert. Für den photometrischen Assay wurden 10 mM Substratlösungen aus 12,75 μl *rac*-Methylbenzylamin und 8,8 mg Pyruvat in jeweils 10 ml Phosphatpuffer hergestellt und des Weiteren eine 10 mM Cofaktor-Lösung aus 4,9 mg Pyridoxalphosphat in 20 ml Phosphatpuffer. Aus diesen Lösungen wurden schließlich eine Referenzprobe und eine Enzym-Substrat-Cofaktor-Mischung angefertigt. Nach Enzymzugabe wurde die photometrische Messung bei $T = 25^{\circ}\text{C}$ umgehend gestartet und die Bildung des Acetophenons über eine Minute durch Verfolgung der Absorption bei $\lambda = 245 \text{ nm}$ detektiert. Die Probenzusammensetzung ist in Tabelle A-20. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der Amintransferase ATA08 zusammengefasst.

Tabelle A-20. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der Amintransferase ATA08.

	Probe	Referenz
50 mM Phosphatpuffer (<i>pH</i> 8,0)	250 µl	450 µl
10 mM rac-Methylbenzylamin	250 µl	250 µl
10 mM Pyruvat	250 µl	250 µl
10 mM Pyridoxalphosphat	-	50 µl
Vorverdünnte Enzymlösung mit 0,1 mM Pyridoxalphosphat	250 µl	-

iii. Alkoholdehydrogenasen

Für die Bestimmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenasen aus *Lactobacillus brevis* (*Lb*-ADH) und *Lactobacillus kefir* (*Lk*-ADH) wurde der Verbrauch des Cofaktors NADPH bestimmt (Schema 4-21), der direkt mit dem Verbrauch des Acetophenons und somit mit der Reaktionsgeschwindigkeit korreliert [Riebel 1996]. Die Reduktion des Acetophenons wurde zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität der ADHs in Phosphatpuffer, deren *pH*- und Temperaturabhängigkeit und für Stabilitätsuntersuchungen derselben in thermomorphen Lösungsmittelsystemen genutzt.

Im Vorfeld der Messung wurde die jeweilige Alkoholdehydrogenase im Kaliumphosphat-Puffer (50 mM mit 1 mM MgCl₂, *pH* 7,0) bei 30 °C für 30 Minuten inkubiert. Für den photometrischen Assay wurde eine 10 mM Substratlösung aus 5,83 µl Acetophenon in 5 ml Kaliumphosphat-Puffer sowie eine 0,2 mM Cofaktor-Lösung aus 1,767 mg NADPH in 1 ml KPi hergestellt. Daraus wurden eine Referenzprobe und eine Enzym-Substrat-Cofaktor-Mischung angefertigt. Nach Enzymzugabe wurde die photometrische Messung bei *T* = 30 °C umgehend gestartet und die Abnahme des NADPH über eine Minute durch Verfolgung der Absorption bei λ = 340 nm detektiert. Die Probenzusammensetzung ist in Tabelle A-21 zusammengefasst.

Tabelle A-21. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenasen *Lb*-ADH und *Lk*-ADH.

	Probe	Referenz
10 mM Acetophenon in 50 mM KPi (mit 1 mM MgCl ₂ , <i>pH</i> 7,0)	930 µl	1000 µl
0,2 mM NADPH	50 µl	-
Vorverdünnte Enzymlösung	20 µl	-

Für die Bestimmung der Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus der Pferdeleber wurde die Oxidation von Benzylalkohol zu Benzaldehyd als Modellreaktion gewählt (Schema 4-22).

iv. Saure Phosphatase

Eine Modellreaktion zur Bestimmung der Aktivität saurer Phosphatasen ist die Hydrolyse von 2-Carboxyphenylphosphat zu Salicylsäure (Schema 4-20). [Brandenberger und Hanson, 1953; Worthington Enzyme Manual Assay, 2013] Diese Reaktion wurde zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität von saurer Phosphatase in Acetatpuffer, deren *pH*- und Temperaturabhängigkeit und für Stabilitätsuntersuchungen derselben in thermomorphen Lösungsmittelsystemen genutzt.

Im Vorfeld der Messung wurde die saure Phosphatase im Acetatpuffer (150 mM, *pH* 5,5) bei 25 °C für eine Stunde inkubiert. Für den photometrischen Assay wurde eine 3,65 mM Substratlösung aus 1,6 mg 2-Carboxyphenylphosphat in 2 ml Acetatpuffer hergestellt. Daraus wurden eine Referenzprobe und eine Enzym-Substrat-Mischung angefertigt. Nach Enzymzugabe wurde die photometrische Messung bei *T* = 25 °C umgehend gestartet und die Bildung der Salicylsäure über eine Minute durch Verfolgung der Absorption bei λ = 300 nm detektiert. Die Probenzusammensetzung ist in Tabelle A-22 zusammengefasst.

Tabelle A-22. Allgemeine Zusammensetzungen der Lösungen zur Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase.

	Probe	Referenz
150 mM Acetatpuffer (<i>pH</i> 5,5)	666 µl	666 µl
3,65 mM 2-Carboxyphenylphosphat	167 µl	167 µl
Vorverdünnte Enzymlösung	167 µl	-
Entionisiertes Wasser	-	167 µl

Die Aktivität der beschriebenen Enzyme konnte nachfolgend aus dem linearen Teil der Produktbildung nach Gleichung (A-6) berechnet werden.

$$A = \frac{\Delta E \left[\text{min}^{-1} \right] * V_{\text{Küvette}} [\text{ml}]}{\varepsilon \left[\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1} \right] * d [\text{cm}] * V_{\text{Enzym}} [\text{ml}] * c_{\text{Enzym, vorverdünnt}} \left[\text{mg ml}^{-1} \right]} \quad (\text{A-6})$$

Dabei entspricht *A* der Aktivität und gibt den Reaktionsumsatz in µmol Substrat pro Minute und Milligramm Enzym (U/mg) wieder. Im Zähler ist ΔE der lineare Anstieg der Extinktion und $V_{\text{Küvette}}$ das Küvettenvolumen; im Nenner ε der Extinktionskoeffizient, *d* die Schichtdicke, V_{Enzym} das Volumen der zugesetzten Enzymlösung und $c_{\text{Enzym, vorverdünnt}}$ die Konzentration an zugesetzter vorverdünnter Enzymlösung.

A.2.11.3 Temperatur-Optimum der Enzyme

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Biokatalysatoren im jeweiligen Puffer wurden die Enzymverdünnungen bei Temperaturen von 10 - 55 °C inkubiert und der Assay bei der entsprechenden Temperatur am Photometer wie zuvor durchgeführt. Tabelle A-23 zeigt die Zusammensetzungen und Messparameter für die untersuchten Enzyme. Jede Messung wurde mindestens dreimal wiederholt.

Tabelle A-23. Zusammensetzungen und Messparameter zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Enzyme.

Enzym	Puffer	λ	pH	T
CaL B	50 mM Phosphatpuffer	400 nm	7,0	10 – 55 °C
ATA08	50 mM Phosphatpuffer	245 nm	8,0	10 – 55 °C
Saure Phosphatase	150 mM Acetatpuffer	300 nm	5,5	15 – 35 °C
ADH	50 mM Phosphatpuffer	340 nm	7,0	5 – 55 °C
TPP106	50 mM KPi mit 2,5 mM MgCl ₂	340 nm	7,5	10 – 50 °C

A.2.11.4 pH-Optimum der Enzyme

Für die Messungen zur pH-Wert-Abhängigkeit der Enzyme wurde im pH-Bereich von 3,0 - 5,5 ein Acetatpuffer, von 6,0 - 8,0 ein Kaliumphosphatpuffer und im Bereich von pH 8,5 - 10,0 ein Boratpuffer eingesetzt. Die Wahl der Pufferkonzentration und die Messtemperatur wurden der allgemeinen Versuchsbedingung der Enzyme angepasst. Tabelle A-24 zeigt die Zusammensetzungen und Messparameter für die untersuchten Enzyme. Jede Messung wurde mindestens dreimal wiederholt.

Tabelle A-24. Zusammensetzungen und Messparameter zur Bestimmung der pH-Wert-Abhängigkeit der Enzyme.

Enzym	Puffer	λ	T	pH
CaLB	50 mM Phosphatpuffer	400 nm	30 °C	7 - 10
ATA08	50 mM Phosphatpuffer	245 nm	25 °C	7 - 10
Saure Phos.	150 mM Acetatpuffer	300 nm	25 °C	3 - 7
ADH	50 mM Phosphatpuffer	340 nm	30 °C	4 - 9
TPP106	50 mM KPi mit 2,5 mM MgCl ₂	340 nm	30 °C	4 - 9

A.2.11.5 BRADFORD-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Enzyme in wässriger Lösung wurde der BRADFORD-Assay genutzt. Diese photometrische Methode beruht wie bei der Gelelektrophorese ebenfalls auf der Anlagerungsreaktion des Säurefarbstoffs Coomassie-Brillantblau an Proteinen. Durch Zugabe des Farbstoffes zum Analyten interkaliert dieser und verschiebt das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Durch Messung dieser Veränderung lässt sich der Proteingehalt nach vorheriger Kalibrierung mit einer BSA-Lösung bekannter Konzentration ermitteln (Dreifachbestimmung). Zu Beginn der Arbeiten wurde die BRADFORD-Lösung A6932 der Firma *AppliChem* auf Raumtemperatur erwärmt und filtriert, um störende Farbstoffaggregate zu entfernen. Für die Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA) in den enzymspezifischen Puffern hergestellt (Tabelle A-25).

Tabelle A-25. Verwendete Konzentrationen und Volumina für die Kalibrierfunktion der Proteinbestimmung.

c(BSA) [µg/ml]	Verwendete Volumina
1000	Einwaage 10 mg BSA, Zugabe von 10 ml Puffer
125	$187,5 \mu\text{l} c(\text{BSA}) = 1000 \mu\text{g}/\text{ml} + 1312,5 \mu\text{l} \text{ Puffer}$
62,5	$750 \mu\text{l} c(\text{BSA}) = 125 \mu\text{g}/\text{ml} + 750 \mu\text{l} \text{ Puffer}$
31,25	$750 \mu\text{l} c(\text{BSA}) = 62,5 \mu\text{g}/\text{ml} + 750 \mu\text{l} \text{ Puffer}$
15,625	$750 \mu\text{l} c(\text{BSA}) = 31,25 \mu\text{g}/\text{ml} + 750 \mu\text{l} \text{ Puffer}$

i. Kalibrierung

Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde eine Referenz-Küvette mit 1000 µl der BRADFORD-Lösung und 100 µl des enzymspezifischen Puffers gemischt sowie eine zweite Küvette mit 1000 µl der BRADFORD-Lösung und 100 µl der Probe befüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Lösung bei $T = 25^\circ\text{C}$ und $\lambda = 595 \text{ nm}$ vermessen. Die Kalibrierung ist im Anhang Kapitel A.3 dargestellt.

ii. Bestimmung der Enzymkonzentration in wässriger Lösung

Zur Definition der spezifischen Aktivität der einzelnen Biokatalysatoren wurde die Enzymkonzentration in Lösung bestimmt. Dazu wurden die Enzyme, wie in Tabelle A-26 dargestellt, verdünnt und wiederum 100 µl dieser Verdünnung zusammen mit 1000 µl der BRADFORD-Lösung in der Küvette zusammengegeben und bei $T = 25^\circ\text{C}$ und $\lambda = 595 \text{ nm}$ gegen die Referenz gemessen. Jede Messung wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Tabelle A-26. Verdünnung der Enzymlösungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD.

Enzym	Puffer	Verdünnung
CaLB	50 mM Phosphatpuffer	1:200
ATA08	50 mM Phosphatpuffer	1:16
Saure Phosphatase	150 mM Acetatpuffer	1:16
ADH	50 mM Phosphatpuffer	1:8

iii. Bestimmung der Enzymkonzentration in der IL-Phase

Zur exemplarischen Darstellung der Verteilung des Enzyms im thermomorphen System wurde die Enzymkonzentration im [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS in der unteren IL-Phase bestimmt. Für die Messungen wurden 2 ml Vials nach Tabelle A-27 vorbereitet und auf 40 °C (1PS) erwärmt und geschüttelt. Für die Entnahme der unteren Phase wurde das TMS auf 0 °C (2PS) abgekühlt, zentrifugiert und mit einer Metallkanüle die Probe entnommen. Der Blindwert wurde in einer ersten Messung mit 1000 µl BRADFORD-Lösung sowie 100 µl der unteren Phase von Vial 1 ermittelt. Die weiteren Messungen setzten sich aus 1000 µl BRADFORD-Lösung und 100 µl der unteren Phase von Vial 2 zusammen. Der ermittelte Blindwert wurde von den Messungen aus Vial 2 subtrahiert.

Tabelle A-27. Zusammensetzung der Vials zur Bestimmung der Enzymkonzentration in der IL-Phase.

Vial 1	Vial 2
0,525 g [BMIm][BF ₄]	0,525 g [BMIm][BF ₄]
225 µl 1 M NaPi	225 µl 1 M NaPi
750 µl H ₂ O	750 µl H ₂ O
Kein Enzym	150 µl Enzym CaLB

iv. IL-Konzentration in der oberen wässrigen Phase des TMS

Nach DREYER *et al.* kann das BRADFORD-Assay auch für die Bestimmung von ionischen Flüssigkeiten in wässrigen Lösungen verwendet werden, da nachgewiesen werden konnte, dass bspw. Ammoeng™110 in Interaktion mit dem Coomassie-Farbstoff Brilliant Blue G-250 ebenso ein Absorptionsmaximum bei 595 nm hat. Bis zu 15% (w/w) IL in Lösung können mit einer Genauigkeit von ±0,4% (w/w) mit dieser Methode bestimmt werden. [Dreyer und Kragl 2008] Eingangs wurde eine Kalibrierkurve auf Grundlage verschiedener IL-Konzentrationen für die photometrische Messung angefertigt. Die Zusammensetzung der Küvette entspricht der Bestimmung der Enzymkonzentration in Puffer und die Messungen wurden ebenso durchgeführt, in Dreifachbestimmung.

A.2.11.6 Stabilitätsuntersuchung der Enzyme in den Lösungsmittelsystemen

Für die Stabilitätsuntersuchung der einzelnen Enzyme in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen wurden die photometrischen Assays zur Aktivitätsbestimmung über mehrere Tage (200 h) in definierten Zeitabständen durchgeführt. Die Enzyme wurden zwischenzeitlich bei der gewünschten Temperatur inkubiert.

A.2.12 Statistik

Zur Vermeidung von Messunsicherheiten wurden die Versuche mindestens dreifach durchgeführt, jede Probe dreimal vermessen und der entsprechende Mittelwert mit Standardabweichung gebildet.

Für die statistische Begutachtung der Messdaten in dieser Arbeit wurden fortwährend das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Messwerte von mind. drei Durchführungen gebildet. Der Mittelwert errechnete sich aus Gleichung (A-7), für die Standardabweichung wurde Gleichung (A-8) verwendet. Festzuhalten sei, dass Mittelwert und Standardabweichung stets nach dem Abschluss aller Berechnungen der Einzelwerte gebildet wurden.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{A-7})$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_{\text{arithm}})^2} \quad (\text{A-8})$$

A.3 Abbildungen und Tabellen

Kapitel 4.1.1

Tabelle A-28. Mischbarkeit der verwendeten Lösungsmittel bei T = 25 °C. + mischbar, - nicht mischbar.

		50% (v/v)																														
		Wasser	Ethylen glykol	Methanol	Ethanol	Essigsäure	1-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	2-Propanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol	Acetonitril	DMSO	DMF	Aceton	DCM	Chloroform	Ethylacetat	THF	1,4-Dioxan	MTBE	Diethylether	Toluol	Tetra	Cyclohexan	n-Heptan	Pentan	n-Hexan
Wasser	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Ethylen glykol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Methanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Essigsäure	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Propanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Butanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Pentanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Hexanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
2-Propanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Heptanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Octanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Nonanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
1-Decanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Acetonitril	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	
DMF	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Aceton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Tabelle A-29. Ordnung der verwendeten Lösungsmittel nach polar – semi-polar - unpolar, $E_T(30)$ -Werte nicht dargestellt.

polar	semi-polar	unpolar
Wasser	Ethylenglykol	1-Butanol
	Methanol	1-Pentanol
	Ethanol	1-Hexanol
	Essigsäure	1-Heptanol
	1-Propanol	1-Octanol
	2-Propanol	1-Nonanol
	Acetonitril	1-Decanol
	DMSO	DMF
	Aceton	Dichlormethan
	THF	Chloroform
	1,4-Dioxan	Ethylacetat
↓ Polarität		
	MTBE	
	Diethylether	
	Toluol	
	Tetra(chlorkohlenstoff)	
	Cyclohexan	
	<i>n</i> -Heptan	
	Pentan	
	<i>n</i> -Hexan	

Tabelle A-30. Untersuchte organische Lösungsmittel mit Kaliumphosphat-Puffer im Mischungsverhältnis 20:40:40% (v/v). Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen zwischen 20 °C und 60 °C.

		Polarität ← 20% (v/v)												
		T/°C	1-Butanol	1-Octanol	Dichlormethan	Chloroform	Ethylacetat	MTBE	Diethylether	Toluol	Tetra	Cyclohexan	<i>n</i> -Heptan	<i>n</i> -Hexan
1,4-Dioxan	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
THF	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS

↓

	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
40% (v/v)	Aceton	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	DMSO	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	Acetonitril	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	2-Propanol	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	1-Propanol	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	Ethanol	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	Methanol	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		Kaliumphosphat-Puffer (50 mM pH 7,0) 40% (v/v)											

Tabelle A-31. Mischung von 40% (v/v) KPi und 50% (v/v) Tetrahydrofuran mit einer Auswahl semi-polarer organischer Lösungsmittel. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		10% (v/v)												
THF 50% (v/v)	T/°C	MTBE	Ethylacetat	Chloroform	Dichlormethan	1-Octanol	1-Butanol	Aceton	DMSO	Acetonitril	2-Propanol	1-Propanol	Ethanol	Methanol
		2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS
40% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)														

Tabelle A-32. Mischung von 40% (v/v) KPi und 10-50% (v/v) MTBE mit einer Auswahl semi-polarer organischer Lösungsmittel. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		10-50% (v/v)							
MTBE 10% (v/v)	T/°C	1,4-Dioxan	Aceton	DMSO	Acetonitril	2-Propanol	1-Propanol	Ethanol	Methanol
		2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS
	20	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	2PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	2PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	2PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
MTBE 20% (v/v)	T/°C	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS
		20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
MTBE 30% (v/v)	T/°C	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS
MTBE 50% (v/v)	T/°C	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS

	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	10	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		40% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0)								

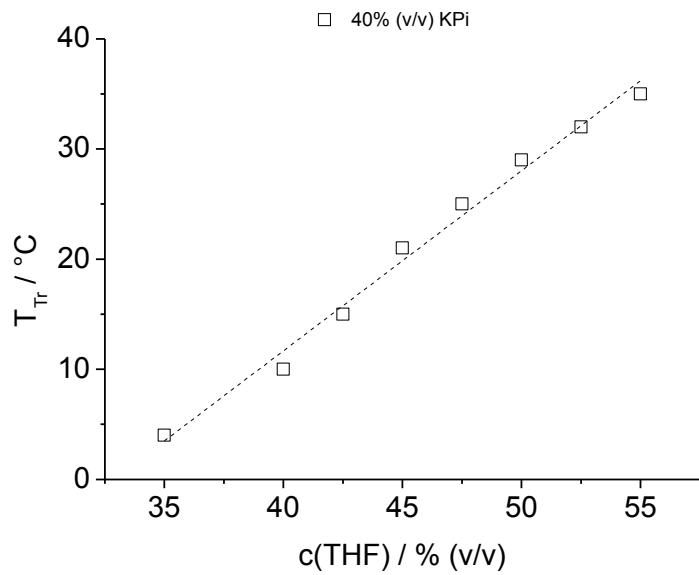


Abbildung A-2. Einfluss von 1-Butanol als Phasenvermittler auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im organischen TMS mit 40% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0) und abhängigen Volumina THF.

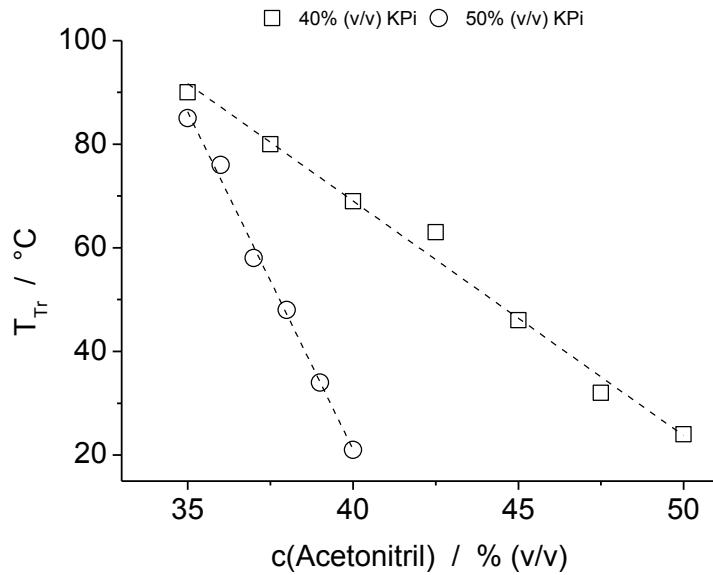


Abbildung A-3. Einfluss von Acetonitril als Phasenvermittler auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im organischen TMS mit verschiedenen 50 mM KPi-Volumina.

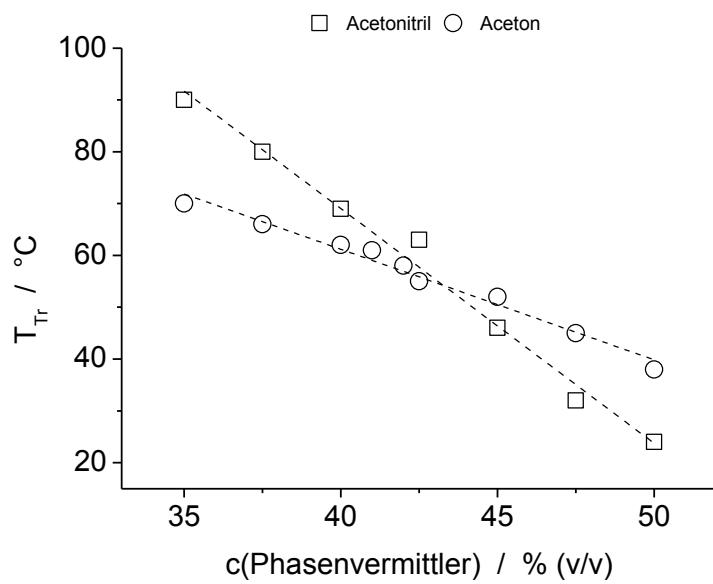


Abbildung A-4. Einfluss von Acetonitril und Aceton als Phasenvermittler auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im organischen TMS aus 40% (v/v) KPi und veränderlichen Anteilen an MTBE.

Kapitel 4.1.2

Tabelle A-33. Phasenverhalten der $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ -IL in der Mischung mit Kaliumphosphat-Puffer und polaren bis semi-polaren Lösungsmitteln als Phasenvermittler. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		10% (v/v)													
		T / °C	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol	Cyclohexanol	1,4-Dioxan
$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	20	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS
$[N_{1122(OH)}][NTf_2]$	20	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS
$[N_{1132(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS
$[N_{1142(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
$[N_{1152(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
80% (v/v) KPi 50 mM pH 7,0															

Tabelle A-34. Phasenverhalten Ammonium-basierter ILs in der Mischung mit Kaliumphosphat-Puffer und polaren bis semi-polaren organischen Lösungsmitteln als Phasenvermittler. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogen (2PS) Phasen.

	T / °C	MTBE	Polarität →											
			1,4-Dioxan	Aceton	DMSO	Acetonitril	2-Propanol	1-Propanol	Ethanol	Methanol	Essigsäure	Glycerol	Diethyenglykol	Ethyleneglykol
$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS
	50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS
	60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS
$[N_{1100}][DMC]$	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
$[N_{2220}][HSO_4]$	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
Ammoeng™110	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
70% (v/v) KPi 50 mM pH 7,0														

Tabelle A-35. Phasenverhalten Ammonium-basierter ILs in der Mischung mit nicht polaren bis semi-polaren organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

50% (v/v)	T / °C	Polarität															
		Isopropylacetat	2-Propanol	1-Butanol	DMSO	Acetonitril	Ethylacetat	Dichlormethan	Chloroform	MTBE	Diethyläther	Diisopropyläther	Toluol	Tetra	Cyclohexan	n-Heptan	n-Hexan
[N _{1112(OH)}][NTf ₂]	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
[N ₁₁₀₀][DMC]	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
[N ₂₂₂₀][HSO ₄]	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
Ammoeng™110	20	1PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS

Tabelle A-36. Vergleich der Mischbarkeit der [NTf₂]-basierten ILs mit Alkoholen. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		50% (v/v)												
		T / °C	50 mM KP ⁱ	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol
50% (v/v)	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	[EMIm][NTf ₂]	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	[BMIm][NTf ₂]	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS
		60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS

Tabelle A-37. Phasenverhalten ionischer Flüssigkeiten mit $[BF_4]$ -Anion in der Mischung mit polaren bis unpolaren Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

				50% (v/v)																						
				T / °C	Wasser	Ethyenglykol	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol	DMSO	Acetonitril	Ethylacetat	1,4-Dioxan	THF	Toluol	1,4-Butandiol	MTBE	n-Heptan
50% (v/v)	$[EMIm][BF_4]$	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
$[BMIm][BF_4]$	$[EMIm][BF_4]$	30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
$[BPY][BF_4]$	$[EMIm][BF_4]$	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
$[BPY][BF_4]$	$[BMIm][BF_4]$	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS

Tabelle A-38. Phasenverhalten einer wasserlöslichen ($[EMIm][EtSO_4]$) und einer wasserunlöslichen ($[EMIm][NTf_2]$) Imidazolium-basierten IL. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		50% (v/v)																							
		T / °C	Wasser	Ethylen glykol	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nananol	1-Decanol	DMSO		Acetonitril	Ethylacetat	1,4-Dioxan	THF	Toluol	1,4-Butandiol	MTBE	n-Heptan
$[EMIm][NTf_2]$	$[EMIm][EtSO_4]$	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
		20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
$[EMIm][EtSO_4]$	$[EMIm][NTf_2]$	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS

Tabelle A-39. Phasenverhalten Imidazolium-basierter ionischer Flüssigkeiten in der 3-Komponenten-Mischung mit Kalumphosphatpuffer und polaren bis unpolaren organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		10% (v/v)																	
		T / °C	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	DMSO	Acetonitril	Aceton	1,4-Dioxan	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol	Cyclohexanol	n-Hexan
		30% (v/v)																	
[EMIm][NTf ₂]	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
[BMIm][NTf ₂]	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
[BMIm][MeSO ₄]	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	
[BMIm][Me ₂ PO ₄]	20	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	30	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
[BMIm][BF ₄]	20	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	30	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	40	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	50	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
	60	1PS	1PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	
60% (v/v) KPi 50 mM pH 7,0																			

Tabelle A-40. Phasenverhalten untersuchter ILs in der 3-Komponenten-Mischung mit organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

		60% (v/v)								
		T / °C	1-Octanol	MTBE			2-Propanol	DMSO	Acetonitril	1,4-Dioxan
$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
$[N_{1142(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
$[N_{1152(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
$[N_{2220}][HSO_4]$	20	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS
	40	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS
	50	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
	60	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
$[EMIm][NTf_2]$	20	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
$[BMIm][NTf_2]$	20	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS
	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS
	40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
	60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS
$[BMIm][MeSO_4]$	20	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	50	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
	60	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
$[BMIm][Phos]$	20	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS

	30	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS
	40	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
	50	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
	60	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS
[BMPy][OTf]	20	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	30	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	40	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS
	50	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	1PS	1PS	2PS
	60	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	1PS	1PS	1PS	2PS
		Vinylacetat	2-Propanol	DMSO	Acetonitril	1,4-Dioxan				
							MTBE			
							10% (v/v)			

Tabelle A-41. Charakterisierung von verschiedenen IL-NaPi-Wasser-Systemen. Die Parameter für das Konzentrationsoptimum betragen $T_{UCST} < 40^\circ\text{C}$ und IL = 35% (v/v).

Nr.	IL	Konzentrationsoptimum NaPi
1	[BMIm][BF ₄]	150 mM
2	[Bpy][BF ₄]	233 mM
3	[EMIm][BF ₄]	567 mM
4	[BMIm][Br]	333 mM
5	[BMIm][NO ₃]	350 mM
6	[EMIm][Br]	470 mM
7	[BMIm][Cl]	—
8	Ammoeng TM 110	450 mM

Tabelle A-42. Experimentelle Werte der freien Hydratisierungenthalpie ΔG_{hyd} nach MARCUS et al. bei 298,15 K. [Marcus 1991]

Ion	$\Delta G_{\text{hyd}}(\text{exp.} 298,15 \text{ K}) / \text{kJ/mol}$
H_2PO_4^-	-465
Na^+	-365
CH_3CO_2^-	-365
Cl^-	-340
Br^-	-315
NO_3^-	-300
I^-	-275
BF_4^-	-190

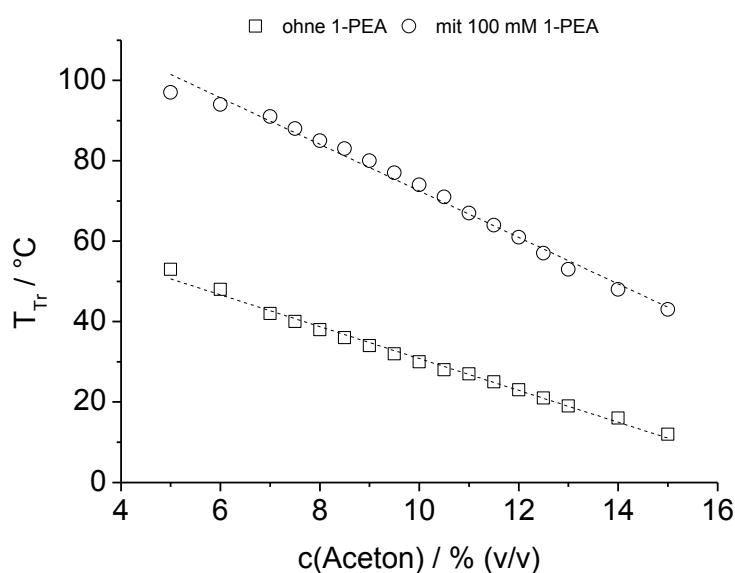


Abbildung A-5. Einfluss des Phasenvermittlers Aceton auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im $[\text{N}_{1112}(\text{OH})][\text{NTf}_2]\text{-KPi-TMS}$ (20% (v/v) IL, 65-75% (v/v) KPi (50 mM, pH 7,0). Parallelverschiebung des linearen Zusammenhangs durch Zugabe von 100 mM 1-PEA.

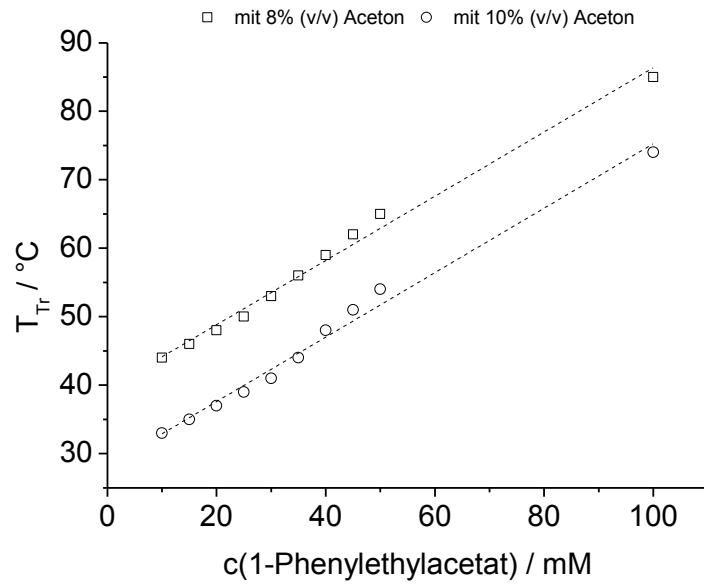


Abbildung A-6. Einfluss von 1-100 mM Substrat 1-Phenylethylacetat im $[\text{N}_{1112(\text{OH})}\text{][NTf}_2]\text{-KPi-Aceton-TMS}$ (20% (v/v) IL, 70 bzw. 72% (v/v) KPi, 8 bzw. 10% (v/v) Aceton) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

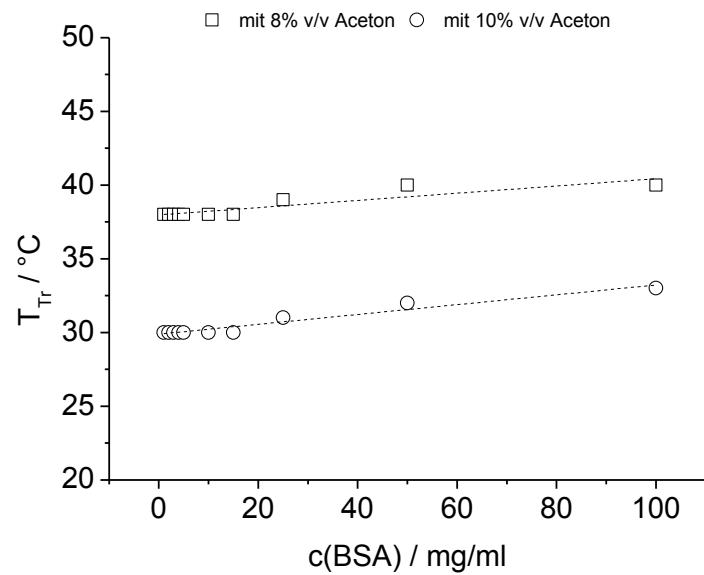


Abbildung A-7. Einfluss von 1-100 mg/ml BSA im $[\text{N}_{1112(\text{OH})}\text{][NTf}_2]\text{-KPi-Aceton-TMS}$ (20% (v/v) IL, 70 bzw. 72% (v/v) KPi, 8 bzw. 10% (v/v) Aceton) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

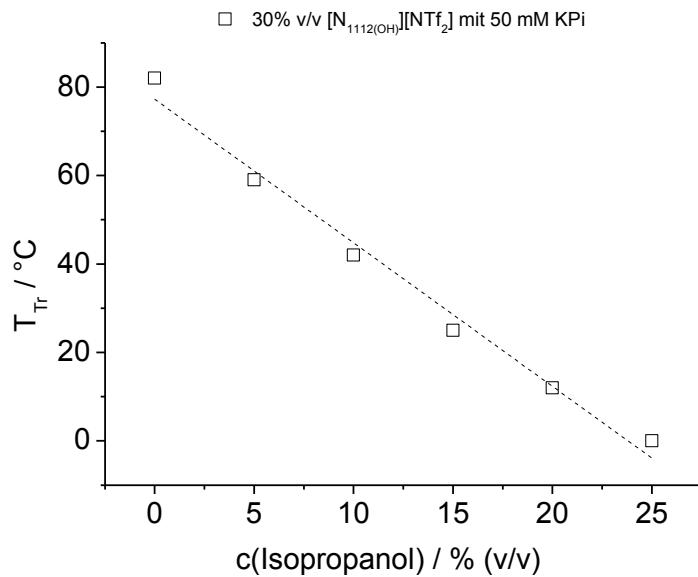


Abbildung A-8. Einfluss des Phasenvermittlers Isopropanol im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

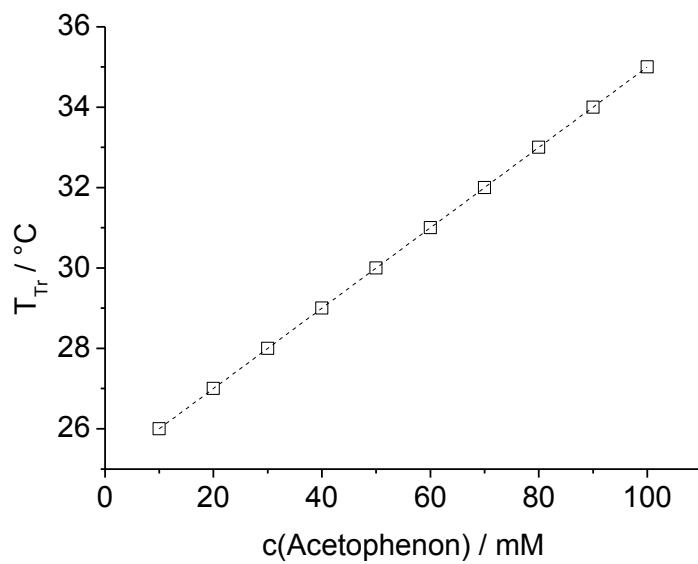


Abbildung A-9. Einfluss des Substrates Acetophenon im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Isopropanol-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

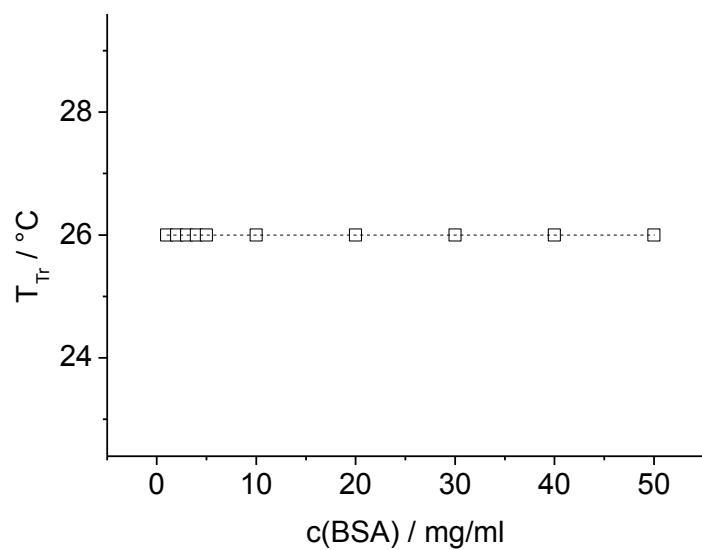


Abbildung A-10. Einfluss von BSA im $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$ -KPi-Isopropanol-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

Tabelle A-43. Das Phasenverhalten von $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ in der Mischung mit Alkoholen. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen zwischen 20 und 60 °C.

		33,3% (v/v)												
		T / °C	Wasser	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol
(v/v)	$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1112(OH)}][NTf_2]$	60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1122(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
(v/v)	$[N_{1122(OH)}][NTf_2]$	30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1122(OH)}][NTf_2]$	40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1122(OH)}][NTf_2]$	50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
	$[N_{1122(OH)}][NTf_2]$	60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS

$[N_{1132(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	30	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	40	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	50	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	60	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
$[N_{1142(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	30	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	40	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS						
	50	2PS	1PS	2PS	2PS								
	60	2PS	1PS	2PS									
$[N_{1152(OH)}][NTf_2]$	20	2PS	1PS	2PS									
	30	2PS	1PS										
	40	2PS	1PS										
	50	2PS	1PS										
	60	2PS	1PS										

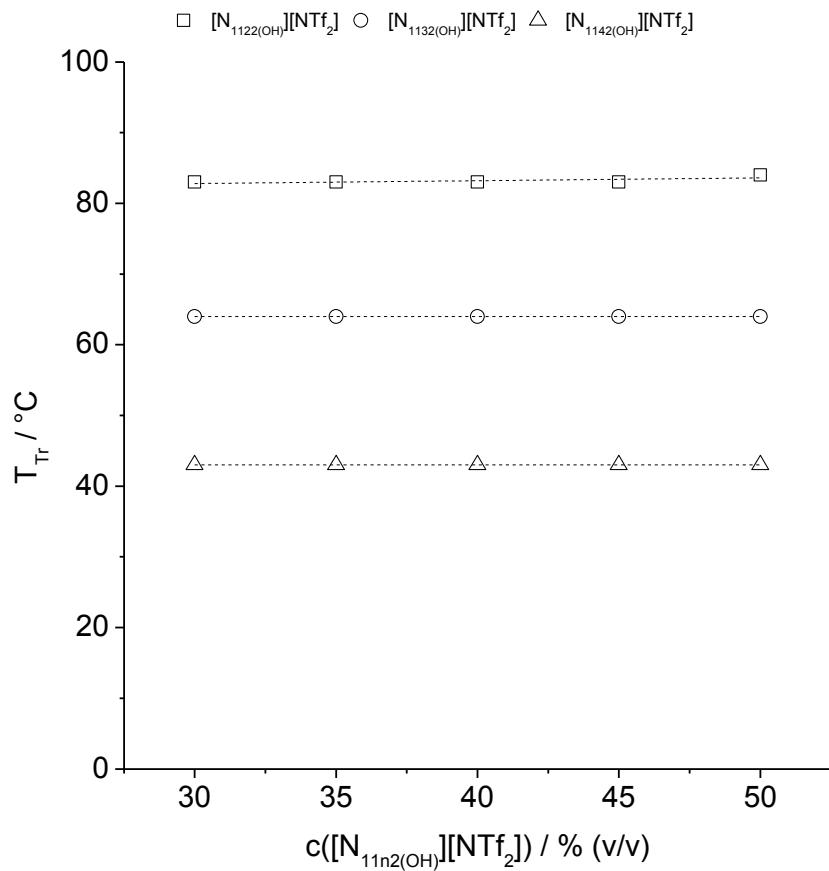


Abbildung A-11. Trübungstemperaturen T_{Tr} im thermomorphen System aus 30-50% (v/v) $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ ($n= 2,3,4$) und 1-Octanol.

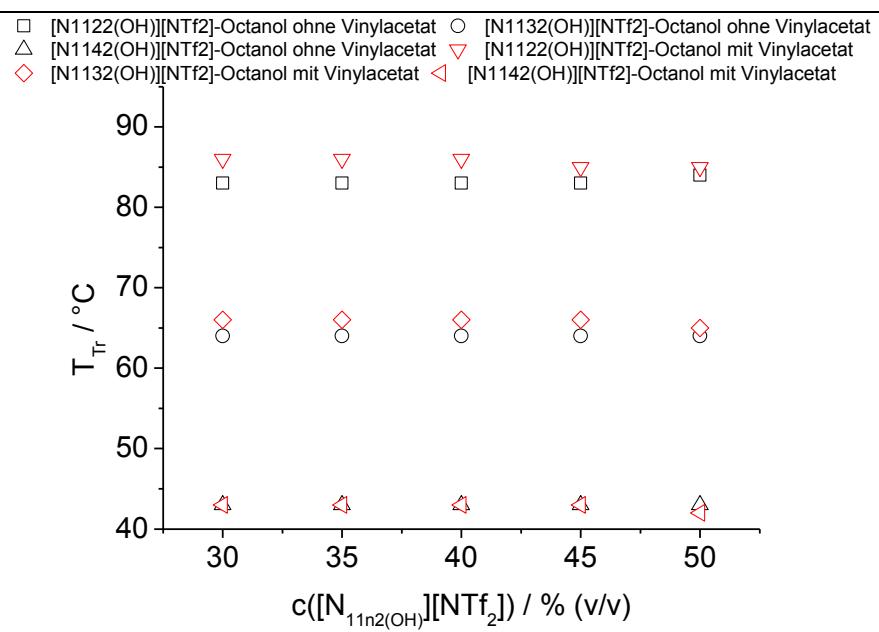


Abbildung A-12. Trübungstemperaturen T_{Tr} im $[N_{11n2(OH)}][NTf_2]$ -Octanol-TMS ($n = 2,3,4$) mit 25 mM Vinylacetat.

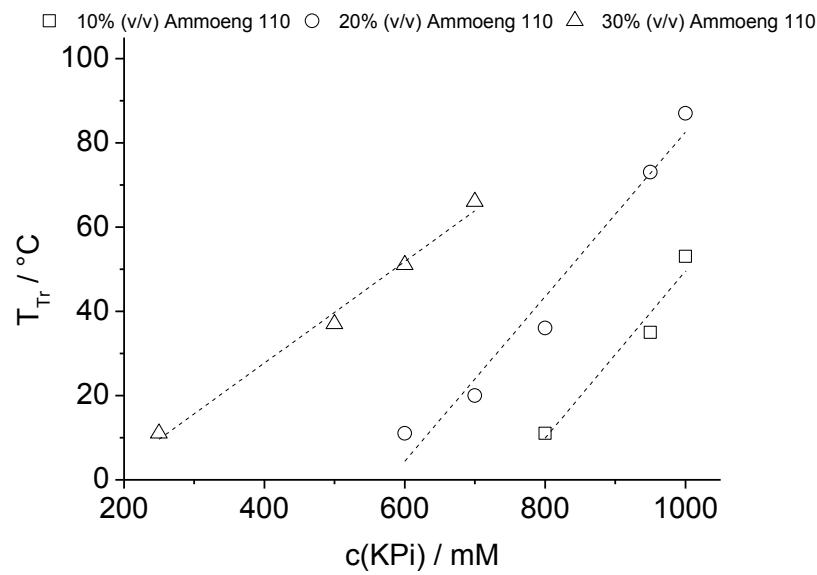


Abbildung A-13. Trübungstemperatur T_{Tr} von 10-30% (v/v) AmmoengTM110 mit 100-1000 mM KPi.

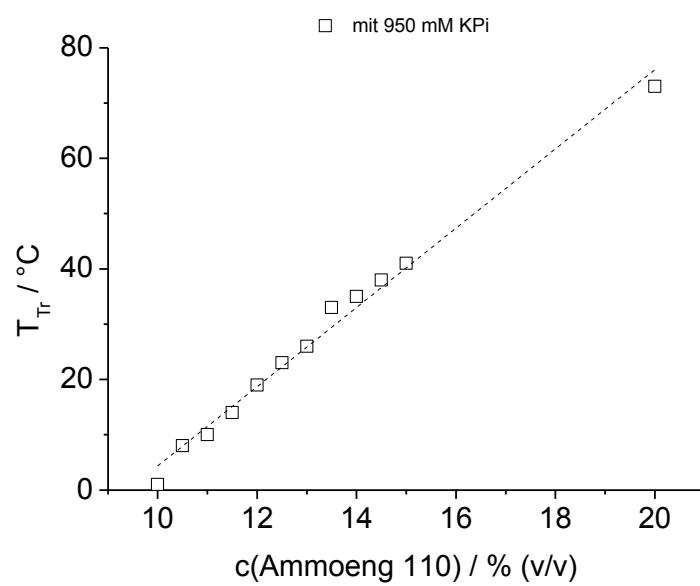


Abbildung A-14. Trübungstemperatur T_{Tr} im AmmoengTM110-KPi-TMS bei unterschiedlicher IL-Konzentration.

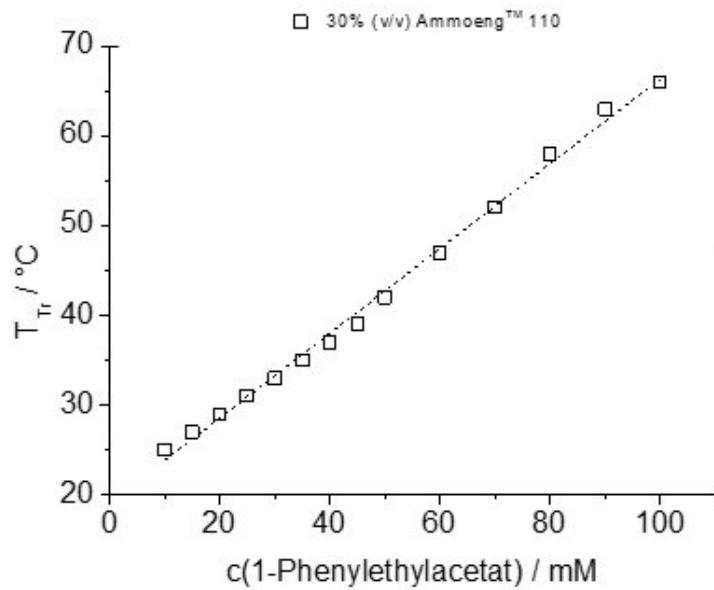


Abbildung A-15. Einfluss des Substrates 1-Phenylethylacetat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im Ammoeng™110-TMS (30% (v/v) IL, 70% (v/v) 500 mM KPi).

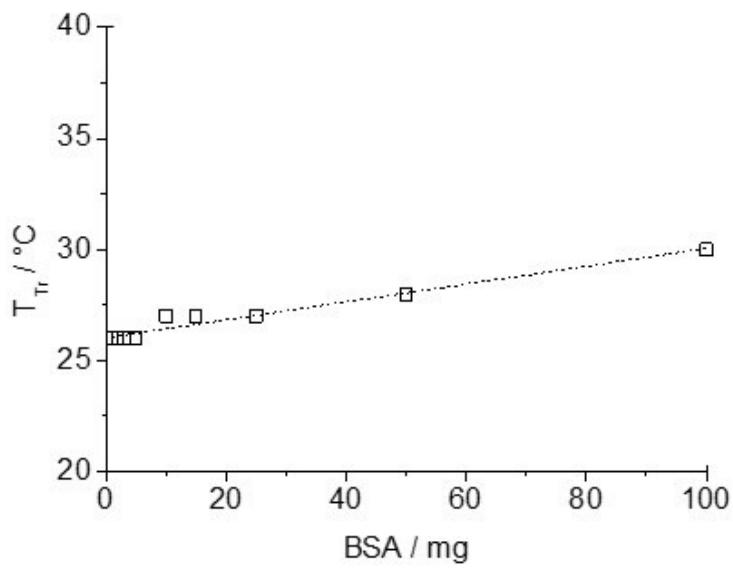


Abbildung A-16. Einfluss von BSA im Ammoeng™110-KPi-TMS (30% (v/v) IL, 70% (v/v) 500 mM KPi) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

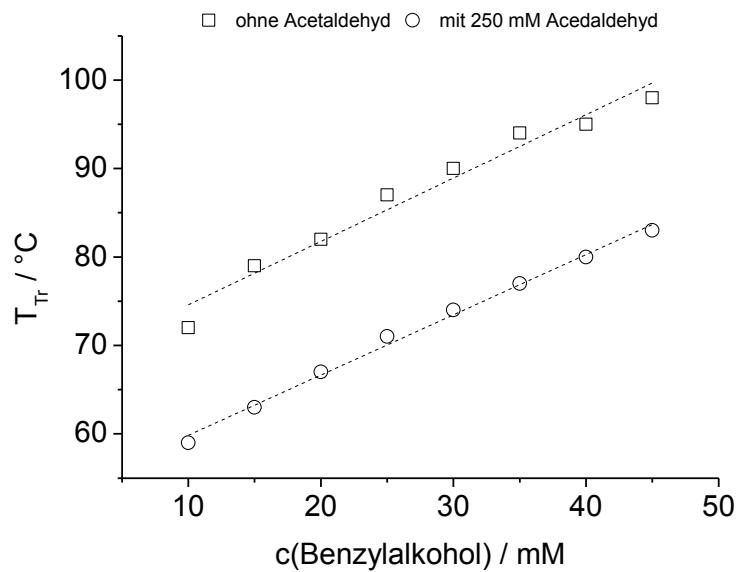


Abbildung A-17. Parallelverschiebung der Trübungstemperatur T_{Tr} im AmmoengTM110-KPi-TMS bei Zugabe der Substrate Benzylalkohol und Acetaldehyd.

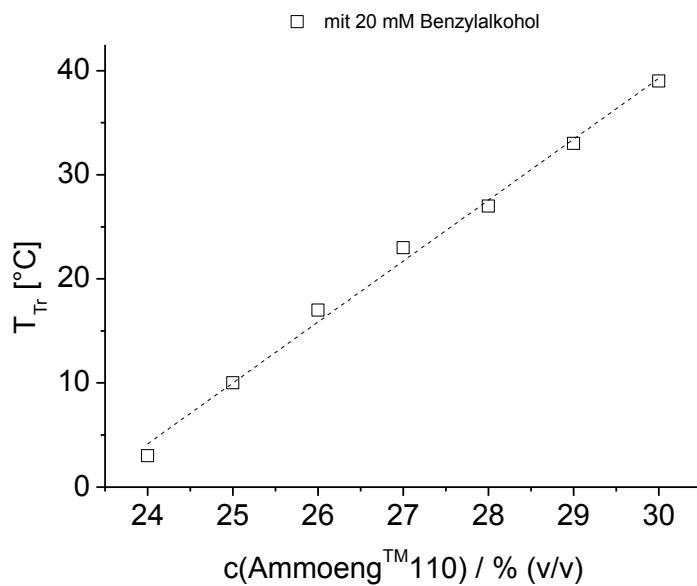


Abbildung A-18. Einfluss von 20 mM des Substrates Benzylalkohol im AmmoengTM110-KPi-TMS (500 mM KPi) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

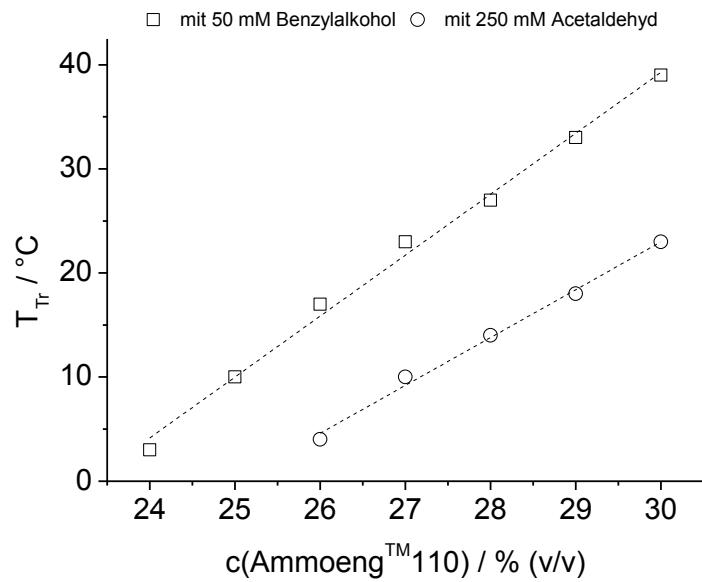


Abbildung A-19. Einfluss des Substrates und des Co-Faktor-Regenerators im AmmoengTM110-KPi-TMS (500 mM KPi) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

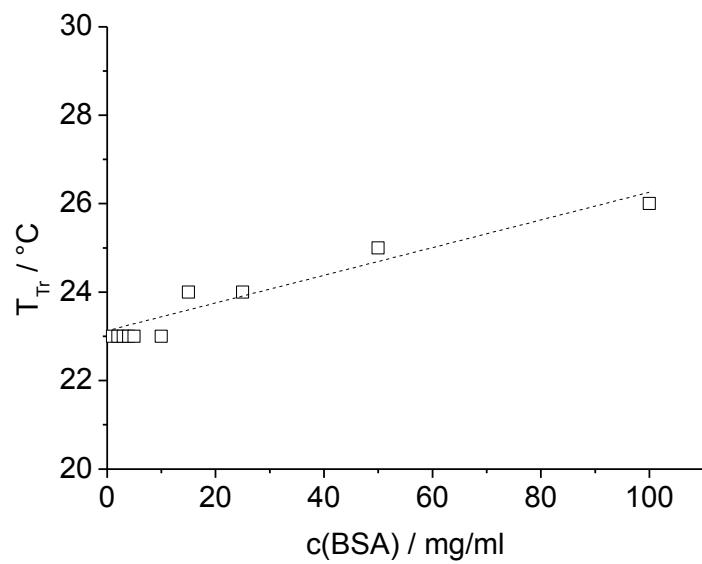


Abbildung A-20. Einfluss von BSA im AmmoengTM110-KPi-TMS mit Substrat und Cofaktor-Regenerator auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

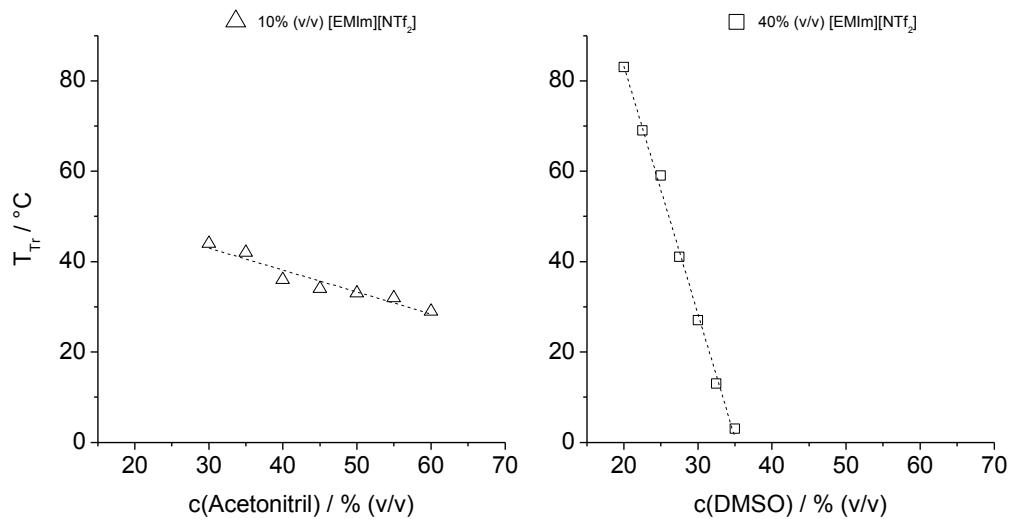


Abbildung A-21. Trübungstemperaturen T_{Tr} im $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ -KPi-TMS mit dem Phasenvermittler Acetonitril (links) und DMSO (rechts) (50 mM KPi, pH 7,0).

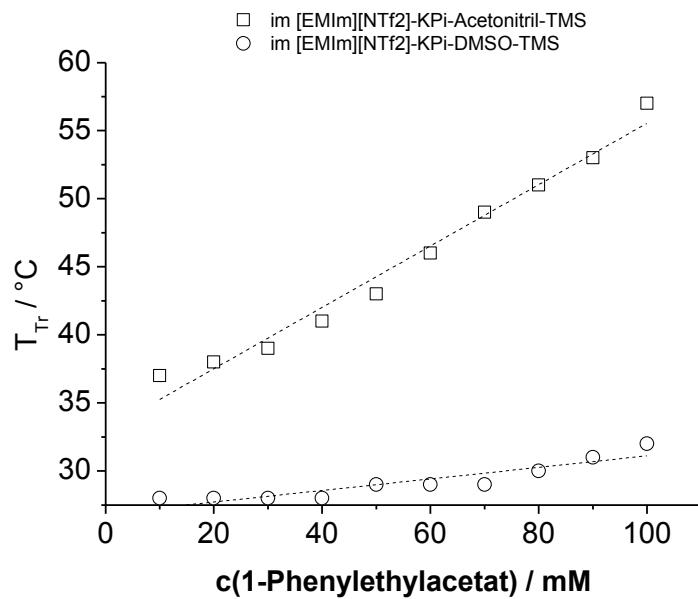


Abbildung A-22. Einfluss des Substrates 1-Phenylethylacetat im $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ -KPi-Acetonitril-/ $[\text{EMIm}][\text{NTf}_2]$ -KPi-DMSO-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

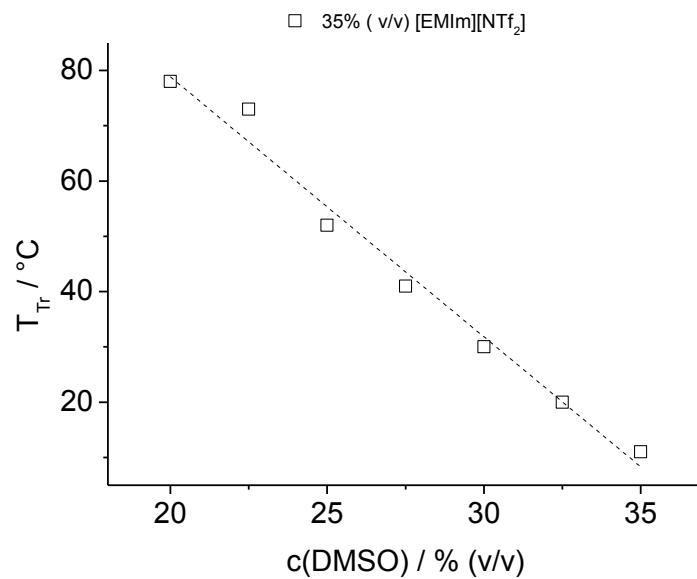


Abbildung A-23. Einfluss des Phasenvermittlers DMSO im [EMIm][NTf₂]-NaPi-TMS (35% (v/v) IL, 30-45% (v/v) NaPi (50 mM, pH 7,0)) auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

Tabelle A-44. [EMIm]-basierte ionische Flüssigkeiten in der Mischung mit unpolaren bis polaren organischen Lösungsmitteln. Beurteilung der homogenen (1PS) und heterogenen (2PS) Phasen.

			50% (v/v)																								
			T / °C	Wasser	Ethylen glykol	Methanol	Ethanol	1-Propanol	2-Propanol	1-Butanol	1-Pentanol	1-Hexanol	1-Heptanol	1-Octanol	1-Nonanol	1-Decanol	DMSO	Acetonitril	Ethylacetat	1,4-Dioxan	THF	Toluol	1,4-Butandiol	MTBE	n-Heptan		
50% (v/v)	[EMIm][EtSO ₄]		20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS			
	[EMIm][NTf ₂]		30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
	[EMIm][NTf ₂]		40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
	[EMIm][NTf ₂]		50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
	[EMIm][NTf ₂]		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
	[EMIm][NTf ₂]		20	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS		
			30	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
			40	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
			50	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS		
			60	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS	2PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS		

Tabelle A-45. Phasenverhalten des $[EMIm][NTf_2]$ in der Mischung mit gängigen organischen Lösungsmitteln, geordnet nach der eluotropen Reihe.

		Polarität ← 66,6% (v/v) →											
		T / °C	Wasser	Ethylenglykol	DMSO	Acetonitril	Ethylacetat	THF	1,4-Dioxan	1,4-Butandiol	Toluol	MTBE	n-Heptan
33,3% (v/v)	$[EMIm][NTf_2]$	20	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		30	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		40	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		50	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS
		60	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	1PS	2PS	2PS	2PS	2PS



T = 40 °C > Abkühlung > T = 0 °C

Abbildung A-24. Das UCST-Phasenverhalten von $[BMIm][BF_4]$, H_2O und $NaPi$ (150 mM $NaPi$, 35% (v/v) $[BMIm][BF_4]$). Das System wurde zur besseren Sichtbarkeit mit dem Indikator Nilblau angefärbt.

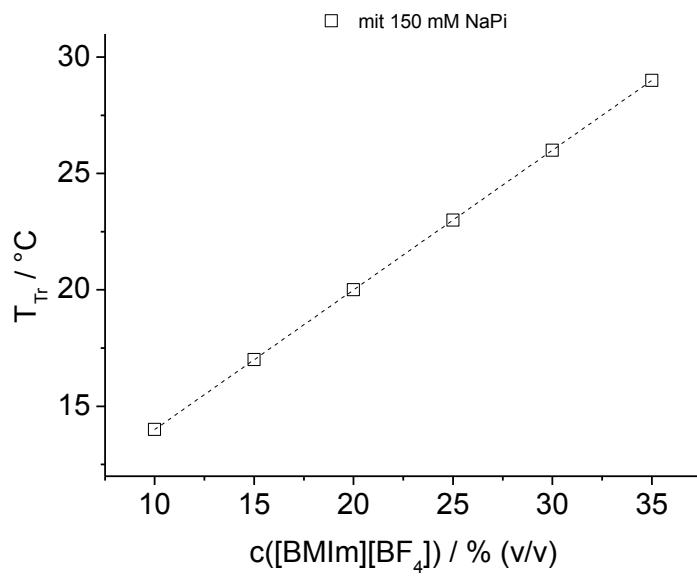


Abbildung A-25. Trübungstemperatur T_{Tr} in Abhängigkeit von der IL-Konzentration im [BmIm][BF₄]-NaPi-TMS.

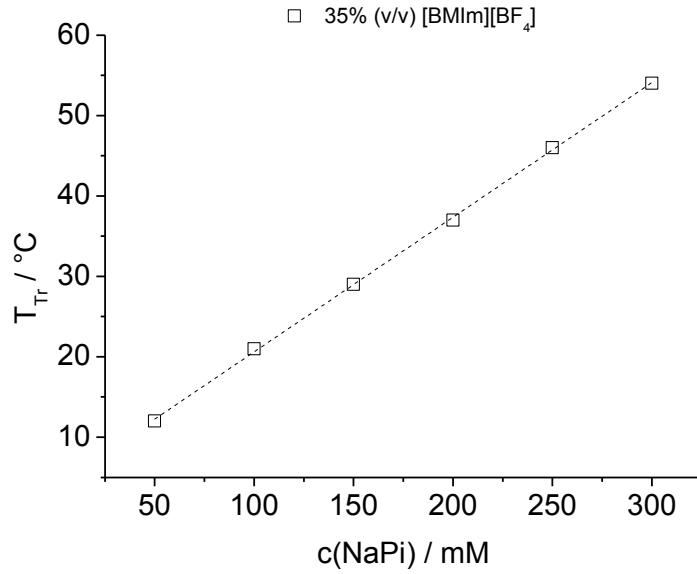


Abbildung A-26. Einfluss der Pufferkonzentration von NaPi auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im System mit 35% (v/v) [BmIm][BF₄].

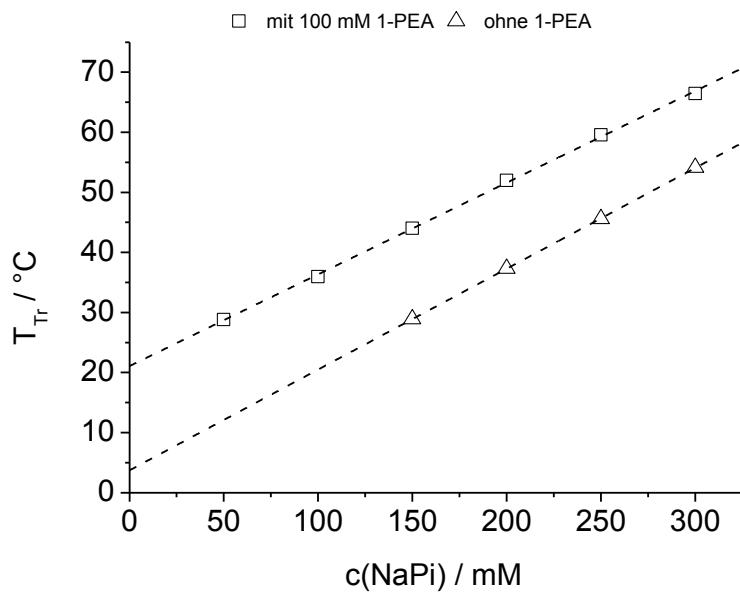


Abbildung A-27. Parallelverschiebung der Trübungstemperatur T_{Tr} durch Zugabe von 100 mM 1-PEA zum $[\text{BMIm}](\text{BF}_4)$ -TMS.

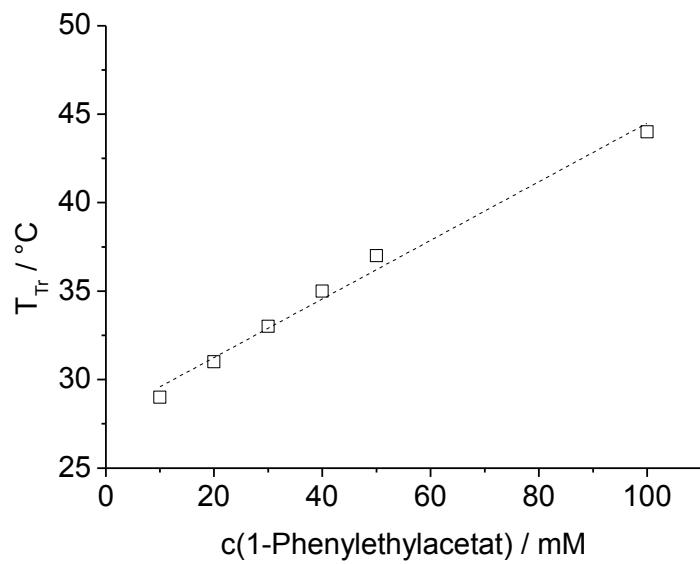


Abbildung A-28. Einfluss von 10-100 mM Phenylethylacetat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} des $[\text{BMIm}](\text{BF}_4)$ -TMS.

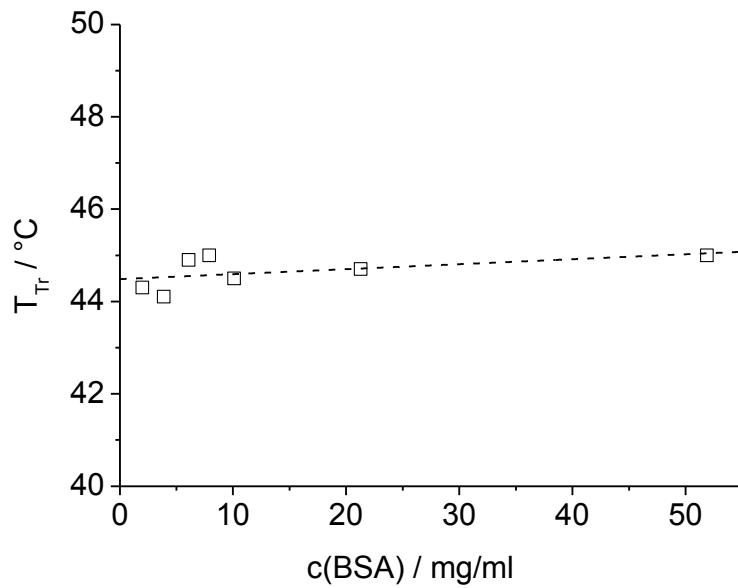


Abbildung A-29. Einfluss von BSA im [BMIm][BF₄]-NaPi-TMS auf die Trübungstemperatur T_{Tr} .

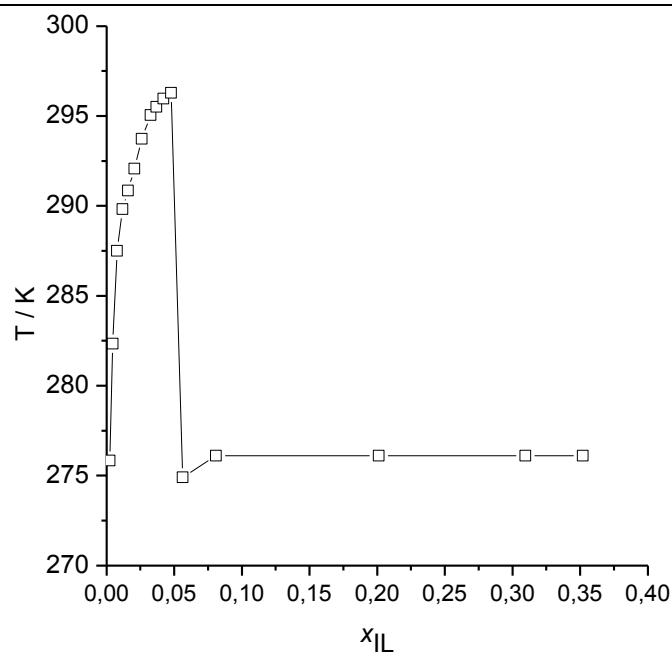


Abbildung A-30. Das UCST-Phasenverhalten von [Bpy][BF₄] und H₂O nach VREEKAMP et al. [Vreekamp et al. 2011]

Kapitel 4.2.1

Tabelle A-46. Aktivität der untersuchten Lipasen in der Umsetzung von *p*-Nitrophenylacetat bei 30 °C und pH 7,0 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen).

Lipase	Hersteller	Aktivität A
Amano Lipase PS	Aldrich	(1,9± 0,1) U/ml
Amano CA Lipase	Jülich Fine Chemicals	(4,8± 0,4) U/mg
Lipase TL	Meito Sangyo Co., LTD	(3,7± 0,1) U/mg
CaLB Lipozym	Cognis	(9,3± 0,3) U/ml
CaLB liquid	c-lecta	(37,2 ± 0,4) U/ml
CaLB powder	Sigma	(4,1± 0,1) U/mg
Novozym® 435	Novozymes	(10,1± 0,1) U/ml

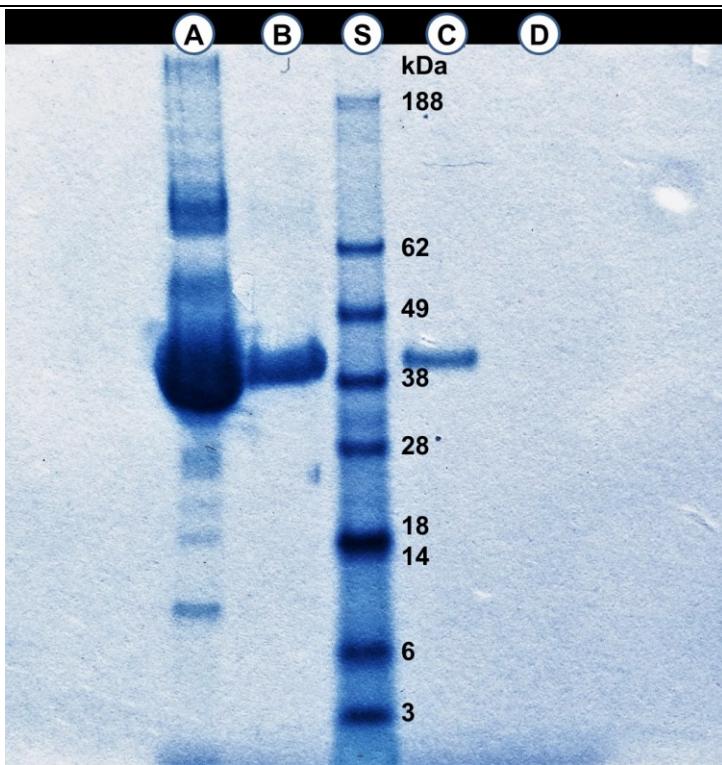


Abbildung A-31. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms CaLB in verschiedenen Konzentrationen (S = Proteinstandard SeeBlue®¹⁰, A = Enzym ohne Verdünnung, B = Verdünnung 1:10, C = Verdünnung 1:100, D = Verdünnung 1:1000).

¹⁰ Als Vergleichsprotein zur Massenabschätzung der eingesetzten Probe wurde der Proteinstandard SeeBlue® (S) aufgetragen, welcher aus einer bekannten Zusammensetzung verschiedener Proteine von 3 kDa (B-Kette des Insulin) bis 188 kDa (Mycosin) besteht. [Invitrogen 2002]

Markierung **A** in der Abbildung A-31 zeigt den unverdünnten Biokatalysator, bei der besonders intensiven Bande im Bereich von 40 kDa handelt es sich um das katalytisch aktive Enzym CaLB. Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Massenbereichen sind weitere Banden zu erkennen, die auf Proteinverunreinigungen hindeuten, jedoch im Verhältnis zur Bande bei 40 kDa nur in geringer Konzentration vorliegen. Dies belegt die Betrachtung der ersten Verdünnung bei Markierung **B** (1:10), wo bereits kaum Begleitproteine zu erkennen sind. Je verdünnter das Enzym auf das Gel aufgetragen wird, desto geringer ist auch die Bandenintensität (Markierung **C** mit 1:100). Bei einer Konzentration von 1:1000 ist das Enzym mit Hilfe des Gels nicht mehr nachweisbar (Markierung **D**).

Tabelle A-47. Die volumetrische Aktivität von CaLB in verschiedenen Medien bei 30 °C (Mittelwerte aus Fünffachbestimmung).

Nr.	Zusammensetzung des Mediums	vol. Aktivität A_{vol} / U/ml
1	50 mM KPi	37,16 ± 0,10
2	100 mM NaPi	38,81 ± 0,61
3	KPi- Acetonitril-MTBE	22,63 ± 0,09
4	KPi-THF-Butanol	20,84 ± 0,42
5	Ammoeng™ 110-KPi	42,86 ± 0,62
6	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]-KPi-Dioxan	26,58 ± 0,17
7	[N _{1112(OH)}][NTf ₂]-KPi-Aceton	28,95 ± 0,54
8	[EMIm][NTf ₂]-KPi-Acetonitril	10,53 ± 0,08
9	[EMIm][NTf ₂]-KPi-DMSO	11,79 ± 0,07
10	[BMIm][BF ₄]-NaPi	43,16 ± 0,47

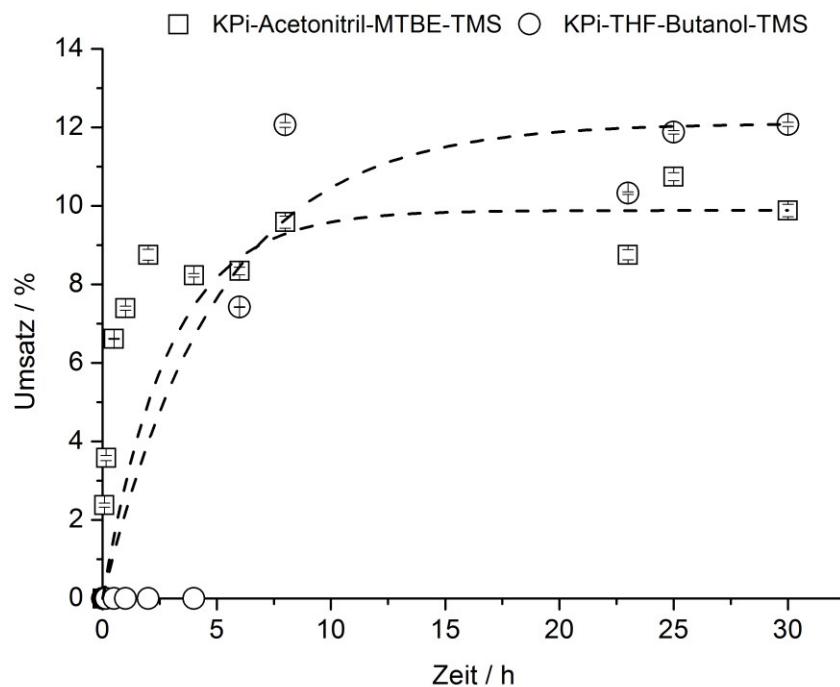
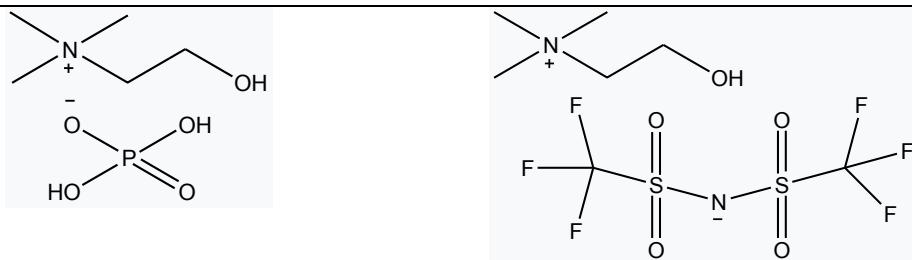


Abbildung A-32. CaLB-Reaktion im organischen TMS 1 und TMS 2 bei 40 °C über 30 Stunden. (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung)



Schema A-2. Die ionischen Flüssigkeiten Cholin-Dihydrogenphosphat und $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$.



Abbildung A-33. Anreicherung der IL-Phase über sechs Rezyklierungsläufe.

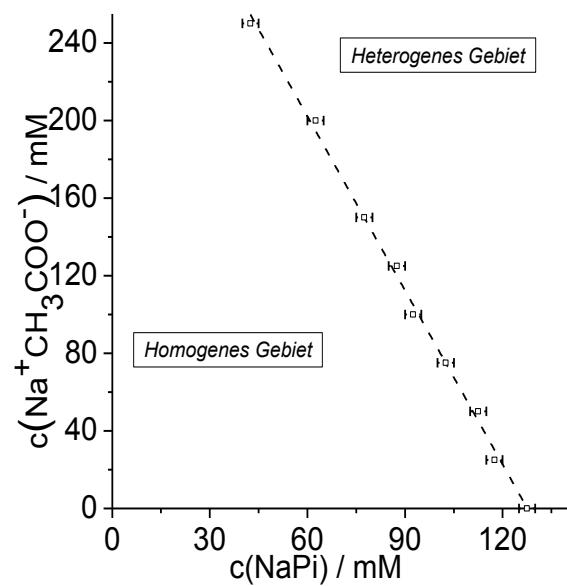


Abbildung A-34. Einfluss von Acetat auf das ternäre System $[\text{BMIm}][\text{BF}_4]$, Wasser und NaPi bei $T = 25^\circ\text{C}$.

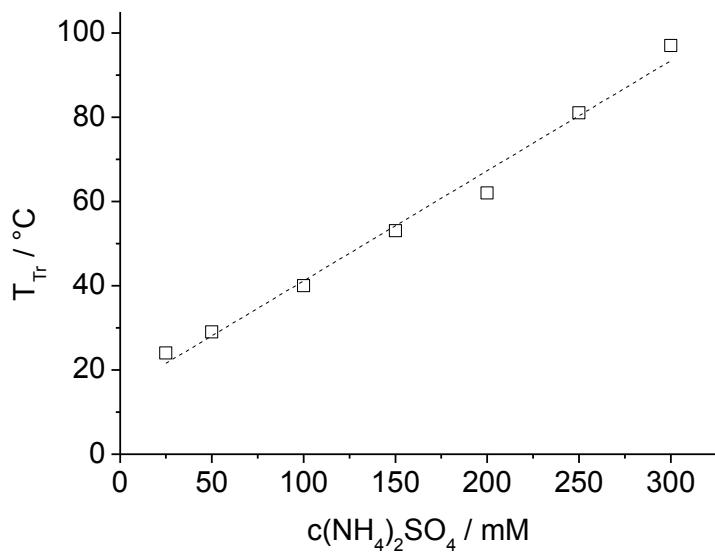


Abbildung A-35. Einfluss des Salzes Ammoniumsulfat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im System aus 50% (v/v) [BMin][BF₄] und 50% (v/v) Natriumacetat-Puffer (500 mM, pH 5,5).

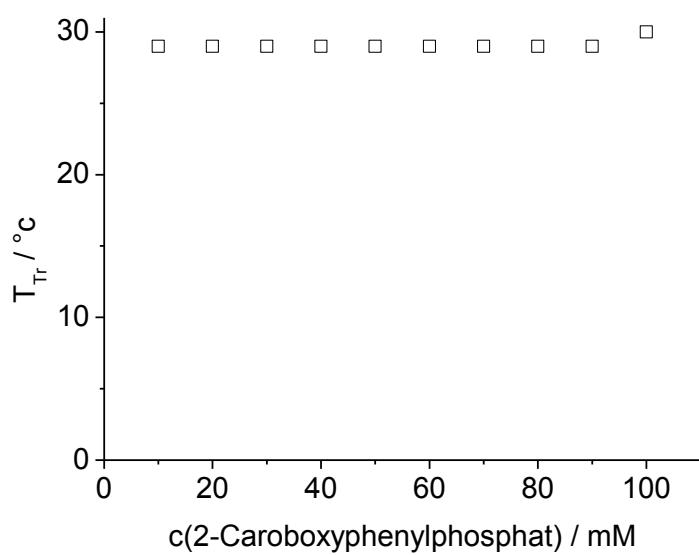


Abbildung A-36. Einfluss des Substrates 2-Carboxyphenylphosphat auf die Trübungstemperatur T_{Tr} im System aus [BMin][BF₄] und NaAcPi 50:50.

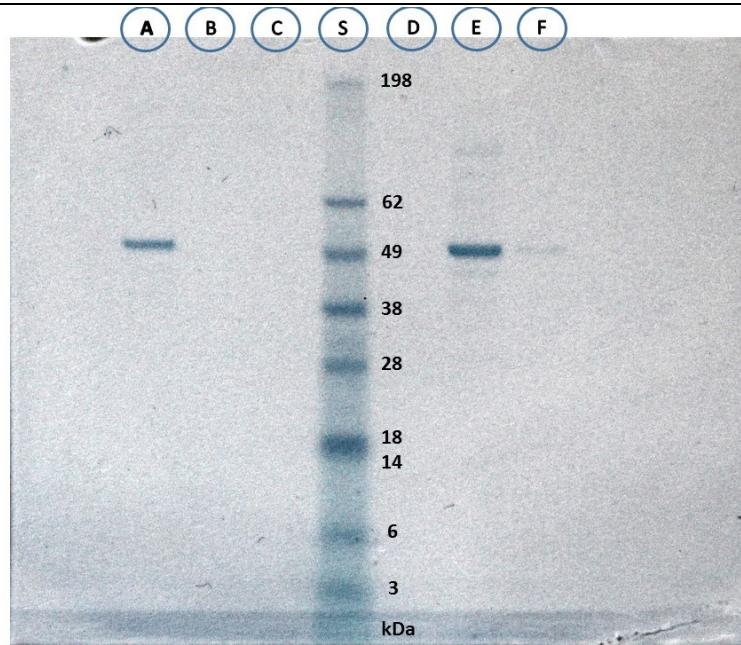


Abbildung A-37. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms ATA08 in verschiedenen Konzentrationen. (S = Proteinstandard SeeBlue®; D = NaPi (200 mM pH 8,0); E = ATA08 unverdünnt; A = 1:2 Verdünnung ATA08 in NaPi (200 mM, pH 8,0); B = 1:100 Verdünnung; C = 1:1000 Verdünnung; F = 1:10 Verdünnung.)

Markierung **E** und **A** lassen eine intensiv gefärbte Bande bei 50 kDa erkennen, ansonsten jedoch nur wenig gefärbte Begleitproteine.

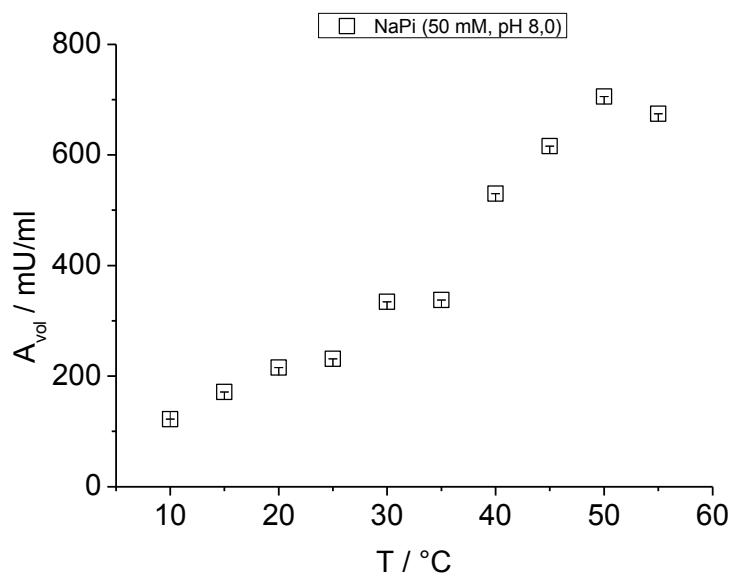


Abbildung A-38. Die Temperaturabhängigkeit der volumetrischen Aktivität der ATA08 in 50 mM NaPi bei pH 8,0.

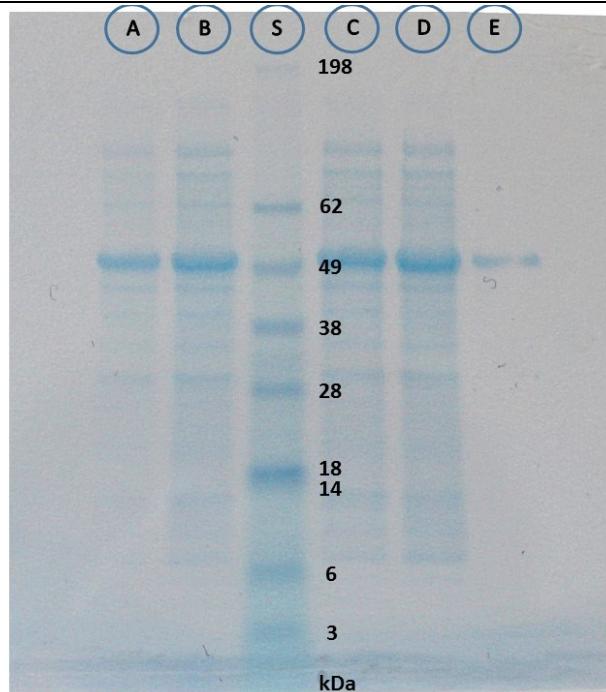


Abbildung A-39. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms ATA08 in verschiedenen Medien. (S = Proteinstandard SeeBlue®, B = 5 mg ATA08 in 1 ml NaPi (200 mM, pH 8,0), A = 1:2 Verdünnung, C = ATA08 im 1PS des [EMIm][NTf₂]-NaPi-DMSO-TMS, D = ATA08 in oberer TMS-Phase, E = ATA08 in unterer TMS-Phase).

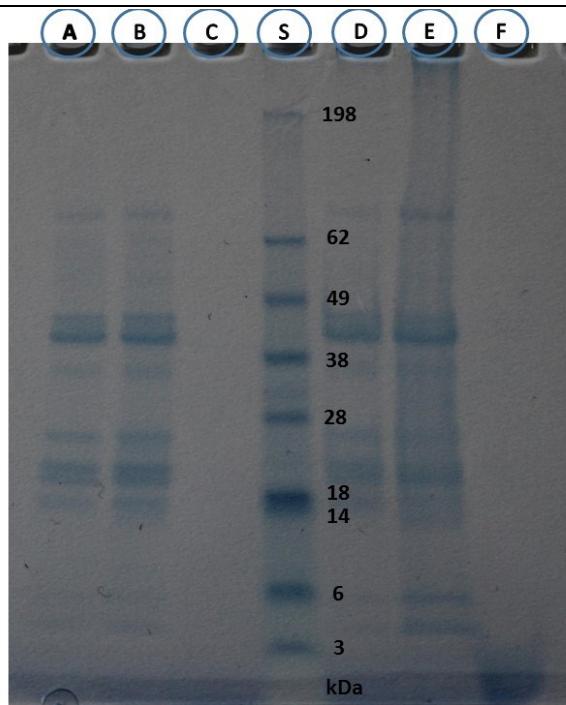


Abbildung A-40. Coomassie-gefärbtes 4–12%iges Bis-Tris-Gel des Enzyms saure Phosphatase (Typ IV-S) in verschiedenen Konzentrationen und Medien. (S = Proteinstandard SeeBlue®; A = 1,25 mg saure Phosphatase in 1 ml Natriumacetat-Puffer (0,1 M, pH 5,5); B = 2,5 mg saure Phosphatase in 1 ml Natriumacetat-Puffer (0,1 M, pH 5,5); C = Natriumacetat-Puffer pur; D = 2,5 mg saure Phosphatase im 1PS von [BMIm][BF₄]-NaAcP-TMS; E = Enzym in oberer Phase des TMS; F = Enzym in unterer Phase des TMS).

Es ist bekannt, dass die saure Phosphatase in bis zu sechs Isoformen vorkommt, die die gleiche molekulare Masse besitzen, sich aber in der Proteinsequenz und daraus resultierend der Ladung unterscheiden. [Kubicz et al. 1974] Abbildung A-40 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der sauren Phosphatase des Isoenzymes Typ IV-S in Natriumacetatpuffer bzw. dem einphasigen und zweiphasigen Zustand eines thermomorphen Lösungsmittelsystems. Markierung **A**, **B**, **D** und **E** der Abbildung A-40 zeigen deutlich gefärbte Banden im Bereich unter 60 kDa und das katalytisch aktive Enzym bei 69 kDa. [Kubicz 1963; Kruzel und Morawiecka 1982; Anand und Srivastava 2012] Markierung **E** und **F** kann entnommen werden, dass sich das Enzym bevorzugt in der oberen wässrigen Phase eines [BMim][BF₄]-Natriumacetatpuffer-TMS verteilt.

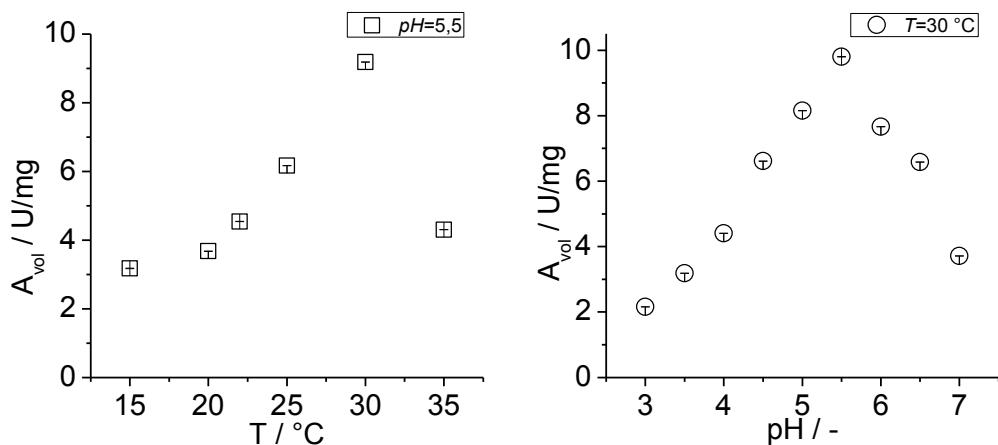


Abbildung A-41. Die Temperatur-(links) und pH-Abhängigkeit (rechts) der sauren Phosphatase im Natriumacetatpuffer (150 mM).

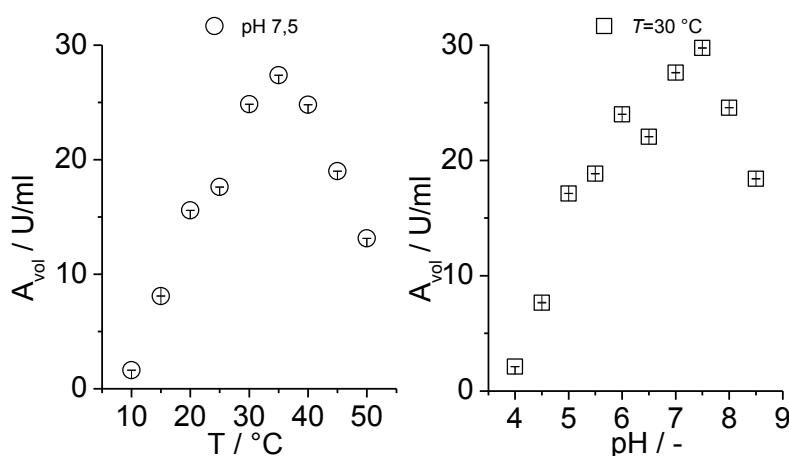


Abbildung A-42. Temperatur- und pH-Abhängigkeit der TPP106.

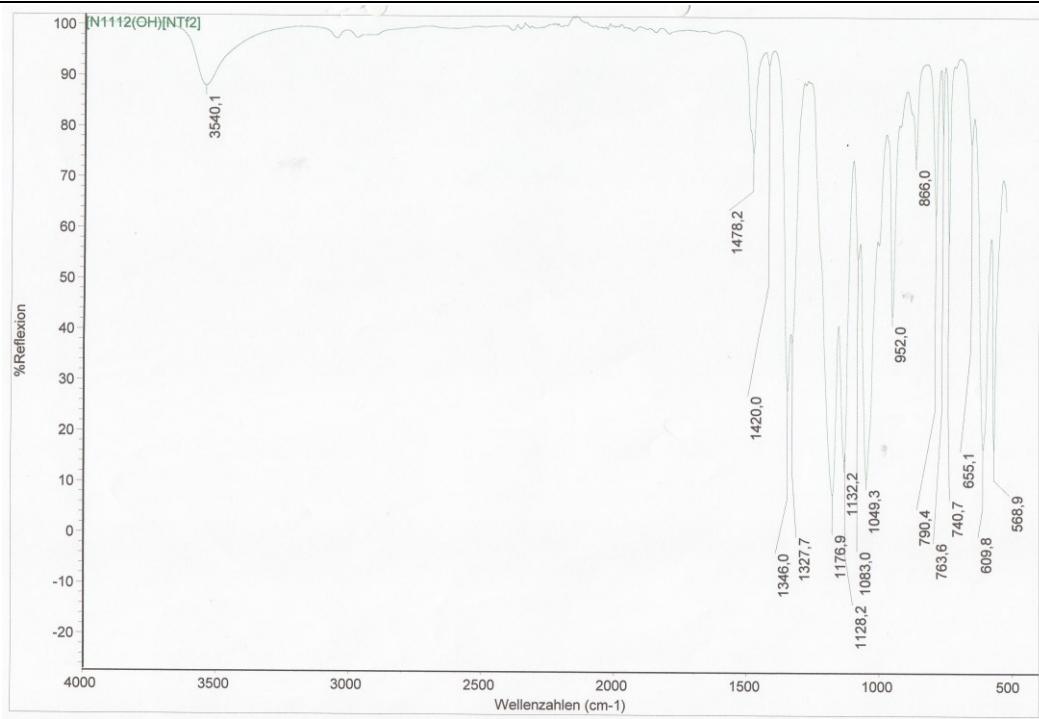


Abbildung A-43. IR-Spektrum der reinen ionischen Flüssigkeit $[N_{1112(OH)}][NTf_2]$.

A.4 Biokatalyse in reactiomorphen Lösungsmittelsystemen

Ein weiterer Aspekt der Entwicklung kombinierter und neuartiger Reaktions- und Extraktionssysteme war die Erforschung reactiomorpher Lösungsmittelsysteme (RMS). Diese Idee basiert auf dem industriell angewandten Basil™-Verfahren, in welchem ebenfalls während der Reaktion des Chlorphenylphosphins mit einem Alkohol durch das Abfangen der entstehenden Säure durch die zugesetzte Base 1-Methylimidazol im Verlauf der Alkoxylierung die ionische Flüssigkeit Methylimidazoliumchlorid als eine zweite Phase entsteht. [Maase 2004]

ODA et al. stellten 2011 fest, dass die Reaktion in hydrophoben Lösungsmitteln in Gegenwart von Natrium- oder Kaliumcarbonat eine hohe Zunahme der Lipase-Reaktivität erfährt und konnten infolgedessen Ausbeuten bis zu 50% ohne merkliche Veränderung der Selektivität in der Racematspaltung erreichen. [Oda et al. 2011] Darüberhinaus wurde berichtet, dass die Zugabe der Metallsalze Lithiumchlorid oder Magnesiumchlorid die Enantioselektivität von *Candida rugosa* Lipase im Verlauf der enzymatischen Hydrolyse in biphasischen Medien verbesserte. [Okamoto und Ueji 2000] Dies wurde auf eine Veränderung der Konformation durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Metallion und Enzym zurückgeführt. Durch die Zunahme der Wechselwirkungsenergie wird die Flexibilität des Enzyms erhöht und damit die Zugänglichkeit für das Substrat. [Salgın und Takaç 2007] Mit diesem Wissen wurden den TMS 1 und TMS 2 in zwei voneinander unabhängigen Versuchen Kaliumcarbonat bzw. Magnesiumchlorid hinzugefügt; doch führte dies schon vor Beginn der eigentlichen Reaktion zur Veränderung des Phasenverhalten, welches im Phasendiagramm durch die Verschiebung der Binodalen zu Gunsten des Zweiphasengebietes ausgedrückt werden würde. Es resultierten bereits bei 5 mM Kaliumcarbonat und 7 mM biphasische Systeme bei 40 °C, wodurch die Modellreaktion nicht mehr beim Temperaturoptimum der CaLB im Einphasensystem durchzuführen war. Da die Salze somit nicht in ausreichender Menge den Systemen zugeführt werden konnten, wurde deren Einfluss auf die Reaktion nicht weiter untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Prozess derartig gestaltet werden, dass das Ursprungssystem aus einer homogenen Mischung aus ionischer Flüssigkeit, Wasser, organischem und anorganischem Salz besteht und sich die Zusammensetzung x im ternären Phasendiagramm direkt an der Koexistenzkurve auf Seite des homogenen Gebiets befindet (siehe Kapitel 3.5). Durch die Entstehung von bspw. Acetat oder Phosphat wird das Phasenverhalten des komplexen Lösungsmittelsystems verändert und die Konode zugunsten des Zweiphasensystems verschoben. Im Verlauf einer Reaktion kommt es daher bei genügend hoher Substratkonzentration zu einer temperaturabhängigen Ausbildung einer zweiten Phase. Als Modellreaktionen dienten wiederum die kinetische Racematspaltung des 1-Phenylethylacetats mittels der CaLB ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 7,0$) (Schema 4-6) und die Hydrolyse des 2-Carboxyphenylphosphats mittels der sauren Phosphatase ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $pH = 5,5$) (Schema 4-20).

Ein Ausschnitt der Ergebnisse zu Zusammensetzung, Reaktionsverlauf und Phasenverhalten sind nachfolgend aufgeführt.

A.4.1 Die Entwicklung der reactionomorphen Lösungsmittelsysteme

Untersucht wurden Mischungen mit 10-60% (v/v) IL ([BMIm][BF₄] und Ammoeng™110) mit den für die jeweilige Reaktion nötigen Puffern. Im Falle der CaLB-vermittelten Modellreaktion wurde ein System aus 10-60% (v/v) [BMIm][BF₄] bzw. Ammoeng™110 mit 50-1000 mM Natriumphosphatpuffer (*pH* 7,0) getestet. Erstes Ziel war es das Konzentrationsmaximum an IL und NaPi zu finden, das gewährleistet bei 25 °C ein 1PS zu bilden und anschließend durch entstehendes Acetat eine Phasenseparation zu induzieren. Tatsächlich kann ein linearer Einfluss im untersuchten Konzentrationsbereich auf das Verhalten der Systeme beobachtet werden (Bsp. Abbildung A-44). Bei konstanter [BMIm][BF₄]-Konzentration bildet sich mit geringen Gehalt an Natriumacetat- und Natriumphosphat-Salzen bei 25 °C eine homogene Phase aus (gelb, vgl. Abbildung Phasendiagramm). Mit zunehmender Salzkonzentration wird die Koexistenzkurve, die Binodale, überschritten und das System wird heterogen. Für weitere Untersuchungen wurden die Zusammensetzungen der Felder 28, 39, 50, 61, 71, 81 und 90 in Abbildung A-44 gewählt, da in diesen Systemen das IL-zu-Wasser-Phasenverhältnis in etwa 1:1 entspricht. Durch die sukzessive Zugabe von Natriumacetat kann bei gleicher NaPi-Konzentration ein temperaturabhängiger Phasenzerfall beobachtet werden; das System zeigt ein UCST-Verhalten. Analoges gilt für das Ammoeng™110-NaPi-RMS. Da bei der CaLB-vermittelten Reaktion äquimolare Mengen an Acetat entstehen, ist der Einfluss dieser Komponente auf das Phasenverhalten ebenso relevant. Literaturbekannt sind die ternären Phasendiagramme von [BMIm][BF₄], Wasser und NaH₂PO₄ [Wang et al. 2010] und von [BMIm][BF₄], Wasser und Natriumacetat [Gao et al. 2015a]. Das Verhalten des quaternären Systems [BMIm][BF₄], Wasser, NaPi und Natriumacetat ist bis zu diesem Zeitpunkt nach bestem Wissen nicht in der Literatur erwähnt.

		Na-Phosphatpuffer													
		100	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150	[mM] →		
Na-Acetat	0	Na-Acetat [µl]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	[mM] →	
		Na-Pufferlösung [µl]	1	150	2	157,5	3	165	4	172,5	5	180	6	187,5	
Na-Acetat	25	[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	
		H ₂ O [µl]	825	817,5	810	802,5	795	787,5	780	772,5	765	757,5	750	750	
Na-Acetat	50	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	140	140	[mM] →	
		Na-Acetat [µl]	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	
Na-Acetat	75	Na-Pufferlösung [µl]	12	135	13	142,5	14	150	15	157,5	16	165	17	172,5	
		[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	
Na-Acetat	100	H ₂ O [µl]	802,5	795	787,5	780	772,5	765	757,5	750	742,5	735	727,5	720	[mM] →
		75	80	85	90	95	100	105	110	115	120	125	130	135	
Na-Acetat	125	Na-Acetat [µl]	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	112,5	[mM] →
		Na-Pufferlösung [µl]	34	127,5	23	135	24	142,5	25	150	26	157,5	27	165	28
Na-Acetat	150	[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525
		H ₂ O [µl]	750	742,5	735	727,5	720	712,5	705	697,5	690	682,5	675	667,5	660
Na-Acetat	175	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	110	[mM] →	
		Na-Acetat [µl]	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	[mM] →
Na-Acetat	200	Na-Pufferlösung [µl]	45	97,5	46	105	47	112,5	48	120	49	127,5	50	135	51
		[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525
Na-Acetat	225	H ₂ O [µl]	727,5	720	712,5	705	697,5	690	682,5	675	667,5	660	652,5	645	[mM] →
		60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	115	110	
Na-Acetat	250	Na-Acetat [µl]	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	187,5	[mM] →
		Na-Pufferlösung [µl]	56	90	57	97,5	58	105	59	112,5	60	120	61	127,5	62
Na-Acetat	275	[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525
		H ₂ O [µl]	697,5	690	682,5	675	667,5	660	652,5	645	637,5	630	622,5	615	607,5
Na-Acetat	300	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	105	[mM] →	
		Na-Acetat [µl]	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	225	[mM] →
Na-Acetat	325	Na-Pufferlösung [µl]	82,5	87,5	68	90	97,5	105	112,5	120	127,5	135	142,5	150	157,5
		[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525
Na-Acetat	350	H ₂ O [µl]	667,5	660	652,5	645	637,5	630	622,5	615	607,5	600	592,5	585	[mM] →
		45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	105	
Na-Acetat	375	Na-Acetat [µl]	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	[mM] →
		Na-Pufferlösung [µl]	67,5	75	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	85
Na-Acetat	400	[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525
		H ₂ O [µl]	607,5	600	592,5	585	577,5	570	562,5	555	547,5	540	532,5	525	518
Na-Acetat	425	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	80	85	
		Na-Acetat [µl]	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	[mM] →
Na-Acetat	450	Na-Pufferlösung [µl]	89	52,5	90	60	91	67,5	92	75	82,5	94	95	96	97
		[Bmim][BF ₄] [mg]	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525	525
Na-Acetat	475	H ₂ O [µl]	547,5	540	532,5	525	517,5	510	502,5	495	487,5	480	472,5	465	[mM] →

Abbildung A-44. Zusammensetzung von [BMIm][BF₄] mit Natriumphosphat, Natriumacetat und Wasser für ein Reaktionssystem bei pH 7,0. Beurteilung der homogenen (1PS, gelb) und heterogenen Phasen (2PS, rot) bei 25 °C.

Neun homogene Systeme aus 35% (v/v) [BMIm][BF₄] und 65% (v/v) Natriumacetat (100, 115 und 125 mM) mit 25, 50 und 75 mM Natriumacetat (u.a. RMS 1) sowie das RMS 2 aus 20% (v/v) Ammoeng™110 und 80% (v/v) NaPi (600 mM) mit 25 mM Natriumacetat wurden schließlich für die CaLB-vermittelte Modellreaktion von 50 mM 1-Phenylethylacetat untersucht. Es sollten 25 mM zusätzliches Acetat entstehen und das Gleichgewicht somit auf die Seite des heterogenen Gebietes (rot, vgl. Abbildung A-44) verschieben.

Tabelle A-48. Zusammensetzung der RMS 1 und RMS 2.

RMS 1	RMS 2
35% (v/v) [BMIm][BF ₄]	20% (v/v) Ammoeng™110
65% (v/v) NaPi (115 mM, pH 7,0)	80% (v/v) NaPi (600 mM, pH 7,0)
25 mM Natriumacetat	25 mM Natriumacetat
50 mM 1-Phenylethylacetat	50 mM 1-Phenylethylacetat

Jedoch konnte in keinem RMS eine Separation der Phasen nach vollständiger Umsetzung des 1-PEA bei 25 °C beobachtet werden. Zum Einen kann diskutiert werden, dass durch die gleichzeitige Entstehung von 25 mM (*R*-Phenylethanol, welches scheinbar phasenvermittelnd wirkt, die Systeme einphasig bleiben. Zum Anderen ist die Konzentration des entstehenden Acetats bei gegebener Arbeitstemperatur und ungünstigem Dissoziationsgleichgewicht bei pH 7,0 wohl zu vernachlässigen. Vermutlich führen entropische Effekte beim Hinzufügen von Acetat zu einer Erhöhung der freien Mischungsenthalpie (vgl. Kapitel 4.1.1).

Zwei analoge reaktionomorphe Lösungsmittelsysteme für biokatalytische Reaktionen bei geringerem pH-Wert (pH 4-5) wurden auf Basis von [BMIm][BF₄] bzw. Ammoeng™110, Wasser, Natriumacetat-Puffer und Ammoniumsulfat entwickelt. Bei der sauren Phosphatase-vermittelten Modellreaktion kommt es im Verlauf der Dephosphorylierung des 2-Carboxyphenylphosphats zu einer temperaturabhängigen Ausbildung einer zweiten Phase durch die Entstehung von Phosphat; das Phasenverhalten des komplexen Lösungsmittelsystems verändert sich und die Konode wird zugunsten des Zweiphasensystems verschoben. Im Speziellen wurde daher wie zuvor ein Screening mit 10-60% (v/v) [BMIm][BF₄] bzw. Ammoeng™110 und Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 5,5) durchgeführt, das zum Ziel ein 1PS bei 25 °C hatte, welches genau an der Grenze zum 2PS liegt. Anschließend sollte die Konzentration an Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄ gefunden werden, die die Lösungsmittelsysteme bei 25 °C gerade noch einphasig sein und durch das entstehende Phosphat als Nebenprodukt der Reaktion ins Zweiphasengebiet übergehen lassen. Ammoniumsulfat wird typischerweise zum Aussalzen von Proteinen verwendet ohne sie zu denaturieren [Wingfield 2001] und sollte daher dem Konzept der RMS dienen. Das Phasenverhalten in Folge der Zugabe von 25-300 mM (NH₄)₂SO₄ zu 50%(v/v) [BMIm][BF₄] und 50% (v/v) NaAcPi (100 mM, pH 5,5) ist in Abbildung A-35 exemplarisch dargestellt. Die aus den Vorversuchen resultierenden RMS sind in Tabelle A-49 gezeigt.

Tabelle A-49. Zusammensetzung der RMS 3 und RMS 4.

RMS 3	RMS 4
50% (v/v) [BMIm][BF ₄]	30% (v/v) Ammoeng™110
50% Natriumacetatpuffer (100 mM; pH 5,5)	70% (v/v) Natriumacetatpuffer (100mM, pH 5,5)
130 mM Ammoniumsulfat	450 mM Ammoniumsulfat
50 mM 2-CPP	50 mM 2-CPP

Nach Beendigung der APase-vermittelten Reaktion bei 25 °C bildete sich keine zweite Phase, erst nach Absenken der Temperatur im RMS 3 auf 15 °C konnte eine Phasenseparation erreicht werden. Im RMS 4 kam es zur Trübung der Lösung. Eine mögliche Erklärung ist die Aggregation und das Ausfällen des Proteins durch die hohe Ionenkonzentration, da nicht mehr genügend Wasser-Moleküle zur Solvatisierung der APase zur Verfügung stehen.

Literaturverzeichnis

- Abbott, Andrew P.; Frisch, Gero; Hartley, Jennifer; Ryder, Karl S. (2011): Processing of metals and metal oxides using ionic liquids. In: *Green Chem.* 13 (3), S. 471. DOI: 10.1039/C0GC00716A.
- Abdel-Mohsen, Heba T.; Conrad, Jürgen; Beifuss, Uwe (2014): Laccase-catalyzed synthesis of catechol thioethers by reaction of catechols with thiols using air as an oxidant. In: *Green Chem.* 16 (1), S. 90–95. DOI: 10.1039/C3GC41968A.
- Abraham, Michael H.; Zissimos, Andreas M.; Huddleston, Jonathan G.; Willauer, Heather D.; Rogers, Robin D.; Acree, William E. (2003): Some Novel Liquid Partitioning Systems. Water–Ionic Liquids and Aqueous Biphasic Systems. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 42 (3), S. 413–418. DOI: 10.1021/ie020520y.
- Affleck, R.; Haynes, C. A.; Clark, D. S. (1992): Solvent dielectric effects on protein dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (11), S. 5167–5170.
- Albertsson, Per-Åke (1986): Partition of cell particles and macromolecules. Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3. ed. New York: Wiley.
- Alonso, Luisa; Arce, Alberto; Francisco, María; Soto, Ana (2008): Thiophene separation from aliphatic hydrocarbons using the 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. In: *Fluid Phase Equilib.* 270 (1-2), S. 97–102. DOI: 10.1016/j.fluid.2008.06.012.
- Alvarez, E. F. (1962): The kinetics and mechanism of the hydrolysis of phosphoric acid esters by potato acid phosphatase. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 59 (3), S. 663–672. DOI: 10.1016/0006-3002(62)90646-7.
- Álvarez, M. S.; Gómez, L.; Ulloa, R. G.; Deive, F. J.; Sanromán, M. A.; Rodríguez, A. (2016): Antibiotics in swine husbandry effluents. Laying the foundations for their efficient removal with a biocompatible ionic liquid. In: *Chemical Engineering Journal* 298, S. 10–16. DOI: 10.1016/j.cej.2016.04.014.
- Anand, Asha; Srivastava, Pramod Kumar (2012): A molecular description of acid phosphatase. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 167 (8), S. 2174–2197. DOI: 10.1007/s12010-012-9694-8.
- Anastas, Paul; Eghbali, Nicolas (2010): Green chemistry. Principles and practice. In: *Chemical Society reviews* 39 (1), S. 301–312. DOI: 10.1039/B918763B.
- Anastas, Paul T. (2010): Handbook of Green Chemistry. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Anderson, Emily M.; Larsson, Karin M.; Kirk, Ole (2009): One Biocatalyst—Many Applications. The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 16 (3), S. 181–204. DOI: 10.3109/10242429809003198.

Anderson, Jared L.; Armstrong, Daniel W. (2005): Immobilized ionic liquids as high-selectivity/high-temperature/high-stability gas chromatography stationary phases. In: *Anal. Chem.* 77 (19), S. 6453–6462. DOI: 10.1021/ac051006f.

Anderson, Jared L.; Ding, Jie; Welton, Thomas; Armstrong, Daniel W. (2002): Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. In: *J. Am. Chem. Soc.* 124 (47), S. 14247–14254. DOI: 10.1021/ja028156h.

Angell, C. Austen; Byrne, Nolene; Belieres, Jean-Philippe (2007): Parallel developments in aprotic and protic ionic liquids: physical chemistry and applications. In: *Accounts of chemical research* 40 (11), S. 1228–1236. DOI: 10.1021/ar7001842.

Anthemidis, Aristidis N.; Ioannou, Kallirroy-Ioanna G. (2009): Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. In: *Talanta* 80 (2), S. 413–421. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.09.005.

Antonietti, Markus; Kuang, Daibin; Smarsly, Bernd; Zhou, Yong (2004): Ionic liquids for the convenient synthesis of functional nanoparticles and other inorganic nanostructures. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 43 (38), S. 4988–4992. DOI: 10.1002/anie.200460091.

Armand, Michel; Endres, Frank; MacFarlane, Douglas R.; Ohno, Hiroyuki; Scrosati, Bruno (2009): Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. In: *Nature materials* 8 (8), S. 621–629. DOI: 10.1038/nmat2448.

Arnold, Frances H.; Wintrode, Patrick L.; Miyazaki, Kentaro; Gershenson, Anne (2001): How enzymes adapt. Lessons from directed evolution. In: *Trends in Biochemical Sciences* 26 (2), S. 100–106. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)01755-2.

Atkins, Peter William; Paula, Julio de (2014): Physikalische Chemie. Place of publication not identified: Wiley-VCH (Wiley-VCH-Lehrbuchkollektion 1). Online verfügbar unter <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/3527682899>.

Baldwin, R. L. (1996): How Hofmeister ion interactions affect protein stability. In: *Biophysical Journal* 71 (4), S. 2056–2063. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79404-3.

Bandomir, Jenny; Schulz, André; Taguchi, Satomi; Schmitt, Lena; Ohno, Hiroyuki; Sternberg, Katrin et al. (2014): Synthesis and Characterization of Polymerized Ionic Liquids. Mechanical and Thermal

- Properties of a Novel Type of Hydrogels. In: *Macromol. Chem. Phys.* 215 (8), S. 716–724. DOI: 10.1002/macp.201400009.
- Batchelor, Joseph D.; Olteanu, Alina; Tripathy, Ashutosh; Pielak, Gary J. (2004): Impact of protein denaturants and stabilizers on water structure. In: *J. Am. Chem. Soc.* 126 (7), S. 1958–1961. DOI: 10.1021/ja039335h.
- Baumann, Markus; Stürmer, Rainer; Bornscheuer, Uwe T. (2001): A High-Throughput-Screening Method for the Identification of Active and Enantioselective Hydrolases. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (22), S. 4201–4204. DOI: 10.1002/1521-3773(20011119)40:22<4201::AID-ANIE4201>3.0.CO;2-V.
- Becker, W.; Freund, H.; Pfeil, E. (1965): Stereospecific Synthesis of D-Hydroxynitriles and Optically Active Ethanolamines. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 4 (12), S. 1079. DOI: 10.1002/anie.196510792.
- Behr, A.; Fängewisch, Ch. (2001): Temperatur-gesteuerte Lösungsmittelsysteme – Ein alternatives Konzept zum Recycling homogener Übergangsmetallkatalysatoren. In: *Chemie Ingenieur Technik* 73 (7), S. 874–878. DOI: 10.1002/1522-2640(200107)73:7<874::AID-CITE874>3.0.CO;2-C.
- Behr, Arno; Agar, David W.; Jörissen, Jakob; Vorholt, Andreas J. (2016): Einführung in die Technische Chemie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Behr, Arno; Henze, Guido; Schomäcker, Reinhard (2006): Thermoregulated Liquid/Liquid Catalyst Separation and Recycling. In: *Adv. Synth. Catal.* 348 (12-13), S. 1485–1495. DOI: 10.1002/adsc.200606094.
- Behr, Arno; Johnen, Leif; Daniel, Bastian (2011): A liquid immobilisation concept for enzymes by thermomorphic solvent systems. In: *Green Chem.* 13 (11), S. 3168. DOI: 10.1039/C1GC15802C.
- Bhatt, Anand I.; Bond, Alan M.; MacFarlane, Douglas R.; Zhang, Jie; Scott, Janet L.; Strauss, Christopher R. et al. (2006): A critical assessment of electrochemistry in a distillable room temperature ionic liquid, DIMCARB. In: *Green Chem.* 8 (2), S. 161–171. DOI: 10.1039/B512263E.
- Biesalski, Hans Konrad (2015): Mikronährstoffe und Gehirn. In: Hans Konrad Biesalski (Hg.): Mikronährstoffe als Motor der Evolution. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 189–219.
- Bisswanger, Hans (2015): Enzyme. Struktur, Kinetik und Anwendungen. Hoboken: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&AN=1028638>.
- Bohnet, Matthias; Ullmann, Fritz (Hg.) (2003): Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. 6., compl. rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH.

Boland, Wilhelm; Frößl, Christian; Lorenz, Michael (1991): Esterolytic and Lipolytic Enzymes in Organic Synthesis.

Bommarius, A. S.; Riebel, B. R. (2010): Biocatalysis. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/3527602364>.

Bonhôte, Pierre; Dias, Ana-Paula; Papageorgiou, Nicholas; Kalyanasundaram, Kuppuswamy; Grätzel, Michael (1996): Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts †. In: *Inorg. Chem.* 35 (5), S. 1168–1178. DOI: 10.1021/ic951325x.

Bornscheuer, Uwe T. (2009): Directed Evolution of Enzymes for Biocatalytic Applications. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 19 (2), S. 85–97. DOI: 10.3109/10242420109003638.

Bornscheuer, Uwe Theo; Kazlauskas, Romas J. (2006): Hydrolases in organic synthesis. Regio- and stereoselective biotransformations. 2nd ed. Weinheim, Chichester: John Wiley. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10302593>.

Bösmann, A.; Datsevich, L.; Jess, A.; Lauter, A.; Schmitz, C.; Wasserscheid, P. (2001): Deep desulfurization of diesel fuel by extraction with ionic liquids. In: *Chem. Commun.* (23), S. 2494–2495. DOI: 10.1039/B108411A.

Breuer, Michael; Stürmer, Rainer (2006): Chemie und Biologie Hand in Hand. Enzyme als Katalysatoren. In: *Chemie in unserer Zeit* 40 (2), S. 104–111. DOI: 10.1002/ciuz.200600379.

Bridges, Nicholas J.; Gutowski, Keith E.; Rogers, Robin D. (2007): Investigation of aqueous biphasic systems formed from solutions of chaotropic salts with kosmotropic salts (salt–salt ABS). In: *Green Chem.* 9 (2), S. 177–183. DOI: 10.1039/B611628K.

Bridges, Nicholas J.; Rogers, Robin D. (2008): Can Kosmotropic Salt/Chaotropic Ionic Liquid (Salt/Salt Aqueous Biphasic Systems) be Used to Remove Pertechnetate From Complex Salt Waste? In: *Separation Science and Technology* 43 (5), S. 1083–1090. DOI: 10.1080/01496390801888292.

Böhler, Holger; Bayer, Andreas; Effenberger, Franz (2000): A Convenient Synthesis of Optically Active 5,5-Disubstituted 4-Amino- and 4-Hydroxy-2(5H)-furanones from (S)-Ketone Cyanohydrins. In: *Chem. Eur. J.* 6 (14), S. 2564–2571. DOI: 10.1002/1521-3765(20000717)6:14<2564::AID-CHEM2564>3.0.CO;2-F.

Bull, H.; Murray, P. G.; Thomas, D.; Fraser, A. M.; Nelson, P. N. (2002): Acid phosphatases. In: *Molecular pathology : MP* 55 (2), S. 65–72.

- Cao, Qing; Quan, Li; He, Chiyang; Li, Na; Li, Kean; Liu, Feng (2008): Partition of horseradish peroxidase with maintained activity in aqueous biphasic system based on ionic liquid. In: *Talanta* 77 (1), S. 160–165. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.055.
- Carneiro, Aristides P.; Held, Christoph; Rodríguez, Oscar; Sadowski, Gabriele; Macedo, Eugénia A. (2013): Solubility of sugars and sugar alcohols in ionic liquids. Measurement and PC-SAFT modeling. In: *J. Phys. Chem. B* 117 (34), S. 9980–9995. DOI: 10.1021/jp404864c.
- Carneiro, Aristides P.; Rodríguez, Oscar; Macedo, Eugénia A. (2012): Solubility of xylitol and sorbitol in ionic liquids – Experimental data and modeling. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 55, S. 184–192. DOI: 10.1016/j.jct.2012.05.020.
- Carquigny, Stéphanie; Lakard, Boris; Lakard, Sophie; Moutarlier, Virginie; Hihn, Jean-Yves; Viau, Lydie (2016): Investigation of pharmaceutically active ionic liquids as electrolyte for the electrosynthesis of polypyrrole and active component in controlled drug delivery. In: *Electrochimica Acta* 211, S. 950–961. DOI: 10.1016/j.electacta.2016.06.080.
- Carrea, Giacomo; Ottolina, Gianluca; Riva, Sergio (1995): Role of solvents in the control of enzyme selectivity in organic media. In: *Trends in Biotechnology* 13 (2), S. 63–70. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)88907-6.
- Carrea, Giacomo; Riva, Sergio (2000): Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 39 (13), S. 2226–2254. DOI: 10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2226::AID-ANIE2226>3.0.CO;2-L.
- Cassol, Cláudia C.; Ebeling, Günter; Ferrera, Bauer; Dupont, Jairton (2006): A Simple and Practical Method for the Preparation and Purity Determination of Halide-Free Imidazolium Ionic Liquids. In: *Adv. Synth. Catal.* 348 (1-2), S. 243–248. DOI: 10.1002/adsc.200505295.
- Cesari, Laëtitia; Canabady-Rochelle, Laetitia; Mutelet, Fabrice (2017): Extraction of phenolic compounds from aqueous solution using choline bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. In: *Fluid Phase Equilib.* 446, S. 28–35. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.04.022.
- Cha, Seoncheol; Ao, Mingqi; Sung, Woongmo; Moon, Bongjin; Ahlström, Bodil; Johansson, Patrik et al. (2014): Structures of ionic liquid-water mixtures investigated by IR and NMR spectroscopy. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (20), S. 9591–9601. DOI: 10.1039/C4CP00589A.
- Chang, Antje; Scheer, Maurice; Grote, Andreas; Schomburg, Ida; Schomburg, Dietmar (2009): BRENDA, AMENDA and FRENDNA the enzyme information system: new content and tools in 2009. In: *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue), D588–92. DOI: 10.1093/nar/gkn820.

- Chen, Ching-Shih; Sih, Charles J. (1989): General Aspects and Optimization of Enantioselective Biocatalysis in Organic Solvents. The Use of Lipases [New Synthetic Methods(76)]. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (6), S. 695–707. DOI: 10.1002/anie.198906951.
- Chen, Ching-Shih; Wu, Shih-Hsiung; Girdaukas, Gary, and Sih, Charles J. (1987): Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. 2. Enzyme-Catalyzed Esterifications in Water-Organic Solvent Biphasic Systems. In: *J. Am. Chem. Soc.* 109 (9), S. 2812–2817.
- Chen, Hao; Du, Ping; Chen, Jie; Hu, Shenghua; Li, Shengqing; Liu, Hanlan (2010): Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination trace amount of chromium(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry. In: *Talanta* 81 (1-2), S. 176–179. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.11.054.
- Chen, Long; Sharifzadeh, Mahdi; Mac Dowell, Niall; Welton, Tom; Shah, Nilay; Hallett, Jason P. (2014): Inexpensive ionic liquids. $[HSO_4^-]$ -based solvent production at bulk scale. In: *Green Chem.* 16 (6), S. 3098–3106. DOI: 10.1039/c4gc00016a.
- Cheng, De-Hong; Chen, Xu-Wei; Wang, Jian-Hua; Fang, Zhao-Lun (2007): An abnormal resonance light scattering arising from ionic-liquid/DNA/ethidium interactions. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 13 (17), S. 4833–4839. DOI: 10.1002/chem.200601544.
- Chin, J. T.; Wheeler, S. L.; Klibanov, A. M. (1994): On protein solubility in organic solvent. In: *Biotechnol. Bioeng.* 44 (1), S. 140–145. DOI: 10.1002/bit.260440120.
- Choi, Jung-Min; Han, Sang-Soo; Kim, Hak-Sung (2015): Industrial applications of enzyme biocatalysis. Current status and future aspects. In: *Biotechnology advances* 33 (7), S. 1443–1454. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.
- Clark, Douglas S. (2004): Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents. Implications for biocatalysis in the absence of water. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359 (1448), 1299-307; discussion 1307, 1323-8. DOI: 10.1098/rstb.2004.1506.
- Clarke, Daniel; Ali, Mohammed; Clifford, Anthony; Parratt, Andrew; Rose, Paul; Schwinn, Dominik et al. (2004): Reactions in Unusual Media. In: *CTMC* 4 (7), S. 729–771. DOI: 10.2174/1568026043451096.
- Cláudio, Ana Filipa M.; Freire, Mara G.; Freire, Carmen S.R.; Silvestre, Armando J.D.; Coutinho, João A.P. (2010): Extraction of vanillin using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. In: *Separation and Purification Technology* 75 (1), S. 39–47. DOI: 10.1016/j.seppur.2010.07.007.

- Claus, Johanna; Sommer, Fridolin O.; Kragl, Udo (2018): Ionic liquids in biotechnology and beyond. In: *Solid State Ionics* 314, S. 119–128. DOI: 10.1016/j.ssi.2017.11.012.
- Coelho, Maria Alice Z.; Ribeiro, Bernardo D. (Hg.) (2016): White biotechnology for sustainable chemistry. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry (RSC green chemistry, no. 45).
- Colaço, Camilo; Sen, Shevanti; Thangavelu, Madan; Pinder, Stephen; Roser, Bruce (1992): Extraordinary Stability of Enzymes Dried in Trehalose. Simplified Molecular Biology. In: *Nat Biotechnol* 10 (9), S. 1007–1011. DOI: 10.1038/nbt0992-1007.
- Coleman, Deborah; Gathergood, Nicholas (2010): Biodegradation studies of ionic liquids. In: *Chem. Soc. Rev.* 39 (2), S. 600–637. DOI: 10.1039/B817717C.
- Collins, K. D. (1997): Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. In: *Biophysical Journal* 72 (1), S. 65–76. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78647-8.
- Conceição, Lucinda J. A.; Bogel-Łukasik, Ewa; Bogel-Łukasik, Rafał (2012): A new outlook on solubility of carbohydrates and sugar alcohols in ionic liquids. In: *RSC Adv.* 2 (5), S. 1846. DOI: 10.1039/C1RA01006A.
- Costa, Anabela J. L.; Soromenho, Mário R. C.; Shimizu, Karina; Esperança, José M. S. S.; Lopes, José N. Canongia; Rebelo, Luís Paulo N. (2013): Unusual LCST-type behaviour found in binary mixtures of choline-based ionic liquids with ethers. In: *RSC Adv.* 3 (26), S. 10262. DOI: 10.1039/C3RA40327K.
- Costa, Anabela J. L.; Soromenho, Mário R. C.; Shimizu, Karina; Marrucho, Isabel M.; Esperança, José M. S. S.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, Luís Paulo N. (2012a): Liquid-liquid equilibrium of cholinium-derived bis(triflimide) ionic liquids with water and octanol. In: *J. Phys. Chem. B* 116 (30), S. 9186–9195. DOI: 10.1021/jp3053168.
- Costa, Anabela J. L.; Soromenho, Mário R. C.; Shimizu, Karina; Marrucho, Isabel M.; Esperança, José M. S. S.; Lopes, José N. Canongia; Rebelo, Luís Paulo N. (2012b): Density, thermal expansion and viscosity of cholinium-derived ionic liquids. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 13 (7), S. 1902–1909. DOI: 10.1002/cphc.201100852.
- Cull, S. G.; Holbrey, J. D.; Vargas-Mora, V.; Seddon, K. R.; Lye, G. J. (2000): Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. In: *Biotechnol. Bioeng.* 69 (2), S. 227–233. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000720)69:2<227::AID-BIT12>3.0.CO;2-0.
- Dalziel, K.; Dickinson, F. M. (1966): The kinetics and mechanism of liver alcohol dehydrogenase with primary and secondary alcohols as substrates. In: *The Biochemical journal* 100 (1), S. 34–46.

- Dang, Dung Thanh; Ha, Sung Ho; Lee, Sang-Mok; Chang, Woo-Jin; Koo, Yoon-Mo (2007): Enhanced activity and stability of ionic liquid-pretreated lipase. In: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 45 (3-4), S. 118–121. DOI: 10.1016/j.molcatb.2007.01.001.
- Danieli, Bruno; Luisetti, Monica; Sampognaro, Giannantonio; Carrea, Giacomo; Riva, Sergio (1997): Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida Antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. In: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 3 (1-4), S. 193–201. DOI: 10.1016/S1381-1177(96)00055-0.
- Das, Dibyendu; Dasgupta, Antara; Das, Prasanta Kumar (2007): Improved activity of horseradish peroxidase (HRP) in ‘specifically designed’ ionic liquid. In: *Tetrahedron Letters* 48 (32), S. 5635–5639. DOI: 10.1016/j.tetlet.2007.06.022.
- Deive, F. J.; Rodríguez, A.; Pereiro, A. B.; Araújo, J. M. M.; Longo, M. A.; Coelho, M. A. Z. et al. (2011): Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction. In: *Green Chem.* 13 (2), S. 390–396. DOI: 10.1039/C0GC00075B.
- Demir, Ayhan S.; Şeşenoglu, Özge; Eren, Elif; Hosrik, Birsu; Pohl, Martina; Janzen, Elena et al. (2002): Enantioselective Synthesis of α-Hydroxy Ketones via Benzaldehyde Lyase-Catalyzed C–C Bond Formation Reaction. In: *Adv. Synth. Catal.* 344 (1), S. 96. DOI: 10.1002/1615-4169(200201)344:1<96::AID-ADSC96>3.0.CO;2-Z.
- Desai, Umesh R.; Klibanov, Alexander M. (1995): Assessing the Structural Integrity of a Lyophilized Protein in Organic Solvents. In: *J. Am. Chem. Soc.* 117 (14), S. 3940–3945. DOI: 10.1021/ja00119a007.
- Deye, Jerry F.; Berger, T. A.; Anderson, Albert G. (2002): Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. In: *Anal. Chem.* 62 (6), S. 615–622. DOI: 10.1021/ac00205a015.
- Dharaskar, Swapnil A.; Wasewar, Kailas L.; Varma, Mahesh N.; Shende, Diwakar Z.; Yoo, ChangKyoo (2013): Synthesis, characterization and application of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate for extractive desulfurization of liquid fuel. In: *Arab. J. Chem.* 9 (4), S. 578–587. DOI: 10.1016/j.arabjc.2013.09.034.
- Dobryakov, Yuri G.; Tuma, Dirk; Maurer, Gerd (2008): Activity Coefficients at Infinite Dilution of Alkanols in the Ionic Liquids 1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate, 1-Butyl-3-methylimidazolium Methyl Sulfate, and 1-Hexyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethylsulfonyl) Amide Using the Dilutor Technique. In: *J. Chem. Eng. Data* 53 (9), S. 2154–2162. DOI: 10.1021/je800355e.

- Docherty, Kathryn M.; Kulpa, Jr. Charles F. (2005): Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. In: *Green Chem.* 7 (4), S. 185. DOI: 10.1039/B419172B.
- Dolman, Mark; Halling, Peter J.; Moore, Barry D.; Waldron, Susan (1997): How dry are anhydrous enzymes? Measurement of residual and buried ¹⁸O-labeled water molecules using mass spectrometry. In: *Biopolymers* 41 (3), S. 313–321. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(199703)41:3<313::AID-BIP6>3.0.CO;2-V.
- Domańska, Urszula; Bogel-Łukasik, Rafał (2005a): Physicochemical properties and solubility of alkyl-(2-hydroxyethyl)-dimethylammonium bromide. In: *The journal of physical chemistry. B* 109 (24), S. 12124–12132. DOI: 10.1021/jp058015c.
- Domańska, Urszula; Bogel-Łukasik, Rafał (2005b): Solubility of ethyl-(2-hydroxyethyl)-dimethylammonium bromide in alcohols (C₂–C₁₂). In: *Fluid Phase Equilib.* 233 (2), S. 220–227. DOI: 10.1016/j.fluid.2005.05.015.
- Domańska, Urszula; Ługowska, Katarzyna; Pernak, Juliusz (2007a): Phase equilibria of didecyldimethylammonium nitrate ionic liquid with water and organic solvents. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 39 (5), S. 729–736. DOI: 10.1016/j.jct.2006.10.009.
- Domańska, Urszula; Lukoshko, Elena Vadimovna (2014): Thermodynamics and activity coefficients at infinite dilution for organic solutes and water in the ionic liquid 1-butyl-1-methylmorpholinium tricyanomethanide. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 68, S. 53–59. DOI: 10.1016/j.jct.2013.08.030.
- Domańska, Urszula; Papis, Paulina; Szydłowski, Jerzy (2014a): Thermodynamics and activity coefficients at infinite dilution for organic solutes, water and diols in the ionic liquid choline bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 77, S. 63–70. DOI: 10.1016/j.jct.2014.04.024.
- Domańska, Urszula; Papis, Paulina; Szydłowski, Jerzy; Królikowska, Marta; Królikowski, Marek (2014b): Excess enthalpies of mixing, effect of temperature and composition on the density, and viscosity and thermodynamic properties of binary systems of {ammonium-based ionic liquid + alkanediol}. In: *J. Phys. Chem. B* 118 (44), S. 12692–12705. DOI: 10.1021/jp5065243.
- Domańska, Urszula; Pobudkowska, Aneta; Królikowski, Marek (2007b): Separation of aromatic hydrocarbons from alkanes using ammonium ionic liquid C₂NTf₂ at T=298.15K. In: *Fluid Phase Equilibria* 259 (2), S. 173–179. DOI: 10.1016/j.fluid.2007.06.025.

- Domańska, Urszula; Pobudkowska, Aneta; Żołek-Tryznowska, Zuzana (2007c): Effect of an Ionic Liquid (IL) Cation on the Ternary System (IL + p -Xylene + Hexane) at T = 298.15 K †. In: *J. Chem. Eng. Data* 52 (6), S. 2345–2349. DOI: 10.1021/je7003337.
- Domínguez de María, Pablo (2008): "Nonsolvent" applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 47 (37), S. 6960–6968. DOI: 10.1002/anie.200703305.
- Dong, Kun; Zhang, Suojiang; Wang, Daxi; Yao, Xiaoqian (2006): Hydrogen bonds in imidazolium ionic liquids. In: *The journal of physical chemistry. A* 110 (31), S. 9775–9782. DOI: 10.1021/jp054054c.
- Doukyu, Noriyuki; Ogino, Hiroyasu (2010): Organic solvent-tolerant enzymes. In: *Biochemical Engineering Journal* 48 (3), S. 270–282. DOI: 10.1016/j.bej.2009.09.009.
- Dreimann, Jens M.; Hoffmann, Frank; Skiborowski, Mirko; Behr, Arno; Vorholt, Andreas J. (2017): Merging Thermomorphic Solvent Systems and Organic Solvent Nanofiltration for Hybrid Catalyst Recovery in a Hydroformylation Process. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 56 (5), S. 1354–1359. DOI: 10.1021/acs.iecr.6b04249.
- Dreyer, Susanne (2009): Aqueous two-phase extraction of proteins and enzymes using tetraalkylammonium-based ionic liquids. Dissertation. Rostock, Universität Rostock. Online verfügbar unter http://rosdok.uni-rostock.de/resolve/id/rosdok_disshab_0000000182.
- Dreyer, Susanne; Kragl, Udo (2008): Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. In: *Biotechnol. Bioeng.* 99 (6), S. 1416–1424. DOI: 10.1002/bit.21720.
- Dreyer, Susanne; Salim, Paulina; Kragl, Udo (2009): Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. In: *Biochemical Engineering Journal* 46 (2), S. 176–185. DOI: 10.1016/j.bej.2009.05.005.
- Du, Zhuo; Yu, Yong-Liang; Wang, Jian-Hua (2007): Extraction of proteins from biological fluids by use of an ionic liquid/aqueous two-phase system. In: *Chem. Eur. J.* 13 (7), S. 2130–2137. DOI: 10.1002/chem.200601234.
- Ducret, Amélie; Trani, Michael; Lortie, Robert (1998): Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. In: *Enzyme and Microbial Technology* 22 (4), S. 212–216. DOI: 10.1016/S0141-0229(97)00180-4.
- Dupont, David; Depuydt, Daphne; Binnemans, Koen (2015): Overview of the effect of salts on biphasic ionic liquid/water solvent extraction systems: anion exchange, mutual solubility, and thermomorphic properties. In: *J. Phys. Chem. B* 119 (22), S. 6747–6757. DOI: 10.1021/acs.jpcb.5b02980.

- Dupont, Jairton (2004): On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. In: *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (3), S. 341–350. DOI: 10.1590/S0103-50532004000300002.
- Dupont, Jairton; Souza, Roberto F. de; Suarez, Paulo A. Z. (2002): Ionic Liquid (Molten Salt) Phase Organometallic Catalysis. In: *Chem. Rev.* 102 (10), S. 3667–3692. DOI: 10.1021/cr010338r.
- Earle, Martyn J.; Esperança, José M. S. S.; Gilea, Manuela A.; Lopes, José N. Canongia; Rebelo, Luis P. N.; Magee, Joseph W. et al. (2006): The distillation and volatility of ionic liquids. In: *Nature* 439 (7078), S. 831–834. DOI: 10.1038/nature04451.
- Earle, Martyn J.; McCormac, Paul B.; Seddon, Kenneth R. (1999): Diels–Alder reactions in ionic liquids. In: *Green Chem.* 1 (1), S. 23–25. DOI: 10.1039/A808052F.
- Earle, Martyn J.; Seddon, Kenneth R. (2000): Ionic liquids. Green solvents for the future. In: *Pure and Applied Chemistry* 72 (7). DOI: 10.1351/pac200072071391.
- Earle, Martyn J.; Seddon, Kenneth R.; Adams, Christopher J.; Roberts, Glyn (1998): Friedel–Crafts reactions in room temperature ionic liquids. In: *Chem. Commun.* (19), S. 2097–2098. DOI: 10.1039/A805599H.
- Ebrahimzadeh, Homeira; Yamini, Yadollah; Kamarei, Fahimeh; Shariati, Shahab (2007): Homogeneous liquid-liquid extraction of trace amounts of mononitrotoluenes from waste water samples. In: *Analytica chimica acta* 594 (1), S. 93–100. DOI: 10.1016/j.aca.2007.05.013.
- Eckstein, Marrit; Sesing, Martin; Kragl, Udo; Adlercreutz, Patrick (2002a): At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. In: *Biotechnology Letters* 24 (11), S. 867–872. DOI: 10.1023/A:1015564608261.
- Eckstein, Marrit; Villela Filho, Murillo; Liese, Andreas; Kragl, Udo (2004): Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. In: *Chem. Commun.* (9), S. 1084–1085. DOI: 10.1039/B401065E.
- Eckstein, Marrit; Wasserscheid, Peter; Kragl, Udo (2002b): Enhanced enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas* sp. at high temperatures and fixed water activity in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide. In: *Biotechnology Letters* 24 (10), S. 763–767. DOI: 10.1023/A:1015563801977.
- Edenberg, H. J.; Bosron, W. F. (2010): Alcohol Dehydrogenases. In: *Comprehensive Toxicology*: Elsevier, S. 111–130.

- Effenberger, Franz; Förster, Siegfried; Wajant, Harald (2000): Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis. In: *Current Opinion in Biotechnology* 11 (6), S. 532–539. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00141-5.
- Eppert, Günther (1988): Einführung in die Schnelle Flüssigchromatographie. 2., neubearbeitete Auflage. Wiesbaden, s.l.: Vieweg+Teubner Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-663-01878-0>.
- Erbeldinger, M.; Mesiano, A. J.; Russell, A. J. (2000): Enzymatic catalysis of formation of Z-aspartame in ionic liquid - An alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. In: *Biotechnology progress* 16 (6), S. 1129–1131. DOI: 10.1021/bp000094g.
- Ernst, Marianne; Kaup, Björn; Müller, Michael; Bringer-Meyer, Stephanie; Sahm, Hermann (2005): Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. In: *Applied microbiology and biotechnology* 66 (6), S. 629–634. DOI: 10.1007/s00253-004-1765-5.
- Faber, Kurt (2011): Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook. 6., rev. and corr. ed. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6>.
- Fahrenfort, J. (1961): Attenuated total reflection. In: *Spectrochimica Acta* 17 (7), S. 698–709. DOI: 10.1016/0371-1951(61)80136-7.
- Farajzadeh, Mir Ali; Bahram, Morteza; Zorita, Saioa; Mehr, Behzad Ghorbani (2009): Optimization and application of homogeneous liquid-liquid extraction in preconcentration of copper (II) in a ternary solvent system. In: *Journal of hazardous materials* 161 (2-3), S. 1535–1543. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.05.041.
- Fernández-Fernández, María; Sanromán, M. Ángeles; Moldes, Diego (2013): Recent developments and applications of immobilized laccase. In: *Biotechnology advances* 31 (8), S. 1808–1825. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.02.013.
- Ferrario, Valerio; Ebert, Cynthia; Knapic, Lorena; Fattor, Diana; Basso, Alessandra; Spizzo, Patrizia; Gardossi, Lucia (2011): Conformational Changes of Lipases in Aqueous Media. A Comparative Computational Study and Experimental Implications. In: *Adv. Synth. Catal.* 353 (13), S. 2466–2480. DOI: 10.1002/adsc.201100397.

- Foresti, M. L.; Pedernera, M.; Ferreira, M. L.; Bucalá, V. (2008): Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. In: *Applied Catalysis A: General* 334 (1-2), S. 65–72. DOI: 10.1016/j.apcata.2007.09.030.
- Förster, Siegfried; Roos, Jürgen; Effenberger, Franz; Wajant, Harald; Sprauer, Achim (1996): The First Recombinant Hydroxynitrile Lyase and its Application in the Synthesis of(S)-Cyanohydrins. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35 (4), S. 437–439. DOI: 10.1002/anie.199604371.
- Forte, Andreia; Bogel-Łukasik, Ewa; Bogel-Łukasik, Rafał (2011): Miscibility Phenomena in Systems Containing Polyhydroxy Alcohols and Ionic Liquids. In: *J. Chem. Eng. Data* 56 (5), S. 2273–2279. DOI: 10.1021/je101269p.
- Franco, T. T.; Andrews, A. T.; Asenjo, J. A. (1996): Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems. Effect of surface hydrophobicity. In: *Biotechnol. Bioeng.* 49 (3), S. 300–308. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<300::AID-BIT8>3.0.CO;2-O.
- Frank, Henry S.; Evans, Marjorie W. (1945): Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures; Partial Molal Entropy in Dilute Solutions; Structure and Thermodynamics in Aqueous Electrolytes. In: *The Journal of Chemical Physics* 13 (11), S. 507–532. DOI: 10.1063/1.1723985.
- Frauenfelder, Hans; Chen, Guo; Berendzen, Joel; Fenimore, Paul W.; Jansson, Helén; McMahon, Benjamin H. et al. (2009): A unified model of protein dynamics. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (13), S. 5129–5134. DOI: 10.1073/pnas.0900336106.
- Freire, Mara G.; Claudio, Ana Filipa M.; Araujo, Joao M. M.; Coutinho, Joao A. P.; Marrucho, Isabel M.; Canongia Lopes, Jose N.; Rebelo, Luis Paulo N. (2012a): Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. In: *Chem. Soc. Rev.* 41 (14), S. 4966–4995. DOI: 10.1039/c2cs35151j.
- Freire, Mara G.; Louros, Cláudia L. S.; Rebelo, Luís Paulo N.; Coutinho, João A. P. (2011a): Aqueous biphasic systems composed of a water-stable ionic liquid + carbohydrates and their applications. In: *Green Chem.* 13 (6), S. 1536. DOI: 10.1039/C1GC15110J.
- Freire, Mara G.; Neves, Catarina M. S. S.; Carvalho, Pedro J.; Gardas, Ramesh L.; Fernandes, Ana M.; Marrucho, Isabel M. et al. (2007): Mutual solubilities of water and hydrophobic ionic liquids. In: *The journal of physical chemistry. B* 111 (45), S. 13082–13089. DOI: 10.1021/jp076271e.

- Freire, Mara G.; Neves, Catarina M. S. S.; Marrucho, Isabel M.; Canongia Lopes, José N.; Rebelo, Luís Paulo N.; Coutinho, João A. P. (2010): High-performance extraction of alkaloids using aqueous two-phase systems with ionic liquids. In: *Green Chem.* 12 (10), S. 1715. DOI: 10.1039/C0GC00179A.
- Freire, Mara G.; Pereira, Jorge F. B.; Francisco, Maria; Rodriguez, Hector; Rebelo, Luis Paulo N.; Rogers, Robin D.; Coutinho, Joao A. P. (2012b): Insight into the interactions that control the phase behaviour of new aqueous biphasic systems composed of polyethylene glycol polymers and ionic liquids. In: *Chem. Eur. J.* 18 (6), S. 1831–1839. DOI: 10.1002/chem.201101780.
- Freire, Mara G.; Teles, Ana Rita R.; Canongia Lopes, José N.; Rebelo, Luís Paulo N.; Marrucho, Isabel M.; Coutinho, João A. P. (2011b): Partition Coefficients of Alkaloids in Biphasic Ionic-Liquid-Aqueous Systems and their Dependence on the Hofmeister Series. In: *Sep. Sci. Technol.* 47 (2), S. 284–291. DOI: 10.1080/01496395.2011.620585.
- Freyland, Werner (2011): Coulombic fluids. Bulk and interfaces. Berlin, New York: Springer (Springer series in solid-state sciences, 168). Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com/detail.asp?id=308854>.
- Fröba, Andreas P.; Kremer, Heiko; Leipertz, Alfred (2008): Density, refractive index, interfacial tension, and viscosity of ionic liquids EMIMEtSO₄, EMIMNTf₂, EMIMN(CN)₂, and OMANTf₂ in dependence on temperature at atmospheric pressure. In: *The journal of physical chemistry. B* 112 (39), S. 12420–12430. DOI: 10.1021/jp804319a.
- Fujii, Kenta; Soejima, Yasufumi; Kyoshoin, Yasuhiro; Fukuda, Shuhei; Kanzaki, Ryo; Umebayashi, Yasuhiro et al. (2008): Liquid structure of room-temperature ionic liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium bis-(trifluoromethanesulfonyl) imide. In: *The journal of physical chemistry. B* 112 (14), S. 4329–4336. DOI: 10.1021/jp7105499.
- Fujita, Kyoko; Forsyth, Maria; MacFarlane, Douglas R.; Reid, Robert W.; Elliott, Gloria D. (2006): Unexpected improvement in stability and utility of cytochrome c by solution in biocompatible ionic liquids. In: *Biotechnol. Bioeng.* 94 (6), S. 1209–1213. DOI: 10.1002/bit.20928.
- Fujita, Kyoko; MacFarlane, Douglas R.; Forsyth, Maria (2005): Protein solubilising and stabilising ionic liquids. In: *Chem. Commun.* (38), S. 4804–4806. DOI: 10.1039/B508238B.
- Fukumoto, Kenta; Ohno, Hiroyuki (2007): LCST-type phase changes of a mixture of water and ionic liquids derived from amino acids. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (11), S. 1852–1855. DOI: 10.1002/anie.200604402.

- Fukumoto, Kenta; Yoshizawa, Masahiro; Ohno, Hiroyuki (2005): Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids. In: *J. Am. Chem. Soc.* 127 (8), S. 2398–2399. DOI: 10.1021/ja043451i.
- Fuller, Joan (1997): The Room Temperature Ionic Liquid 1-Ethyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate. Electrochemical Couples and Physical Properties. In: *J. Electrochem. Soc.* 144 (11), S. 3881. DOI: 10.1149/1.1838106.
- Gadilohar, Balu L.; Shankarling, Ganapati S. (2017): Choline based ionic liquids and their applications in organic transformation. In: *Journal of Molecular Liquids* 227, S. 234–261. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.11.136.
- Gaide, Tom; Dreimann, Jens M.; Behr, Arno; Vorholt, Andreas J. (2016): Überwindung von Phasentransportlimitierungen in der Umsetzung lipophiler Oleoverbindungen in wässrigen Medien – ein temperaturgesteuerter Ansatz. In: *Angew. Chem.* 128 (8), S. 2977–2981. DOI: 10.1002/ange.201510738.
- GanjaliKhany, Mohamad Reza; Ranjbar, Bijan; Taghavi, Amir Hossein; Tohidi Moghadam, Tahereh (2012): Functional motions of *Candida antarctica* lipase B: a survey through open-close conformations. In: *PLoS one* 7 (7), e40327. DOI: 10.1371/journal.pone.0040327.
- Ganske, Franka; Bornscheuer, Uwe T. (2005a): Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. In: *Organic letters* 7 (14), S. 3097–3098. DOI: 10.1021/o10511169.
- Ganske, Franka; Bornscheuer, Uwe T. (2005b): Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. In: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 36 (1-6), S. 40–42. DOI: 10.1016/j.molcatb.2005.08.004.
- Gao, Jing; Chen, Li; Yan, Zongcheng (2015a): Phase Behavior of Aqueous Biphasic Systems Composed of Ionic Liquids and Organic Salts. In: *J. Chem. Eng. Data* 60 (3), S. 464–470. DOI: 10.1021/je500419b.
- Gao, Shiqian; Jin, Haiyan; You, Jingyan; Ding, Yi; Zhang, Nan; Wang, Ying et al. (2011): Ionic liquid-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of antibiotics in milk by high-performance liquid chromatography. In: *Journal of chromatography. A* 1218 (41), S. 7254–7263. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.08.063.
- Gao, Wei-Wei; Zhang, Feng-Xiu; Zhang, Guang-Xian; Zhou, Cheng-He (2015b): Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. In: *Biochemical Engineering Journal* 99, S. 67–84. DOI: 10.1016/j.bej.2015.03.005.

- Garcia, M. Teresa; Gathergood, Nicholas; Scammells, Peter J. (2005): Biodegradable ionic liquids. Part II. Effect of the anion and toxicology. In: *Green Chem.* 7 (1), S. 9. DOI: 10.1039/B411922C.
- García-Alles, Luis F.; Gotor, Vicente (1998a): Alcohol inhibition and specificity studies of lipase B from *Candida antarctica* in organic solvents. In: *Biotechnol. Bioeng.* 59 (2), S. 163–170. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980720)59:2<163::AID-BIT4>3.0.CO;2-F.
- García-Alles, Luis F.; Gotor, Vicente (1998b): Lipase-catalyzed transesterification in organic media. Solvent effects on equilibrium and individual rate constants. In: *Biotechnol. Bioeng.* 59 (6), S. 684–694. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980920)59:6<684::AID-BIT5>3.0.CO;2-B.
- Gathergood, N.; Scammells, P. J. (2002): Design and Preparation of Room-Temperature Ionic Liquids Containing Biodegradable Side Chains. In: *Aust. J. Chem.* 55 (9), S. 557. DOI: 10.1071/CH02148.
- Gathergood, Nicholas; Garcia, M. Teresa; Scammells, Peter J. (2004): Biodegradable ionic liquids. Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. In: *Green Chem.* 6 (3), S. 166. DOI: 10.1039/B315270G.
- Gathergood, Nicholas; Scammells, Peter J.; Garcia, M. Teresa (2006): Biodegradable ionic liquids. Part III. The first readily biodegradable ionic liquids. In: *Green Chem.* 8 (2), S. 156. DOI: 10.1039/B516206H.
- Gerhards, Tina (2013): Einfluss unkonventioneller Medien auf die Selektivität ThDP-abhängiger Enzyme. Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2012. Jülich: Forschungszentrum Jülich (Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Schlüsseltechnologien, Bd. 54).
- Ghanem, Ashraf (2007): Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. In: *Tetrahedron* 63 (8), S. 1721–1754. DOI: 10.1016/j.tet.2006.09.110.
- Ghiasvand, A. R.; Shadabi, S.; Mohagheghzadeh, E.; Hashemi, P. (2005): Homogeneous liquid-liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra trace molybdenum. In: *Talanta* 66 (4), S. 912–916. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.12.041.
- Ghiasvand, Ali Reza; Mohagheghzadeh, Elham (2004): Homogeneous Liquid-Liquid Extraction of Uranium(VI) Using Tri-n-octylphosphine Oxide. In: *Anal. Sci.* 20 (6), S. 917–919. DOI: 10.2116/analsci.20.917.
- Giovanelli, Debora; Buzzo, Marisa C.; Lawrence, Nathan S.; Hardacre, Christopher; Seddon, Kenneth R.; Compton, Richard G. (2004): Determination of ammonia based on the electro-oxidation of hydroquinone in dimethylformamide or in the room temperature ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. In: *Talanta* 62 (5), S. 904–911. DOI: 10.1016/j.talanta.2003.10.015.

- Gmehling, Jürgen; Menke, Jochen; Krafczyk, Jörg; Fischer, Kai (1995): A data bank for azeotropic data — status and applications. In: *Fluid Phase Equilib.* 103 (1), S. 51–76. DOI: 10.1016/0378-3812(94)02569-M.
- Goede, A. T. J. W. de; Benckhuijsen, W.; van Rantwijk, F.; Maat, L.; van Bekkum, H. (1993): Selective lipase-catalyzed 6-O-acylation of alkyl α-D-glucopyranosides using functionalized ethyl esters. In: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 112 (11), S. 567–572. DOI: 10.1002/recl.19931121102.
- Goharshadi, Elaheh K.; Ding, Yulong; Nancarrow, Paul (2008): Green synthesis of ZnO nanoparticles in a room-temperature ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. In: *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 69 (8), S. 2057–2060. DOI: 10.1016/j.jpcs.2008.03.002.
- Golan, Tal; Dahan, Gay; Ludmer, Zvi; Brauner, Neima; Ullmann, Amos (2014): Heavy metals extraction with the SRPTE process from two matrices – Industrial sludge and river sediments. In: *Chemical Engineering Journal* 236, S. 47–58. DOI: 10.1016/j.cej.2013.09.062.
- Gorke, Johnathan; Srienc, Friedrich; Kazlauskas, Romas (2010): Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. In: *Biotechnol Bioproc E* 15 (1), S. 40–53. DOI: 10.1007/s12257-009-3079-z.
- Gorman, L. A.; Dordick, J. S. (1992): Organic solvents strip water off enzymes. In: *Biotechnol. Bioeng.* 39 (4), S. 392–397. DOI: 10.1002/bit.260390405.
- Grant, W. D. (2004): Life at low water activity. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359 (1448), 1249-66; discussion 1266-7. DOI: 10.1098/rstb.2004.1502.
- Greaves, Tamar L.; Drummond, Calum J. (2008): Protic ionic liquids: properties and applications. In: *Chemical Reviews* 108 (1), S. 206–237. DOI: 10.1021/cr068040u.
- Griebel, Kai; Klibanov, Alexander M. (1996): On Protein Denaturation in Aqueous–Organic Mixtures but Not in Pure Organic Solvents. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (47), S. 11695–11700. DOI: 10.1021/ja961869d.
- Gröger, Harald; Drauz, Karlheinz; May, Oliver (Hg.) (2012): Enzyme catalysis in organic synthesis. 3rd, completely rev. and enlarged ed. Weinheim, New York: Wiley. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/9783527639861>.
- Guan, Zhi; Li, Ling-Yu; He, Yan-Hong (2015): Hydrolase-catalyzed asymmetric carbon–carbon bond formation in organic synthesis. In: *RSC Adv.* 5 (22), S. 16801–16814. DOI: 10.1039/C4RA11462K.

Gupta, Munishwar N. (1992): Enzyme function in organic solvents. In: *Eur J Biochem* 203 (1-2), S. 25–32.

DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19823.x.

Gupta, Munishwar N.; Roy, Ipsita (2004): Enzymes in organic media. Forms, functions and applications.

In: *European journal of biochemistry* 271 (13), S. 2575–2583. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04163.x.

Gutowski, Keith E.; Broker, Grant A.; Willauer, Heather D.; Huddleston, Jonathan G.; Swatloski, Richard P.; Holbrey, John D.; Rogers, Robin D. (2003): Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids.

Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (22), S. 6632–6633. DOI: 10.1021/ja0351802.

Gwala, Nobuhle V.; Deenadayalu, Nirmala; Tumba, Kaniki; Ramjugernath, Deresh (2010): Activity coefficients at infinite dilution for solutes in the trioctylmethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid using gas–liquid chromatography. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 42 (2), S. 256–261. DOI: 10.1016/j.jct.2009.08.012.

Haak, Jan R.; Engberts, Jan B. F. N. (1986): Solvent polarity and solvation effects in highly aqueous mixed solvents. Application of the Dimroth-Reichardt ET(30) parameter. In: *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 105 (9), S. 307–311. DOI: 10.1002/recl.19861050913.

Haase, Rolf (1956): Thermodynamik der Mischphasen. Mit Einer Einführung in die Grundlagen der Thermodynamik. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-22546-2>.

Habulin, Maja; Knez, Željko (2009): Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58 (1-4), S. 24–28. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.10.007.

Hajipour, Abdol R.; Rafiee, Fatemeh (2015): Recent Progress in Ionic Liquids and their Applications in Organic Synthesis. In: *Organic Preparations and Procedures International* 47 (4), S. 249–308. DOI: 10.1080/00304948.2015.1052317.

Hallett, Jason P.; Welton, Tom (2011): Room-temperature ionic liquids. Solvents for synthesis and catalysis. 2. In: *Chem. Rev.* 111 (5), S. 3508–3576. DOI: 10.1021/cr1003248.

Halling, Peter J. (2004): What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 359 (1448), 1287-96; discussion 1296-7, 1323-8. DOI: 10.1098/rstb.2004.1505.

- Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D. (Hg.) (1995): Exploring QSAR Hydrophobic, Electronic and Steric Constants. American Chemical Society. Washington, DC.
- Hardacre, Chris; Parvulescu, Vasile (Hg.) (2014): Catalysis in ionic liquids. From catalyst synthesis to application. Cambridge: Royal Soc. of Chemistry (RSC catalysis series, 15). Online verfügbar unter <http://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-84973-603-9>.
- Hasslacher, Meinhard; Kratky, Christoph; Griengl, Herfried; Schwab, Helmut; Kohlwein, Sepp D. (1997): Hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. Molecular characterization and mechanism of enzyme catalysis. In: *Proteins* 27 (3), S. 438–449. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(199703)27:3<438::AID-PROT11>3.0.CO;2-M.
- Hatti-Kaul, Rajni (2001): Aqueous Two-Phase Systems. A General Overview. In: *MB* 19 (3), S. 269–278. DOI: 10.1385/MB:19:3:269.
- Haumann, Marco; Riisager, Anders (2008): Hydroformylation in room temperature ionic liquids (RTILs). Catalyst and process developments. In: *Chem. Rev.* 108 (4), S. 1474–1497. DOI: 10.1021/cr078374z.
- Hawkins, Christopher F.; Borges, Adolfo; Perham, Richard N. (1989): A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. In: *FEBS Letters* 255 (1), S. 77–82. DOI: 10.1016/0014-5793(89)81064-6.
- He, Chi Yang; Li, Shehong; Liu, Huawei; Li, Kean; Liu, Feng (2005): Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt. In: *Journal of Chromatography A* 1082 (2), S. 143–149. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.05.065.
- He, Lijun; Luo, Xianli; Xie, Hongxue; Wang, Chunjian; Jiang, Xiuming; Lu, Kui (2009): Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample. In: *Analytica chimica acta* 655 (1-2), S. 52–59. DOI: 10.1016/j.aca.2009.09.044.
- Hey, Michael J.; Jackson, Daniel P.; Yan, Hong (2005): The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol). In: *Polymer* 46 (8), S. 2567–2572. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.02.019.
- Hinckley, Glen; Mozhaev, Vadim V.; Budde, Cheryl; Khmelnitsky, Yuri L. (2002): Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. In: *Biotechnology Letters* 24 (24), S. 2083–2087. DOI: 10.1023/A:1021305229969.

- Hofer, Rainer; Clark, James H.; Kraus, George Andrew; Saling, Peter; Spicher, Philippe; Schroder, Roland et al. (Hg.) (2009): Sustainable solutions for modern economies. Cambridge: Royal Society of Chemistry (RSC green chemistry, 4). Online verfügbar unter <http://www.rsc.org/Publishing/eBooks/2009/9781847559050.asp>.
- Hofmeister, Franz (1888): Zur Lehre von der Wirkung der Salze. In: *Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmakol* 24 (4-5), S. 247–260. DOI: 10.1007/bf01918191.
- Höhne, Matthias; Bornscheuer, Uwe T. (2009): Biocatalytic Routes to Optically Active Amines. In: *ChemCatChem* 1 (1), S. 42–51. DOI: 10.1002/cctc.200900110.
- Holbrey, J. D.; Seddon, K. R. (1999a): Ionic Liquids. In: *Clean Technologies and Environmental Policy* 1 (4), S. 223–236. DOI: 10.1007/s100980050036.
- Holbrey, John D.; Seddon, Kenneth R. (1999b): The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. In: *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (13), S. 2133–2140. DOI: 10.1039/A902818H.
- Holbrey, John D.; Turner, Megan B.; Rogers, Robin D. (2003): Selection of Ionic Liquids for Green Chemical Applications. In: Robin D. Rogers und Kenneth R. Seddon (Hg.): Ionic Liquids as Green Solvents, Bd. 856. Washington, DC: American Chemical Society (ACS symposium series), S. 2–12.
- Holleman, Arnold F.; Wiberg, Egon; Wiberg, Nils (2007): Lehrbuch der anorganischen Chemie. 102., stark umgearb. u. verb. Aufl. Berlin: de Gruyter. Online verfügbar unter <http://www.reference-global.com/action/showBook?doi=10.1515/9783110177701>.
- Hooper, Herbert H.; Michel, Stefan; Prausnitz, John M. (1988): Correlation of liquid-liquid equilibria for some water-organic liquid systems in the region 20-250.degree.C. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 27 (11), S. 2182–2187. DOI: 10.1021/ie00083a039.
- Horton, Horace Robert; Moran, Laurence A.; Scrimgeour, K. Gray; Perry, Marc D.; Rawn, J. David; Biele, Carsten (2008): Biochemie. 4., aktualisierte Aufl. München: Pearson Studium (bio - Biologie). Online verfügbar unter http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=3081329&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.
- Howlett, Patrick C.; MacFarlane, Douglas R.; Hollenkamp, Anthony F. (2004): High Lithium Metal Cycling Efficiency in a Room-Temperature Ionic Liquid. In: *Electrochim. Solid-State Lett.* 7 (5), A97. DOI: 10.1149/1.1664051.

- Hoyos, Pilar; Fernández, María; Sinisterra, José Vicente; Alcántara, Andrés R. (2006): Dynamic kinetic resolution of benzoins by lipase-metal combo catalysis. In: *J. Org. Chem.* 71 (20), S. 7632–7637. DOI: 10.1021/jo061060b.
- Huddleston, Jonathan G.; Visser, Ann E.; Reichert, W. Matthew; Willauer, Heather D.; Broker, Grant A.; Rogers, Robin D. (2001): Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. In: *Green Chem.* 3 (4), S. 156–164. DOI: 10.1039/B103275P.
- Huddleston, Jonathan G.; Willauer, Heather D.; Swatloski, Richard P.; Visser, Ann E.; Rogers, Robin D. (1998): Room temperature ionic liquids as novel media for ‘clean’ liquid–liquid extraction. In: *Chem. Commun.* 68 (16), S. 1765–1766. DOI: 10.1039/A803999B.
- Hug, Heinz; Reiser, Wolfgang (2013): Physikalische Chemie. 3. neu bearb. Aufl. Haan-Gruiten: Verl. Europa-Lehrmittel Nourney Vollmer (Europa-Fachbuchreihe für Chemieberufe).
- Hughes, J.; Decarvalho, J.P.C.; Hughes, M. A. (1994): Purification, Characterization, and Cloning of α-Hydroxynitrile Lyase from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 311 (2), S. 496–502. DOI: 10.1006/abbi.1994.1267.
- Hult, Karl; Berglund, Per (2007): Enzyme promiscuity. Mechanism and applications. In: *Trends in Biotechnology* 25 (5), S. 231–238. DOI: 10.1016/j.tibtech.2007.03.002.
- Hummel, Werner (1997): New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. In: T. Schepers, W. Babel, H. W. Blanch, Ch. L. Cooney, S.-O Enfors, K.-E. L. Eriksson et al. (Hg.): *New Enzymes for Organic Synthesis*, Bd. 58. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), S. 145–184.
- Hummel, Werner; KULA, Maria-Regina (1989): Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. In: *Eur J Biochem* 184 (1), S. 1–13. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb14983.x.
- Hurley, Frank H.; Wler, Thomas P. (1951): The Electrodeposition of Aluminum from Nonaqueous Solutions at Room Temperature. In: *J. Electrochem. Soc.* 98 (5), S. 207. DOI: 10.1149/1.2778133.
- Husum, Tommy L.; Jørgensen, Christel T.; Christensen, Morten W.; Kirk, Ole (2009): Enzyme Catalysed Synthesis in Ambient Temperature Ionic Liquids. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 19 (4), S. 331–338. DOI: 10.3109/10242420109003648.
- Illner, Sabine; Plagemann, Regina; Saling, Peter; Kragl, Udo (2014): Eco-efficiency analysis as a reaction-engineering tool—Case study of a laccase-initiated oxidative C–N coupling. In: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 102, S. 106–114. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.01.015.

- Invitrogen (Hg.) (2002): Protein Standards.
- Itoh, Toshiyuki; Akasaki, Eri; Kudo, Kazutoshi; Shirakami, Shohei (2001a): Lipase-Catalyzed Enantioselective Acylation in the Ionic Liquid Solvent System. Reaction of Enzyme Anchored to the Solvent. In: *Chem. Lett.* 30 (3), S. 262–263. DOI: 10.1246/cl.2001.262.
- Itoh, Toshiyuki; Akasaki, Eri; Kudo, Kazutoshi; Shirakami, Shohei (2001b): Lipase-Catalyzed Enantioselective Acylation in the Ionic Liquid Solvent System. Reaction of Enzyme Anchored to the Solvent. In: *Chem. Lett.* (3), S. 262–263. DOI: 10.1246/cl.2001.262.
- Itoh, Toshiyuki; Akasaki, Eri; Nishimura, Yoshihito (2002): Efficient Lipase-catalyzed Enantioselective Acylation under Reduced Pressure Conditions in an Ionic Liquid Solvent System. In: *Chem. Lett.* 31 (2), S. 154–155. DOI: 10.1246/cl.2002.154.
- Itoh, Toshiyuki; Nishimura, Yoshihito; Ouchi, Nozomi; Hayase, Shuichi (2003): 1-Butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate. The most desirable ionic liquid solvent for recycling use of enzyme in lipase-catalyzed transesterification using vinyl acetate as acyl donor. In: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 26 (1-2), S. 41–45. DOI: 10.1016/S1381-1177(03)00147-4.
- Jaeger, K.-E.; Thieman, V.; Antranikian, G. (2006): Biokatalyse. In: Garabed Antranikian (Hg.): *Angewandte Mikrobiologie*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, S. 135–160.
- Jaenicke, Rainer (1996): How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? In: *Naturwissenschaften* 83 (12), S. 544–554. DOI: 10.1007/BF01141979.
- Jain, Nidhi; Kumar, Anil; Chauhan, Sushma; Chauhan, S.M.S. (2005): Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. In: *Tetrahedron* 61 (5), S. 1015–1060. DOI: 10.1016/j.tet.2004.10.070.
- Janes, Lana E.; Kazlauskas, Romas J. (1997): Empirical rules for the enantio preference of lipase from *Aspergillus niger* toward secondary alcohols and carboxylic acids, especially α-amino acids. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 8 (22), S. 3719–3733. DOI: 10.1016/S0957-4166(97)00524-7.
- Jenkins, H. Donald B.; Marcus, Yizhak. (1995): Viscosity B-Coefficients of Ions in Solution. In: *Chem. Rev.* 95 (8), S. 2695–2724. DOI: 10.1021/cr00040a004.
- Jeon, Jong-Rok; Baldrian, Petr; Murugesan, Kumarasamy; Chang, Yoon-Seok (2012): Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols. From in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. In: *Microbial biotechnology* 5 (3), S. 318–332. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00273.x.
- Jessop, Philip G. (2011): Searching for green solvents. In: *Green Chem.* 13 (6), S. 1391. DOI: 10.1039/C0GC00797H.

- Johannes, Tyler W.; Zhao, Huimin (2006): Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. In: *Current opinion in microbiology* 9 (3), S. 261–267. DOI: 10.1016/j.mib.2006.03.003.
- Kaar, Joel L.; Jesionowski, Anita M.; Berberich, Jason A.; Moulton, Roger; Russell, Alan J. (2003): Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (14), S. 4125–4131. DOI: 10.1021/ja028557x.
- Kahlweit, M.; Strey, R.; Schomaecker, R.; Haase, D. (1989): General patterns of the phase behavior of mixtures of water, nonpolar solvents, amphiphiles, and electrolytes. 2. In: *Langmuir* 5 (2), S. 305–315. DOI: 10.1021/la00086a002.
- Kamlet, Mortimer J.; Abboud, Jose Luis M.; Abraham, Michael H.; Taft, R. W. (1983): Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters,.pi.*,.alpha., and .beta., and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. In: *J. Org. Chem.* 48 (17), S. 2877–2887. DOI: 10.1021/jo00165a018.
- Karlson, Peter; Doenecke, Detlef; Koolman, Jan (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14., neubearb. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Kasaka, Y.; Bibouche, B.; Volovych, I.; Schwarze, M.; Schomäcker, R. (2016): Investigation of phase behaviour of selected chemical reaction mixtures in microemulsions for technical applications. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 494, S. 49–58. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.01.013.
- Katayanagi, Hideki; Hayashi, Satoshi; Hamaguchi, Hiro-o; Nishikawa, Keiko (2004a): Structure of an ionic liquid, 1-n-butyl-3-methylimidazolium iodide, studied by wide-angle X-ray scattering and Raman spectroscopy. In: *Chemical Physics Letters* 392 (4-6), S. 460–464. DOI: 10.1016/j.cplett.2004.04.125.
- Katayanagi, Hideki; Nishikawa, Keiko; Shimozaki, Hideki; Miki, Kumiko; Westh, Peter; Koga, Yoshikata (2004b): Mixing Schemes in Ionic Liquid–H₂O Systems. A Thermodynamic Study. In: *The journal of physical chemistry. B* 108 (50), S. 19451–19457. DOI: 10.1021/jp0477607.
- Kazlauskas, Romas J.; Weber, Hedda K. (1998): Improving hydrolases for organic synthesis. In: *Current opinion in chemical biology* 2 (1), S. 121–126. DOI: 10.1016/S1367-5931(98)80043-4.
- Khmelnitsky, Yuri L.; Mozhaev, Vadim V.; BELOVA, Alla B.; SERGEEVA, Maria V.; MARTINEK, Karel (1991): Denaturation capacity. A new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. In: *Eur J Biochem* 198 (1), S. 31–41. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb15983.x.

- Kim, Kwang-Wook; Song, Boyoung; Choi, Min-Young; Kim, Mahn-Joo (2001): Biocatalysis in Ionic Liquids. Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase. In: *Organic letters* 3 (10), S. 1507–1509. DOI: 10.1021/ol015824f.
- Kirk, Ole; Christensen, Morten Würtz (2002): Lipases from *Candida antarctica*. Unique Biocatalysts from a Unique Origin. In: *Org. Process Res. Dev.* 6 (4), S. 446–451. DOI: 10.1021/op0200165.
- Kirschner, Anett; Langer, Peter; Bornscheuer, Uwe T. (2004): Lipase-catalyzed highly enantioselective kinetic resolution of racemic α-hydroxy butenolides. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (18), S. 2871–2874. DOI: 10.1016/j.tetasy.2004.06.047.
- Kitaguchi, Hiroshi; Fitzpatrick, Paul A.; Huber, Joel E.; Klibanov, Alexander M. (1989): Enzymic resolution of racemic amines. Crucial role of the solvent. In: *J. Am. Chem. Soc.* 111 (8), S. 3094–3095. DOI: 10.1021/ja00190a070.
- Klibanov, A. M. (2001): Improving enzymes by using them in organic solvents. In: *Nature* 409 (6817), S. 241–246. DOI: 10.1038/35051719.
- Klibanov, Alexander M. (1997): Why are enzymes less active in organic solvents than in water? In: *Trends in Biotechnology* 15 (3), S. 97–101. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01013-5.
- Klibanov, Alexander M. (2003): Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. In: *Current Opinion in Biotechnology* 14 (4), S. 427–431. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00074-0.
- Köddermann, Thorsten; Klembt, Sandra; Klasen, Dagmar; Paschek, Dietmar; Kragl, Udo; Ludwig, Ralf (2012): The effect of neutral ion aggregate formation on the electrical conductivity of an ionic liquid and its mixtures with chloroform. In: *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 13 (7), S. 1748–1752. DOI: 10.1002/cphc.201100838.
- Kohno, Yuki; Ohno, Hiroyuki (2012): Ionic liquid/water mixtures: from hostility to conciliation. In: *Chem. Commun.* 48 (57), S. 7119–7130. DOI: 10.1039/c2cc31638b.
- Kohno, Yuki; Saita, Shohei; Men, Yongjun; Yuan, Jiayin; Ohno, Hiroyuki (2015): Thermoresponsive polyelectrolytes derived from ionic liquids. In: *Polym. Chem.* 6 (12), S. 2163–2178. DOI: 10.1039/C4PY01665C.
- Kosmulski, Marek; Gustafsson, Jan; Rosenholm, Jarl B. (2004): Thermal stability of low temperature ionic liquids revisited. In: *Thermochimica Acta* 412 (1-2), S. 47–53. DOI: 10.1016/j.tca.2003.08.022.
- Koszelewski, Dominik; Tauber, Katharina; Faber, Kurt; Kroutil, Wolfgang (2010): omega-Transaminases for the synthesis of non-racemic alpha-chiral primary amines. In: *Trends in Biotechnology* 28 (6), S. 324–332. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.03.003.

- Kourist, Robert; Höhne, Matthias; Bornscheuer, Uwe (2009): Gerichtete Evolution und rationales Design. Maßgeschneiderte Enzyme. In: *Chemie in unserer Zeit* 43 (3), S. 132–142. DOI: 10.1002/ciuz.200900478.
- Kragl, Udo; Eckstein, Marrit; Kaftzik, Nicole (2002a): Biocatalytic Reactions in Ionic Liquids. In: Peter Wasserscheid und Thomas Welton (Hg.): *Ionic Liquids in Synthesis*. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 336–347.
- Kragl, Udo; Eckstein, Marrit; Kaftzik, Nicole (2002b): Enzyme catalysis in ionic liquids. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (6), S. 565–571. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00353-1.
- Kragl, Udo; Kruse, Wolfgang; Hummel, Werner; Wandrey, Christian (1996): Enzyme engineering aspects of biocatalysis. Cofactor regeneration as example. In: *Biotechnol. Bioeng.* 52 (2), S. 309–319. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19961020)52:2<309::AID-BIT11>3.0.CO;2-E.
- Kreher, Ulf P.; Rosamilia, Anthony E.; Raston, Colin L.; Scott, Janet L.; Strauss, Christopher R. (2004): Self-associated, "distillable" ionic media. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 9 (6), S. 387–393.
- Kruzel, M.; Morawiecka, B. (1982): Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Purification, properties, sugar and amino acid composition. In: *Acta Biochimica Polonica* 29 (3-4), S. 321–330.
- Kubicz, Aleksandra; Morawiecka, Bronislawa; Kruzel, M. (1974): Heterogeneity of Acid Phosphatase from Potato Tubers. In: *Acta Biochimica Polonica* 21 (2).
- Kulszewski, Tobias; Sasso, Francesco; Secundo, Francesco; Lotti, Marina; Pleiss, Jürgen (2013): Molecular mechanism of deactivation of *C. antarctica* lipase B by methanol. In: *Journal of biotechnology* 168 (4), S. 462–469. DOI: 10.1016/j.biote.2013.10.012.
- Kumar, Awanish; Bisht, Meena; Jha, Indrani; Venkatesu, Pannuru (2017): The Role of Ionic Liquids in Protein Folding/Unfolding Studies. In: Scott Handy (Hg.): *Progress and Developments in Ionic Liquids*: InTech.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K. (1985): On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. In: *Trends in Biotechnology*.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. (1987): Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. In: *Biotechnol. Bioeng.* 30 (1), S. 81–87. DOI: 10.1002/bit.260300112.
- Lamb, John D.; Peterson, Randall T. (1995): Coalescence Extraction. A Novel, Rapid Means of Performing Solvent Extractions. In: *Separation Science and Technology* 30 (17), S. 3237–3244. DOI: 10.1080/01496399508013141.

- Lange, Kathrin M.; Könnecke, René; Soldatov, Mikhail; Golnak, Ronny; Rubensson, Jan-Erik; Soldatov, Alexander; Aziz, Emad F. (2011): On the origin of the hydrogen-bond-network nature of water: X-ray absorption and emission spectra of water-acetonitrile mixtures. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 50 (45), S. 10621–10625. DOI: 10.1002/anie.201104161.
- Langermann, Jan von; Guterl, Jan-Karl; Pohl, Martina; Wajant, Harald; Kragl, Udo (2008): Hydroxynitrile lyase catalyzed cyanohydrin synthesis at high pH-values. In: *Bioprocess and biosystems engineering* 31 (3), S. 155–161. DOI: 10.1007/s00449-008-0198-4.
- Langermann, Jan von; Mell, Annett; Paetzold, Eckhard; Daußmann, Thomas; Kragl, Udo (2007): Hydroxynitrile Lyase in Organic Solvent-Free Systems to Overcome Thermodynamic Limitations. In: *Adv. Synth. Catal.* 349 (8-9), S. 1418–1424. DOI: 10.1002/adsc.200700016.
- Lashkarbolooki, Mostafa (2018): Prediction of Partial Miscibility of Binary Mixtures Consisting of Ionic Liquids. In: *Journal of Thermophysics and Heat Transfer* 314 (1), S. 1–12. DOI: 10.2514/1.T5390.
- Laszlo, J. A.; Compton, D. L. (2001): Alpha-chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. In: *Biotechnol. Bioeng.* 75 (2), S. 181–186. DOI: 10.1002/bit.1177.
- Lauble, Hanspeter; Miehlich, Burkhard; Förster, Siegfried; Kobler, Christoph; Wajant, Harald; Effenberger, Franz (2002): Structure determinants of substrate specificity of hydroxynitrile lyase from Manihot esculenta. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 11 (1), S. 65–71. DOI: 10.1110/ps.33702.
- Lee, Bong-Seop; Lin, Shiang-Tai (2014): A priori prediction of the octanol–water partition coefficient (*K_{ow}*) of ionic liquids. In: *Fluid Phase Equilibria* 363, S. 233–238. DOI: 10.1016/j.fluid.2013.11.042.
- Lee, Sun Bok; Kim, Ki-Joo (1995): Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79 (5), S. 473–478. DOI: 10.1016/0922-338X(95)91264-6.
- Leitner, Walter; Hölscher, Markus; Behr, Arno (Hg.) (2008): Regulated systems for multiphase catalysis. Berlin, Heidelberg: Springer (Topics in organometallic chemistry, 23). Online verfügbar unter <http://www.springerlink.com/content/gn0363410206>.
- Li, Changping; Li, Dan; Zou, Shuangshuang; Li, Zhuo; Yin, Jingmei; Wang, Ailing et al. (2013): Extraction desulfurization process of fuels with ammonium-based deep eutectic solvents. In: *Green Chem.* 15 (10), S. 2793. DOI: 10.1039/C3GC41067F.
- Li, Chun-Xiang; Han, Juan; Wang, Yun; Yan, Yong-Sheng; Xu, Xiao-Hui; Pan, Jian-Ming (2009): Extraction and mechanism investigation of trace roxithromycin in real water samples by use of ionic

- liquid-salt aqueous two-phase system. In: *Analytica chimica acta* 653 (2), S. 178–183. DOI: 10.1016/j.aca.2009.09.011.
- Li, Cong; Tan, Tianwei; Zhang, Haiyang; Feng, Wei (2010): Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. Insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. In: *The Journal of Biological Chemistry* 285 (37), S. 28434–28441. DOI: 10.1074/jbc.M110.136200.
- Li, Shehong; He, Chiyang; Liu, Huwei; Li, Kean; Liu, Feng (2005): Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid chromatography of opium alkaloids. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 826 (1-2), S. 58–62. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.08.005.
- Lienhard, G. E. (1973): Enzymatic catalysis and transition-state theory. In: *Science (New York, N.Y.)* 180 (4082), S. 149–154.
- Lin, Ho-Mu; Tien, Hsin-Yi; Hone, Ying-Tzu; Lee, Ming-Jer (2007): Solubility of selected dibasic carboxylic acids in water, in ionic liquid of [Bmim][BF₄], and in aqueous [Bmim][BF₄] solutions. In: *Fluid Phase Equilib.* 253 (2), S. 130–136. DOI: 10.1016/j.fluid.2007.02.011.
- Liszka, Michael J.; Clark, Melinda E.; Schneider, Elizabeth; Clark, Douglas S. (2012): Nature versus nurture. Developing enzymes that function under extreme conditions. In: *Annual review of chemical and biomolecular engineering* 3, S. 77–102. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114239.
- Liu, Qingfen; Yu, Jiang; Li, Wangliang; Hu, Xuesheng; Xia, Hansong; Liu, Huizhou; Yang, Ping (2006): Partitioning Behavior of Penicillin G in Aqueous Two Phase System Formed by Ionic Liquids and Phosphate. In: *Sep. Sci. Technol.* 41 (12), S. 2849–2858. DOI: 10.1080/01496390600786135.
- Ios Ríos, A. P. de; Hernández Fernández, F. J.; Gómez, D.; Rubio, M.; Víllora, G. (2011): Biocatalytic transesterification of sunflower and waste cooking oils in ionic liquid media. In: *Process Biochemistry* 46 (7), S. 1475–1480. DOI: 10.1016/j.procbio.2011.03.021.
- Lotti, Marina; Pleiss, Jürgen; Valero, Francisco; Ferrer, Pau (2015): Effects of methanol on lipases. Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. In: *Biotechnology journal* 10 (1), S. 22–30. DOI: 10.1002/biot.201400158.
- Louros, Cláudia L. S.; Cláudio, Ana Filipa M.; Neves, Catarina M. S. S.; Freire, Mara G.; Marrucho, Isabel M.; Pauly, Jérôme; Coutinho, João A. P. (2010): Extraction of biomolecules using phosphonium-based ionic liquids + K(3)PO(4) aqueous biphasic systems. In: *International journal of molecular sciences* 11 (4), S. 1777–1791. DOI: 10.3390/ijms11041777.

Lozano, P.; Diego, T. de; Carrié, D.; Vaultier, Michel; Iborra, J. L. (2001): Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. In: *Biotechnology Letters* 23 (18), S. 1529–1533. DOI: 10.1023/A:1011697609756.

Lozano, Pedro (2010): Enzymes in neoteric solvents. From one-phase to multiphase systems. In: *Green Chem.* 12 (4), S. 555. DOI: 10.1039/B919088K.

Lozano, Pedro; Bernal, Juana M.; Garcia-Verdugo, Eduardo; Sanchez-Gomez, Gregorio; Vaultier, Michel; Burguete, M. Isabel; Luis, Santiago V. (2015): Sponge-like ionic liquids. A new platform for green biocatalytic chemical processes. In: *Green Chem.* 17 (7), S. 3706–3717. DOI: 10.1039/C5GC00894H.

Lozano, Pedro; Bernal, Juana M.; Sánchez-Gómez, Gregorio; López-López, Gregorio; Vaultier, Michel (2013): How to produce biodiesel easily using a green biocatalytic approach in sponge-like ionic liquids. In: *Energy Environ. Sci.* 6 (4), S. 1328. DOI: 10.1039/C3EE24429F.

Lozano, Pedro; Bernal, Juana María; Piamtongkam, Rungtiwa; Fetzer, Dirk; Vaultier, Michel (2010): One-phase ionic liquid reaction medium for biocatalytic production of biodiesel. In: *ChemSusChem* 3 (12), S. 1359–1363. DOI: 10.1002/cssc.201000244.

Lozano, Pedro; Diego, Teresa de; Carrié, Daniel; Vaultier, Michel; Iborra, José L. (2003): Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21 (1-2), S. 9–13. DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00128-5.

Lüdecke, Christa; Lüdecke, Dorothea (2000a): Phasengleichgewichte mehrkomponentiger Systeme. In: Christa Lüdecke und Dorothea Lüdecke (Hg.): Thermodynamik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 570–750.

Lüdecke, Christa; Lüdecke, Dorothea (Hg.) (2000b): Thermodynamik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).

Maase, Matthias (2004): Erstes technisches Verfahren mit ionischen Flüssigkeiten. In: *Chemie in unserer Zeit* 38 (6), S. 434–435. DOI: 10.1002/ciu.200490093.

Madeira Lau, R.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A. (2000): Lipase-Catalyzed Reactions in Ionic Liquids. In: *Organic letters* 2 (26), S. 4189–4191. DOI: 10.1021/o1006732d.

Madeira Lau, Rute; Sorgedrager, Menno J.; Carrea, Giacomo; van Rantwijk, Fred; Secundo, Francesco; Sheldon, Roger A. (2004): Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. Effects on structure and activity. In: *Green Chem.* 6 (9), S. 483. DOI: 10.1039/B405693K.

- Magnuson, David K.; Bodley, James W.; Evans, D. Fennell (1984): The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate. In: *J Solution Chem* 13 (8), S. 583–587. DOI: 10.1007/BF00647226.
- Magnusson, Anders O.; Rotticci-Mulder, Johanna C.; Santagostino, Alberto; Hult, Karl (2005): Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 6 (6), S. 1051–1056. DOI: 10.1002/cbic.200400410.
- Makowska, Anna; Dyoniziak, Ewa; Siporska, Agnieszka; Szydłowski, Jerzy (2010): Miscibility of ionic liquids with polyhydric alcohols. In: *J. Phys. Chem. B* 114 (7), S. 2504–2508. DOI: 10.1021/jp911660a.
- Makowska, Anna; Sztank, Ewa; Szydłowski, Jerzy (2011): Liquid phase behavior of hexafluorophosphate ionic liquids with polyhydric alcohols. In: *Fluid Phase Equilib.* DOI: 10.1016/j.fluid.2011.11.004.
- Marcus, Yizhak (1991): Thermodynamics of solvation of ions. Part 5.—Gibbs free energy of hydration at 298.15 K. In: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 87 (18), S. 2995–2999. DOI: 10.1039/FT9918702995.
- Marcus, Yizhak (2002): Solvent mixtures. Properties and selective solvation. New York, NY: Marcel Dekker. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0647/2002073994-d.html>.
- Martinelle, Mats; Holmquist, Mats; Hult, Karl (1995): On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1258 (3), S. 272–276. DOI: 10.1016/0005-2760(95)00131-U.
- Maruyama, Tatsuo; Nagasawa, Shinichiro; Goto, Masahiro (2002): Poly(ethylene glycol)-lipase complex that is catalytically active for alcoholysis reactions in ionic liquids. In: *Biotechnology Letters* 24 (16), S. 1341–1345. DOI: 10.1023/A:1019848400436.
- Matouš, J.; Hrnčířík, J.; Novák, J. P.; Šobr, J. (1970): Liquid-liquid equilibrium in the system water-tetrahydrofuran. In: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 35 (6), S. 1904–1905. DOI: 10.1135/cccc19701904.
- McMahon, Jennifer M.; White, Wanda L.B.; Sayre, Richard T. (1995): REVIEW ARTICLE: Cyanogenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In: *J Exp Bot* 46 (7), S. 731–741. DOI: 10.1093/jxb/46.7.731.
- Meck, Warren H.; Williams, Christina L. (1999): Choline supplementation during prenatal development reduces proactive interference in spatial memory. In: *Developmental Brain Research* 118 (1-2), S. 51–59. DOI: 10.1016/S0165-3806(99)00105-4.

- Meck, Warren H.; Williams, Christina L. (2003): Metabolic imprinting of choline by its availability during gestation. Implications for memory and attentional processing across the lifespan. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 27 (4), S. 385–399. DOI: 10.1016/S0149-7634(03)00069-1.
- Melo, Catarina I.; Bogel-Łukasik, Rafał; Nunes da Ponte, Manuel; Bogel-Łukasik, Ewa (2013): Ammonium ionic liquids as green solvents for drugs. In: *Fluid Phase Equilibria* 338, S. 209–216. DOI: 10.1016/j.fluid.2012.11.029.
- Micaêlo, Nuno M.; Soares, Cláudio M. (2007): Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents. In: *FEBS Journal* 274 (9), S. 2424–2436. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05781.x.
- Miki, Kumiko; Westh, Peter; Nishikawa, Keiko; Koga, Yoshikata (2005): Effect of an "ionic liquid" cation, 1-butyl-3-methylimidazolium, on the molecular organization of H₂O. In: *The journal of physical chemistry. B* 109 (18), S. 9014–9019. DOI: 10.1021/jp046309c.
- Miroliaei, Mehran; Nemat-Gorgani, Mohsen (2002): Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenases. A comparative study. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2), S. 169–175. DOI: 10.1016/S1357-2725(01)00109-1.
- Mizutani, Yukiko; Matsumura, Yasuki; Imamura, Koreyoshi; Nakanishi, Kazuhiro; Mori, Tomohiko (2003): Effects of water activity and lipid addition on secondary structure of zein in powder systems. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (1), S. 229–235. DOI: 10.1021/jf0205007.
- Möbius, Hans-Heinrich (1955): Mischungsenthalpien und Mischbarkeit von Aceton, Benzol und Wasser. In: *J. Prakt. Chem.* 2 (1-2), S. 95–104. DOI: 10.1002/prac.19550020108.
- Mohammad, Ali; Inamuddin (2012): Green solvents. Dordrecht: Springer (Chemistry).
- Mohd Zaid, Hayyiratul Fatimah; Chong, Fai Kait; Abdul Mutualib, Mohamed Ibrahim (2017): Extractive deep desulfurization of diesel using choline chloride-glycerol eutectic-based ionic liquid as a green solvent. In: *Fuel* 192, S. 10–17. DOI: 10.1016/j.fuel.2016.11.112.
- Moniruzzaman, Muhammad; Kamiya, Noriho; Goto, Masahiro (2010a): Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids. In: *Organic & biomolecular chemistry* 8 (13), S. 2887–2899. DOI: 10.1039/B926130C.
- Moniruzzaman, Muhammad; Kamiya, Noriho; Nakashima, Kazunori; Goto, Masahiro (2008): Water-in-ionic liquid microemulsions as a new medium for enzymatic reactions. In: *Green Chem.* 10 (5), S. 497. DOI: 10.1039/B802501K.

- Moniruzzaman, Muhammad; Nakashima, Kazunori; Kamiya, Noriho; Goto, Masahiro (2010b): Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. In: *Biochemical Engineering Journal* 48 (3), S. 295–314. DOI: 10.1016/j.bej.2009.10.002.
- Moon, Yun Hee; Lee, Sang Mok; Ha, Sung Ho; Koo, Yoon-Mo (2006): Enzyme-catalyzed reactions in ionic liquids. In: *Korean J. Chem. Eng.* 23 (2), S. 247–263. DOI: 10.1007/BF02705724.
- Morandeira, Lois; Álvarez, María S.; Markiewicz, Marta; Stolte, Stefan; Rodríguez, Ana; Sanromán, M. Ángeles; Deive, Francisco J. (2017a): Testing True Choline Ionic Liquid Biocompatibility from a Biotechnological Standpoint. In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5 (9), S. 8302–8309. DOI: 10.1021/acssuschemeng.7b02017.
- Morandeira, Lois; Deive, Francisco J.; Sanromán, M. Ángeles; Rodríguez, Ana; Álvarez, María S. (2017b): Aqueous two-phase systems containing imidazolium ionic liquids and a Tween surfactant. In: *The Journal of Chemical Thermodynamics* 105, S. 209–216. DOI: 10.1016/j.jct.2016.10.025.
- Moreno, JoséM.; Samoza, A.; del Campo, Carmen; Llama, Emilio F.; Sinisterra, JoséV. (1995): Organic reactions catalyzed by immobilized lipases. Part I. Hydrolysis of 2-aryl propionic and 2-aryl butyric esters with immobilized *Candida cylindracea* lipase. In: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 95 (2), S. 179–192. DOI: 10.1016/1381-1169(94)00006-9.
- Moriel, P.; García-Suárez, E. J.; Martínez, M.; García, A. B.; Montes-Morán, M. A.; Calvino-Casilda, V.; Bañares, M. A. (2010): Synthesis, characterization, and catalytic activity of ionic liquids based on biosources. In: *Tetrahedron Letters* 51 (37), S. 4877–4881. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.07.060.
- Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Shleev, S. V.; Yaropolov, Ya. I. (2007): Laccase-mediator systems and their applications. A review. In: *Appl Biochem Microbiol* 43 (5), S. 523–535. DOI: 10.1134/S0003683807050055.
- Mozhaev, Vadim V.; Khmelnitsky, Yuri L.; Sergeeva, Mariya V.; Belova, Alla B.; Klyachko, Nataliya L.; Levashov, Andrey V.; Martinek, Karel (1989): Catalytic activity and denaturation of enzymes in water/organic cosolvent mixtures. alpha-Chymotrypsin and laccase in mixed water/alcohol, water/glycol and water/formamide solvents. In: *Eur J Biochem* 184 (3), S. 597–602. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15055.x.
- Mu, Liwen; Shi, Yijun; Guo, Xiaojing; Ji, Tuo; Chen, Long; Yuan, Ruixia et al. (2015): Non-corrosive green lubricants. Strengthened lignin-[choline][amino acid] ionic liquids interaction via reciprocal hydrogen bonding. In: *RSC Adv.* 5 (81), S. 66067–66072. DOI: 10.1039/C5RA11093A.

- Muldoon, Mark J.; Gordon, Charles M.; Dunkin, Ian R. (2001): Investigations of solvent–solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. In: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (4), S. 433–435. DOI: 10.1039/B101449H.
- Murata, K.; Yokoyama, Y.; Ikeda, S. (1972): Homogeneous liquid-liquid extraction method. Extraction of iron(III) thenoyltrifluoroacetone by propylene carbonate. In: *Anal. Chem.* 44 (4), S. 805–810. DOI: 10.1021/ac60312a009.
- Mutti, Francesco G.; Fuchs, Christine S.; Pressnitz, Desirée; Sattler, Johann H.; Kroutil, Wolfgang (2011): Stereoselectivity of Four (R)-Selective Transaminases for the Asymmetric Amination of Ketones. In: *Adv. Synth. Catal.* 353 (17), S. 3227–3233. DOI: 10.1002/adsc.201100558.
- Muzart, Jacques (2006): Ionic Liquids as Solvents for Catalyzed Oxidations of Organic Compounds. In: *Adv. Synth. Catal.* 348 (3), S. 275–295. DOI: 10.1002/adsc.200505273.
- Najdanovic-Visak, Vesna; Lopes, José N. Canongia; Visak, Zoran P.; Trindade, J.; Rebelo, Luís P. N. (2007): Salting-out in Aqueous Solutions of Ionic Liquids and K₃PO₄. Aqueous Biphasic Systems and Salt Precipitation. In: *Int. J. Mol. Sci.* 8 (8), S. 736–748. DOI: 10.3390/i8080736.
- Nakashima, Kazunori; Maruyama, Tatsuo; Kamiya, Noriho; Goto, Masahiro (2005): Comb-shaped poly(ethylene glycol)-modified subtilisin Carlsberg is soluble and highly active in ionic liquids. In: *Chem. Commun.* (34), S. 4297–4299. DOI: 10.1039/B505479F.
- Nara, Susheel J.; Harjani, Jitendra R.; Salunkhe, Manikrao M. (2002): Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents. A comparative study. In: *Tetrahedron Letters* 43 (16), S. 2979–2982. DOI: 10.1016/S0040-4039(02)00420-3.
- Nara, Susheel J.; Naik, Prashant U.; Harjani, Jitendra R.; Salunkhe, Manikrao M. (2006): Potential of ionic liquids in greener methodologies involving biocatalysis and other synthetically important transformations. In: *Indian Journal of Chemistry* (45B), 2257-2269.
- Naushad, Mu; Alothman, Zied Abdullah; Khan, Abbul Bashar; Ali, Maroof (2012): Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes. A review. In: *International journal of biological macromolecules* 51 (4), S. 555–560. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.06.020.
- Ncanana, Sandile; Baratto, Lara; Roncaglia, Lucia; Riva, Sergio; Burton, Stephanie G. (2007): Laccase-Mediated Oxidation of Totarol. In: *Adv. Synth. Catal.* 349 (8-9), S. 1507–1513. DOI: 10.1002/adsc.200700005.
- Neves, Catarina M. S. S.; Ventura, Sónia P. M.; Freire, Mara G.; Marrucho, Isabel M.; Coutinho, João A. P. (2009): Evaluation of cation influence on the formation and extraction capability of ionic-liquid-

- based aqueous biphasic systems. In: *The journal of physical chemistry. B* 113 (15), S. 5194–5199. DOI: 10.1021/jp900293v.
- Newington, Ian; Perez-Arlandis, Juan M.; Welton, Tom (2007): Ionic liquids as designer solvents for nucleophilic aromatic substitutions. In: *Organic letters* 9 (25), S. 5247–5250. DOI: 10.1021/o1702435f.
- Nič, Miloslav; Jirát, Jiří (2009): upper critical solution temperature. In: Miloslav Nič, Jiří Jirát, Bedřich Košata, Aubrey Jenkins und Alan McNaught (Hg.): IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC.
- Nič, Miloslav; Jirát, Jiří; Košata, Bedřich; Jenkins, Aubrey; McNaught, Alan (Hg.) (2009): IUPAC Compendium of Chemical Terminology. Research Triangle Park, NC: IUPAC.
- Niculescu, Mihai D. (2017): Choline and Brain Development. In: Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease: Elsevier, S. 347–360.
- Niefeld, Karsten; Müller, Jörg; Riebel, Bettina; Hummel, Werner; Schomburg, Dietmar (2003): The Crystal Structure of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Suggests the Structural Basis of its Metal Dependency. In: *Journal of molecular biology* 327 (2), S. 317–328. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00081-0.
- Niefeld, Karsten; Riebel, Bettina; Müller, Jörg; Hummel, Werner; Schomburg, Dietmar (2000): Crystallization and preliminary characterization of crystals of R -alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. In: *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (12), S. 1696–1698. DOI: 10.1107/S0907444900011860.
- Nockemann, Peter; Binnemans, Koen; Thijss, Ben; Parac-Vogt, Tatjana N.; Merz, Klaus; Mudring, Anja-Verena et al. (2009): Temperature-driven mixing-demixing behavior of binary mixtures of the ionic liquid choline bis(trifluoromethylsulfonyl)imide and water. In: *The journal of physical chemistry. B* 113 (5), S. 1429–1437. DOI: 10.1021/jp808993t.
- Nordblad, Mathias; Adlercreutz, Patrick (2008): Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. In: *Journal of biotechnology* 133 (1), S. 127–133. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.09.002.
- Oda, Shinobu; Wakui, Hironori; Ohashi, Shinichi (2011): Efficient hydrolytic reaction of an acetate ester with fungal lipase in a liquid-liquid interface bioreactor (L-L IBR) using CaCO₃-coated ballooned microsphere. In: *Journal of bioscience and bioengineering* 112 (2), S. 151–153. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.04.001.

Oehlke, Alexander; Hofmann, Katja; Spange, Stefan (2006): New aspects on polarity of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as measured by solvatochromic probes. In: *New J. Chem.* 30 (4), S. 533. DOI: 10.1039/B516709D.

Okamoto, Takashi; Ueji, Shinichi (2000): A new method for improving the enantioselectivity of lipase-catalyzed hydrolysis in organic solvent containing a small amount of water in the presence of metal ions. In: *Biotechnology Letters* 22 (14), S. 1169–1171. DOI: 10.1023/A:1005637329704.

Olczak, Mariusz; Morawiecka, Bronislawa; Watorek, Wroclaw (2003): Plant purple acid phosphatases — genes, structures and biological function. In: *Acta Biochimica Polonica* 50 (4), S. 1245–1256.

Ollis, David L.; Cheah, Eong; Cygler, Miroslaw; Dijkstra, Bauke; Frolov, Felix; Franken, Sybille M. et al. (1992): The α / β hydrolase fold. In: *Protein Eng Des Sel* 5 (3), S. 197–211. DOI: 10.1093/protein/5.3.197.

Onghena, Bieke; Jacobs, Jeroen; van Meervelt, Luc; Binnemans, Koen (2014): Homogeneous liquid-liquid extraction of neodymium(III) by choline hexafluoroacetylacetone in the ionic liquid choline bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. In: *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)* 43 (30), S. 11566–11578. DOI: 10.1039/C4DT01340A.

Oppermann, Sebastian; Stein, Florian; Kragl, Udo (2011): Ionic liquids for two-phase systems and their application for purification, extraction and biocatalysis. In: *Applied microbiology and biotechnology* 89 (3), S. 493–499. DOI: 10.1007/s00253-010-2933-4.

Osterath, Brigitte; Rao, Nagaraj; Lütz, Stephan; Liese, Andreas (2007): Technische Anwendung von Enzymen. Weiße Wäsche und Grüne Chemie. In: *Chemie in unserer Zeit* 41 (4), S. 324–333. DOI: 10.1002/ciu.200700412.

Ottosson, Jenny; Fransson, Linda; King, Jerry W.; Hult, Karl (2002): Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1594 (2), S. 325–334. DOI: 10.1016/S0167-4838(01)00324-7.

Overbeeke, P.L.A; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Jongejan, J.A; Heijnen, J.J (2000): Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10 (4), S. 385–393. DOI: 10.1016/S1381-1177(99)00110-1.

Pace, C.Nick (1990): Conformational stability of globular proteins. In: *Trends in Biochemical Sciences* 15 (1), S. 14–17. DOI: 10.1016/0968-0004(90)90124-T.

Paduszyński, Kamil; Chiyen, Jim; Ramjugernath, Deresh; Letcher, Trevor M.; Domańska, Urszula (2011): Liquid–liquid phase equilibrium of (piperidinium-based ionic liquid+an alcohol) binary systems and modelling with NRHB and PCP-SAFT. In: *Fluid Phase Equilib.* 305 (1), S. 43–52. DOI: 10.1016/j.fluid.2011.03.005.

Paduszyński, Kamil; Okuniewski, Marcin; Domańska, Urszula (2013a): Renewable feedstocks in green solvents. Thermodynamic study on phase diagrams of D-sorbitol and xylitol with dicyanamide based ionic liquids. In: *J. Phys. Chem. B* 117 (23), S. 7034–7046. DOI: 10.1021/jp401937p.

Paduszyński, Kamil; Okuniewski, Marcin; Domańska, Urszula (2013b): “Sweet-in-Green” Systems Based on Sugars and Ionic Liquids. New Solubility Data and Thermodynamic Analysis. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (51), S. 18482–18491. DOI: 10.1021/ie4033186.

Pagliaro, Mario; Ciriminna, Rosaria; Kimura, Hiroshi; Rossi, Michele; Della Pina, Cristina (2007): Von Glycerin zu höherwertigen Produkten. In: *Angew. Chem.* 119 (24), S. 4516–4522. DOI: 10.1002/ange.200604694.

Parida, Sanghamitra; Dordick, Jonathan S. (1991): Substrate structure and solvent hydrophobicity control lipase catalysis and enantioselectivity in organic media. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (6), S. 2253–2259. DOI: 10.1021/ja00006a051.

Park, Seongsoon; Kazlauskas, Romas J. (2001): Improved Preparation and Use of Room-Temperature Ionic Liquids in Lipase-Catalyzed Enantio- and Regioselective Acylations. In: *J. Org. Chem.* 66 (25), S. 8395–8401. DOI: 10.1021/jo015761e.

Park, Seongsoon; Kazlauskas, Romas J. (2003): Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. In: *Current Opinion in Biotechnology* 14 (4), S. 432–437. DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00100-9.

Park, Seongsoon; Viklund, Fredrik; Hult, Karl; Kazlauskas, Romas J. (2003): Ionic Liquids Create New Opportunities for Nonaqueous Biocatalysis with Polar Substrates. Acylation of Glucose and Ascorbic Acid. In: Robin D. Rogers und Kenneth R. Seddon (Hg.): *Ionic Liquids as Green Solvents*, Bd. 856. Washington, DC: American Chemical Society (ACS symposium series), S. 225–238.

Pârvulescu, Vasile I.; Hardacre, Christopher (2007): Catalysis in ionic liquids. In: *Chem. Rev.* 107 (6), S. 2615–2665. DOI: 10.1021/cr050948h.

Patel, Rajan; Kumari, Meena; Khan, Abbul Bashar (2014): Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity. A review. In: *Applied biochemistry and biotechnology* 172 (8), S. 3701–3720. DOI: 10.1007/s12010-014-0813-6.

- Payne, Samantha M.; Kerton, Francesca M. (2010): Solubility of bio-sourced feedstocks in ‘green’ solvents. In: *Green Chem.* 12 (9), S. 1648. DOI: 10.1039/C0GC00205D.
- Pei, YuanChao; Li, ZhiYong; Liu, Li; Wang, JianJi; Wang, HuiYong (2010): Selective separation of protein and saccharides by ionic liquids aqueous two-phase systems. In: *Sci. China Chem.* 53 (7), S. 1554–1560. DOI: 10.1007/s11426-010-4025-9.
- Pei, YuanChao; Wang, JianJi; Liu, Li; Wu, Kun; Zhao, Yang (2007): Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Biphasic Systems Containing Selected Imidazolium Ionic Liquids and Salts. In: *J. Chem. Eng. Data* 52 (5), S. 2026–2031. DOI: 10.1021/je700315u.
- Pena-Pereira, Francisco; Namieśnik, Jacek (2014): Ionic liquids and deep eutectic mixtures. Sustainable solvents for extraction processes. In: *ChemSusChem* 7 (7), S. 1784–1800. DOI: 10.1002/cssc.201301192.
- Pereira, Jorge F. B.; Lima, Álvaro S.; Freire, Mara G.; Coutinho, João A. P. (2010): Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. In: *Green Chem.* 12 (9), S. 1661. DOI: 10.1039/c003578e.
- Pereira, Jorge F. B.; Rebelo, Luis Paulo N.; Rogers, Robin D.; Coutinho, Joao A. P.; Freire, Mara G. (2013): Combining ionic liquids and polyethylene glycols to boost the hydrophobic-hydrophilic range of aqueous biphasic systems. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (45), S. 19580–19583. DOI: 10.1039/c3cp53701c.
- Pereiro, Ana B.; Rodriguez, Ana (2009): An ionic liquid proposed as solvent in aromatic hydrocarbon separation by liquid extraction. In: *A/ChE J.* 45, NA-NA. DOI: 10.1002/aic.11937.
- Pernak, Juliusz; Smiglak, Marcin; Griffin, Scott T.; Hough, Whitney L.; Wilson, Timothy B.; Pernak, Anna et al. (2006): Long alkyl chain quaternary ammonium-based ionic liquids and potential applications. In: *Green Chem.* 8 (9), S. 798. DOI: 10.1039/B604353D.
- Persson, Mattias; Bornscheuer, Uwe T. (2003): Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. In: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22 (1-2), S. 21–27. DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00294-1.
- Persson, Mattias; Costes, David; Wehtje, Ernst; Adlercreutz, Patrick (2002): Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. In: *Enzyme and Microbial Technology* 30 (7), S. 916–923. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00033-9.

- Petkovic, Marija; Seddon, Kenneth R.; Rebelo, Luís Paulo N.; Silva Pereira, Cristina (2011): Ionic liquids. A pathway to environmental acceptability. In: *Chemical Society reviews* 40 (3), S. 1383–1403. DOI: 10.1039/C004968A.
- Petucci, Chris; Di, Li; McConnell, Oliver (2007): Rapid screening of enzymes for the enzymatic hydrolysis of chiral esters in drug discovery. In: *Chirality* 19 (9), S. 701–705. DOI: 10.1002/chir.20432.
- Pham, Thi Phuong Thuy; Cho, Chul-Woong; Yun, Yeoung-Sang (2010): Environmental fate and toxicity of ionic liquids. A review. In: *Water research* 44 (2), S. 352–372. DOI: 10.1016/j.watres.2009.09.030.
- Phan, Lam; Andreatta, Jeremy R.; Horvey, Loel K.; Edie, Colin F.; Luco, Aimée-Lee; Mirchandani, Anish et al. (2008): Switchable-polarity solvents prepared with a single liquid component. In: *The Journal of organic chemistry* 73 (1), S. 127–132. DOI: 10.1021/jo7017697.
- Pimerzin, A. A. (Hg.) (2011): Abstracts of Magnetic Ionic Liquids. XVIII International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia, RCCT 2011, Samara, Russian Federation, October 3 - 7, 2011. International Conference on Chemical Thermodynamics in Russia; RCCT 2011. Samara.
- Pinto, Paula C. A. G.; Saraiva, M. Luacute; Scia M. F.; Lima, Joseacute; C, L. F. (2008): Oxidoreductase Behavior in Ionic Liquids. A Review. In: *Anal. Sci.* 24 (10), S. 1231–1238. DOI: 10.2116/analsci.24.1231.
- Plechkova, Natalia V.; Seddon, Kenneth R. (2008): Applications of ionic liquids in the chemical industry. In: *Chemical Society reviews* 37 (1), S. 123–150. DOI: 10.1039/B006677J.
- Pohar, Andrej; Plazl, Igor; Žnidarsič-Plazl, Polona (2009): Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale. In: *Lab on a chip* 9 (23), S. 3385–3390. DOI: 10.1039/B915151F.
- Präve, Paul (Hg.) (1994): Handbuch der Biotechnologie. Mit 401 Abbildungen, 150 Tabellen, 26 Fließschemata sowie 80 Strukturformeln und zahlreichen weiteren Zusammenstellungen und Formeln. 4., neu bearb. und erw. Aufl. München: Oldenbourg.
- Qian, Yuhao; Jing, Guohua; Lv, Bihong; Zhou, Zuoming (2017): Exploring the General Characteristics of Amino-Acid-Functionalized Ionic Liquids through Experimental and Quantum Chemical Calculations. In: *Energy Fuels* 31 (4), S. 4202–4210. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.6b03268.
- Radeglia, Reiner (1989): On the Dynamic Structure Behaviour of the Dimethylamine—Carbondioxide Complex (Dimcarb). In: *Z. Naturforsch.* 44b, S. 181–186.

- Rakels, J.L.L.; Straathof, A.J.J.; Heijneii, J. J. (1994): Improvement of enantioselective enzymatic ester hydrolysis in organic solvents. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 5 (1), S. 93–100. DOI: 10.1016/S0957-4166(00)80488-7.
- Rane, Sandhya Y.; Badave, Kirti D.; Ahmed, Khursheed (2009): Insight into bio-physiological functions of acid phosphatase from potatoes (*Solanum tuberosum*): A bioanalytical approach. In: *Indian Journal of Chemistry* (48A), S. 15–24.
- Ranke, Johannes; Müller, Anja; Bottin-Weber, Ulrike; Stock, Frauke; Stolte, Stefan; Arning, Jürgen et al. (2007): Lipophilicity parameters for ionic liquid cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. In: *Ecotoxicology and environmental safety* 67 (3), S. 430–438. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2006.08.008.
- Rebelo, Luis P. N.; Canongia Lopes, José N.; Esperança, José M. S. S.; Filipe, Eduardo (2005): On the critical temperature, normal boiling point, and vapor pressure of ionic liquids. In: *The journal of physical chemistry. B* 109 (13), S. 6040–6043. DOI: 10.1021/jp050430h.
- Reetz, Manfred T.; Jaeger, Karl-Erich (2000): Enantioselective Enzymes for Organic Synthesis Created by Directed Evolution. In: *Chem. Eur. J.* 6 (3), S. 407–412. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3765(20000204)6:3<407::AID-CHEM407>3.0.CO;2-Y.
- Reichardt, Ch.; Dimroth, K. (1968): Lösungsmittel und empirische Parameter zur Charakterisierung ihrer Polarität. In: Dimroth K. Reichardt C. (Hg.): Lösungen und Lösungsmittel, 11/1. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag (Fortschritte der Chemischen Forschung), S. 1–73.
- Reichardt, Christian (1994): Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. In: *Chem. Rev.* 94 (8), S. 2319–2358. DOI: 10.1021/cr00032a005.
- Reichardt, Christian (2005): Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. In: *Green Chem.* 7 (5), S. 339. DOI: 10.1039/b500106b.
- Reichardt, Christian; Welton, Thomas (2011): Solvents and solvent effects in organic chemistry. 4th, updated and enl. ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10504195>.
- Reid, M. F.; Fewson, C. A. (1994): Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. In: *Critical reviews in microbiology* 20 (1), S. 13–56. DOI: 10.3109/10408419409113545.
- Rengstl, Doris; Fischer, Veronika; Kunz, Werner (2014): Low-melting mixtures based on choline ionic liquids. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 16 (41), S. 22815–22822. DOI: 10.1039/C4CP02860K.

- Rodríguez Couto, Susana; Toca Herrera, José Luis (2006): Industrial and biotechnological applications of laccases. A review. In: *Biotechnology advances* 24 (5), S. 500–513. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
- Roduner, Emil; Kaim, Wolfgang; Sarkar, Biprajit; Urlacher, Vlada B.; Pleiss, Jürgen; Gläser, Roger et al. (2013): Selective Catalytic Oxidation of C-H Bonds with Molecular Oxygen. In: *ChemCatChem* 5 (1), S. 82–112. DOI: 10.1002/cctc.201200266.
- Rogers, Robin D. (Hg.) (2003): Ionic liquids as green solvents. Progress and prospects ; [based on papers that were presented at the Symposium Ionic Liquids as Green Solvents: Progress and Prospects at the 224th American Chemical Society (ACS) national meeting held August 18 - 22, 2002, in Boston, Massachusetts]. Symposium Ionic Liquids as Green Solvents: Progress and Prospects; American Chemical Society (ACS) national meeting. Washington, DC: American Chemical Society (ACS symposium series, 856). Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0614/2003048138-d.html>.
- Rogers, Robin D.; Seddon, Kenneth R. (2002): Ionic Liquids. Washington, DC: American Chemical Society (818).
- Romero, M. D.; Calvo, L.; Alba, C.; Daneshfar, A. (2007): A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. In: *Journal of biotechnology* 127 (2), S. 269–277. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.009.
- Ronde, N. J.; Vogt, D. (2006): Separation by Size-Exclusion Filtration. In: Brian James, Piet W. N. M. van Leeuwen, David J. Cole-Hamilton und Robert P. Tooze (Hg.): Catalyst Separation, Recovery and Recycling, Bd. 30. Dordrecht: Springer Netherlands (Catalysis by Metal Complexes), S. 73–104.
- Ropel, Laurie; Belvèze, Lionel S.; Aki, Sudhir N. V. K.; Stadtherr, Mark A.; Brennecke, Joan F. (2005): Octanol–water partition coefficients of imidazolium-based ionic liquids. In: *Green Chem.* 7 (2), S. 83–90. DOI: 10.1039/B410891D.
- Roy, Ipsita; Gupta, Munishwar Nath (2004): Freeze-drying of proteins. Some emerging concerns. In: *Biotechnology and applied biochemistry* 39 (Pt 2), S. 165–177. DOI: 10.1042/BA20030133.
- Roy-Arcand, L.; Archibald, F. S. (1991): Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. In: *Enzyme and Microbial Technology* 13 (3), S. 194–203. DOI: 10.1016/0141-0229(91)90128-W.
- Rozzell, J. David (1999): Commercial scale biocatalysis. Myths and realities. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7 (10), S. 2253–2261. DOI: 10.1016/S0968-0896(99)00159-5.

- Ruiz, Diego M.; Castro, Rosana E. de (2007): Effect of organic solvents on the activity and stability of an extracellular protease secreted by the haloalkaliphilic archaeon *Natrialba magadii*. In: *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 34 (2), S. 111–115. DOI: 10.1007/s10295-006-0174-4.
- Ruiz-Angel, Maria Jose; Pino, Veronica; Carda-Broch, Samuel; Berthod, Alain (2007): Solvent systems for countercurrent chromatography. An aqueous two phase liquid system based on a room temperature ionic liquid. In: *Journal of Chromatography A* 1151 (1-2), S. 65–73. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.11.072.
- Russell, Alan J.; Klibanov, Alexander M. (1989): Enzymes in organic solvents. In: *Biochm. Soc. Trans.* 17 (6), S. 1145. DOI: 10.1042/bst0171145.
- Ryu, Keungarp; Dordick, Jonathan S. (1992): Quantitative and predictive correlations for peroxidase catalysis in organic media. In: *Biotechnol Tech* 6 (3), S. 277–282. DOI: 10.1007/BF02439358.
- Saha, Satyen; Hayashi, Satoshi; Kobayashi, Akiko; Hamaguchi, Hiro-o (2003): Crystal Structure of 1-Butyl-3-methylimidazolium Chloride. A Clue to the Elucidation of the Ionic Liquid Structure. In: *Chem. Lett.* 32 (8), S. 740–741. DOI: 10.1246/cl.2003.740.
- Sakuratani, Yuki; Kasai, Kenji; Noguchi, Yoshiyuki; Yamada, Jun (2007): Comparison of Predictivities of LogP Calculation Models Based on Experimental Data for 134 Simple Organic Compounds. In: *QSAR Comb. Sci.* 26 (1), S. 109–116. DOI: 10.1002/qsar.200630019.
- Salgın, S.; Takaç, S. (2007): Effects of Additives on the Activity and Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase in a Biphasic Medium. In: *Chem. Eng. Technol.* 30 (12), S. 1739–1743. DOI: 10.1002/ceat.200700285.
- Salvador, Ângelo C.; Santos, Mickael da C.; Saraiva, Jorge A. (2010): Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase. In: *Green Chem.* 12 (4), S. 632. DOI: 10.1039/B918879G.
- Sangeetha, K.; Morris, Viola B.; Emilia Abraham, T. (2008): Stability and catalytic properties of encapsulated subtilisin in xerogels of alkoxsilanes. In: *Applied Catalysis A: General* 341 (1-2), S. 168–173. DOI: 10.1016/j.apcata.2008.02.043.
- Santos, E.; Albo, J.; Irabien, A. (2014): Magnetic ionic liquids. Synthesis, properties and applications. In: *RSC Adv.* 4 (75), S. 40008–40018. DOI: 10.1039/C4RA05156D.
- Sasso, Francesco; Kulszewski, Tobias; Secundo, Francesco; Lotti, Marina; Pleiss, Jürgen (2015): The effect of thermodynamic properties of solvent mixtures explains the difference between methanol and

- ethanol in *C.antarctica* lipase B catalyzed alcoholysis. In: *Journal of biotechnology* 214, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.biotech.2015.08.023.
- Savateev, Aleksandr; Liedel, Clemens; Tröger-Müller, Steffen; León, Alberto S. de; Antonietti, Markus; Dontsova, Dariya (2017): Halogen free 1,2,3- and 1,2,4-triazolide based ionic liquids. Synthesis and properties. In: *Chem. Commun.* 53 (73), S. 10192–10195. DOI: 10.1039/C7CC05770A.
- Schaadt, A.; Bart, H.-J. (2003): Coalescence Extraction - A Benign Extraction Tool. In: *Chem. Eng. Technol.* 26 (4), S. 469–472. DOI: 10.1002/ceat.200390070.
- Schäffner, Benjamin; Verevkin, Sergey P.; Börner, Armin (2009): Organische Carbonate. Grüne Lösungsmittel für Synthese und Katalyse. In: *Chemie in unserer Zeit* 43 (1), S. 12–21. DOI: 10.1002/ciu.200900468.
- Schenk, Gerhard; Mitić, Nataša; Hanson, Graeme R.; Comba, Peter (2013): Purple acid phosphatase. A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. In: *Coordination Chemistry Reviews* 257 (2), S. 473–482. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.03.020.
- Schilderman, Astrid M.; Raeissi, Sona; Peters, Cor J. (2007): Solubility of carbon dioxide in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. In: *Fluid Phase Equilib.* 260 (1), S. 19–22. DOI: 10.1016/j.fluid.2007.06.003.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. (2001): Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: *Nature* 409 (6817), S. 258–268. DOI: 10.1038/35051736.
- Schmid, Andreas; Hollmann, Frank; Park, Jin Byung; Bühler, Bruno (2002): The use of enzymes in the chemical industry in Europe. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (4), S. 359–366. DOI: 10.1016/S0958-1669(02)00336-1.
- Schmidt, C.; Beck, M.; Ahrenberg, M.; Schick, C.; Keßler, O.; Kragl, U. (2014): Room temperature ionic liquids in a heat treatment process for metals. In: *RSC Adv.* 4 (98), S. 55077–55081. DOI: 10.1039/C4RA06901C.
- Schmitke, Jennifer L.; Wescott, Charles R.; Klibanov, Alexander M. (1996): The Mechanistic Dissection of the Plunge in Enzymatic Activity upon Transition from Water to Anhydrous Solvents. In: *J. Am. Chem. Soc.* 118 (14), S. 3360–3365. DOI: 10.1021/ja9539958.
- Schoemaker, Hans E.; Mink, Daniel; Wubbolts, Marcel G. (2003): Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 299 (5613), S. 1694–1697. DOI: 10.1126/science.1079237.

- Schöfer, Sonja H.; Kaftzik, Nicole; Kragl, Udo; Wasserscheid, Peter (2001): Enzyme catalysis in ionic liquids. Lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. In: *Chem. Commun.* (5), S. 425–426. DOI: 10.1039/B009389K.
- Schomäcker, Reinhard; Schwarze, Michael; Nowothnick, Henriette; Rost, Anke; Hamerla, Tobias (2011): Mizellare Lösungen und Mikroemulsionen als Reaktionsmedien für katalytische Reaktionen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 83 (9), S. 1343–1355. DOI: 10.1002/cite.201100042.
- Schomburg, Ida; Chang, Antje; Placzek, Sandra; Söhngen, Carola; Rother, Michael; Lang, Maren et al. (2013): BRENDA in 2013. Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D764-72. DOI: 10.1093/nar/gks1049.
- Schroth, Werner; Schädler, Hans-Dieter; Andersch, Jörg (1989): Struktur und Aggregation von Dimethylammonium-dimethylcarbamat (Dimcarb) und analogen Dialkylammonium-dialkylcarbamaten. In: *Z. Chem.* 29 (4), S. 129–135. DOI: 10.1002/zfch.19890290403.
- Schumacher, Jan; Eckstein, Marrit; Kragl, Udo (2006): Influence of water-miscible organic solvents on kinetics and enantioselectivity of the (R)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. In: *Biotechnology journal* 1 (5), S. 574–581. DOI: 10.1002/biot.200600039.
- Secundo, F.; Carrea, G.; Soregaroli, C.; Varinelli, D.; Morrone, R. (2001): Activity of different *Candida antarctica* lipase B formulations in organic solvents. In: *Biotechnol. Bioeng.* 73 (2), S. 157–163. DOI: 10.1002/bit.1047.
- Seddon, Kenneth R. (1997): Ionic Liquids for Clean Technology. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 68 (4), S. 351–356. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199704)68:4<351::AID-JCTB613>3.0.CO;2-4.
- Sellek, Gerard A.; Chaudhuri, Julian B. (1999): Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. In: *Enzyme and Microbial Technology* 25 (6), S. 471–482. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00075-7.
- Sgalla, Simona; Fabrizi, Giancarlo; Cacchi, Sandro; Macone, Alberto; Bonamore, Alessandra; Boffi, Alberto (2007): Horseradish peroxidase in ionic liquids. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44 (3-4), S. 144–148. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.10.002.
- Shahriari, Shahla; Neves, Catarina M S S; Freire, Mara G.; Coutinho, Joao A. P. (2012): Role of the Hofmeister series in the formation of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. In: *J. Phys. Chem. B* 116 (24), S. 7252–7258. DOI: 10.1021/jp300874u.

- Sheldon, Roger A. (2012): Fundamentals of green chemistry. Efficiency in reaction design. In: *Chemical Society reviews* 41 (4), S. 1437–1451. DOI: 10.1039/C1CS15219J.
- Sheldon, Roger A.; Lau, Rute Madeira; Sorgedrager, Menno J.; van Rantwijk, Fred; Seddon, Kenneth R. (2002): Biocatalysis in ionic liquids. In: *Green Chem.* 4 (2), S. 147–151. DOI: 10.1039/B110008B.
- Sheldon, Roger Arthur; Arends, Isabel; Hanefeld, Ulf (2008): Green chemistry and catalysis. Repr. Weinheim: Wiley-VCH (Green chemistry).
- Shen, Liu-Lan; Wang, Fang; Mun, Han-Seo; Suh, Myungkoo; Jeong, Jin-Hyun (2008): Solvent-dependent reactivity in porcine pancreatic lipase (PPL)-catalyzed hydrolysis. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 19 (14), S. 1647–1653. DOI: 10.1016/j.tetasy.2008.05.021.
- Shiflett, Mark B.; Yokozeki, A. (2007): Liquid–Liquid Equilibria in Binary Mixtures of 1,3-Propanediol + Ionic Liquids [bmim][PF₆], [bmim][BF₄], and [emim][BF₄]. In: *J. Chem. Eng. Data* 52 (4), S. 1302–1306. DOI: 10.1021/je700037z.
- Shin, Jong-Shik; Kim, Byung-Gee (1997): Kinetic resolution of α-methylbenzylamine with o-transaminase screened from soil microorganisms. Application of a biphasic system to overcome product inhibition. In: *Biotechnol. Bioeng.* 55 (2), S. 348–358. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<348::AID-BIT12>3.0.CO;2-D.
- Shipovskov, Stepan; Gunaratne, H. Q. Nimal; Seddon, Kenneth R.; Stephens, Gill (2008): Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. In: *Green Chem.* 10 (7), S. 806. DOI: 10.1039/B716369J.
- Singer, S. J. (1963): The Properties of Proteins in Nonaqueous Solvents. In: Advances in Protein Chemistry Volume 17, Bd. 17: Elsevier (Advances in Protein Chemistry), S. 1–68.
- Singh, Manish Pratap; Singh, Rajendra Kumar; Chandra, Suresh (2014): Ionic liquids confined in porous matrices. Physicochemical properties and applications. In: *Progress in Materials Science* 64, S. 73–120. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2014.03.001.
- Singh, Rohit; Kissling, Rebecca M.; Letellier, Marie-Anne; Nolan, Steven P. (2004): Transesterification/Acylation of secondary alcohols mediated by N-heterocyclic carbene catalysts. In: *J. Org. Chem.* 69 (1), S. 209–212. DOI: 10.1021/jo035431p.
- Skjøt, Michael; Maria, Leonardo de; Chatterjee, Robin; Svendsen, Allan; Patkar, Shamkant A.; Ostergaard, Peter R.; Brask, Jesper (2009): Understanding the plasticity of the alpha/beta hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic

- properties. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10 (3), S. 520–527. DOI: 10.1002/cbic.200800668.
- Smiglak, M.; Pringle, J. M.; Lu, X.; Han, L.; Zhang, S.; Gao, H. et al. (2014): Ionic liquids for energy, materials, and medicine. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 50 (66), S. 9228–9250. DOI: 10.1039/C4CC02021A.
- Soto, A.; Arce, A.; Khoshkbarchi, M. (2005): Partitioning of antibiotics in a two-liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid. In: *Separation and Purification Technology* 44 (3), S. 242–246. DOI: 10.1016/j.seppur.2005.01.013.
- Soujanya, T.; Krishna, T. S. R.; Samanta, A. (1992): The nature of 4-aminophthalimide-cyclodextrin inclusion complexes. In: *J. Phys. Chem.* 96 (21), S. 8544–8548. DOI: 10.1021/j100200a061.
- Souza, Ranyere L.; Ventura, Sónia P. M.; Soares, Cleide M. F.; Coutinho, João A. P.; Lima, Álvaro S. (2015): Lipase purification using ionic liquids as adjuvants in aqueous two-phase systems. In: *Green Chem.* 17 (5), S. 3026–3034. DOI: 10.1039/C5GC00262A.
- Staahl, Marianne; Jeppsson-Wistrand, Ulla; Maansson, Mats Olle; Mosbach, Klaus (1991): Induced stereo- and substrate selectivity of bioimprinted. α -chymotrypsin in anhydrous organic media. In: *J. Am. Chem. Soc.* 113 (24), S. 9366–9368. DOI: 10.1021/ja00024a051.
- Stark, A.; Hofmann, C.; Wirker, R.; Ondruschka, B.; Hübschmann, S.; Kralisch, D. (2010): Dimcarb als Reaktivlösungsmittel in der Kolbe-Schmitt-Synthese. In: *Chemie Ingenieur Technik* 82 (9), S. 1440. DOI: 10.1002/cite.201050077.
- Steenkamp, Lucia; Brady, Dean (2003): Screening of commercial enzymes for the enantioselective hydrolysis of R,S-naproxen ester. In: *Enzyme and Microbial Technology* 32 (3-4), S. 472–477. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00335-6.
- Steffen-Munsberg, Fabian; Vickers, Clare; Kohls, Hannes; Land, Henrik; Mallin, Hendrik; Nobili, Alberto et al. (2015): Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. In: *Biotechnology advances* 33 (5), S. 566–604. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.012.
- Steffen-Munsberg, Fabian; Vickers, Clare; Thontowi, Ahmad; Schätzle, Sebastian; Tumlirsch, Tony; Svedendahl Humble, Maria et al. (2013): Connecting Unexplored Protein Crystal Structures to Enzymatic Function. In: *ChemCatChem* 5 (1), S. 150–153. DOI: 10.1002/cctc.201200544.
- Stepankova, Veronika; Bidmanova, Sarka; Koudelakova, Tana; Prokop, Zbynek; Chaloupkova, Radka; Damborsky, Jiri (2013): Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. In: *ACS Catal.* 3 (12), S. 2823–2836. DOI: 10.1021/cs400684x.

- Stetter, Hermann (1976): Catalyzed Addition of Aldehydes to Activated Double Bonds? A New Synthetic Approach. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 15 (11), S. 639–647. DOI: 10.1002/anie.197606391.
- Stolte, Stefan; Arning, Jürgen; Bottin-Weber, Ulrike; Matzke, Marianne; Stock, Frauke; Thiele, Karen et al. (2006): Anion effects on the cytotoxicity of ionic liquids. In: *Green Chem.* 8 (7), S. 621. DOI: 10.1039/B602161A.
- Stolte, Stefan; Matzke, Marianne; Arning, Jürgen; Böschen, Andrea; Pitner, William-R.; Welz-Biermann, Urs et al. (2007): Effects of different head groups and functionalised side chains on the aquatic toxicity of ionic liquids. In: *Green Chem.* 9 (11), S. 1170. DOI: 10.1039/B711119C.
- Tan, A. W. I.; Fischbach, M.; Huebner, H.; Buchholz, R.; Hummel, W.; Daussmann, T. et al. (2006): Synthesis of enantiopure (5R)-hydroxyhexane-2-one with immobilised whole cells of Lactobacillus kefiri. In: *Applied microbiology and biotechnology* 71 (3), S. 289–293. DOI: 10.1007/s00253-005-0168-6.
- Tao, Guo-hong; He, Ling; Liu, Wei-shan; Xu, Lin; Xiong, Wei; Wang, Tao; Kou, Yuan (2006): Preparation, characterization and application of amino acid-based green ionic liquids. In: *Green Chem.* 8 (7), S. 639. DOI: 10.1039/B600813E.
- Theodor, J. L.; Carriere, J. (1975): Direct evidence of heterolysis of gorgonian target cells. In: *Advances in experimental medicine and biology* 64, S. 101–103.
- Thomazeau, Cécile; Olivier-Bourbigou, Hélène; Magna, Lionel; Luts, Stéphane; Gilbert, Bernard (2003): Determination of an acidic scale in room temperature ionic liquids. In: *J. Am. Chem. Soc.* 125 (18), S. 5264–5265. DOI: 10.1021/ja0297382.
- Timasheff, Serge N. (2002): Protein Hydration, Thermodynamic Binding, and Preferential Hydration. In: *Biochemistry* 41 (46), S. 13473–13482. DOI: 10.1021/bi020316e.
- Tokuda, Hiroyuki; Ishii, Kunikazu; Susan, Md Abu Bin Hasan; Tsuzuki, Seiji; Hayamizu, Kikuko; Watanabe, Masayoshi (2006): Physicochemical properties and structures of room-temperature ionic liquids. 3. Variation of cationic structures. In: *The journal of physical chemistry. B* 110 (6), S. 2833–2839. DOI: 10.1021/jp053396f.
- Tomé, Luciana I. N.; Pereira, Jorge F. B.; Rogers, Robin D.; Freire, Mara G.; Gomes, Jose R. B.; Coutinho, Joao A. P. (2014): Evidence for the interactions occurring between ionic liquids and tetraethylene glycol in binary mixtures and aqueous biphasic systems. In: *J. Phys. Chem. B* 118 (17), S. 4615–4629. DOI: 10.1021/jp501718w.

- Tranha, M.; Santos, V.; WILEY, D. (2005): The effect of multivalent cations on membrane? Protein interactions during cleaning with CTAB. In: *Journal of Membrane Science* 251 (1-2), S. 179–188. DOI: 10.1016/j.memsci.2004.10.045.
- Trindade, Carlos A. S.; Visak, Zoran P.; Bogel-Łukasik, Rafał; Bogel-Łukasik, Ewa; Ponte, Manuel Nunes da (2010): Liquid–Liquid Equilibrium of Mixtures of Imidazolium-Based Ionic Liquids with Propanediols or Glycerol. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 49 (10), S. 4850–4857. DOI: 10.1021/ie901700b.
- Trodler, Peter; Pleiss, Jürgen (2008a): Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. In: *BMC structural biology* 8, S. 9. DOI: 10.1186/1472-6807-8-9.
- Trodler, Peter; Pleiss, Jürgen (2008b): Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. In: *BMC structural biology* 8, S. 9. DOI: 10.1186/1472-6807-8-9.
- Turner, Nicholas J. (2003): Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. In: *Trends in Biotechnology* 21 (11), S. 474–478. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.09.001.
- Turner, Nicholas J. (2009): Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. In: *Nature chemical biology* 5 (8), S. 567–573. DOI: 10.1038/nchembio.203.
- Turner, Nigel A.; Needs, Eric C.; Khan, Jeffrey A.; Vulfson, Evgeny N. (2001): Analysis of conformational states of *Candida rugosa* lipase in solution. Implications for mechanism of interfacial activation and separation of open and closed forms. In: *Biotechnol. Bioeng.* 72 (1), S. 108–118. DOI: 10.1002/1097-0290(20010105)72:1<108::AID-BIT14>3.0.CO;2-7.
- Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S. et al. (1995a): Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. In: *Biochemistry* 34 (51), S. 16838–16851.
- Uppenberg, J.; Patkar, S.; Bergfors, T.; Jones, T. A. (1994a): Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. In: *Journal of molecular biology* 235 (2), S. 790–792. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1035.
- Uppenberg, Jonas; Hansen, Mogens Trier; Patkar, Shamkant; Jones, T. Alwyn (1994b): The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. In: *Structure* 2 (4), S. 293–308. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)00031-9.
- Uppenberg, Jonas; Hansen, Mogens Trier; Patkar, Shamkant; Jones, T. Alwyn (1994c): The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. In: *Structure* 2 (4), S. 293–308. DOI: 10.1016/S0969-2126(00)00031-9.

- Uppenberg, Jonas; Oehrner, Niklas; Norin, Martin; Hult, Karl; Kleywegt, Gerard J.; Patkar, Shamkant et al. (1995b): Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. In: *Biochemistry* 34 (51), S. 16838–16851. DOI: 10.1021/bi00051a035.
- Vafaeenezadeh, Majid; Alinezhad, Heshmatollah (2016): Brønsted acidic ionic liquids. Green catalysts for essential organic reactions. In: *Journal of Molecular Liquids* 218, S. 95–105. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.02.017.
- Valivety, R. H.; Halling, P. J.; Macrae, A. R. (1992): Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1118 (3), S. 218–222.
- van Rantwijk, Fred; Madeira Lau, Rute; Sheldon, Roger A. (2003): Biocatalytic transformations in ionic liquids. In: *Trends in Biotechnology* 21 (3), S. 131–138. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00008-8.
- van Rantwijk, Fred; Secundo, Francesco; Sheldon, Roger A. (2006): Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. In: *Green Chem.* 8 (3), S. 282–286. DOI: 10.1039/B513062J.
- van Rantwijk, Fred; Sheldon, Roger A. (2007): Biocatalysis in ionic liquids. In: *Chem. Rev.* 107 (6), S. 2757–2785. DOI: 10.1021/cr050946x.
- van Vechten, J. A. (1969): Quantum Dielectric Theory of Electronegativity in Covalent Systems. I. Electronic Dielectric Constant. In: *Phys. Rev.* (182), S. 891.
- Vecchio; Zambianchi; Zacchetti; Secundo; Carrea (1999): Fourier-transform infrared spectroscopy study of dehydrated lipases from *candida antarctica* B and *pseudomonas cepacia*. In: *Biotechnol. Bioeng.* 64 (5), S. 545–551.
- Ventura, Sonia P. M.; Neves, Catarina M. S. S.; Freire, Mara G.; Marrucho, Isabel M.; Oliveira, Joao; Coutinho, Joao A. P. (2009): Evaluation of anion influence on the formation and extraction capacity of ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. In: *J. Phys. Chem. B* 113 (27), S. 9304–9310. DOI: 10.1021/jp903286d.
- Ventura, Sónia P. M.; Sousa, Sílvia G.; Serafim, Luísa S.; Lima, Álvaro S.; Freire, Mara G.; Coutinho, João A. P. (2011): Ionic Liquid Based Aqueous Biphasic Systems with Controlled pH. The Ionic Liquid Cation Effect. In: *J. Chem. Eng. Data* 56 (11), S. 4253–4260. DOI: 10.1021/je200714h.
- Ventura, Sónia P. M.; Sousa, Sílvia G.; Serafim, Luísa S.; Lima, Álvaro S.; Freire, Mara G.; Coutinho, João A. P. (2012): Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems with Controlled pH. The Ionic Liquid Anion Effect. In: *J. Chem. Eng. Data* 57 (2), S. 507–512. DOI: 10.1021/je2010787.

- Villela Filho, Murillo; Stillger, Thomas; Müller, Michael; Liese, Andreas; Wandrey, Christian (2003): Is log P a Convenient Criterion to Guide the Choice of Solvents for Biphasic Enzymatic Reactions? In: *Angew. Chem.* 115 (26), S. 3101–3104. DOI: 10.1002/ange.200351089.
- Visser, Ann E.; Swatloski, Richard P.; Griffin, Scott T.; Hartman, Deborah H.; Rogers, Robin D. (2001): LIQUID/LIQUID EXTRACTION OF METAL IONS IN ROOM TEMPERATURE IONIC LIQUIDS. In: *Separation Science and Technology* 36 (5-6), S. 785–804. DOI: 10.1081/SS-100103620.
- Voet, Donald; Voet, Judith G. (2004): Biochemistry. 3. ed. Hoboken, NJ: Wiley.
- Vogl, Thomas; Goodrich, Peter; Jacquemin, Johan; Passerini, Stefano; Balducci, Andrea (2016): The Influence of Cation Structure on the Chemical–Physical Properties of Protic Ionic Liquids. In: *J. Phys. Chem. C* 120 (16), S. 8525–8533. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01945.
- von Langermann, Jan; Wapenhensch, Stefanie (2014): Hydroxynitrile Lyase-Catalyzed Synthesis of Enantiopure Cyanohydrins in Biocatalytic Active Static Emulsions (BASE) with Suppression of the Non-Enzymatic Side Reaction. In: *Adv. Synth. Catal.* 356 (14-15), S. 2989–2997. DOI: 10.1002/adsc.201301149.
- Vreekamp, Remko; Castellano, Desire; Palomar, Jose; Ortega, Juan; Espiau, Fernando; Fernandez, Luis; Penco, Eduvigis (2011): Thermodynamic behavior of the binaries 1-butylpyridinium tetrafluoroborate with water and alkanols: their interpretation using ^1H NMR spectroscopy and quantum-chemistry calculations. In: *J. Phys. Chem. B* 115 (27), S. 8763–8774. DOI: 10.1021/jp202828z.
- Wagner, Monika; Stanga, Olimpiu; Schröer, Wolffram (2004): The liquid–liquid coexistence of binary mixtures of the room temperature ionic liquid 1-methyl-3-hexylimidazolium tetrafluoroborate with alcohols. In: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6 (18), S. 4421–4431. DOI: 10.1039/B404933K.
- Wajant, H.; Effenberger, F. (1996): Hydroxynitrile lyases of higher plants. In: *Biological chemistry* 377 (10), S. 611–617.
- Walden, Paul (1914): Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. In: *Bull. Acad. Imper. Sci.(St. Petersburg)* (8), S. 405.
- Waldmann, H.; Drauz, K. (Hg.) (2002): Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook. 2nd, completely revised and enlarged. I-III. Weinheim: Wiley-VCH.
- Wang, Jian-Hua; Cheng, De-Hong; Chen, Xu-Wei; Du, Zhuo; Fang, Zhao-Lun (2007): Direct extraction of double-stranded DNA into ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and its quantification. In: *Anal. Chem.* 79 (2), S. 620–625. DOI: 10.1021/ac061145c.

- Wang, JianJi; Pei, YuanChao; Zhao, Yang; Hu, Zhiguo (2005): Recovery of amino acids by imidazolium based ionic liquids from aqueous media. In: *Green Chem.* 7 (4), S. 196. DOI: 10.1039/B415842C.
- Wang, Yue-Ming; Ulrich, Viktor; Donnelly, Gerald F.; Lorenzini, Fabio; Marr, Andrew C.; Marr, Patricia C. (2015): A Recyclable Acidic Ionic Liquid Gel Catalyst for Dehydration. Comparison with an Analogous SILP Catalyst. In: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 3 (5), S. 792–796. DOI: 10.1021/sc5008303.
- Wang, Yun; Xu, Xiaohui; Yan, Yongsheng; Han, Juan; Zhang, Zulei (2010): Phase behavior for the [Bmim]BF₄ aqueous two-phase systems containing ammonium sulfate/sodium carbonate salts at different temperatures. Experimental and correlation. In: *Thermochim. Acta* 501 (1-2), S. 112–118. DOI: 10.1016/j.tca.2010.01.020.
- Wasserscheid, Peter; Keim, Wilhelm (2000): Ionische Flüssigkeiten – neue „Lösungen“ für die Übergangsmetallkatalyse. In: *Angew. Chem.* 112 (21), S. 3926–3945. DOI: 10.1002/1521-3757(20001103)112:21<3926::AID-ANGE3926>3.0.CO;2-U.
- Wasserscheid, Peter; Welton, Thomas (Hg.) (2008a): Ionic liquids in synthesis. Wiley InterScience (Online service). 2nd, completely rev. and enl. ed. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/9783527621194>.
- Wasserscheid, Peter; Welton, Thomas (2008b): Ionic Liquids in Synthesis. 2nd ed. Hoboken: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=518592>.
- Weaver, Katherine D.; Vrakkis, Regina M.; van Vorst, Matthew P.; Trullinger, Jonathan; Vijayaraghavan, Ranganathan; Foureau, David M. et al. (2012): Structure and function of proteins in hydrated choline dihydrogen phosphate ionic liquid. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 14 (2), S. 790–801. DOI: 10.1039/c1cp22965f.
- Wei, Guor-Tzo; Chen, Jin-Chu; Yang, Zusing (2003): Studies on Liquid/liquid Extraction of Copper Ion with Room Temperature Ionic Liquid. In: *Jnl Chinese Chemical Soc* 50 (6), S. 1123–1130. DOI: 10.1002/jccs.200300159.
- Wellner, Niels; Siebeneck, Karl; Scholl, Stephan (2015): Continuous dehydration of Ionic Liquids in a falling film evaporator. In: *Separation and Purification Technology* 150, S. 44–51. DOI: 10.1016/j.seppur.2015.06.014.
- Wells, Andrew S.; Coombe, Vyvyan T. (2006): On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids. In: *Org. Process Res. Dev.* 10 (4), S. 794–798. DOI: 10.1021/op060048i.

- Welton, Thomas (1999): Room-Temperature Ionic Liquids. Solvents for Synthesis and Catalysis. In: *Chem. Rev.* 99 (8), S. 2071–2084. DOI: 10.1021/cr980032t.
- Wescott, Charles R.; Klibanov, Alexander M. (1994): The solvent dependence of enzyme specificity. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1206 (1), S. 1–9. DOI: 10.1016/0167-4838(94)90065-5.
- Westerholt, Antje; Liebert, Vincent; Gmehling, Jürgen (2009): Influence of ionic liquids on the separation factor of three standard separation problems. In: *Fluid Phase Equilib.* 280 (1-2), S. 56–60. DOI: 10.1016/j.fluid.2009.03.014.
- Wichmann, R.; Vasic-Racki, D. (2005): Cofactor Regeneration at the Lab Scale. In: Udo Kragl (Hg.): *Technology Transfer in Biotechnology*, Bd. 92. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), S. 225–260.
- Wiggins, P. M. (2001): High and low density intracellular water. In: *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 47 (5), S. 735–744.
- Wilkes, John S. (2002): A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. In: *Green Chem.* 4 (2), S. 73–80. DOI: 10.1039/B110838G.
- Wilkes, John S.; Levisky, Joseph A.; Wilson, Robert A.; Hussey, Charles L. (1982): Dialkylimidazolium chloroaluminate melts. A new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. In: *Inorg. Chem.* 21 (3), S. 1263–1264. DOI: 10.1021/ic00133a078.
- Wilkes, John S.; Zaworotko, Michael J. (1992): Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. In: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (13), S. 965. DOI: 10.1039/C39920000965.
- Wingfield, P. (2001): Protein precipitation using ammonium sulfate. In: *Current protocols in protein science* Appendix 3, Appendix 3F. DOI: 10.1002/0471140864.psa03fs13.
- Witayakran, Suteera; Zettilli, Abdullah; Ragauskas, Arthur J. (2007): Laccase-generated quinones in naphthoquinone synthesis via Diels–Alder reaction. In: *Tetrahedron Letters* 48 (17), S. 2983–2987. DOI: 10.1016/j.tetlet.2007.03.013.
- Włazło, Michał; Marciniak, Andrzej (2014): Ternary liquid–liquid equilibria of trifluorotris(perfluoroethyl)phosphate based ionic liquids+benzothiophene+heptane. In: *Fluid Phase Equilibria* 361, S. 54–59. DOI: 10.1016/j.fluid.2013.10.028.
- Wong, Chi-Huey; Whitesides, George (2010): Enzymes in synthetic organic chemistry. 1st ed. Oxford, U.K, Tarrytown N.Y: Pergamon (Tetrahedron organic chemistry series, v. 12). Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/bookseries/14601567/12>.

- Woodley, John M. (2013): Protein engineering of enzymes for process applications. In: *Current opinion in chemical biology* 17 (2), S. 310–316. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.03.017.
- Woudenberg-van Oosterom, Marjolein; van Rantwijk, Fred; Sheldon, Roger A. (1996): Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. In: *Biotechnol. Bioeng.* 49 (3), S. 328–333. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<328::AID-BIT11>3.0.CO;2-A.
- Wu, Jang-Yen; Yang, Jen Tsi (1970): Effects of Salts and Organic Solvents on the Activity of Citrate Synthase*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 14 (245), S. 3561–3564.
- Yadav, Ganapati D.; Kadam, Anup A. (2012): Atom-Efficient Benzoin Condensation in Liquid–Liquid System Using Quaternary Ammonium Salts. Pseudo-Phase Transfer Catalysis. In: *Org. Process Res. Dev.* 16 (5), S. 755–763. DOI: 10.1021/op300027j.
- Yang, Lu; Dordick, Jonathan S.; Garde, Shekhar (2004): Hydration of enzyme in nonaqueous media is consistent with solvent dependence of its activity. In: *Biophysical Journal* 87 (2), S. 812–821. DOI: 10.1529/biophysj.104.041269.
- Yang, Zhen; Pan, Wubin (2005): Ionic liquids. Green solvents for nonaqueous biocatalysis. In: *Enzyme and Microbial Technology* 37 (1), S. 19–28. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.02.014.
- Yoshimura, Yukihiro; Abe, Hiroshi; Takekiyo, Takahiro; Shigemi, Machiko; Hamaya, Nozomu; Wada, Ryoichi; Kato, Minoru (2013): Superpressing of a room temperature ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. In: *J. Phys. Chem. B* 117 (40), S. 12296–12302. DOI: 10.1021/jp4055507.
- Zafarani-Moattar, Mohammed Taghi; Hamzehzadeh, Sholeh (2011): Partitioning of amino acids in the aqueous biphasic system containing the water-miscible ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the water-structuring salt potassium citrate. In: *Biotechnology progress* 27 (4), S. 986–997. DOI: 10.1002/btpr.613.
- Zagajewski, M.; Behr, A.; Sasse, P.; Wittmann, J. (2014a): Continuously operated miniplant for the rhodium catalyzed hydroformylation of 1-dodecene in a thermomorphic multicomponent solvent system (TMS). In: *Chemical Engineering Science* 115, S. 88–94. DOI: 10.1016/j.ces.2013.09.033.
- Zagajewski, Michael; Dreimann, Jens; Behr, Arno (2014b): Verfahrensentwicklung vom Labor zur Miniplant. Hydroformylierung von 1-Dodecen in thermomorphen Lösungsmittelsystemen. In: *Chemie Ingenieur Technik* 86 (4), S. 449–457. DOI: 10.1002/cite.201300147.

- Zaks, A.; Klibanov, A. M. (1985a): Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (10), S. 3192–3196.
- Zaks, Aleksey; Klibanov, Alexander M. (1985b): Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (82), S. 3192–3196.
- Zaks, Aleksey; Klibanov, Alexander M. (1988): Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. In: *The Journal of Biological Chemistry* 263 (7), S. 3194–3201.
- Zgajnar Gotvajn, Andreja; Tratar-Pirc, Elizabeta; Bukovec, Peter; Znidaršič Plazl, Polona (2014): Evaluation of biotreatability of ionic liquids in aerobic and anaerobic conditions. In: *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 70 (4), S. 698–704. DOI: 10.2166/wst.2014.283.
- Zhang, Liqun; Xu, Zheng; Wang, Yong; Li, Haoran (2008a): Prediction of the solvation and structural properties of ionic liquids in water by two-dimensional correlation spectroscopy. In: *The journal of physical chemistry. B* 112 (20), S. 6411–6419. DOI: 10.1021/jp8001349.
- Zhang, Suojiang; Sun, Ning; He, Xuezhong; Lu, Xingmei; Zhang, Xiangping (2006): Physical Properties of Ionic Liquids. Database and Evaluation. In: *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 35 (4), S. 1475–1517. DOI: 10.1063/1.2204959.
- Zhang, Yanjie; Cremer, Paul S. (2006): Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. In: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (6), S. 658–663. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.09.020.
- Zhang, Yun; Huang, Xirong; Li, Yuezhong (2008b): Negative effect of [bmim][PF₆] on the catalytic activity of alcohol dehydrogenase. Mechanism and prevention. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (9), S. 1230–1235. DOI: 10.1002/jctb.1931.
- Zhao, Dongbin; Wu, Min; Kou, Yuan; Min, Enze (2002): Ionic liquids. Applications in catalysis. In: *Catalysis Today* 74 (1-2), S. 157–189. DOI: 10.1016/S0920-5861(01)00541-7.
- Zhao, Hua (2006): Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (6), S. 877–891. DOI: 10.1002/jctb.1449.
- Zhao, Hua (2016): Protein Stabilization and Enzyme Activation in Ionic Liquids. Specific Ion Effects. In: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (1), S. 25–50. DOI: 10.1002/jctb.4837.
- Zhao, Hua; Luo, Robert G.; Malhotra, Sanjay V. (2003): Kinetic study on the enzymatic resolution of homophenylalanine ester using ionic liquids. In: *Biotechnology progress* 19 (3), S. 1016–1018. DOI: 10.1021/bp025721b.

- Zhao, Hua; Olubajo, Olarongbe; Song, Zhiyan; Sims, Arbez L.; Person, Terra E.; Lawal, Rasheed A.; Holley, Ladena A. (2006): Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. In: *Bioorganic chemistry* 34 (1), S. 15–25. DOI: 10.1016/j.bioorg.2005.10.004.
- Zhou, Yan; Dyck, Jeffrey; Graham, Todd W.; Luo, Huimin; Leonard, Donovan N.; Qu, Jun (2014): Ionic liquids composed of phosphonium cations and organophosphate, carboxylate, and sulfonate anions as lubricant antiwear additives. In: *Langmuir* 30 (44), S. 13301–13311. DOI: 10.1021/la5032366.
- Zhou, Yong (2005): Recent Advances in Ionic Liquids for Synthesis of Inorganic Nanomaterials. In: *CNANO* 1 (1), S. 35–42. DOI: 10.2174/1573413052953174.
- Zimmermann, Vera; Masuck, Ines; Kragl, Udo (2008): Reactive extraction of N-acetylneuraminic acid—Kinetic model and simulation of integrated product removal. In: *Separation and Purification Technology* 63 (1), S. 129–137. DOI: 10.1016/j.seppur.2008.04.005.
- Zimmermann, Vera; Kragl, Udo (2008): Reactive extraction of N-acetylneuraminic acid—A new method to recover neuraminic acid from reaction solutions. In: *Separation and Purification Technology* 61 (1), S. 60–67. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.09.025.

Curriculum Vitae

Anja Gummesson geboren am 14.07.1985 in Rostock

verheiratet, 2 Kinder

Studium und Schule

04/2013 – 10/2019	Promotion (Dr. rer. nat.) , Universität Rostock, Technische Chemie
10/2005 – 09/2011	Studium (Dipl. Chem.) , Universität Rostock, Studiengang Chemie
09/1992 – 06/2005	Allgemeine Hochschulreife (Abitur) , Stephan-Jantzen-Gymnasium Rostock (1996 - 2005), Grundschule Lichtenhagen (1992 – 1996)

Wissenschaftlicher Werdegang

seit 11/2017	Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Nuklearmedizin Leiterin der Qualitätskontrolle, Strahlenschutzbeauftragte, F&L
04/2013 – 12/2017	Universität Rostock, Technische Chemie Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Doktorandin, Stipendiatin des Professorinnenprogramms II (BMBF)
06/2014 – 07/2014	Imperial College London, Chemical Engineering Internship
10/2011 – 12/2011	Universität Rostock, Analytische Chemie Wissenschaftliche Mitarbeiterin
10/2009 – 09/2011	Universität Rostock, Analytische Chemie Studentische Mitarbeiterin, Diplomandin
04/2008 – 10/2008	Universität Rostock, Anorganische Chemie Studentische Mitarbeiterin
06/2005 – 04/2007	Universität Rostock, Institut für Betriebswirtschaftslehre Studentische Mitarbeiterin
07/2005 – 10/2005	Universitätsmedizin Rostock, Klinik für Augenheilkunde Praktikum
01/2002	Detharding Apotheke Warnemünde Berufsorientiertes Praktikum

Liste der Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Publikationen

- Gummesson, A.; Kragl, U.; Langermann, J. von (2014): Biokatalyse in thermomorphen Lösungsmitteln. *Chemie Ingenieur Technik* 86 (9), 1523. DOI: 10.1002/cite.201450121.
- Meyer, L., Gummesson, A., Kragl, U. and Langermann, J. (2019): Development of Ionic Liquid-Water-Based Thermomorphic Solvent (TMS)-Systems for Biocatalytic Reactions. *Biotechnol. J.*. Accepted Author Manuscript June 2019. DOI:10.1002/biot.201900215.

Präsentationen

- Gummesson, A.; Kragl, U.; von Langermann, J.: *Biocatalysis in thermomorphic solvents*. ProcessNet-Jahrestagung und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, September 2014, Aachen. (Vortrag)
- Gummesson, A.; von Langermann, J.; Kragl, U.: *Biocatalysis in thermomorphic solvents*. Joint Annual EMLG/JMLG Meeting, September 2015, Rostock. (Poster)
- Gummesson, A.; Engelmann, C.; von Langermann, J.; Kragl, U.: *Biocatalysis in thermomorphic solvents*. 10th European Congress of Chemical Engineering, September 2015, Nizza. (Poster)
- Gummesson, A.; von Langermann, J.; Kragl, U.: *Biocatalysis in thermomorphic solvent systems*. BioTrans, Juli 2015, Wien. (Poster)
- Meyer, L.-E.; Gummesson, A.; von Langermann, J.: *Ionic Liquid based thermomorphic solvent systems for biocatalytic reactions*. Biocat, August 2016, Hamburg. (Poster)
- Gummesson, A.; Meyer, L.-E.; von Langermann, J.: *Ionic liquid based thermomorphic solvent systems for biocatalytic reactions*. 5th International Conference on Biocatalysis in Non-Conventional Media, Mai 2017, Rostock. (Poster)
- Gummesson, A.; Meyer, L.-E.; von Langermann, J.: *Ionic liquid based thermomorphic solvent systems for biocatalytic reactions*. BioTrans, Juli 2017, Budapest. (Poster)
- Gummesson, A.; Meyer, L.-E.; von Langermann, J.: *Ionic liquid based thermomorphic solvent systems for biocatalytic reactions*. 19th Japanese-German Workshop on Enzyme Technology, September 2017, Rostock. (Poster)

Erklärung gemäß §4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.
2. Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Anja Gummesson

Hansestadt Rostock, 14.06.2019