Enzymatische und chemische Studien zur Veresterung und Löslichkeit von Cellulose in ionischen Flüssigkeiten

Enzymatic and chemical esterfication of cellulose and solubility studies in ionic liquids

Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Lars Pieter Hinner
aus
Affalterbach

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof. Dr. Arnd G. Heyer
Vorsitzender: Prof. Dr. Ralf Takors

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2017

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart
2017

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

„Enzymatische und chemische Studien zur Veresterung und Löslichkeit von Cellulose in ionischen Flüssigkeiten“

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled
“Enzymatic and chemical esterfication of cellulose and solubility studies in ionic liquids”
is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Name: Lars Pieter Hinner

Datum/Date: 20.10.2017

Publikationsliste des Autors

Die hier vorgelegte Dissertation wurde unter der Betreuung von Prof. D. Bernhard Hauer im Zeitraum von Januar 2014 bis Dezember 2016 am Institut für technische Biochemie der Universität Stuttgart erstellt.

Teile der Doktorarbeit wurden bereits vorab publiziert:

Hinner, L. P., Wissner, J. L., Beurer, A., Nebel, B. A. & Hauer, B. Homogeneous vinyl ester-based synthesis of different cellulose derivatives in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.* 18, 6099–6107 (2016).

Der Autor designte alle Experimente dieser Arbeit und war an der Durchführung dieser direkt involviert oder führte sie selbst durch. Zusätzlich war der Autor bei der Datenauswertung und Interpretation federführend und erstellte die Publikation eigenständig. Die Publikation ist im Anhang der Doktorarbeit aufgeführt.

Weitere Publikationen sind in Vorbereitung und sind in Teilen Bestandteil dieser Dissertation:

Hinner, L. P., Goebel, L., Wissner, J. L., Bonten, C., Hauer, B., Nebel, B. A. Vinyl ester based synthesis, upscaling and thermoplastic characterisation of various branched and long-chain cellulose esters.

Das Upscaling, sowie die Synthese von verzweigten Celluloseestern ist in der hier vorliegenden Arbeit direkt eingeflossen.

Der Autor designte die Experimente bezüglich des Upscalings und der Synthese der Celluloseester selbst und war bei der Durchführung federführend. Auch die Erstellung der Publikation erfolgt hauptsächlich durch den Autor.

Hinner, L. P., Hauer, B., Nebel, B. A. Fine-adjustment of ionic liquids hydrogen bounding for improved cellulose dissolution – The [EHEMIM]-[EMIM]OAc-water system.

Das Manuskript beinhaltet alle Daten und Grafiken bezüglich des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems, welche in der hier vorgelegten Arbeit enthalten sind. Der Autor war federführend bei der Planung und Durchführung aller Experimente, sowie deren Auswertung. Auch die Erstellung der Publikation erfolgt hauptsächlich durch den Autor.

Danksagung

Mein großer Dank geht an Prof. Dr. Bernhard Hauer für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung während meiner Dissertation. Insbesondere bin ich dankbar dafür, dass er mir ermöglichte, in der technischen Biochemie zu promovieren, obwohl ich ursprünglich aus einem anderen Bereich kam.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Bernd Nebel für die ausgezeichnete Betreuung in den letzten Jahren. Schon während meines Vorstellungsgesprächs am ITB wurde mir schnell klar, dass eine Zusammenarbeit mit dir aufgrund deiner überlegten und bodenständigen Art zielführend und angenehm verlaufen wird. Dieser Eindruck hat sich über die Jahre noch verfestigt. Danke Bernd!

Auch möchte ich Dr. Bettina Nestl für Korrekturen und Tipps danken, den unermüdlichen Einsatz für das gesamte Institut und die gute Arbeitsatmosphäre am ITB.

Für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Enzymacell-Projekts möchte ich mich bei Linda Göbel vom Institut für Kunststofftechnik bedanken.

Für die angenehme Laboratmosphäre möchte ich mich bei Lisa Kühnel, Sara Hoffmann, Sebastian Löw, Jens Schmid, Nico Kress, Maike Lenz und Julia Halder bedanken.

Für inspirierende Diskussionen, insbesondere bezüglich NMR-Spektren, möchte ich mich bei Sabrina Henche, Nico Kress, Jens Schmid, Lisa Kühnel und Sebastian Löw bedanken.

Für die großartige Zusammenarbeit und ihren Einsatz möchte ich mich bei Julian Wissner und Ann-Katrin Beurer bedanken.

Für die Mitarbeit im Labor möchte ich mich bei Andreas Schneider, Nadezhda Petkova, Kristina Schneider, Lorenzo Favilli, Philipp Ehni, Max Borgolte und Sibel Ilhan bedanken.

Für den guten Austausch über ionische Flüssigkeiten möchte ich mich bei Sandra Vlahovic und Michaela Antonovici bedanken.

Für inspirierende Gespräche und Diskussionen am sehr frühen Morgen möchte ich mich bei Jan Klenk bedanken.

Ich möchte mich auch für die schöne gemeinsame Zeit des Schreibens im Stuhllager mit Lisa Kühnel, Silke Bastian und Philipp Trauzettel bedanken.

Mein Dank gilt auch Lisa Kühnel, Sandra Vlahovic und Sabrina Henche für das gemeinsame Joggen am Morgen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des ITB für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, sowie den Projektpartnern im Enzymacell-Projekt möchte ich sehr für die Finanzierung danken.

Vielen Dank an Pieter, Brigitte, Johann, Petra, Stefan, Amy, Jan, Sandra, Marco Lara, Kim, Alina und Nic für ihre Unterstützung, die es mir erst ermöglichte, diese Arbeit zu schreiben.

Bei meiner Frau Carina, meinem Sohn Cedric und meiner Tochter Finja möchte ich mich für alle wundervollen Momente bedanken, die ich dank ihnen jeden Tag erlebe und die mir die Kraft und Motivation für das Anfertigen dieser Arbeit gegeben haben.

Für Carina, Cedric und Finja.

Danke.

-One sometimes finds what one is not looking for-

Alexander Fleming

Inhaltsverzeichnis

Erklärung 1

Publikationsliste des Autors 2

Danksagung 4

Inhaltsverzeichnis 8

Abkürzungsverzeichnis 10

Summary 12

Zusammenfassung 16

1 Einleitung 20
- 1.1 Cellulose 20
- 1.2 Chemische Modifikation 29
- 1.3 Enzymatische Modifikation von Cellulose 35
- 1.4 Zielsetzung 46

2 Materialien und Methoden 47
- 2.1 Materialien 47
- 2.2 Synthese 49
- 2.3 Analytik 54

3 Ergebnisse 62
- 3.1 Enzymatische Modifikation von Cellulose 62
- 3.2 Das Zucker-Vinylester-[EMIM]OAc-System 85
- 3.3 Das Cellulose-Vinylester-[EMIM]OAc-System 90
- 3.4 FT-IR-Analytik und relativer Substitutionsgrad (RDS) 104
- 3.5 Upscaling und Recycling der Vinylester-basierten Synthese 108
- 3.6 Verbesserte Löslichkeit von Cellulose 113
- 3.7 EHEMIM-Ester 120
- 3.8 Mechanismus 122

4 Diskussion 123
- 4.1 Enzymaktivität in Cellulose-lösenden ionischen Flüssigkeiten 123
- 4.2 Enzymatische Veresterung von Cellobiose 132
- 4.3 Enzymatische Veresterung von Cellulose 135
- 4.4 Die chemische Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc 138
- 4.5 Acetylierung als unerwünschte Nebenreaktion 142

4.6 Robustheit der FT-IR-Analytik 146
4.7 Upscaling, Recycling und Wiederverwendbarkeit 149
4.8 Verbesserte Löslichkeit von Cellulose 152
4.9 Mechanismus der Löslichkeit 156
4.10 Mechanismus der Vinylester-basierten Synthese 159

5 Zusatz 164
5.1 Thermoplastische Eigenschaften von Celluloseestern 164

6 Resümee und Ausblick 168

7 Literatur 173

8. Anhang 186

Abkürzungsverzeichnis

[BMIM]Cl	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid
[EHEMIM]OAc	1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazoliumacetat
[EMIM]OAc	1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat
ACN	Acetonitril
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Substitutionsgrad
ELSD	Lichtstreudetektor
FA	Ameisensäure
GC	Gaschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
m	Masse
M	Molare Masse
M_n	Zahlenmittel der Molmasse
M_w	Massenmittel der Molmasse
NMR	Kernspinresonanz
n.d.	Nicht bestimmt
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
RDS	Relativer Substitutionsgrad
Rpm	Umdrehungen pro Minute
SN	Seriennummer
TFA	Trifluoressigsäure
TfO	Trifluoromethansulfonat
δ	Chemische Verschiebung

Summary

Cellulose as a part of plant cell wall is the most abundant organic compound on earth. This renewable biopolymer is nowadays mainly used for the production of paper and pulp or is simply burned as a cheap energy source. Many other applications are hampered due to its insufficient material properties. Especially thermoplastic utilization of cellulose is not possible, because cellulose exhibit no melting point. Due to its insolubility in common organic solvents, the chemical processing of cellulose, to produce novel biopolymers is challenging. Therefore, industrial processes are heterogeneous, which means that cellulose is not solubilized during the process. To overcome this limitation, laborious mechanic and chemical pretreatment steps are necessary to enable efficient processing and modification of cellulose. In addition, due to the strong steric hindrance of non-solubilized cellulose, such strategies are limited to the use of short acyl chains (C_2–C_4). As a result, it is not possible to produce a wide spectrum of potential cellulose esters. However, there is an increasing interest for novel cellulose esters, due to the limited thermoplastic processability of the industrial produced and available cellulose derivatives.

The synthesis of novel cellulose esters can be advantageously realized in homogeneous modification procedures, which can be realized in cellulose solubilizing ionic liquids. In this context, many syntheses based on reactive acyl donors are described in literature, but e.g. the use of reactive acyl Mdonors like carboxylic acid chlorides are problematic, because it can lead to significant degradation of the cellulose backbone and the ionic liquid too. Therefore, a homogeneous enzymatic synthesis of cellulose esters might be a possibility to overcome these drawbacks by using less reactive acyl donors.

The goal of the present work is to catalyze at ambient conditions with one focus on the investigation of the enzymatic synthesis of cellulose esters with long side chains in cellulose solvents. First, due to the challenging analytics of low substituted cellulose ester, model reactions were performed, which are easier to analyze. Simple esterification and transesterification reactions can be successful catalyzed enzymatically in cellulose solubilizing ionic liquids. However, the enzymatic synthesis of glucose esters was only

successful in ionic liquids, which cannot solubilize cellulose. A possible explanation would be an insufficient interaction between enzyme and glucose in polar cellulose solvents. In order to increase the interaction between enzyme and glucose, the glucose concentration was increased in the cellulose solvent 1-Butyl-3-methylimidazolium-chlorid ([BMIM]Cl), but did not lead to a successful synthesis of glucose laurate, because the increased viscosity of high concentrated sugar solutions limited the mass transfer, thereby again inhibiting the reaction. Apart from that, the strategy to enhance the enzyme-glucose interaction by increasing the glucose concentration works well in the also polar solvent dimethyl sulfoxide (DMSO). In DMSO, significant amounts of glucose laurate can be synthesized by the enzyme *Candida antartica* lipase B (CAL-B) as soon as a glucose concentration of 60 % w/v is reached.

In order to approximate the polymeric character of cellulose, the enzymatic esterification of cellobiose, which is the dimer unit of cellulose, was investigated. However, CAL-B catalyze only low amounts of cellobiose esters, while other disaccharides based on glucose, like maltose and trehalose are converted to a much higher degree. Nineteen different enzymatic preparations were tested for the ability to synthesize cellobiose laurate. The highest production of cellobiose laurate was catalyzed by pig liver esterase (PLE), but no conversion of cellulose could be observed.

In parallel to the enzymatic approach, a chemical synthesis based on vinyl esters was developed. That synthesis allow the acylation of cellulose using vinyl ester in the biological degradable ionic liquid 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate ([EMIM]OAc) for the first time. The reaction proceeds in the absence of any additional catalyst and glucose- and cellulose-esters with different chain lengths are accessible. Due to the homogeneous character of the synthesis, the degree of substitution (DS) can be adjusted by the amount of acyl donor. Cellulose esters with a degree of substitution (DS) in the range of 0.24 - 3.00 were synthesized successfully. Different reaction parameters like reaction time, temperature and substrate concentration were systematically changed and analyzed by NMR, FT-IR and HPLC-GPC. The highest DS was achieved at 80°C and a reaction time of 2 hours. Taking into consideration the literature, an often-cited synthesis from Barthel and Heinze based on fatty acid chlorides were reproduced and compared to the present vinyl ester-based synthesis. Similar DS-values were obtained,

but the degree of polymerization (DP) was significantly reduced during the synthesis using fatty acid chlorides in [BMIM]Cl. In contrast, the vinyl ester based synthesis in [EMIM]OAc is gentler and allow the synthesis of significant larger cellulose esters. As an undesirable side reaction, acetates from [EMIM]OAc are bound to the cellulose backbone. The quantity of bound acetate groups during vinyl ester-based synthesis rose with decreasing polarity of the substrates but overall proved to be much lower compared to the literature described anhydride or fatty acid chloride based synthesis routes in [EMIM]OAc. This novel process was extended by using further acyl donors like vinyl benzoate, vinyl pivalate and vinyl 2-ethylhexanoate to demonstrate the broad applicability of the vinyl ester-based cellulose modification in [EMIM]OAc.

As part of a cooperation with Linda Göbel from the Institut für Kunststofftechnik, the thermoplastic and rheological properties of cellulose esters were investigated, which in principle confirmed their processability.

An upscaling of the reaction with subsequent recycling of the ionic liquid was conducted. That upscaling was performed in 2.5 kg [EMIM]OAc and 233.25 g cellulose laurate with a DS of 2.3 were synthesized. The ionic liquid was recycled with an average efficiency of 91 % and reused in the next batch. In total, three synthesis-recycling cycles were performed. After the first and the second reactor run the DS (2.3) remain on a high level, however after the third and fourth reactor run the substitution decreased to DS-values of 1.8 and 1.4.

As a side effect, the speed of cellulose solubilization increased successive with proceeding recycling steps. It could be shown that the molecular basis of that effect is a transformation of 1-ethyl-3-methylimidazolium (EMIM) to 1-ethyl-2-(hydroxyethyl)-3-methylimidazolium (EHEMIM) by the addition of an EMIM-carbene species to the by-products acetaldehyde. The formation of EHEMIM cations was analyzed and identified by NMR. The existence of water in the [EMIM]-[EHEMIM]OAc mixtures is crucial for superior cellulose dissolution. A major increased cellulose capability was obtained at 50 cation-% EHEMIM, 50 cation-% EMIM and 8.5 % w/w water. Using these conditions the [EHEMIM]-[EMIM]OAc-water system is able to solubilize 14 % w/w cellulose within 3 hours at 80°C. In contrast to the improved system, the conventional pure [EMIM]OAc

and [EMIM]OAc with 10 % w/w water (optimized water content) solubilize less than 1 % w/w and 2 % w/w cellulose applying the same conditions.

Zusammenfassung

Cellulose ist der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand und daher die häufigste organische Verbindung auf unserem Planeten. Dieses nachwachsende Biopolymer wird heutzutage hauptsächlich für die Produktion von Papier und Zellstoff verwendet oder verbrannt und somit als billiger Energieträger genutzt. Viele alternative Anwendungsgebiete sind aufgrund von unzureichenden Materialeigenschaften schwierig zu realisieren. Insbesondere thermoplastische Anwendungen sind nicht durchführbar, da Cellulose keinen Schmelzpunkt besitzt. Auch die chemische Modifikation der Cellulose – mit dem Ziel, andere Materialeigenschaften zu generieren – ist schwierig, da Cellulose nicht in Wasser oder in üblichen organischen Lösungsmitteln gelöst werden kann. Bis dato wurden daher industriell heterogene Synthesen entwickelt, um Cellulose im nicht gelösten Zustand zu modifizieren. Hierbei sind allerdings aufwendige mechanische und chemische Vorbehandlungen notwendig, um eine effiziente Verarbeitung bzw. Modifizierung der Cellulose zu gewährleisten. Zusätzlich sind heterogene Synthesen zur Produktion von Celluloseestern, aufgrund der starken sterischen Hinderung der nicht gelösten Cellulose, auf kurzkettige Acyldonoren (C_2-C_4) beschränkt. Somit ist es mit heterogenen Prozessen nicht möglich, das komplette Spektrum an potenziellen Celluloseestern zu erzeugen. Es gibt allerdings ein steigendes Interesse an neuartigen Celluloseestern, da beispielsweise Celluloseacetat nur eine schlechte thermoplastische Prozessierbarkeit aufweist.

Die Herstellung von neuartigen Celluloseestern kann in homogenen Synthesen besser realisiert werden, in denen Cellulose vollständig gelöst vorliegt. Als Reaktionsmedium können unter anderem spezielle ionische Flüssigkeiten genutzt werden, welche in der Lage sind, Cellulose zu lösen. In diesem Kontext wurden verschiedene Synthesen entwickelt, welche reaktive Acyldonoren verwenden. Der Einsatz von derartigen Acyldonoren, wie beispielsweise Carbonsäurechloriden ist allerdings problematisch, da diese sowohl das Cellulosegrundgerüst, als auch die ionische Flüssigkeit zersetzen können. Daher erscheint eine homogene enzymatische Synthese von Celluloseestern als inte-

ressante Alternative, da durch die Verwendung von enzymatischen Katalysatoren weniger reaktive Acyldonoren, wie beispielsweise Ester, genutzt werden können.

Angesichts der Herausforderung, unter moderaten Bedingungen zu katalysieren, lag ein Fokus der hier vorgelegten Arbeit in der Entwicklung einer enzymatischen Synthese von Celluloseestern mit langen Seitenketten. Da die Analytik von niedrig substituierten Celluloseestern schwierig ist, wurden zunächst leichter zu analysierende Modellreaktionen untersucht. Einfache Veresterungs- und Umesterungsreaktionen können in Cellulose-lösenden ionischen Flüssigkeiten erfolgreich enzymatisch katalysiert werden. Die enzymatische Synthese von Glucoseestern war jedoch nur in ionischen Flüssigkeiten erfolgreich, welche Cellulose nicht lösen. Als möglicher Grund hierfür wird eine mangelnde Interaktion zwischen Enzym und Glucose in diesen polaren ionischen Flüssigkeiten postuliert. Um die Interaktion zwischen Enzym und Glucose zu steigern, wurde die Glucosekonzentration erhöht, was allerdings zu keiner erfolgreichen Synthese von Glucoselaurat führte, da die große Viskosität von hoch konzentrierten Zuckerlösungen den Massentransfer und damit die Reaktion zusätzlich inhibiert. Eine Steigerung der Interaktionswahrscheinlichkeit zwischen Enzym und Glucose durch die Erhöhung der Glucosekonzentration ist allerdings in dem ebenfalls polaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) erfolgreich und erzeugt ab einer Glucosekonzentration von 60 % w/v signifikante Mengen an Glucoselaurat.

Um sich in einem nächsten Schritt an den polymeren Charakter der Cellulose weiter anzunähern, wurde die enzymatische Veresterung des Dimers der Cellulose, d.h. der Cellobiose, als weitere Modellreaktion untersucht. Hierbei katalysiert das Enzym *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B) die Synthese von nur sehr geringen Mengen an Cellobioseestern, wobei andere, ebenfalls aus Glucose aufgebaute Disaccharide wie Maltose und Trehalose, deutlich besser umgesetzt werden. Neunzehn verschiedene Enzympräparationen wurden auf die Fähigkeit untersucht, Cellobioselaurat zu synthetisieren. Den höchsten Umsatz katalysiert die Schweineleberesterase (PLE), jedoch zeigte dieses Enzym keine Aktivität gegenüber Cellulose als Ausgangssubstrat.

Neben der enzymatischen Katalyse wurde eine chemische Synthese, basierend auf Vinylestern, entwickelt. Diese Vinylester-basierte Synthese ermöglicht erstmals die

Acylierung von Cellulose mit Vinylestern in der biologisch abbaubaren ionischen Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat ([EMIM]OAc). Die Reaktion läuft in Abwesenheit von zusätzlichen Katalysatoren ab und erlaubt die Synthese von Glucoseestern und Celluloseestern mit unterschiedlich langen Seitenketten. Es war möglich, Celluloseester mit Substitutionsgraden von 0,24 bis 3,00 zu erzeugen. Um die Reaktion zu charakterisieren, wurden verschiedene Reaktionsparameter wie Reaktionszeit, Temperatur und die Menge an Acyldonor systematisch variiert und mittels ^{1}H-NMR, FT-IR und HPLC-GPC analysiert. Der höchste Veresterungsgrad ergibt sich bei einer Synthesetemperatur von 80°C und einer Reaktionszeit von zwei Stunden. Um die Synthese mit anderen Reaktionen aus der Literatur zu vergleichen, wurde eine Fettsäurechlorid-basierte Synthese von Barthel und Heinze in der ionischen Flüssigkeit 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ([BMIM]Cl) reproduziert. Beide Reaktionen zeigen vergleichbare Substitutionsgrade (DS), jedoch ist der Polymerisationsgrad (DP) von Celluloselaurat nach der Fettsäurechlorid-basierten Synthese erheblich reduziert, während die Vinylester-basierte Synthese deutlich schonender ist und die Produktion von signifikant größeren Celluloseestern erlaubt.

Bei der Vinylester-basierten Synthese in [EMIM]OAc wurde eine zusätzliche Acetylierung der Cellulose als unerwünschte Nebenreaktion identifiziert. Der Acetylierungsgrad steigt mit abnehmender Polarität und steigender sterischer Hinderung der eingesetzten Vinylester. Allgemein ist der Acetylierungsgrad nach der Vinylester-basierten Synthese in [EMIM]OAc allerdings deutlich niedriger als bei bereits beschriebenen Synthesen in [EMIM]OAc, welche Anhydride oder Fettsäurechloride als Acyldonoren nutzen.

Das Produktspektrum der Vinylester-basierten Synthese konnte durch Verwendung zusätzlicher Acyldonoren wie Benzoesäurevinylester, Pivalinsäurevinylester, Neodecansäurevinylester und 2-Ethylhexansäurevinylester erfolgreich erweitert werden. Des Weiteren wurden die thermoplastischen und rheologischen Eigenschaften der Celluloseester im Rahmen einer Kooperation mit Linda Göbel vom Institut für Kunststofftechnik untersucht, wobei die thermoplastische Verarbeitbarkeit prinzipiell bestätigt werden konnte.

Es wurde außerdem ein Upscaling der Synthese mit anschließendem Recycling der ionischen Flüssigkeit durchgeführt. Das Upscaling wurde in einem Laborreaktor mit 2,5 kg ionischer Flüssigkeit durchgeführt, wobei 233,25 g Celluloselaurat mit einem Substitutionsgrad von 2,3 synthetisiert werden konnte. Die ionische Flüssigkeit wurde mit einer durchschnittlichen Effizienz von 91 % w/w recycelt und konnte in einer nachfolgenden Synthese als Lösungsmittel eingesetzt werden. Insgesamt wurden drei Synthese-Recyclingzyklen durchgeführt, wobei der Substitutionsgrad nach den ersten zwei Synthesen bei 2,3 lag, bei der dritten bzw. vierten Synthese allerdings auf 1,8 bzw. 1,4 sank.

Parallel zur Verringerung des Substitutionsgrades verkürzte sich die Lösezeit von Cellulose in der ionischen Flüssigkeit mit jedem weiteren Recyclingzyklus signifikant. Als Grund für die verbesserte Löslichkeit wurde die Bildung von 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazolium (EHEMIM) identifiziert, das durch die Reaktion einer Carben-Spezies des 1-Ethyl-3-methylimidazoliums (EMIM) mit Acetaldehyd – welches als Nebenprodukt bei der Vinylester-basierten Synthese auftritt – entsteht. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von Wasser für das verbesserte Lösungsvermögen des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Systems essentiell ist. Die besten Lösungseigenschaften wurden bei einem Kationenanteil von 50 mol-% EHEMIM bzw. 50 mol-% EMIM und einem Wassergehalt von 8,5 % w/w beobachtet. Dieses optimierte [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System ermöglicht das Lösen von 14 % w/w Cellulose bei 80°C innerhalb von 3 Stunden. Im Gegensatz dazu löst die ursprüngliche ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc bzw. [EMIM]OAc mit einem optimalen Wassergehalt von 10 % w/w unter den gleichen Bedingungen lediglich 1 % w/w bzw. 2 % w/w Cellulose.

1 Einleitung

1.1 Cellulose

Struktur, Vorkommen und Anwendungen

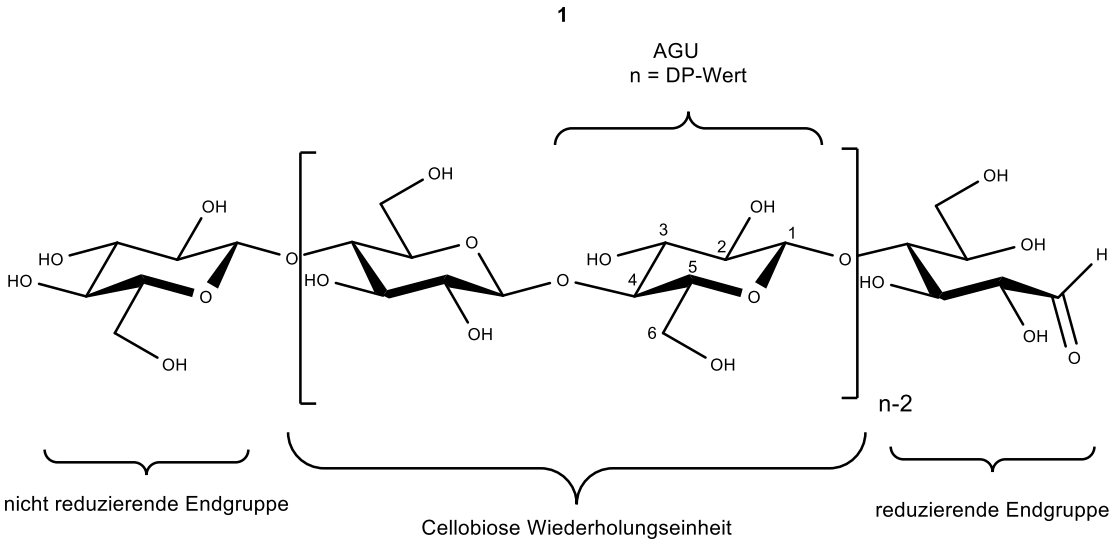
Cellulose ist der Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden und ist daher das häufigste Biopolymer und die häufigste organische Verbindung in der Natur.[1] Jährlich werden etwa 1,8 Billionen Tonnen Biomasse photosynthetisch gebildet, wovon ca. 40 % in den Cellulose-Pool fließen.[2] Hauptsächlich wird Cellulose für die Produktion von Papier oder Zellstoff eingesetzt oder verbrannt, um Wärme zu erzeugen. Eine andere Strategie, welche sich die Materialeigenschaften der Cellulose zunutze macht, ist beispielsweise die Produktion von Celluloseacetat. Im Jahr 2008 wurden weltweit mehr als 800.000 Tonnen Celluloseacetat produziert, wobei der Großteil für die Produktion von Zigarettenfiltern verwendet wird. Zusätzlich wird es auch für die Produktion von Plastikfilmen, Fotofilmen und Textilien genutzt.[3]

Derartige thermoplastische Materialien, basierend auf Cellulose, können dazu beitragen, die Abhängigkeit unserer Gesellschaft von fossilen Energieträgern zu reduzieren, wenn dadurch Erdöl-basierte Produkte ersetzt werden.

Cellulose ist ein teilkristallines Polymer und besteht aus vielen Anhydroglucoseeinheiten (AGU), welche β-(1→4)glycosidisch verbunden sind und dadurch lineare Ketten aus bis zu 10.000 AGUs ausbilden (Schema 1).[1] Jede AGU besitzt drei freie Hydroxygruppen. Bei den Hydroxygruppen an Position 2 und 3 handelt es sich um sekundäre Alkohole, während es sich bei der Hydroxygruppe an Position 6 um einen primären Alkohol handelt. Diese Hydroxygruppen können sowohl innerhalb desselben Cellulosestrangs, als auch mit anderen Cellulosesträngen Wasserstoffbrücken ausbilden und erzeugen dadurch ein komplexes Wasserstoffbrückennetzwerk. Alle Hydroxygruppen innerhalb

des Cellulosepolymers besitzen eine äquatoriale Orientierung.[4] Auch wenn sich Substitutions- und Polymerisationsgrade häufig auf die AGUs der Cellulose beziehen, ist die eigentliche Wiederholungseinheit der Cellulose die Cellobiose (Schema 1). Die Cellobiose und die Cellulose besitzen sowohl eine nicht-reduzierende Endgruppe, als auch eine reduzierende Endgruppe.

Ein Ansatz um Cellulose zu nutzen, ist der enzymatische oder mikrobielle Abbau, welcher das Ziel verfolgt, Biotreibstoffe wie Ethanol oder Butanol zu produzieren.[5] Im Gegensatz zu diesen Anwendungen ist die Verwendung von Cellulose für die Produktion von verschiedenen Polymer-Materialien eine interessante Alternative.[6] Cellulose besitzt allerdings keinen Schmelzpunkt und ist unlöslich in gängigen organischen Lösungsmitteln, was ihre Verarbeitung und Verwendung als nachwachsender Rohstoff erschwert. Mit dem Ziel, diese Limitationen zu umgehen, wird Cellulose häufig chemisch modifiziert, um auf diese Weise andere Eigenschaften zu generieren. Daher wurde die Produktion von besser verarbeitbaren Cellulosederivaten wie Celluloseacetat (**55**), Celluloseacetatpropionat und Celluloseacetatbutyrat bereits im industriel-



Schema 1: Molekularer Aufbau der Cellulose.
Cellulose (**1**) ist aus vielen β-glycosidisch verbundenen Anhydroglucoseeinheiten (AGU) aufgebaut. Die Anzahl der AGUs in einem Polymerstrang definiert den Polymerisationsgrad einer Cellulosekette. Jede Anhydroglucoseeinheit besitzt an Position 2, 3 und 6 jeweils freie Hydroxygruppen. Die Wiederholungseinheit der Cellulose ist die Cellobiose, welche aus zwei β-glycosidisch verbundenen Glucoseeinheiten aufgebaut ist. Jeder Cellulosestrang besitzt sowohl eine nicht reduzierende Endgruppe, als auch eine reduzierende Endgruppe.

len Maßstab realisiert. Diese Celluloseester (**12**) sind in vielen organischen Lösungsmitteln löslich, was die Erzeugung von Polymerfilmen durch „Solventcasting“ ermöglicht.[7] Hierbei werden die Celluloseester gelöst und in Formen gegossen, wobei nach dem Abdampfen des Lösungsmittels ein Polymerfilm zurückbleibt. Allerdings zeigen derartige kurzkettige Celluloseester nur eine begrenzte thermoplastische Verarbeitbarkeit, sodass ein praktischer Folienblasprozess, aufgrund der großen Sprödigkeit der Celluloseester, bisher nicht realisiert werden konnte.[8] Die Modifikation von Cellulose mit anderen Seitenketten, zum Beispiel längere oder verzweigte Seitenketten, könnte dabei helfen, Cellulosederivate mit anderen Eigenschaften, wie beispielsweise einer verbesserten thermoplastischen Verarbeitbarkeit, zu erzeugen und somit die Anwendungsgebiete von Cellulosederivaten zu vergrößern.

Bei der Suche nach neuartigen Celluloseestern mit verbessertem Eigenschaftsprofil ist die chemische Charakterisierung der zu untersuchenden Cellulosederivate bedeutend. Um Cellulose bzw. Cellulosederivate zu charakterisieren, sind zwei Parameter von großer Bedeutung. Zum einen der bereits beschriebene Polymerisationsgrad (DP), welcher die Anzahl an AGUs innerhalb einer Cellulosekette beschreibt. Celluloseproben weisen eine hohe Polydispersität auf, bestehen also aus Polymersträngen mit sehr unterschiedlichen Kettenlängen. Die Messung des Polymerisationsgrades kann über unterschiedliche Methoden, wie beispielsweise Viskosimetrie oder Gelpermeationschromatographie erfolgen und liefert eine Molmassenverteilung. Je nachdem welche Messmethode, bzw. Berechnungsmodel angewendet wird, unterscheiden sich die erhaltenden Werte. Beispielsweise wird bei der Bestimmung des Zahlenmittels (M_n) der relative Zahlenanteil des Polymers gewichtet, während bei dem Massenmittel (M_w) der relative Massenanteil gewichtet wird. Basierend auf diesen Molmassenverteilungen kann der entsprechende Polymerisationsgrad (DP), unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der AGU, im Falle von Cellulosederivaten, berechnet werden.

Ein anderer wichtiger Parameter zur Charakterisierung von Cellulosederivaten ist der Substitutionsgrad (DS). Der DS definiert, wie viele der Hydroxygruppen einer AGU durchschnittlich modifiziert vorliegen und kann, in Anlehnung an die drei Hydroxygruppen der AGU, Werte zwischen 0 und 3 annehmen. Zur Bestimmung des Substituti-

onsgrades gibt es verschiedene Methoden, basierend auf NMR, FT-IR oder Derivatisierungs-Strategien.

Wie bereits beschrieben, ist das Lösen von Cellulose in gängigen organischen Lösungsmitteln oder Wasser nicht möglich, was die Verarbeitbarkeit von Cellulose stark einschränkt. Jedoch kann Cellulose in speziellen Lösungssystemen gelöst werden, welche nachfolgend vorgestellt werden.

1.1.1 Cellulose-Lösungsmittel

Cellulose ist nicht löslich in Wasser und in gängigen organischen Lösungsmitteln.[9] Der Grund für diese vorliegende Unlöslichkeit wird in der Literatur kontrovers diskutiert.[10] Das häufig angeführte Argument, dass der lineare Charakter der Cellulose den Alkoholgruppen ermöglicht, starke Wasserstoffbrücken auszubilden, die der Löslichkeit entgegenstehen, wird von anderen Autoren heutzutage hinterfragt.[4,11] So wird nach Björn Lindman und Kollegen der Einfluss der polaren Wechselwirkungen der Cellulose, in Bezug auf die Löslichkeit, überschätzt und sie betonen den amphiphilen Charakter der Cellulose, der sich aus polaren, sowie aus unpolaren Wechselwirkungen ergibt.[4] Auch wenn es zunächst nicht intuitiv erscheint, der Cellulose mit ihren vielen Hydroxygruppen einen unpolaren Charakter zuzusprechen, zeigen jedoch sowohl kristallographische Untersuchungen, als auch Computermodelle, einen partiell unpolaren Charakter der Cellulose.[10] Lindman führt eine Reihe von anderen Gründen an, welche die Löslichkeit von Cellulose beeinflussen:

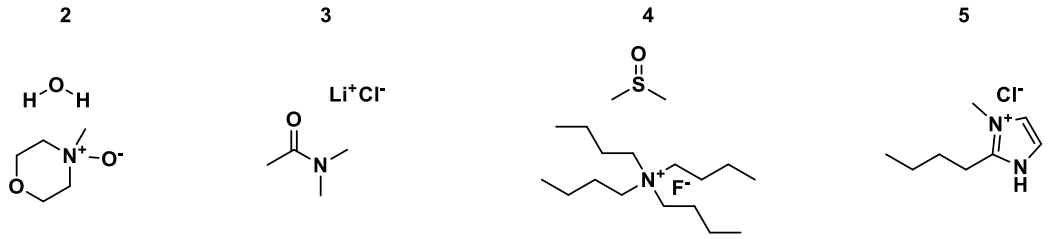
1) Die Entropie ist die Triebkraft der Löslichkeit, was sich aus folgender Gleichung ableiten lässt: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Da die Gibbs-Energie ($\Delta G$) negativ sein muss, damit der Lösungsvorgang erfolgt und die Enthalpie (ΔH) üblicherweise positiv ist, ergibt sich die Entropie (ΔS) als die eigentliche Triebkraft des Lösungsprozesses. Für das Lösen von großen Polymeren ist die Entropie geringer als für kleinere Moleküle, da die Anzahl an gelösten Molekülen niedriger ist. Daher ist das Lösen von Polymeren schwieriger als das Lösen von kleineren Molekülen.[4]

2) Für Polymere, bei denen sich nach dem Lösungsvorgang die Anzahl der Konformationsmöglichkeiten (Freiheitsgrade) erhöht, ist der Lösungsvorgang ge-

genüber starren Polymeren ebenfalls bevorzugt. Cellulose besitzt allerdings aufgrund der β-glycosidischen Bindung zwischen den AGUs eine vollständige äquatoriale Konfirmation. Diese äquatoriale Konformation stabilisiert die Sesselkonformation der AGUs, was die Flexibilität des Polymers reduziert. Daher besitzt die Cellulose weniger Konformationsmöglichkeiten als die α-glycosidisch verbundene Amylose, welche eine nicht vollständige äquatoriale Konformation besitzt. Dies erschwert das Lösen von Cellulose im Vergleich zu Amylose.[4]

3) Der von Lindman und anderen betonte unpolare bzw. amphiphile Charakter der Cellulose würde aufgrund des hydrophoben Effektes dazu führen, dass sich die unpolaren Regionen der Cellulose zusammenlagern, was zumindest in Wasser der Löslichkeit entgegenstehen würde.[4]

Lindmans Theorie wurde in der Literatur in den letzten Jahren häufig kontrovers diskutiert. Einige Autoren kritisieren in diesem Kontext, dass Lindman den Einfluss der Wasserstoffbrückenbindungen in seiner Theorie unterschätzt.[10] Es scheint allerdings ein Konsens zu bestehen, dass unpolare Wechselwirkungen im Cellulosepolymer von großer Bedeutung sind und dass der Lösungsprozess von Cellulose in Wasser und anderen Lösungsmitteln von vielen Faktoren beeinflusst wird.[10] Als Konsequenz aus dem amphiphilen Charakter der Cellulose schließen Lindman und Kollegen darauf, dass Cellulose-Lösemittel ebenfalls einen amphiphilen Charakter besitzen müssen (Schema 2). Als Beispiele nennen sie *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (**2**) und ionische Flüssigkeiten (**5**),



Schema 2: Struktur verschiedener Cellulose-Lösungsmitteln.
Die Abbildung zeigt das NMMO-Systems (**2**), das LiCl/DMAc-Systems (**3**) das DMSO/TBAF-System und beispielhaft als Vertreter der ionischen Flüssigkeiten [BMIM]Cl (**5**). Es sind jeweils die einzelnen Komponenten der jeweiligen Lösungsmittelsystems angegeben, die Abbildung gibt keine Angabe über die stöchiometrischen Verhältnisse der Komponenten.

welche eindeutig einen amphiphilen Charakter besitzen und sehr gute Cellulose-Lösungsmittel sind.[4] Es gibt allerdings noch weitere Beispiele, wie das Dimethylacetamid (DMAc)/Lithiumchlorid (LiCl)-System (**3**) und das Dimethylsulfoxid (DMSO)/Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF)-System (**4**), welche ebenfalls einen amphiphilen Charakter besitzen (Schema 2).[9] Es ist anzumerken, dass es noch weitere Arten von Cellulose-Lösungsmitteln gibt. So unterteilt Liebert Cellulose-Lösungsmittel in „wässrige (protische) Systeme“, in „derivatisierende, intermediat-bildende Systeme“ und in „nicht wässrige, nicht derivatisierende Systeme“.[9]

Im Hinblick auf eine Veresterung von Cellulose sind nicht alle dieser Lösungsmittelklassen geeignet. Derivatisierende Systeme generieren zu viele Nebenreaktionen für eine gezielte Veresterung und wässrige Systeme bevorzugen die Hydrolyse von Estern, was einer Veresterung von Cellulose entgegensteht. Im Fokus der hier vorliegenden Arbeit steht allerdings eine gezielte chemische Synthese von Celluloseestern, wofür nicht wässrige, nicht-derivatisierende Systeme als am besten geeignet erscheinen. Daher wird sich die folgende Übersicht auf nicht wässrige, nicht-derivatisierende Systeme beschränken:

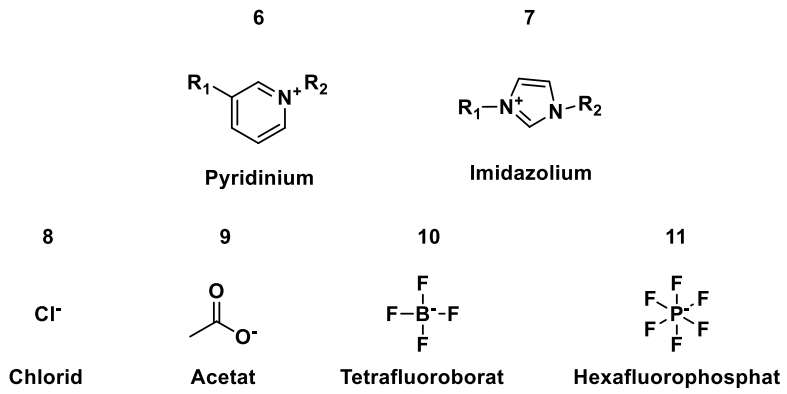
Das *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMMO)-System wird bereits im industriellen Maßstab von der Firma Lenzing angewendet, um Cellulosefasern für die Textilherstellung zu produzieren.[12] Das NMMO-System besteht aus *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid und Wasser. Dieser Prozess ist besonders umweltfreundlich, da NMMO fast vollständig recycelt werden kann.[13] Die Synthese von Celluloseestern gilt allerdings als schwierig, da das NMMO-System sehr reaktiv ist und eine große Anzahl von Nebenreaktionen ablaufen können.[14,9] Im Gegensatz dazu gilt das Lösungssystem *N*,*N*-Dimethylacetamid/LiCl (DMac/LiCl) als chemisch inert, was die Cellulosemodifikation mit sehr reaktiven Fettsäurechloriden und Anhydriden ermöglicht.[15] Das Recycling von DMAc/LiCl ist allerdings problematisch, was die Anwendung bisher auf Labormaßstab limitiert.[9] Zusätzlich ist die Anwendung von Dimethylacetamid aufgrund seiner gesundheitsschädigenden Eigenschaften im industriellen Maßstab ungünstig. Kürzlich wurde von Kostag und Kollegen ein neues Lösungsmittel, basierend auf Aceton und Triethyloctylammoniumchlorid beschrieben. Dieses System kann 2,4 % w/w Cellulose lösen und zeigt die geringsten Viskositäten im Vergleich mit anderen üblichen Cellulose-Lösungsmitteln.[16] Es

ist allerdings schwierig abzuschätzen, wie teuer die Produktion ist, und ob sich die großtechnische Produktion von Triethyloctylammoniumchlorid rechnet. Eine andere bedeutende Klasse von Cellulose-Lösungsmitteln sind ionische Flüssigkeiten, die im kommenden Abschnitt vorgestellt werden.

1.1.2 Ionische Flüssigkeiten

In den letzten Jahren stehen immer häufiger ionische Flüssigkeiten im Fokus der Wissenschaft und der chemischen Industrie. So gibt es interessante Anwendungsmöglichkeiten von ionischen Flüssigkeiten in der Elektrochemie und der Synthesechemie.[17] Beispielsweise entwickelte BASF den BASIL-Prozess zu Produktion von Alkoxyphenylphosphinen, wobei die ionische Flüssigkeit 1-methylimidazoliumchlorid eingesetzt wird.[18] Doch auch in der Biokatalyse werden ionische Flüssigkeiten eingesetzt, da einige Enzyme in bestimmten ionischen Flüssigkeiten ihre Aktivität nicht verlieren und hohe Umsatzraten vorweisen.[19] In den Fokus der Cellulosechemie traten die ionischen Flüssigkeiten als Swatloski und Kollegen im Jahre 2002 entdeckten, dass bestimmte ionische Flüssigkeiten Cellulose lösen können.[20,21]

Ionische Flüssigkeiten bestehen üblicherweise aus unsymmetrischen, organischen Kationen und verschiedenen Anionen und zeichnen sich durch einen Schmelzpunkt unterhalb von 100°C aus. Übliche Kationen bestehen aus Ammonium-, Phosphonium-, Pyridinium (**6**)- und Imidazolium (**7**)-Gerüsten. In den Pyridinium- und Imidazolium-Kationen ist die positive Ladung in einem π-Elektronensystem delokalisiert (Schema 3). Delokalisierte Ladungen begrenzen, ebenso wie ein unsymmetrischer Charakter der



Schema 3: Typische Kationen und Anionen von ionischen Flüssigkeiten.

Kationen, die Ausbildung eines definierten Kristallgitters, was die niedrigen Schmelzpunkte der ionischen Flüssigkeiten begünstigt. Für das Lösen von Cellulose haben sich insbesondere Pyridinium- und Imidazolium -Kationen als vielversprechend erwiesen. Bei den Anionen gelten Formate, Chloride (**8**) und Acetate (**9**) als vorteilhaft für das Lösen von Cellulose.[1]

Das sogenannte Kamlet-Taft-Parameter-System wird häufig angewendet, um die Lösungseigenschaften von ionischen Flüssigkeiten vorherzusagen. Hierbei definiert der α-Parameter die Fähigkeit eines Lösungsmittels, als Wasserstoffbrückendonor zu agieren, während der β-Parameter die Fähigkeit eines Lösungsmittels, als Wasserstoffbrückenakzeptor zu fungieren, bestimmt. Der so genannte π*-Parameter ist ein Maß für die Dipolarität bzw. die Polarisierbarkeit des Lösungsmittels. Insbesondere große β-Parameter-Werte korrelieren mit der Fähigkeit eines Lösungsmittels, Cellulose zu lösen.[22] Die Kamlet-Taft-Parameter können durch die Verwendung von Farbstoffen und der Analyse der jeweiligen UV-Vis-Spektren bestimmt werden. Für nicht funktionalisierte Imidazolium-basierte ionische Flüssigkeiten wird angenommen, dass hauptsächlich die Anionen die Wasserstoffbrückenbasizität definieren.[22] In diesem Zusammenhang stellen Tabellen der Wasserstoffbrückenbasizität von Anionen einen guten Anhaltspunkt für die Abschätzung der Lösungseigenschaften von ionischen Flüssigkeiten gegenüber Cellulose dar. Derartige Tabellen sind seit kurzem, basierend auf quantenchemischen Berechnungsmodellen, verfügbar.[23] Diese Tabellen zeigen, dass insbesondere Carboxylat-Anionen (z.B. Acetat), Phosphat-Anionen und Chlorid-Anionen eine besonders starke Wasserstoffbrückenbasizität zeigen und daher als Lösungsmittel von Cellulose ein großes Potenzial besitzen. Es ist jedoch zu beachten, dass im Falle von funktionalisierten Imidazoliumkationen die Wasserstoffbrückenbasizität auch von den Kationen bestimmt wird und damit die Celluloselöslichkeit beeinflusst werden kann. So können beispielsweise Hydroxygruppen am Imidazoliumkation die Löslichkeit von Cellulose positiv beeinflussen, wie am Beispiel von 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazoliumchlorid ([EHEMIM]Cl) bereits gezeigt wurde.[24]

Obwohl einige ionische Flüssigkeiten wie [BMIM]Cl (**5**) und [EMIM]OAc (**24**) gute Lösungsmittel für Cellulose sind, ist der Lösungsprozess sehr langwierig. Während sich gering konzentrierte Lösungen innerhalb von Minuten lösen, sind hoch konzentrierte

Lösungen üblicherweise nur durch lange Lösezeiten von 12 bis mehr als 48 Stunden bei Temperaturen zwischen 70°C und 150°C realisierbar (Tabelle 1).[25-28] Diese langwierige Exposition bei hohen Temperaturen ist allerdings problematisch, da sich ionische Flüssigkeiten dabei partiell zersetzen können. Studien zeigen zwar relativ hohe Zersetzungstemperaturen von 300 - 400°C, jedoch ist die Degradation bei langfristiger Exposition auch schon bei deutlich niedrigeren Temperaturen möglich.[29,1] Um langwierige Lösezeiten zu umgehen, wurde der Einsatz von Ultraschall oder Mikrowellenstrahlung vorgeschlagen. Obgleich diese Strategien die Lösezeit signifikant reduzieren können, benötigen sie einen größeren apparativen Aufwand.[30,20] Des Weiteren ist es nicht ausgeschlossen, dass der verwendete Ultraschall bzw. die Mikrowellenstrahlung die Zersetzung der ionischen Flüssigkeiten ebenfalls begünstigen. Diese Zersetzung ist, neben den hohen Kosten für ionische Flüssigkeiten und deren teilweise hohe Viskosität, die größte Limitierung bei einer potenziellen Anwendung im großtechnischen Maßstab. Demgegenüber steht allerdings das enorme Potenzial der ionischen Flüssigkeiten, Lösungsumgebungen bereitzustellen, die mit üblichen Lösungsmitteln nicht realisierbar sind.[1] Um eine industrielle Anwendung zu ermöglichen, ist insbesondere das Recycling der ionischen Flüssigkeiten von enormer Bedeutung, um die Kosten für das Lösungsmittel zu minimieren. In diesem Kontext ist es auch von Bedeutung, den Lösungsprozess von Cellulose in ionischen Flüssigkeiten zu beschleunigen und damit die Zersetzung von ionischen Flüssigkeiten zu begrenzen und das Recycling der ionischen Flüssigkeit zu erleichtern.

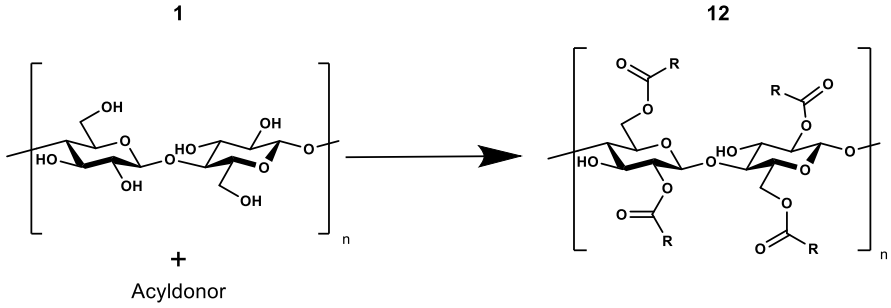
Tabelle 1: Übersicht über die Löslichkeit von Cellulose in ionischen Flüssigkeiten.

Ionische Flüssigkeit	Cellulose	Vorbehandlung	Temp.	Zeit	Menge [% w/w]	Literatur
[EMIM]OAc	Alicell-Super[a]	12 h im Gemisch mit Wasser	110°C	n.d.	18	28
[BMIM]OAc	Alicell-Super	12 h im Gemisch mit Wasser	110°C	n.d.	20	28
[BMIM]Cl	Alicell-Super	12 h im Gemisch mit Wasser	110°C	n.d.	14	28
[EMIM]OAc	Alpha Cellulose	-	90°C	12 h	5	27
[EMIM]OAc	MCC[b]	-	70°C	12 h	10	31
[EMIM]OAc	Avicel Cellulose	-	150°C	20 min	2,47	25
[EMIM]OAc	MCC, SSP[c]	-	100°C	min. 48 h	15	26

[a] Zellstoff mit 93%-igen α-Celluloseanteil und einem Polymerisationsgrad zwischen 540,5 und 599,
[b] mikrokristalline Cellulose, [c] Sulfitzellstoff miteinem Polymerisationsgrad von 1000

1.2 Chemische Modifikation

Celluloseester werden ausgehend von Cellulose und verschiedenen Acyldonoren synthetisiert (Schema 4). Wird eine Fettsäure als Acyldonor eingesetzt, handelt es sich um eine Veresterung. Bei einer Veresterungsreaktion reagiert eine Carbonsäure mit einem Alkohol, wobei Wasser und der jeweilige Ester entstehen. Bei der Rückreaktion, der sogenannten Hydrolyse, wird der Ester unter Einwirken von Wasser wieder in einen Alkohol und eine Säure gespalten (Schema 6). Wenn ein Ester gebildet werden soll, ist also eine Minimierung der Wasserkonzentration anzustreben, um hohe



Schema 4: Synthese von Celluloseestern (12), ausgehend von Cellulose (1) und Acyldonoren.

Produktausbeuten zu gewährleisten. Für die Synthese können allerdings auch Umesterungsreaktionen eingesetzt werden. Bei einer Umesterung wird die Alkoholkomponente im Ester durch einen anderen Alkohol ersetzt. Wenn beispielsweise Methylester als Substrat für die Veresterung von Cellulose eingesetzt werden, wird die Säurekomponente des jeweiligen Methylesters mit der Alkoholgruppe der Cellulose einen Ester bilden, wobei Methanol als Nebenprodukt ensteht (Schema 5). Hierbei ist also eine Minimierung der Methanolkonzentration in der Lösung sinvoll, um durch die Verschiebung des chemischen Gleichgewichts die Produktbildung zu begünstigen. Als Katalysatoren für Veresterungen bzw. Umesterungen können Säuren oder Enzyme eingesetzt werden. Es können auch andere, reaktivere Acyldonoren wie Anhydride oder Fettsäurechloride für die Synthese von Celluloseestern verwendet werden, welche insbesondere im Fall der Fettsäurechloride nicht zwingend Katalysatoren benötigen (Schema 4). Hierbei bilden sich bei der Verwendung von Anhydriden freie Fettsäuren als Nebenprodukt, während bei den Fettsäurechloriden Chlorwasserstoff entsteht.

Neben der Differenzierung anhand der verwendeten Acyldonoren kann zwischen homogenen Synthesen, in denen Cellulose gelöst vorliegt und heterogenen Synthesen, in denen Cellulose nicht gelöst vorliegt, unterschieden werden. Im Kontext industrieller Verfahren, wie dem Essigsäureprozess oder dem Methylenchloridverfahren, wird der Begriff „homogen“ auch verwendet, um zu verdeutlichen, dass das Zwischenprodukt Cellulosetriacetat in den verwendeten Reaktionsmischungen gelöst vorliegt und die anschließende partielle Verseifung der Cellulose homogen durchgeführt wird.[32] Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wird der Begriff „homogen“ jedoch verwendet, um die Löslichkeit des Substrates, d.h. der Cellulose und nicht des Produktes, d.h. des Celluloseesters, zu beschreiben. Die Prozesse zur industriellen Produktion von Celluloseacetat, wie beispielsweise der Essigsäureprozess oder das Methylenchloridverfahren, beinhalten aufwendige Vorbehandlungsschritte der Cellulose, verwenden meist Essigsäureanhydrid als Veresterungsreagenz, Methylenchlorid oder Eisessig als Lösungsmittel, Schwefelsäure als Katalysator und sind heterogen. Die Cellulose liegt also nicht gelöst vor.[32] Dies erfordert viele zusätzliche Prozessschritte, wie beispielsweise eine mechanische und chemische Vorbehandlung. Zusätzlich ist die Synthese von Cel-

luloseacetat mit definiertem Substitutionsgrad nur indirekt möglich, indem Cellulose erst vollständig acetyliert und anschließend partiell verseift wird, um den gewünschten Substitutionsgrad zu erhalten. Eine direkte Synthese von Celluloseacetat mit definiertem Substitutionsgrad ist in heterogenen Systemen nicht möglich, da immer ein Gemisch aus unterschiedlichen Substitutionsgraden erzeugt wird.[32] So wäre ein Teil des Produktes vollständig acetyliert, während ein anderer Teil der Cellulose nicht acetyliert vorliegen würde.

In homogenen Synthesen ist eine direkte Einstellung des Substitutionsgrades allerdings möglich, da Cellulose gelöst vorliegt und daher gleichmäßig modifiziert werden kann.[33] Ein weiterer Vorteil von homogenen Systemen liegt in der größeren Anzahl von möglichen chemischen Modifikationen. Heterogene Systeme erlauben meist nur effiziente Veresterungsreaktionen mit kurzen Seitenketten, welche im Gegensatz zu längeren Seitenketten eine geringere sterische Hinderung vorweisen. Diese Vorzüge der homogenen Synthese führten in den letzten Jahren zur Entwicklung von neuen homogenen Syntheserouten, die eng mit der Entwicklung von neuen Cellulose-Lösemitteln einhergingen, welche im letzten Abschnitt beschrieben wurden.

Viele homogene Synthesen basieren auf LiCl/DMAc, DMSO/TBAF oder ionischen Flüssigkeiten (Tabelle 2). LiCl/DMAc gehörte zu den ersten homogenen Systemen, welche für die Veresterung von Cellulose eingesetzt wurden. Die meisten Synthesen von Cellulosefettsäureestern in LiCl/DMAc benötigen lange Reaktionszeiten von ca. 16 Stunden oder länger.[34,35,15] Satgé und Kollegen konnten die Reaktionszeiten durch die Verwendung des toxischen Katalysators 4-(Dimethylamino)-pyridin und des Einsatzes von Mikrowellenstrahlung auf eine Minute reduzieren.[36] Grundsätzlich ist allerdings zu beachten, dass auch ohne zusätzliche Katalysatoren die Synthese von kurzkettigen Celluloseestern deutlich schneller abläuft, als mit langkettigen Acyldonoren (Tabelle 2).[15,37]

Tabelle 2: Literaturübersicht über homogene Synthesen.

Lösungsmittel	Kat.	Acyldonor	Eq.	Temp.	Zeit	DS	Literatur
LiCl/DMAc	Pyridin	C_{12}+ TsCl[b]	6,0	50°C	24 h	2,90	[34]
DMSO/TBAF	-	C_{12}-Vinyl	10,0	40°C	70 h	2,60	[38]
DMSO/TBAF	-	C_{12}-Vinyl	2,3	40°C	70 h	1,47	[38]
LiCl/DMAc	-	Ac_2[c]	4,5	60°C	18 h	2,80	[35]
LiCl/DMAc	DMAP[e]	C_{12}-Cl	10,2	140°C - 165°C	1 min - 2 Tage	2,60	[36]
[BMIM]Cl	-	C_{12}-Cl	3,0	80°C	2 h	1,54	[39]
[BMIM]OAc [a]	-	C_2-Vinyl	3,0	40°C	70 h	1,80	[40]
[BMIM]Cl	-	C_{18}-Cl	5,0	90°C	1 h	2,57	[41]
DMSO/ [BMIM]Cl	TBD[d]	Methylester	5,0	95°C	24 h	0,69	[42]
[EMIM]OAc	-	C_2- Isopropenyl	5,3	80°C	15 min	2,33	[43]
LiCl/DMAc	Pyridin	C_{16}-Cl	3,0	60°C	16 h	1,10	[15]
Li/Cl	-	C_2-Cl	5,0	50°C	2 h	2.83	[37]
N_{2228}Cl[f]-Aceton	-	C_2-Cl	5,0	50°C	2 h	2,63	[37]

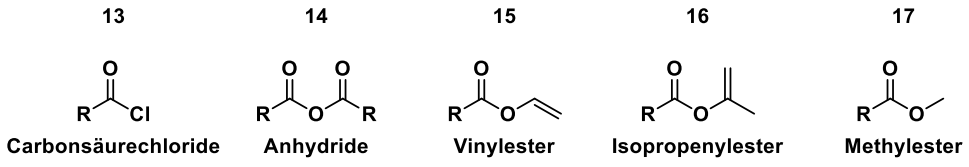
[a] Hier wurde Stärke anstatt Cellulose verestert, [b] p-Toluolsulfonsäure, [c] Essigsäureanhydrid, [d] 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene, [e] 4-(Dimethylamino)-pyridin, [f] Triethyloctylammoniumchlorid

Aufgrund von komplizierten Recyclingschritten und des toxischen Charakters von DMAc werden zunehmend andere Lösungsmittel für die homogene Celluloseestersynthese untersucht.

Für die Veresterung der Cellulose werden üblicherweise sehr reaktive und korrosive Carbonsäurechloride (**13**) oder Anhydride (**14**) eingesetzt. Reaktionen mit derartig aktivierten Acyldonoren können exotherm verlaufen, was eine aktive Kühlung der Reaktionsansätze notwendig machen kann. Durch die Verwendung von Anhydriden kann die Synthese von Celluloseestern mit hohen Substitutionsgraden realisiert werden, jedoch reagiert ein großer Teil des Anhydrids zu unerwünschten Carbonsäure-Nebenprodukten und vermindert dadurch die Effizienz des Prozesses. Außerdem sind insbesondere langkettige Fettsäureanhydride sehr unpolar, was zu einer niedrigeren

Löslichkeit und einem reduzierten Massentransfer innerhalb von üblicherweise polaren Cellulose-Lösemitteln führt.

Im Falle von Carbonsäurechloriden (**13**) ist die Verwendung von Säurefängern erforderlich, um eine Akkumulation von hoch reaktivem Chlorwasserstoff zu begrenzen.[41] Beispielsweise führt das Substrat Acetylchlorid in halogenhaltigen ionischen Flüssigkeiten zu einem signifikanten Abbau des Cellulosegrundgerüstes bzw. des Polymerisationsgrades und der ionischen Flüssigkeiten.[39] Um diesen Abbau zu begrenzen stellt die ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc eine interessante halogenfreie Alternative als effizientes Cellulose-Lösemittel dar. Des Weiteren ist [EMIM]OAc biologisch abbaubar, nicht flüchtig und besitzt im Gegensatz zu halogenhaltigen ionischen Flüssigkeiten einen niedrigeren Schmelzpunkt und gilt als weniger toxisch im Vergleich zu chlorhaltigen ionischen Flüssigkeiten.[31] Allerdings ist [EMIM]OAc nicht vollständig inert, da während des Lösungsprozesses bis zu 1,7 mol-% aller Hydroxygruppen der Cellulose acetyliert werden können.[25] Zusätzlich führt die Verwendung von Anhydriden oder chlorierten Substraten als Acetylierungs-Reagenz zu einer Aktivierung der Acetate der ionischen Flüssigkeit und dadurch zu einer erhöhten Acetylierung der Cellulose.[31,44] Dieser Effekt, welcher über die Bildung von gemischten Anhydriden erklärt werden kann, begrenzt die Kontrolle über die Substitutionsmuster von Cellulose in der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc und verhindert eine industrielle Anwendung.[33] Um diesen Acyldonor-induzierten Acetylierungs-Effekt in [EMIM]OAc zu begrenzen, ist die Verwendung von weniger reaktiven Acyldonoren ratsam. Eine vielversprechende Alternative zu Anhydriden und Acylchloriden ist die Umesterung, ausgehend von Methyl-(**17**) oder Vinylestern (**15**). Schenzel und Kollegen beschrieben die Veresterung von Cellulose ausgehend von Methylestern (**17**) in einem Gemisch aus [BMIM]Cl und DMSO. Diese Reaktion wird katalysiert durch 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD), wobei allerdings



Schema 5: Wichtige Acyldonorgruppen.

nur Substitutionsgrade von maximal 0,69 erreicht wurden.[42] Im Gegensatz zu der Verwendung von Methylestern als Acyldonoren ist die Vinylester-basierte Synthese bevorzugt. Der bei der Reaktion entstehende Vinylalkohol (Ethenol) tautomerisiert zu flüchtigem Acetaldehyd, wodurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung Produkt verschoben wird. Eine homogene Synthese von Celluloseestern (**12**), ausgehend von Vinylester (**15**), wurde bereits in DMSO/Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) beschrieben und führte zu Celluloseestern mit hohen Substitutionsgraden. Ein bedeutender Nachteil dieser Synthese liegt in den langen Reaktionszeiten von mehreren Tagen und einem hohen Substratüberschuss, welcher für die Synthese von Celluloseestern mit hohen DS-Werten notwendig ist.[38] Außerdem erschweren vergleichsweise schwierige Recyclingprozesse und die Brennbarkeit des Lösungsmittelsystems industrielle Anwendungen.[44] Als Alternative wurde eine Vinylester-basierte Cellulosemodifikation in einem heterogenen System aus DMSO und NaOH bzw. KOH als Katalysator vorgestellt. Diese Syntheseroute benötigt hohe Substratkonzentrationen und ist auf kurze Seitenketten von C_2-C_4 beschränkt, erlaubt allerdings eine schnelle Synthese, die innerhalb von 5 Minuten zu hohen Substitutionsgraden führt.[45] Im Gegensatz zu diesem heterogenen Prozess wurde eine homogene Vinylester-basierte Stärkeacetat-Synthese in der basischen ionischen Flüssigkeit [BMIM]OAc von Shogren und Biswas beschrieben.[40] Es wurde allerdings bereits früher gezeigt, dass einige Salze (z.B. Acetate) Umesterungsreaktionen, ausgehend von Vinylestern katalysieren.[46] Die Anwendung dieses Prinzips, im Kontext von ionischen Flüssigkeiten, wurde allerdings als erstes von Shogren und Biswas gezeigt und kürzlich von Kakuchi und Kollegen auf Isopropenylacetat (**16**) und Cellulose erweitert.[40,43] Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde das Konzept der Umesterung in Acetat-basierten ionischen Flüssigkeiten anhand von Vinylestern und Cellulose untersucht und eine große Anzahl verschiedener Seitenketten an Cellulose gebunden.

1.3 Enzymatische Modifikation von Cellulose

Die enzymatische Celluloseestersynthese läuft nach demselben Reaktionsschema wie bei der chemischen Synthese ab, wobei Enzyme als Katalysatoren dienen (Schema 4). Die enzymatische Modifikation bzw. Veresterung von Cellulose birgt vielfältige Vorteile gegenüber verschiedenen chemischen Syntheserouten. Grundsätzlich kann die enzymatische Umsetzung bei niedrigeren Temperaturen erfolgen, was etwaige Nebenreaktionen minimiert und Heizungskosten begrenzt. Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Katalyse liegt in der Verwendung von weniger reaktiven Acyldonoren, was ebenfalls potenzielle Nebenreaktionen minimiert und die Selektivität der Synthese erhöhen kann. Zusätzlich kann auf toxische Katalysatoren, wie beispielsweise 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP), welches bei der chemischen Synthese von Celluloseestern eingesetzt wurde, verzichtet werden.[47] Ein weiterer Vorteil liegt in der Regioselektivität von Enzymen, die es ermöglichen könnte, die drei Alkoholgruppen an Position zwei, drei und fünf der AGU von Cellulose selektiv zu verestern (Schema 1).[3,48] Die enzymatische Modifikation von Cellulose wird im Folgenden aus unterschiedlichen Sichtweisen betrachtet. Zum einen wird der Stand der Forschung bei der enzymatischen Modifikation von Cellulose aufgezeigt, wobei heterogene und homogene Ansätze separat eingeführt werden. Zusätzlich wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Modifikation der Cellulose, basierend auf Modelreaktionen mit dem Monomer (Glucose) und Dimer (Cellobiose) der Cellulose untersucht. Daher wird ebenfalls der Stand der Forschung bei der enzymatischen Veresterung von Zuckern betrachtet. Da bei der homogenen Modifikation von Cellulose die Stabilität und Aktivität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten von großer Bedeutung ist, wird diesbezüglich ebenfalls ein Überblick über die Literatur gegeben.

1.3.2 Heterogene enzymatische Modifikation

Bei der heterogenen enzymatischen Modifikation wird Cellulose im nicht gelösten Zustand, d.h. als Feststoff zu modifiziert. Die bisher publizierten Arbeiten konzentrieren sich hierbei hauptsächlich auf die Veresterung durch Verwendung von Esterasen wie beispielsweise Lipasen und Cutinasen (Tabelle 3). Die heterogene enzymatische Modifikation beschränkt sich dabei auf die Oberflächenmodifikation von Cellulose, da die in-

Tabelle 3: Enzymatische Synthesen von Celluloseestern.

Heterogene Prozesse

Enzym	Substrat	Prozesse	Acyldonor	DS	Literatur
Subtilisin Carlsberg	div. Cellulosen	Pyridin	Vinylester	n.d.[d]	49
Cutinase, PLE	Avicel	[BMIM]Cl-Vorbehandlung	Vinylester	0,06	50
CAL-B, Cutinase, PLE	Baumwolle	Überkritisches Kohlenstoffdioxid	Vinylester	0,12	51
Cutinase, Cutinase+CBM[e]	Baumwolle, Avicel	Isooctan	Octansäure	0,08 - 0,1	52
Cutinase	Baumwolle	Lösungsmittelfrei	Triolein	n.d.	53
Aspergillus niger Lipase	Nanocellulose	DMSO/PBS[b]	Essigsäureanhydrid	0,18	54
Homogene Prozesse					
Proteinase N *Bacillus subtilis*	Cellulose	DMSO-NMMO	Vinylacetat	0,3	55
Aspergillus niger Lipase	Cellulose	DMSO-PF[c]	Vinylacetat	0,33	56
Novozyme 435	Cellulose	Polyether-ILs	Methacrylsäure-methylester	n.d.	48
Candida rugosa Lipase	MCC[a]	[BMIM]Cl-[BMIM]BF_4	Vinylester	1,45	57

[a] mikrokristalline Cellulose, [b] Phosphatgepufferte Salzlösung, [c] Paraformaldehyd, [d] Nicht bestimmt, [e] Kohlenhydratbindedomäne

neren Bereiche der Cellulosepartikel für Enzyme nur erschwert zugänglich sind. Um die Zugänglichkeit von Cellulose für Enzyme zu erleichtern, werden häufig Lösungsmittel verwendet, die Cellulose quellen, wodurch die Kristallinität reduziert wird und somit die enzymatische Katalyse erleichtert werden kann. Xie und Hsieh beschreiben eine Veresterung von Cellulose in dem quellenden Lösungsmittel Pyridin.

Hierbei katalysierten sie mit dem Enzym Subtilisin Carlsberg die Synthese von Celluloseacrylat, sowie Celluloseproponat und zeigten die Veresterung anhand eines Ester-Peaks im FT- IR-Spektrum der jeweiligen Produkte.[49] Angaben zum Substitutionsgrad wurden in dieser Arbeit allerdings nicht gemacht, was eine Abschätzung der Effizienz der Synthese und des Produktspektrums erschwert. Zusätzlich beschreiben sie, dass diese Lipase stereoselektiv die Position 6, d.h. den primären Alkohol der Cellulose

verestert, da sie in einem Kontrollexperiment keinen Ester-Peak nach der enzymatischen Umsetzung von 6-O-Tritylcellulose identifizieren konnten.[49] Um die Enzymaktivität gegenüber ungelöster Cellulose zu erhöhen, entwickelten Gremos und Kollegen eine Zweistufensynthese, basierend auf einer ionischen Flüssigkeit. Hierbei wurde in einem ersten Schritt Cellulose in der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl gelöst und anschließend durch Zugabe von Wasser ausgefällt (regeneriert), wodurch die Kristallinität der Cellulose reduziert und die Zugänglichkeit erleichtert wird. In einem zweiten Schritt wurde diese sogenannte „regenerierte“ Cellulose als Substrat für die enzymatische Umsetzung eingesetzt. Unter Verwendung der Schweineleberesterase (PLE), sowie der Cutinase aus *Fusarium solani* konnten bis zu 1,9 % (DS = 0,06) aller Hydroxygruppen der Cellulose verestert werden.[58] In einer anschließenden Arbeit gelang es Gremos und Kollegen, Cellulose in einer einstufigen Synthese in superkritischem Kohlenstoffdioxid aufzuquellen, dadurch die Zugänglichkeit für Enzyme zu erhöhen und bis zu 4,1 % (DS = 0,12) der Alkohol-Gruppen der Cellulose enzymatisch mit Laurinsäure zu verestern.[51] In dieser Studie wurde des Weiteren gezeigt, dass sowohl die Cutinase von *Fusarium solani*, die Schweineleberesterase (PLE), als auch die Lipase B von *Candida antarctica* (CAL-B), Cellulose verestern können. Weitere Studien beschreiben die enzymatische Veresterung von Cellulose bzw. Baumwolle und betonen das Potenzial dieses Prozesses für die Modifikation von Cellulose und Baumwollfasern für die Textilindustrie, da dadurch wasserabweisende Baumwollfasern produziert werden können. Matamá und Kollegen konnten 3,2 % (DS = 0,1) aller Hydroxygruppen von Baumwolle und 2,6 % (DS = 0,08) aller Hydroxygruppen von mikrokristalliner Cellulose verestern.[51] Hierbei nutzten sie ein Cutinase-Kohlenhydrat-Bindemodul-Fusionskonstrukt, welches bei der Umsetzung von mikrokristalliner Cellulose bessere Ergebnisse als die Wildtyp-Cutinase zeigte.[51] In einer darauf aufbauenden Arbeit wurde beschrieben, dass Baumwolle auch mit einer Cutinase von *Thermobifida fusca* mit Ölsäure verestert werden kann. Durch enzymatische Depolymerisierung mittels Cellulasen wurde der Baumwollester in Mono- und Oligomere überführt. Eine anschließende MALDI-TOF Analyse identifizierte Glucoseoleat, was als weiterer Beweis für die enzymatische Modifikation von Cellulose gedeutet wird.[53] Eine weitere Studie beschreibt die Lipase-katalysierte Veresterung von Nanofibrillierter Cellulose mit Substitutionsgrad von bis zu 0,18 (6 %

der Hydroxygruppen), unter Verwendung von Anhydriden als Acyldonoren. Diese vergleichsweise starke enzymatische Modifikation ist vermutlich in der größeren Oberfläche von Nanofibrillierter Cellulose begründet. Bemerkenswerterweise zeigt diese Studie, dass als Nebenreaktion stabile Acyl-Enzym-Zwischenprodukte durch eine Maillard-Reaktion an die Celluloseoberfläche gebunden werden und die Hydrophobizität des Polymers erhöhen.[54]

Die bisherigen Arbeiten zur heterogenen enzymatischen Modifikation beschreiben alle geringe Substitutionsgrade von maximal 0,18, was üblicherweise auf die niedrige Zugänglichkeit und die hohe Kristallinität der Cellulose zurückgeführt wird. Derartige Oberflächenmodifikationen sind heterogen und eignen sich nur in sehr begrenztem Maße dafür, die Eigenschaften des gesamten Cellulosepolymers zu modifizieren. Daher erschien die heterogene enzymatische Modifikation im Rahmen dieser Dissertation als ungeeignet, da eine Veränderung der thermoplastischen Eigenschaften des Gesamtpolymers im Mittelpunkt stand. Dennoch zeigt die heterogene, auf Oberflächen begrenzte enzymatische Modifikation im Hinblick auf Veränderungen der Fasereigenschaften von Baumwollerzeugnissen Potenzial.[52] Um die Eigenschaften der gesamten Cellulose und nicht nur deren Oberfläche zu modifizieren, ist eine homogene enzymatische Modifikation, im Gegensatz zu heterogenen Ansätzen, vielversprechend.

1.3.3 Homogene enzymatische Modifikation von Cellulose

Die homogene enzymatische Modifikation von Cellulose oder Cellulosederivaten erfolgt in Lösungsmitteln, welche diese Polymere lösen. Diese Art der Modifikation ermöglicht eine deutlich bessere Zugänglichkeit des Polymers für Enzyme, im Gegensatz zur heterogenen Synthese. Eines der größten Probleme der heterogenen Synthese liegt in den potenziell denaturierenden Eigenschaften der verwendeten Lösungsmittel, welche sich häufig durch hohe Salzkonzentrationen auszeichnen.[53,59,60] Die meisten Studien konzentrieren sich auf die enzymatische hydrolytische Spaltung von Cellulose, mit dem Ziel, den fermentativen Abbau zu beschleunigen und die Nutzung von Lignocellulose zu erleichtern.[61-63] Hierbei gab es bereits unterschiedliche Versuche, die Enzymaktivität von Cellulasen in diesen salzhaltigen Lösungsmitteln durch gerichtete Evolution zu steigern. Obwohl es möglich war, die Salztoleranz von Cellulasen zu erhö-

hen, wurden nur Restaktivitäten von 30-40 % in 30 %-igen Salzkonzentrationen gemessen.[60,64] Bei höheren Salzkonzentrationen zeigten die optimierten Cellulasen jedoch weiterhin keine Aktivität. Allerdings benötigt das Lösen von Cellulose üblicherweise deutlich höhere Salzkonzentration und bereits geringe Mengen von Wasser können zu einem Ausfällen der Cellulose führen.

Esterasen, wie beispielsweise Lipasen sind sehr stabile Enzyme, die in verschiedenen organischen Lösungsmitteln für die Biokatalyse eingesetzt werden.[65] Dies macht Esterasen zu vielversprechenden Kandidaten für die homogene enzymatische Modifikation von Cellulose. Dennoch gibt es bisher nur sehr wenige Studien, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzen. Eine der ersten Arbeiten nutzte Celluloseacetat als Substrat für eine zusätzliche Veresterung mit Fettsäuren, welche durch das Enzym *Candida antartica* Lipase (Novozyme SP435), katalysiert wurde. Diese Studie zeigte einen 2 %-igen Anstieg der Esterbildung des Celluloseesterprodukts.[66] Im Gegensatz zu der Synthese, ausgehend von dem Substrat Celluloseacetat, muss bei der Veresterung von nativer Cellulose mit deutlich polareren und potenziell denaturierenden Lösungsmitteln gearbeitet werden. Klohr und Kollegen berichten, dass Cellulose in Mischungen aus NMMO und DMSO gelöst werden und anschließend enzymatisch, mit Essigsäurevinylester, verestert werden kann, wobei sie einen Substitutionsgrad von 0,3 berichten.[55] In einer weiteren Studie wurde Cellulose in einer Mischung aus DMSO und Paraformaldehyd gelöst und anschließend konnten enzymatisch 11 % der Alkoholgruppen (DS = 0,33) der Cellulose acetyliert werden.[56] Zhao und Kollegen designten neuartige polyetherhaltige ionische Flüssigkeiten, welche Cellulose lösen können und besonders enzym-kompatibel sind. In diesen ionischen Flüssigkeiten beschreiben sie die enzymatische Veresterung von Cellulose, sowie deren Stereoselektivität an Position 6, machten allerdings keine Angaben über Substitutionsgrade, was eine Abschätzung der Syntheseeffizienz erschwert.[48] In einer kürzlich publizierten Studie wurden ionische Flüssigkeiten, welche üblicherweise eine gute Enzymaktivität ermöglichen ([BMIM]BF_4, [BMIM]PF_6), mit ionischen Flüssigkeiten vermengt, die Cellulose gut lösen, aber einen negativen Effekt hinsichtlich Enzymaktivität besitzen ([BMIM]Cl). In diesen Mischungen beschreiben sie die enzymatische Synthese von Cellulosefettsäureestern mit Substitutionsgraden von bis zu 1,2.[57] Allgemein zeigen die bisher publizierten Arbeiten zur ho-

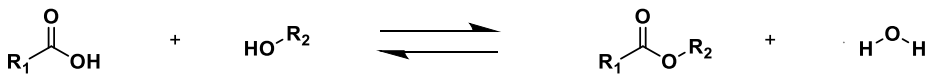
mogenen Synthese tendenziell höhere Substitutionsgrade im Vergleich zur heterogenen Synthese, was das Potenzial dieser Synthesestrategien unterstreicht.

1.3.4 Enzymatische Veresterung von Zuckern

Zuckertenside bestehen aus einem polaren Teil, dem Zucker und einem unpolaren Teil, z.B. einer Fettsäure, welcher kovalent mit der Zuckereinheit verbunden ist. Im Fall der Zuckerfettsäureester ist der Zucker mittels Esterbindung mit einer Fettsäure verknüpft. Aufgrund der amphiphilen Struktur der Zuckerfettsäureester können sie als Tenside wirken. Zuckertenside sind biologisch abbaubar und erst in sehr hohen Konzentrationen gesundheitlich bedenklich, was ihre Anwendung in verschiedenen Bereichen begünstigt.[67] Außerdem sind Zuckerfettsäureester geruchs- und geschmacksneutral, was ihre Nutzung in Nahrungsmitteln oder als Kosmetikzusatzstoff fördert.[68] Zusätzlich zeigen einige Zuckerfettsäureester einen inhibierenden Effekt auf mikrobielles Wachstum.[69] Aufgrund dieser positiven Eigenschaften von Zuckerfettsäureestern gibt es bereits viele Arbeiten zur enzymatischen Synthese dieser Substanzen. Verschiedene Hydrolasen, wie beispielsweise Lipasen und Esterasen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Mono-, Di- und Trisaccharide mit Fettsäuren zu verestern, untersucht. Hierbei gibt es Studien, die freie Fettsäuren oder verschiedene Ester der Fettsäuren als Substrate einsetzen.[70,71] Grundsätzlich ist zu beachten, dass diese Hydrolasen die Fähigkeit besitzen, einen Ester zu bilden, sowie diesen auch zu spalten (Hydrolyse). Zusätzlich wird auch die Umesterung, ausgehend von Carbonsäureestern, katalysiert. Der katalytische Mechanismus des Enzyms basiert auf einer katalytischen Triade, welche aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat aufgebaut ist. Das Serin wird durch Interaktion mit Histidin bzw. Aspartat deprotoniert, wodurch eine aktivierte Alkoxidspezies des Serins entsteht. Das Alkoxidion des Serins wirkt als Nucleophil und greift die Carbonylgruppe des Substrates an, wobei ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt entsteht und im Falle einer Umesterung, der Alkohol freigesetzt wird. Anschließend folgt ein nukleophiler Angriff eines Nukleophils – wie beispielsweise Wasser oder eines Alkohols – was zu einer Substratfreisetzung (Ester oder Säure) und Wiederherstellung des ursprünglichen aktiven Zentrums führt.[72,73]

Viele Lipasen zeigen zunächst mit ansteigender Substratkonzentration einen nur geringfügigen Anstieg in ihrer Aktivität, während sie ab einer kritischen Konzentration, die oft mit der Sättigung einhergeht, einen sprunghaften Anstieg in der Enzymaktivität zeigen. Aufgrund der erhöhten Aktivität nach dem Erreichen der Sättigung und der damit verbundenen Phasentrennung wird dieser Effekt auch als „Oberflächenaktivierung“ bezeichnet.[72] Häufig wird diese Oberflächenaktivierung durch Konformationsänderungen erklärt, wobei sich eine Schleife an der Oberfläche des Enzyms, der sogenannte *lid* (Deckel) den Eingang zum Aktiven Zentrum blockiert. Es existieren allerdings auch andere Erklärungsmodelle, welche die Bedeutung einer erhöhten Substratverfügbarkeit, sowie deren Orientierung, an der Grenzfläche betonen.[72] Es zeigen allerdings nicht alle Lipasen eine „Oberflächenaktivierung“ wie beispielsweise die CAL-B, welche in der hier vorliegenden Arbeit häufig verwendet wurde.[74,75]

Ob ein Ester gebildet oder gespalten wird, hängt insbesondere von der Wasserkonzentration bzw. dem Reaktionsgleichgewicht ab. Da bei der Veresterung einer Carbonsäure mit einem Alkohol Wasser frei wird (Schema 6) und umgekehrt bei einer Esterspaltung Wasser verbraucht wird, ist es von großer Bedeutung, die Menge an Wasser zu minimieren bzw. das entstehende Wasser bei der Esterbildung abzuführen.[76] Hierfür wurden bereits verschiedene Konzepte entwickelt. Das Verwenden von wasserfreien Lösungsmitteln für die Synthese von Zuckerestern ist bedeutend. Dies kann zum einen mithilfe der Schlenck-Technik realisiert werden, oder über das Trocknen mit Molekularsieb. Im Hinblick auf großtechnische Anwendungen wurde beispielsweise der Wasserentzug mittels niedrig siedender Azeotrope in Ethylmethylketon-Hexan Mischungen als Reaktionsmedium vorgeschlagen. Dieses Konzept ermöglicht den Wasserabzug bei Temperaturen, bei denen das Enzym CAL-B nur minimal deaktiviert wird.[70] Neben der klassischen Veresterung werden häufig Umesterungsreaktionen, ausgehend von Methyl- und Vinylestern, eingesetzt, um Zuckerester zu



Schema 6: Schematische Darstellung einer Veresterung (von links nach rechts) bzw. Hydrolyse (von rechts nach links).

synthetisieren.[71] Umesterungsreaktionen sind zwar wasserneutral, dennoch ist aufgrund der Gefahr der Hydrolyse der Ester-Substrate, sowie der Produkte, eine Begrenzung des Wassergehalts notwendig.

Da Cellulose aus vielen Glucose- bzw. Cellobioseeinheiten aufgebaut ist, wird im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Veresterung dieser Mono- und Disaccharideinheiten als Modellreaktion für die Veresterung von Cellulose untersucht. Glucose wird neben Fructose und Saccharose häufig als Substrat für die Synthese von Zuckerfettsäureestern verwendet.[77] Yan und Kollegen konnten unter Einsatz von äquimolaren Substratverhältnissen und unter permanenter Wasserabscheidung 93 % Umsatz innerhalb von 48 Stunden erzielen.[70] Andere Quellen zeigen den Nutzen von Vinylestern als Acyldonoren bei der enzymatischen Synthese, wobei Ausbeuten von 89 %, mit deutlich niedrigerem apparativen Aufwand, realisiert werden konnten.[71] Ein häufig verwendetes Enzym bei der enzymatischen Modifikation von Glucose ist die *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B), die unter verschiedenen Produktnamen und Präparationen kommerziell erhältlich ist. Beispielsweise ist die Enzympräparation Novozyme 435, die häufig für die Synthese von Zuckerestern verwendet wird, eine auf stark porigem Acrylpolymer immobilisierte CAL-B.[78] Hierbei ist anzumerken, dass die Immobilisierung von Enzymen auf Trägermaterialien ihre Lösungsmitteltoleranz bzw. ganz allgemein ihre Stabilität erhöhen kann. Zusätzlich wird insbesondere die CAL-B in organischen Lösungsmitteln sehr häufig eingesetzt, da dieses Enzym eine hohe Lösungsmitteltoleranz, als auch eine gute Aktivität bei erhöhten Temperaturen zeigt.[79] Dennoch wurden auch weitere Lipasen auf ihre Fähigkeit, Zucker zu verestern, untersucht: Hierzu gehören die *Rhizormucor miehei* Lipase, Schweinepankreas Lipase, *Candida rugosa* Lipase, sowie weitere immobilisierte Enzyme wie *Thermomyces lanuginosus* Lipase, immobilisiert auf Celite, *Pseudomonas* sp. Lipase, immobilisiert auf Toyonite und *Penicillium chrysogenum Lipase,* immobilisert auf Celite.[77,80] Viele dieser Lipasen zeigen Stereoselektivität gegenüber bestimmten Alkoholgruppen von Zuckern. Beispielsweise zeigten Ganske und Bornscheuer, dass CAL-B ausschließlich die Position 6 der Glucose, also den primären Alkohol, verestert.[71] Diese Stereoselektivität von Enzymen ermöglicht es, den Substitutionsgrad der Zucker mit Fettsäuren zu beschränken. Dies ist wichtig, da eine höhere bzw. vollständige Substitution der Zucker zu anderen bzw. schlechteren Tensid-

Eigenschaften führen kann. So kann vermutet werden, dass eine vollständige Substitution von Zuckern mit Fettsäure den polaren Anteil der Zucker teilweise maskiert und damit den amphiphilen Charakter reduziert.

Neben der Synthese von Zuckerestern aus Glucose wurde die Synthese von Disaccharid-Fettsäureestern ebenfalls bereits intensiv untersucht. Degn und Zimmerman optimierten die enzymatische Glucoseester-Synthese für CAL-B durch Variation von verschiedenen organischen Lösungsmitteln. Anschließend untersuchten sie, inwieweit der Umsatz von Disacchariden zu Disaccharidestern möglich ist und fanden Enzymaktivität für Glucose, Fructose, Maltose und Methylglucoside. So konnten beispielsweise innerhalb von 24 Stunden 34 mg/ml Glucosemyristat synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu fanden sie keinen Umsatz von Lactose, Cellobiose und Maltotriose.[81] Chen und Kollegen hingegen synthetisierten Disaccharidlinoleate aus Trehalose, Maltose und Cellobiose. Sie beschreiben die Cellobioselinoleat-Synthese als deutlich langsamer, als die der beiden anderen Disaccharide. Zusätzlich bestimmten sie die Tensidaktivitäten der drei Disaccharide und fanden die schlechtesten Tensideigenschaften (niedrige Oberflächenaktivität) bei Cellobioselinoleat.[82] Dies verdeutlicht das bisher geringe Interesse und die geringe Zahl an Studien bezüglich der Synthese von Cellobiosefettsäureestern. Als Modelsubstrat für eine potenzielle enzymatische Veresterung von Cellulose ist allerdings Cellobiose als Wiederholungseinheit der Cellulose bedeutend. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit die enzymatische Modifikation von Cellobiose als Modelsubstrat für die Veresterung von Cellulose untersucht.

1.3.5 Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten

Das natürliche Lösungsmittel für enzymatische Reaktionen ist Wasser. Die katalytischen Eigenschaften von Enzymen haben sich in Wasser evolviert und auch die komplexen Faltungsprozesse nach der ribosomalen Proteinsynthese, bei dem der hydrophobe Effekt bedeutend ist, haben sich in Wasser entwickelt. Dennoch zeigen verschiedene Enzyme in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln auch Aktivität, was ihr Anwendungspotenzial signifikant erhöht. Während verschiedene Esterasen in Wasser die hydrolytische Esterspaltung katalysieren, können sie in wasserfreien Medi-

en eine Vielzahl anderer Reaktion, wie beispielsweise eine Veresterung oder Umesterung katalysieren.[83] Hierbei liegt der Vorteil von wasserfreien Lösungsmitteln in einer Verschiebung des chemischen Gleichgewichts durch niedrigere Konzentrationen bzw. Aktivitäten von Wasser. Somit können Reaktionen durchgeführt werden, die in Wasser inhibiert sind. Enzyme zeigen teilweise in organischen Lösungsmitteln eine höhere Thermostabilität, da viele organische Lösungsmittel schwächer mit Proteinen interagieren als Wasser. Beispielsweise besitzen Enzyme in bestimmten organischen Lösungsmitteln eine geringere Flexibilität und auch die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen ist aufgrund des fehlenden Wassers limitiert.[83] Daher sind in organischen Lösungsmitteln höhere Synthesetemperaturen möglich, was das Abführen von Nebenprodukten, wie beispielsweise Methanol, Acetaldehyd oder Wasser aus dem Reaktionsansatz durch Verdampfung oder Evaporation erleichtert und somit das Gleichgewicht aktiv in Richtung des gewünschten Produktes verschoben werden kann. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln besteht, wenn die verwendeten Substrate besser gelöst werden können als in Wasser.

Organische Lösungsmittel zeigen allerdings auch denaturierende Eigenschaften gegenüber Enzymen und Proteinen. Hierbei wird Wasser, welches an der Oberfläche von Enzymen gebunden ist und deren natürliche Faltung gewährleistet, entzogen. Dabei werden polaren Lösungsmitteln stärkere denaturierende Eigenschaften zugeschrieben als unpolaren, da diese stärker mit Wasser wechselwirken. Daher wird häufig der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient – als Maß für die Polarität eines Lösungsmittels – als Indikator für die „Enzym-Kompatibilität“ herangezogen.[84] Darum werden bei der enzymatischen Synthese von Biodiesel häufig unpolare Lösungsmittel wie Hexan, Cyclohexan, Heptan, Petroleumether und Isooctan eingesetzt. Allerdings zeigen auch hydrophilere Lösungsmittel, wie 1,4-Dioxan und *tert*-Butanol, hohe Umesterungsraten, da diese Lösungsmittel eine gute Löslichkeit von Substraten und Produkten der Biodieselproduktion gewährleisten.[85] Dieses Beispiel verdeutlicht, dass auch in organischen Lösungsmitteln nicht nur potenziell denaturierende Effekte, sondern auch die Löslichkeit von Substraten und Produkten für die Gesamteffizienz eines enzymatischen Prozesses, bedeutend sind.

Wie bei konventionellen organischen Lösungsmitteln werden auch bei enzymatischen Synthesen in ionischen Flüssigkeiten unpolare Vertreter bevorzugt eingesetzt. So werden die verhältnismäßig unpolaren ionischen Flüssigkeiten 1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat ([BMIM]PF_6) und 1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborat ([BMIM]BF_4) häufig für enzymatische Reaktionen verwendet.[86,87] So zeigten Ganske und Bornscheuer, dass die enzymatische Synthese von Glucosefettsäureestern in diesen ionischen Flüssigkeiten durchgeführt werden kann.[88,89] Im Gegensatz hierzu gelten polare ionische Flüssigkeiten als weniger enzymfreundlich und ermöglichen eine geringere Enzymaktivität.[72,90] Für das Lösen von Cellulose und eine potenzielle homogene enzymatische Cellulosemodifikation sind allerdings insbesondere polare ionische Flüssigkeiten wie 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid ([BMIM]Cl), 1-Butyl-3-methylimidazoliumacetat ([BMIM]OAc), 1-Ethyl-3-methylimidazoliumchlorid ([EMIM]Cl) und 1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat ([EMIM]OAc) interessant. Für die enzymatische Modifikation von Cellulose müssen also Reaktionssysteme entwickelt werden, in denen Cellulose löslich ist und Enzyme trotz der hohen Polarität des Lösungsmittels aktiv die Veresterung von Cellulose katalysieren. Die Herausforderung, Enzymaktivität bzw. eine enzymatische Veresterung in sehr polaren Lösungsmittelumgebungen zu ermöglichen, ist allerdings nicht auf ionische Flüssigkeiten beschränkt, sondern gilt prinzipiell für alle Celluloselösungsmittel.

1.4 Zielsetzung

Neuartige Celluloseester besitzen das Potenzial, bessere thermoplastische Eigenschaften aufzuweisen, als das industriell erzeugte Celluloseacetat. Daher ist es das Ziel der hier vorgelegten Arbeit, Celluloseester mit langen Seitenketten zu erzeugen, die über übliche heterogene Synthesen, in denen Cellulose nicht gelöst vorliegt, nicht zugänglich sind.

Um die sterische Hinderung, welche die Synthese von Celluloseestern mit langen Seitenketten erschwert, zu überwinden, muss die angestrebte Synthese homogen sein, d.h. Cellulose wird in einem Lösungsmittel gelöst und darin chemisch modifiziert. Hierbei stehen insbesondere spezielle ionische Flüssigkeiten im Fokus, da diese die Fähigkeit besitzen, Cellulose zu lösen.

Die meisten bisher in der Literatur beschriebenen Synthesen beruhen auf reaktiven Acyldonoren, wie Fettsäurechloriden, oder benötigen lange Reaktionszeiten, um hohe Substitutionsgrade zu erzielen. Da reaktive Acyldonoren allerdings die verwendeten Celluloselösungsmittel zersetzen können und dies das Recycling der teuren Celluloselöungsmittel erschwert, ist der Einsatz von weniger reaktiven Acyldonoren bevorzugt.

Der Einsatz von weniger reaktiven Acyldonoren könnte durch die Verwendung enzymatischer Katalysatoren realisiert werden. Daher soll in dieser Arbeit zunächst untersucht werden, inwieweit sich Enzyme als Katalysatoren für eine homogene Veresterung von Cellulose eignen. Zusätzlich können gegebenenfalls auch andere Synthesestrategien erforscht werden, sofern die verwendeten Enzyme, Cellulose nicht als Substrat akzeptieren.

Die angestrebte Synthese soll im Hinblick auf Reaktionszeit, Acyldonormenge, Reaktionstemperatur und Lösezeit optimiert, in einem größeren Maßstab durchgeführt und das Recycling des Lösungsmittels untersucht werden. Zusätzlich sollen die thermoplastischen Eigenschaften der hergestellten Celluloseester im Rahmen einer Kooperation mit dem Institut für Kunststofftechnik verglichen werden, um die Verwendbarkeit als Biopolymer bewerten zu können.

2

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: Sigma Aldrich (St. Louis, US), Carl-Roth (Karlsruhe, D) und TCI-Deutschland GmbH (Eschborn, D). Alle ionischen Flüssigkeiten wurden von der Firma IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D) bezogen. Die verwendete α-Cellulose wurde von Sigma Aldrich (St. Louis, US) bezogen und besitzt einen Wassergehalt von 5,3 % w/w und ein Viskositätsmittel der Molmasse (DP_η) von 1072. Die Messung des Wassergehalts und des Polymerisationsgrades wurde extern am ITCF Denkendorf nach EWN-Methode und Viskosimetrie bestimmt. Die verwendeten ionischen Flüsigkeiten sind in Tabelle 4 und Spezialchemikalien in Tabelle 5 aufgelistet. Informationen über die verwendeten Enzyme können Anhang 15 und Anhang 16 entnommen werden.

Tabelle 4: Liste von verwendeten ionischen Flüssigkeiten.

Abkürzung	*Ionische Flüssigkeit*	*Hersteller*
[EMIM]OAc	1-Ethyl-3-methylimidazoliumacetat Reinheit > 95 %	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D)
[BMIM]OAc	1-Butyl-3-methylimidazoliumacetat Reinheit > 95 %	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D)
[EMIM]Cl	1-Ethyl-3-methylimidazoliumachlorid Reinheit > 95 %	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D)
[BMIM]Cl	1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid Reinheit > 95 %	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D)
[BMIM]PF_6	1-Butyl-3-methylimidazoliumhexafluorophosphat Reinheit > 95 %	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D)
[BMIM]BF_4	1-Butyl-3-methylimidazoliumtetrafluoroborate Reinheit > 95 %	IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH (Heilbronn, D)

Tabelle 5: Liste von verwendeten Spezialchemikalien.

Abkürzung	*Chemikalie*	*Hersteller*
d-TFA	deuterierte Trifluoressigsäure	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
THF	Tetrahydrofuran unstabilisiert	Carl-Roth (Karlsruhe, D)
NMMO	N-Methylmorpholin-N-oxid	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
-	Trehalosedihydrat	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
-	Neodecansäurevinylester	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
-	Laurinsäurevinylester	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
-	Benzoesäurevinylester	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
-	Octansäurevinylester	TCI-Deutschland GmbH (Eschborn, D)
-	Pivalinsäurevinylester	Sigma Aldrich (St. Louis, US)
-	2-Ethylhexansäurevinylester	TCI-Deutschland GmbH (Eschborn, D)
-	Palmitinsäurevinylester	TCI-Deutschland GmbH (Eschborn, D)
-	Laurinsäureanhydrid	TCI-Deutschland GmbH (Eschborn, D)
-	Laurinsäurechlorid	Fluka, Sigma-Aldrich, (Taufkirchen, D)
-	Acetaldehyd	Fluka, Sigma-Aldrich, (Taufkirchen, D)

2.2 Synthese und Experimente

Alle Synthesen und Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, mindestens zweimal durchgeführt.

2.2.1 Enzymatische Umesterungen und Veresterungen in ionischen Flüssigkeiten

Als Modellreaktion wurde die Umesterung von Buttersäureethylester (**18**) mit Butanol (**19**) zu Buttersäurebutylester (**20**) und Ethanol (**21**) durchgeführt und in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten untersucht. Hierbei wurde jeweils 1 ml ionische Flüssigkeit mit 1,5 µl (11 mM) Buttersäureethylester und 4,12 µl (45 mM) Butanol versetzt und in 20 ml „Headspace“-Gefäße überführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 mg immobilisierter CAL-B (CAL-B immobilisiert auf Immobead 150, Anhang 15) gestartet und 2 Tage bei 50°C im geschlossenen „Headspace“-Glasgefäß gerührt. Im Falle von Reaktionen in [BMIM]Cl wurde als Reaktionstemperatur 67°C - 70°C gewählt, um sicher zu stellen, dass [BMIM]Cl flüssig vorliegt. Anschließend wurden die Proben mittels GC-MS-Headspace analysiert.

Die Umesterung von Buttersäuremethylester mit Ethanol zu Buttersäureethylester und Methanol (**27**) wurde in [BMIM]Cl untersucht. Hierbei wurden 5,84 µl (50 mM) Buttersäuremethylester (**23**) und 3 µl (50 mM) Ethanol in 1 ml [BMIM]Cl angesetzt, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 mg immobilisierter CAL-B gestartet, für 10 Tage bei 67°C inkubiert und mittels GC-MS-Headspace analysiert.

Zusätzlich wurde die Veresterung von Buttersäure (**26**) mit Ethanol untersucht. Es wurden 4,72 µl Buttersäure (50mM), 3 µl (50mM) Ethanol und 25 mg CAL-B eingesetzt und bei 67°C für 4 Tage inkubiert und anschließend mit GC-MS-Headspace analysiert.

2.2.2 Enzymatische Synthese von Zuckerlauraten

Der Standardansatz bei der enzymatischen Synthese von Glucoselaurat bestand aus 300 mg ionischer Flüssigkeit bzw. Mischungen aus unterschiedlichen ionischen Flüssigkeiten, 130 µl Laurinsäurevinylester (**29**, 0,5 mmol), 50 mg Glucosemonohydrat (0,25 mmol) und 25 mg immobilisierter CAL-B. Je nach Reaktionsdesign wurden 200 mg Mol-

sieb (3 Å) zugegeben. Die Reaktion wurde 16 Stunden bei 50°C und 400 rpm geschüttelt und anschließend mit LC-MS und LC-ELSD analysiert.

Die enzymatische Synthese in [BMIM]Cl wurde zusätzlich mit erhöhtem Zuckergehalt untersucht. Hierbei wurden 300 mg [BMIM]Cl (**5**), 300 mg Glucose und 100 µl Laurinsäurevinylester (**29**) eingesetzt. Zusätzlich wurden 200 µl *tert*-butanol und 10 µl ddWasser hinzugegeben, um die Viskosität der Lösung zu reduzieren.

Die Untersuchungen bezüglich des NMMO-DMSO-Systems wurden in einer Mischung aus 0,28 mg NMMO, 0,28 ml DMSO und 40 µl ddWasser durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl Laurinsäurevinylester und 25 mg immobilisierter CAL-B gestartet und 16 Stunden bei 50°C inkubiert.

Für die enzymatische Umsetzung in DMSO wurde 300 mg Glucosemonohydrat bzw. 200 mg Cellobiose/Maltose/Trehalose in 500 µl DMSO gegeben. Anschließend wurden 100 µl Laurinsäurevinylester und 25 mg immobilisierte CAL-B zugegeben und für 16 Stunden bei 50°C und 400 rpm geschüttelt.

Zusätzlich wurden in einem Experiment verschiedene Mengen an Glucosemonohydrat in DMSO eingesetzt. Es wurden Konzentrationen zwischen 2 % w/v und 80 % w/v[1] gewählt. Ansonsten wurde die Reaktion wie oben beschrieben durchgeführt.

Bei dem Cellobiose-Enzymscreening wurden jeweils 30 µl bzw. 30 mg der verschiedenen Enympräparationen eingesetzt. Da hierbei viele unterschiedliche Enzyme verwendet wurden, bei denen die Thermostabilität teilweise nicht bekannt ist, wurde die Reaktion – im Gegensatz zu den Experimenten mit immobilisierter CAL-B – bei 30°C durchgeführt. Die untersuchten Enzyme sind in Anhang 15 und Anhang 16 aufgeführt.

Bei allen Ansätzen wurden nach der Synthese die Suspension bzw. Lösung durch Schütteln homogenisiert und fünffach mit Acetonitril verdünnt. Nicht gelöste Zucker wurde durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand mittels HPLC analysiert.

[1] Hierbei bezieht sich % w/v auf das prozentuale Verhältnis des Gewichts von Glucosemonohydrat und des Volumens von DMSO.

2.2.3 Enzymatische Synthese von Celluloselaurat

Der Ansatz für die enzymatische Synthese von Celluloselaurat bestand aus 50 mg mikrokristalliner Cellulose, 200 µl Laurinsäurevinylester, 500 µl DMSO und 30 mg immobilisierter Schweineleberesterase. Die Reaktionszeit betrug 72 Stunden, die Reaktionstemperatur 30°C und die Schüttelfrequenz 400 rpm. Anschließend wurde die Reaktion durch Waschen mit Methanol beendet, wodurch das Enzym, DMSO und Laurinsäurevinylester abgetrennt wurden. Ein Waschschritt beinhaltete das Waschen mit 50 ml Methanol, wobei 3 bis 6 Waschschritte durchgeführt wurden. Anschließend wurde das Polymer bei 70°C für 2 Stunden getrocknet und mittels FT-IR analysiert.

2.2.4 Chemische Acylierung von Glucose in [EMIM]OAc

Glucose wurde in [EMIM]OAc gelöst, um 350 mg einer Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mmol/mg zu erzeugen.

Es wurden 350 mg der Glucoselösung in [EMIM]OAc mit einer Glucosekonzentration von 0,83 mmol/mg hergestellt. Um die Temperaturabhängigkeit der Reaktion zu untersuchen, wurden 2 mol Laurinsäurevinylester je mol Glucose eingesetzt und in einem Thermomixer Comfort von Eppendorf AG (Hamburg, DE) bei 600 rpm für 22 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Um die Zeitkinetik der Reaktion zu bestimmen, wurden 3 mol Laurinsäurevinylester je mol Glucose eingesetzt und bei 60°C inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Proben um den Faktor 4 mit Acetonitril verdünnt und mittels HPLC analysiert.

2.2.5 Chemische Acylierung von Glucose in verschiedenen Lösungsmitteln

Die chemische Acylierung wurde in [BMIM]Cl, [EMIM]Cl, [EMIM]OAc, [BMIM]OAc und DMSO untersucht. Hierfür wurden 300 mg Lösungsmittel mit 50 mg Glucose und 130 µl Laurinsäurevinylester vermengt. In [BMIM]Cl, [EMIM]Cl und DMSO wurden identische Ansätze durchgeführt, bei denen zusätzlich 40 mg Natriumacetat hinzugegeben wurden. Anschließend wurden die Proben für 1 Stunde bei 80°C inkubiert, um den Faktor 4 mit Acetonitril verdünnt und mittels HPLC analysiert.

2.2.6 Chemische Acylierung von Cellulose in [EMIM]OAc

Durch 16-stündiges Rühren mit einem KPG-Rührer wurde eine 3 % w/w Lösung von α-Cellulose bei 80°C in [EMIM]OAc hergestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mol Vinylester, Laurinsäureanhydrid, oder Lauroylchlorid je AGU gestartet und anschließend für 4 Stunden bei 80°C gerührt. Die Menge an Vinylester wurde gegebenenfalls variiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde 1 ml Probe entnommen und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Das Polymer wurde durch die Zugabe von 50 % v/v Wasser ausgefällt und anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Die flüssige Phase wurde verworfen, das Polymer wurde mit 4 x 50 ml Methanol gewaschen und anschließend bei 60°C getrocknet. Zusätzlich wurde die Menge an eingesetztem Vinylester (2 bis 10 mol je AGU) und die Reaktionstemperatur (40°C - 110°C) variiert, um den Einfluss dieser Parameter auf die Reaktion zu untersuchen. Im Fall von Cellulosepivalat, Cellulose-2-ethylhexyloat und Celluloseneodecanoat wurde das Produkt in Methanol gelöst und anschließend durch die Zugabe von Wasser ausgefällt und für 14 Stunden lyophilisiert.

2.2.7 Upscaling der chemischen Acylierung von Cellulose in [EMIM]OAc

Die Acylierung von Cellulose wurde in einem 5-Liter fassenden, doppelwandigen Glasreaktor durchgeführt. Ein Wasserbadthermostat (Haake fision C1, Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, D) regelte die Reaktionstemperatur auf 80°C. Die Reaktionsmischung wurde durch einen KPG Rührer gemischt (Janke&Künkel, IKA-Werk, Staufen im Breisgau, D). 2,5 kg [EMIM]OAc bzw. die recycelte Menge an ionischer Flüssigkeit wurde in den Glasreaktor gegeben und auf 80°C erhitzt, anschließend wurde 3 % w/w Cellulose schrittweise zugegeben, bis der Lösungsprozess abgeschlossen war. Die Zugabe von 4 mol Laurinsäurevinylester je AGU erfolgte graduell über einen Tropftrichter, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und bei -20°C gelagert, bis die Analyse erfolgte. Nach 4 Stunden wurden 2,5l Wasser zugegeben, was zu einem Ausfällen des Produktes führte – welches aufgrund seiner geringen Dichte nach 16 stündiger Sedimentation aufschwamm. Die untere Phase aus ionischer Flüssigkeit und Wasser wurde über ein Ablaufventil am Boden des Reaktors abgelassen. Das zurückbleibende Polymer wurde mit 4 x 2,5 l Methanol ge-

waschen und für 14 Stunden bei 70°C getrocknet, um das restliche Methanol zu verdampfen.

2.2.8 Recycling der ionischen Flüssigkeit

Das Recycling der ionischen Flüssigkeit wurde durch die Evaporation des Wassers aus dem Gemisch aus ionischer Flüssigkeit und Wasser realisiert. Hierbei wurde ein Stickstoffstrom durch die Mischung geleitet, um die Evaporation bei 95°C zu beschleunigen. Die Evaporation wurde gestoppt, nachdem kein Wasserdampf mehr sichtbar war. Die Recyclingeffizienz wurde anschließend gravimetrisch bestimmt.

2.2.9 Chemische Acylierung von Cellulose in [BMIM]Cl

Die Acylierung von Cellulose wurde in [BMIM]Cl nach dem Protokoll von Barthel und Heinze durch Zugabe von Lauroylchlorid durchgeführt.[39] Für das Rühren der Reaktion wurde ein KPG-Rührer verwendet, um eine Homogenisierung der hochviskosen Reaktionsmischung zu gewährleisten.

2.2.10 Synthese von EHEMIM

EHEMIM (**40**) wurde in einem Zweihalskolben mit Rückflusskühler synthetisiert. Die Synthese von EHEMIM (**40**) mit einem Kationenanteil unter 50 % erfolgte bei Raumtemperatur, während die Synthese von [EHEMIM][EMIM]OAc mit höherem Kationenanteil bei 80°C durchgeführt wurde. In den Zweihalskolben wurde [EMIM]OAc vorgelegt und die Reaktion anschließend durch die Zugabe von Acetaldehyd (**31**) gestartet, welches in äquimolaren Verhältnissen bzw. einem 10 %-igen Überschuss entsprechend dem gewünschten Kationenverhältnis, eingesetzt wurde. Die Zugabe von Acetaldehyd erfolgte in 5 bis 7 Einzelschritten, um zu hohe Temperaturen, welche durch den exothermen Charakter der Reaktion entstehen, zu verhindern.

2.2.11 Synthese von EHEMIM-Estern

Die Synthese von EHEMIM-Estern (**41**) wurde bei 68°C in einer Acetat-basierten ionischen Flüssigkeit mit einem Kationenanteil von 80 % EHEMIM (**40**) und 20 % EMIM unter dem Einsatz von 0,5 mol Vinylester je EHEMIM (**40**) synthetisiert. Die Re-

aktionszeit betrug 1 Stunde. Nach der Synthese wurden 20 µl des Reaktionsansatzes mit 500 µl Acetonitril verdünnt und mittels HPLC-RP-MS analysiert.

2.3 Analytik

2.3.1 GC-MS-Headspace Analyse

Bei der GC-MS-Headspace Analytik wurden jeweils 1 g ionische Flüssigkeit zuzüglich Substrat in 20 ml „Headspace"-Gefäße überführt, das Enzym zugegeben und der Reaktionsansatz gasdicht verschlossen. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 160°C in einem Ofen erhitzt und anschließend 250 µl der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit mit einem Gaschromatographen analysiert. Als Gaschromatograph diente eine GC-MS-QP 2010 von Shimadzu mit einer ZB-Säule (5 % Phenyl-, 95 % Dimethylsiloxan, einer Länge von 30 m und einer Schichtdicke von 0,25 mm). Die Methode beinhaltete einen Split von 1:250 und der Massendetektor detektierte in einem m/z-Bereich zwischen 45 und 200. Das Temperaturprofil startete mit dem Aufheizen auf 60 °C mit 60 °C/min, anschließend wurde die Temperatur innerhalb von 10 Minuten mit 6 °C/min auf 120 °C erhöht und zuletzt innerhalb von 4 Minuten mit 25 °C/min auf 220 °C aufgeheizt.

2.3.2 HPLC-GPC

Die Molekulargewichtsverteilung von Cellulosederivaten wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie bestimmt. Hierbei wurden die zu untersuchenden Celluloseester in Tetrahydrofuran gelöst und anschließend 10 µl der Probe mit einer SDV, Linear M 10 µM, 8 x 300 mm-Säule (SN: 8091503) aufgetrennt. Die Analytik wurde mithilfe des HPLC-System Agilent Technology 1260 ELSD-HPLC durchgeführt. Die Detektion erfolgte durch einen Lichtstreudetektor (ELS-Detektor) bei einer Evaporatortemperatur von 70°C, einer Nebulizertemperatur von 30°C und einem Gasfluss von 1,00 SLM. Die HPLC-Methode verlief isokratisch in nicht stabilisierten THF (Carl-Roth, Karlsruhe, D) bei einer Säulentemperatur von 40°C und einem Fluss von 1,5 ml/min für 10 Minuten. Kalibriert wurde relativ zu einem Polystyrol-Standard, (ReadyCal-Kit Po-

ly(styrene) Mn 474 – 2.520.000 Da, von PSS (Mainz, D). Die Molekulargewichtsverteilungen wurden mit der Software Agilent Cirrus GPC Multi Detector Software bestimmt.

2.3.3 HPLC-RP

Glucoselaurat, Cellobioselaurat, Maltoselaurat und Trehaloselaurat (Mono-, Di-, Tri-, Tetralaurat) wurden mit der "Reversed Phase"-Säule Agilent Eclipse XDP (CN-Säule, 150 x 4,6 mm, 5µm, SN: USBJ001588)) aufgetrennt. Der Laufmittelfluss lag bei 0,8 ml/min und die Temperatur der Säule betrug 35°C. Die Methode verlief in den ersten 3 Minuten isokratisch mit 5 % Acetonitril (ACN), 95 % Wasser und 0,1 % v/v Ameisensäure. Es folgte ein 15-minütiger Gradient von 5 % ACN zu 98 % ACN, wonach die Methode 5 Minuten isokratisch verlief. Zuletzt wurde die Säule für 5 Minuten auf das Startverhältnis von 5% ACN und 95%-Wasser equilibriert. Die Analyten wurden mit dem ELS-Detektor (Agilent Technology 1260 Infinity HPLC-ELSD) detektiert und mit dem HPLC-MS System (Agilent Technologies 6310 Quadrupole MS) identifiziert. Der Massendetektor wurde im API-ES (Electrospray) Modus bei folgenden Bedingungen betrieben: Trocknungsgasfluss 10 l/min, Nebuliser 40 psig, Trocknungsgastemperatur 300°C, +/- V_{cap} 3000 V. Das System wurde im positiven und negativen Scan-Modus betrieben, wobei Massenladungsverhältnisse (m/z) von 100 bis 1500 analysiert wurden. Der ELS-Detektor wurde mit einer Evaporatortemperatur von 40°C, einem Glasfluss von 1 SLM und einer Nebuliser Temperatur von 90°C betrieben. Es wurden jeweils ein bis maximal zehn Mikroliter der Analyte über die HPLC aufgetrennt, wobei die Einspritzvolumina über einem Mikroliter nur bei sehr geringer Produktbildung gewählt wurden. Die Quantifizierung von Zuckerestern erfolgte über die Integration der Produktpeaks des ELS-Detektors. Da keine Standards für Zuckerlaurate verfügbar waren, wurde keine absolute Quantifizierung durchgeführt, sondern lediglich relativ zu anderen Proben die Produktbildung verglichen.

Die Proben der enzymatischen Umsetzung von Glucose bzw. Cellobiose wurden wie oben beschriebenen analysiert. Da hierbei lediglich Zuckermono- und Zuckerdilaurat nachgewiesen werden sollten, wurde eine andere Auftrennung durchgeführt. Die Auftrennung wurde mit der „Reversed phase"-Säule Luna C8 von Phenomenex (50 x 3,0 mm, 3 µm, 100 Å, SN: 432031-2) durchgeführt. Die Methode startete mit ei-

nem 10-minütigen Gradienten, ausgehend von 30 % ACN und 70 % Wasser mit 0,1 % v/v Ameisensäure hin zu 95 % ACN und 5 % Wasser mit 0,1 % v/v Ameisensäure wonach die Methode 3 Minuten isokratisch verlief. Zuletzt wurde die Säule für 5 Minuten auf die Startbedingungen von 30 % ACN und 70 % Wasser equilibriert.

2.3.4 NMR und FT-IR von Celluloseestern

Der Substitutionsgrad (DS) von Celluloseestern wurde durch ^{1}H-NMR mit dem NMR Spectrometer Bruker, Avance 500 oder 700 MHz analysiert. Die chemische Verschiebung (δ) wurde in *parts per million* (ppm), relativ zu dem Standard Tetramethylsilan, angegeben. Hierbei wurden 10 µg/ml Probe in $CDCL_3$, *d*-DMSO oder Mischungen aus beiden gelöst und mit deuterierter Trifluoressigsäure (*d*-TFA) versetzt, um eine Konzentration von 1,67 % v/v zu erhalten. Dadurch wurde sichergestellt, dass nichtmodifizierte Hydroxygruppen der Cellulose ins Tieffeld verschoben werden oder deren Protonen durch Deuteriumatome ersetzt werden, damit diese nicht mit den Signalen vom Cellulosegrundgerüst überlagern. Dies ermöglicht es die Signale des Cellulosegrundgerüstes in Relation zu den Signalen der Seitenketten zu setzen und dadurch den DS-Wert zu bestimmen, wobei diese Strategie auch schon von anderen Gruppen angewendet wurde.[91,92] Die Messungen in *d*-DMSO wurden bei 700 MHz und bei 100°C durchgeführt. Durch die erhöhte Temperatur verschiebt sich das Signal von Wasser-Verunreinigungen von 3,30 ppm zu 3,00 ppm und verhindert so das Überlagern der Wassersignale mit den Signalen des Cellulosegrundgerüst.

Der $DS_{Fettsäure}$ von Celluloseoctanoat, -laurat und -palmitat wurden mittels ^{1}H-NMR, basierend auf den Integralen der terminalen Methylgruppe (I_{Methyl}), bei 0,85 - 0,90 ppm und der Fläche der AGU-Signale (I_{AGU}), bei 3,50 - 5,50 ppm nach Formel 1 bestimmt.

Formel 1: Bestimmung des Substitutionsgrades von Cellulosefettsäureestern.

$$DS_{Fettsäure} = \frac{I_{Methyl} * 7}{I_{AGU} * 3}$$

Im Fall von Cellulose-2-ethylhexyloat wurden die Integrale der Signale der beiden terminalen Methylgruppen ($I_{2*Methyl}$) bei 0,78 - 0,92 ppm und für Cellulosepivalat das Integral der Signale der drei terminalen Methylgruppen ($I_{3*Methyl}$) bei 0,90 - 1,35 ppm und

bei Cellulosebenzoat die Fläche der Signale der fünf Phenylprotonen (I_{Phenyl}) bei 6,90 - 8,10 ppm verwendet, um den jeweiligen DS-Wert mit den nachfolgenden Formeln zu bestimmen (Formel 2, Formel 3 und Formel 4).

Formel 2: Bestimmung des Substitutionsgrades von Cellululosepivalat.

$$DS_{Pivalat} = \frac{I_{3*Methyl} * 7}{I_{AGU} * 9}$$

Formel 3: Bestimmung des Substitutionsgrades von Cellulose-2-ethylhexyloat.

$$DS_{2-Ethylhexyloat} = \frac{I_{2*Methyl} * 7}{I_{AGU} * 6}$$

Formel 4: Bestimmung des Substitutionsgrades von Cellulosebenzoat.

$$DS_{Benzoat} = \frac{I_{Phenyl} * 7}{I_{AGU} * 5}$$

Die Berechnung von $DS_{Neodecanoat}$ erfolgte über die Integration der Signale von allen 19 Neodecanoatprotonen ($I_{Neodecanoat}$) bei 0,70 - 1,70 ppm, da aufgrund der verschiedenen Isomere keine einzelnen Protonensignale separat integriert und den jeweiligen Isomeren zugeordnet werden konnten. Die Berechnung erfolgte nach Formel 5.

Formel 5: Bestimmung des Substitutionsgrades von Celluloseneodecanoat.

$$DS_{Neodecanoat} = \frac{I_{Neodecanoat} * 7}{I_{AGU} * 19}$$

Für Berechnung der zusätzlichen Acetylierung wurde die Integral der Acetat- Methylgruppen Signale (I_{Acetat}) in Relation zu dem Integral der AGU-Signale bei 3,50 - 5,50 ppm gesetzt (Formel 6).

Formel 6: Bestimmung des Substitutionsgrades der zusätzlichen Acetylierung.

$$DS_{Acetat} = \frac{I_{Acetat} * 7}{I_{AGU} * 3}$$

Die FT-IR-Spektren wurde mithilfe eines FT-IR-Spektrometers (Bruker, Vector 22, ausgestattet mit einem MKII golden gate single reflection diamond ATR-System) aufgenommen.

2.3.5 NMR der ionischen Flüssigkeiten

Die Identifikation von 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazolium (EHEMIM) erfolgte durch Auswertung von ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren. Zur weiterführenden Charakterisierung wurde als 2D-NMR-Methode das ^{1}H, ^{1}H-COSY (correlated spectroscopy)-Experiment durchgeführt.

Hierfür wurden ca. 10 mg in 600 µl *d*-DMSO oder $CDCL_3$ gelöst und anschließend am NMR Spektrometer Bruker, Avance 500 MHz analysiert. Das Verhältnis zwischen EHEMIM (**40**) und EMIM wurde durch ^{1}H-NMR bestimmt. Hierfür wurden das Verhältnis der Fläche der Singuletts der Methylgruppen der beiden Imidazoliumkationen, welche Verschiebungen im Bereich von δ = 3,85 - 4,1 ppm zeigen, für die Berechnung nach Formel 7 genutzt.

Formel 7: Bestimmung des Kationenanteils.

$$Kationenanteil = \frac{I_{Methyl(EHEMIM)} * 100}{I_{Methyl(EHEMIM)} + I_{Methyl(EMIM)}}$$

Es ist zu beachten, dass das Signal der Methylgruppe von EHEMIM (**40**) in *d*-DMSO weiter ins Tieffeld verschoben ist, als die Methylgruppe von EMIM. Wird das ^{1}H-NMR allerdings in $CDCL_3$ aufgenommen, liegt die EMIM-Methylgruppe weiter im Tieffeld als die Methylgruppe von EHEMIM.

2.3.6 Löslichkeitsmatrizen

Für das Erstellen der Löslichkeitsmatrizen wurde ein Lösungsmittelvolumen von 500 µl in 2 ml Eppendorfgefäßen vorgelegt. Das Lösungsmittel bestand aus unterschiedlichen

Anteilen an [EMIM]OAc bzw. [EHEMIM]OAc. Zu dem Lösungsmittel wurden unterschiedliche Mengen an Wasser und α-Cellulose hinzugefügt und das System bei 500 rpm in einem Thermomixer Comfort der Firma Eppendorf AG (Hamburg, D) bei 80°C geschüttelt. Nach 6 Stunden wurden die Proben aufgrund ihrer Viskosität und dem Vorhandensein von Gelen oder Partikeln bewertet. Hierbei wurde eine Skala von 0, +, ++ und +++ verwendet, in der 0 die schlechteste Löslichkeit und +++ die beste, vollständige Löslichkeit, angibt.

2.3.7 Bestimmung des Cellulose-Lösungsvermögens

Um zu bestimmen, wieviel Gewichtsprozent Cellulose in einem Lösungsmittel löslich ist, wurden 30 ml des Lösungsmittels in einem 200 ml 2-Halskolben auf 80°C erhitzt und mittels KPG-Rührer gerührt. Anschließend wurde jeweils 1 % w/w Cellulose hinzugefügt und gewartet, bis sich die Cellulose vollständig auflöste, wonach das nächste Prozent Cellulose hinzugefügt wurde. Diese Prozedur wurde mehrfach wiederholt, nach 3 Stunden gestoppt und die Menge an gelöster Cellulose bestimmt.

2.3.8 Abschätzung der Ausbeute der Vinylester-basierten Synthese

Die Berechnung der Produktausbeute der Celluloseestersynthese ist von verschiedenen Faktoren, wie dem $DS_{Acyldonor}$ und dem DS_{Acetat} abhängig, da diese das Produkt bzw. dessen Molekulargewicht definieren. Grundsätzlich kann die theoretische maximale Ausbeute einer Synthese durch die Multiplikation der Substratmenge mit dem Quotienten aus dem Molekulargewicht des Produktes und dem Molekulargewicht des Substrats gemäß Formel 8 berechnet werden.

Formel 8: Theoretisch maximale Ausbeute.

$$Theoretisch\ maximale\ Ausbeute\ [g] = m_{Substrat} * \frac{M_{Produkt}}{M_{Substrat}}$$

$$M_{Produkt} = Molekulargewicht\ des\ Produkts \left[\frac{g}{mol}\right]$$
$$M_{Substrat} = Molekulargewicht\ des\ Substrats \left[\frac{g}{mol}\right]$$
$$m_{Substrat} = Masse\ des\ eingesetzten\ Substrats$$

Für Celluloseester, bestehend aus einer definierten Seitenkette und zusätzlichen Acetatseitenketten, welche in der vorliegenden Arbeit relevant sind, ergibt sich Formel 9:

Formel 9: Theoretisch maximale Ausbeute von Celluloseestern.

$$Cell = Menge\ an\ eingesetzter\ Cellulose\ [g]$$

$$M_{Cell} = Molekulargewicht\ einer\ AGU\ innerhalb\ der\ Cellulose = 162{,}14\ \left[\frac{g}{mol}\right]$$

$$DS_{Acyldonor} = Der\ Substitutionsgrad\ der\ Acylkomponente$$

$$M_{Seitenkette} = Molekulargewicht\ der\ Seitenkette\ z.B.\ Laurins\ddot{a}ure\ 200{,}32\ \left[\frac{g}{mol}\right]$$

$$M_{H_2O} = Molekulargewicht\ von\ Wasser = 18{,}01\ \left[\frac{g}{mol}\right]$$

$$M_{CH_3COOH} = Molekulargewicht\ der\ Essigs\ddot{a}ure = 60{,}05\ \left[\frac{g}{mol}\right]$$

$$Ausbeute = Gravimetrisch\ bestimmte\ Produktausbeute\ [g]$$

$$Theoretisch\ maximale\ Ausbeute\ [g] = Cell * \frac{M_{Cell} + DS_{Acyldonor} * \left(M_{Seitenkette} - M_{H_2O}\right) + DS_{Acetat}(M_{CH_3COOH} - M_{H_2O})}{M_{Cell}}$$

Da sich in der vorliegenden Arbeit, zusätzlich zu der gewünschten Veresterung mit beispielsweise Fettsäuren, auch eine Acetylierung ergibt, wird diese in der Berechnung berücksichtigt. Die Acetylierung konnte jedoch nur für bestimmte Polymere bestimmt werden, was die Berechnung der theoretisch maximalen Ausbeute erschwert. Unter der Annahme einer, für Celluloselaurate konstanten prozentualen zusätzlichen Acetylierung von 11,1 %, die bei niedrig substituierten Celluloselauraten bestimmt werden konnte, kann für Celluloselaurat mit höherem Substitutionsgrad eine theoretisch maximale Ausbeute gemäß Formel 10 berechnet werden. Unter Berücksichtigung der gravimetrisch bestimmten Ausbeute kann die prozentuale Ausbeute der Synthese ermittelt werden (Formel 11).

Formel 10: Abschätzung der theoretisch maximalen Ausbeute von Celluloselaurat.

Unter der Annahme,

$$DS_{Acetat} = DS_{Acyldonor} * 0{,}11$$

ergibt sich:

$$Theoretisch\ maximale\ Ausbeute\ [g] = Cell * \frac{162{,}14\ \ + DS_{Acyldonor} * 182{,}3 + 4{,}63 * DS_{Acyldonor}}{162{,}14}$$

Formel 11: Ausbeute an Celluloseestern.

$$Ausbeute\ [\%] = \frac{Ausbeute\ [g]}{Theoretische\ Ausbeute\ [g]}$$

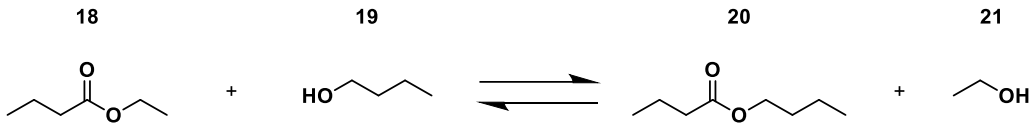
3

3 Ergebnisse

3.1 Enzymatische Modifikation von Cellulose

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der homogenen enzymatischen Modifikation von Cellulose, da diese in verschiedenen Studien eine größere Veresterungseffizienz im Vergleich zu heterogenen Ansätzen zeigt. Da die Analytik von den zu erwartenden, geringen Veresterungsgraden der Cellulose sehr anspruchsvoll ist, wurden zuerst ähnliche Reaktionen an kleineren Molekülen untersucht, um die Reaktionen besser zu verstehen und sie in anschließenden Experimenten auf die Polymer-Ebene zu übertragen. Hierbei wurde ein systematischer Ansatz verfolgt, in dem zuerst Umesterungen und Veresterungen von kurzkettigen organischen Säuren, Estern und Alkoholen in ionischen Flüssigkeiten untersucht wurden. Anschließend wurden einfache Alkohole durch Monosaccharide ersetzt und langkettige Acyldonoren verwendet. In einem nächsten Schritt wurde die Umsetzung von verschiedenen Disacchariden untersucht, wobei Cellobiose als Wiederholungseinheit der Cellulose im Fokus der Untersuchungen stand. Schlussendlich wurde die enzymatische Modifikation von Cellulose untersucht. Bei den hier beschriebenen Experimenten und Ergebnissen wurde auf eine genaue quantitative Bestimmung der Produktausbeute verzichtet, wobei dennoch semi-quantitative Aussagen gemacht werden. Ein umso größerer Fokus liegt dagegen auf qualitativen Nachweisen der entstehenden Produkte und Kontrollexperimenten ohne den Einsatz von Enzymen, um dadurch die katalytische Wirkung der Enzyme zu bestätigen oder auszuschließen.

3.1.1 *Untersuchung von einfachen Umesterungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten*



Schema 7: Umesterung von Buttersäureethylester (18) mit Butanol (19) zu Buttersäurebutylester (20) und Ethanol (21).

Um zu überprüfen, inwieweit Lipasen die Fähigkeit besitzen, in ionischen Flüssigkeiten als Katalysator zu agieren, wurde die Umesterungsreaktion von Buttersäuremethylester (**23**) mit Butanol (**19**) zu Buttersäurebutylester (**20**) und Ethanol (**21**) als erste Modellreaktion gewählt (Schema 7).

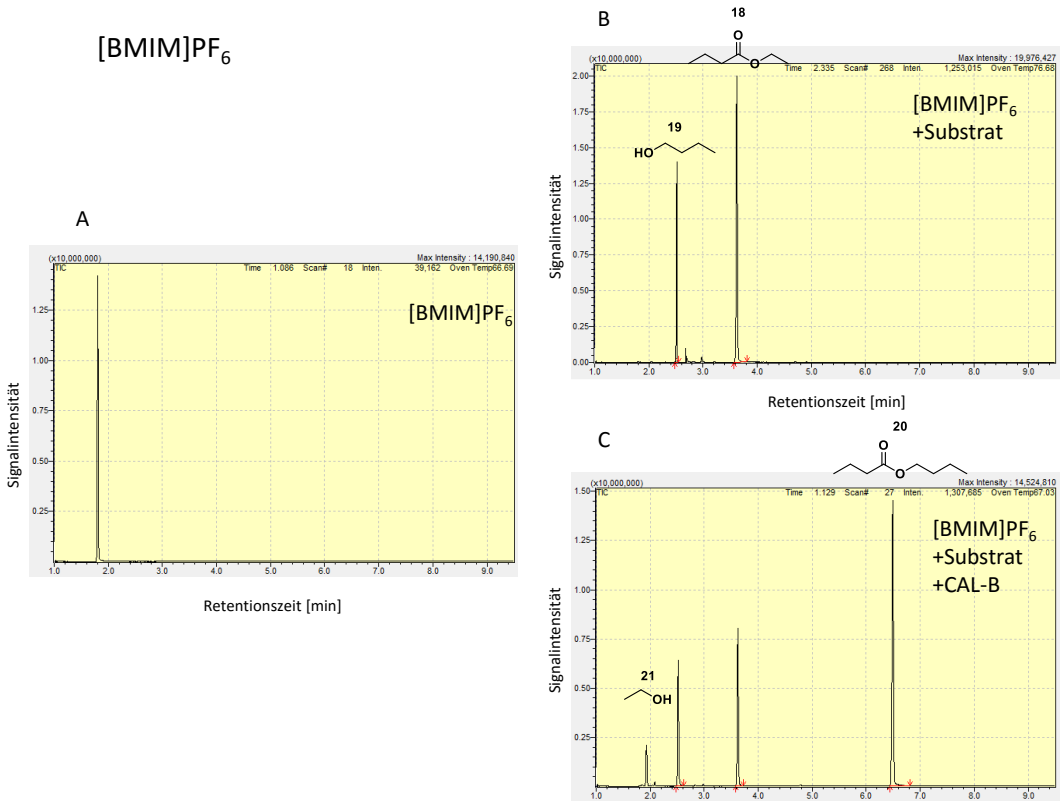


Abbildung 1: Enzymaktivität in [BMIM]PF_6.
GC-MS-Headspace Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [BMIM]PF_6 vor der Zugabe von Substrat (**A**), nach der Zugabe von Substrat (**B**), und nach enzymatischer Umsetzung durch CAL-B (**C**). Betrachtet wird die Reaktion von Buttersäureethylester mit Butanol zu Buttersäurebutylester und Ethanol (Schema 7). Es wurde 1 ml [BMIM]PF_6 in ein 20 ml „Headspacevial“ überführt und gegebenenfalls mit 11 mM Buttersäureethylester und 45 mM Butanol (**B**) sowie 25 mg immobilisierter CAL-B (**C**) versetzt. Die Reaktion wurde anschließend 2 Tage bei 50°C gerührt und anschließend mittels GC-MS analysiert (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1).

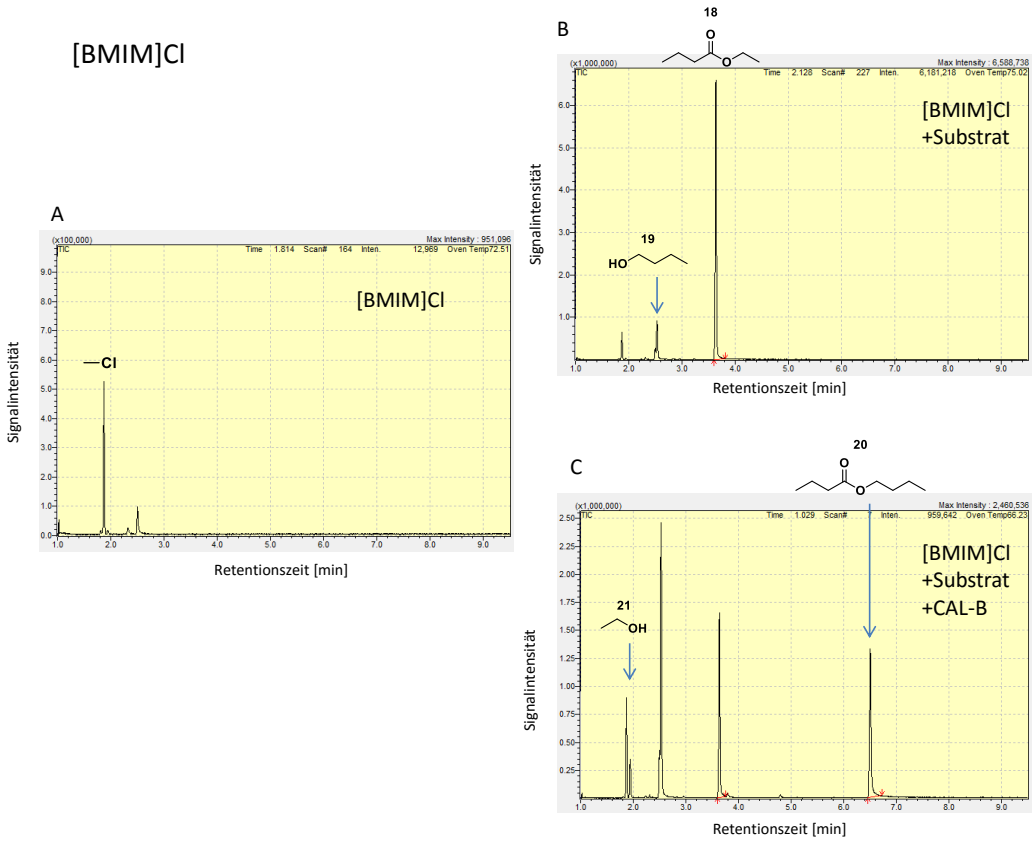


Abbildung 2: Enzymaktivität in [BMIM]Cl.
GC-MS-Headspace Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl vor der Zugabe von Substrat (**A**), nach der Zugabe von Substrat (**B**), und nach enzymatischer Umsetzung durch CAL-B (**C**). Betrachtet wird die Reaktion von Buttersäureethylester mit Butanol zu Buttersäurebutylester und Ethanol (Schema 7). Es wurde 1 ml [BMIM]Cl in ein 20 ml „Headspacevial" überführt und gegebenenfalls mit 11 mM Buttersäureethylester und 45 mM Butanol (**B**) sowie 25 mg immobilisierter CAL-B (**C**) versetzt. Die Reaktion wurde anschließend 2 Tage bei 67°C - 70°C gerührt und anschließend mittels GC-MS analysiert (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1)**.**

Hierbei wurde die Enzymaktivität des Enzyms *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B) in [BMIM]PF_6, [BMIM]OAc, [EMIM]OAc und [BMIM]Cl mittels GC-MS und durch Abgleich mit der Retentionszeit von Standards nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit bezeichnet der Begriff CAL-B eine auf „Immobeads" immobilisierte Enzympräparation der CAL-B (Anhang 15). In wenigen Fällen wird allerdings auch die nicht immobilisierte, sondern lediglich lyophilisierte Enzympräparation der CAL-B verwendet, welche dann als „freie CAL-B" bezeichnet wird (Anhang 16). In den Kontrollansätzen mit Substrat, aber ohne Enzym, werden keine Reaktionsprodukte

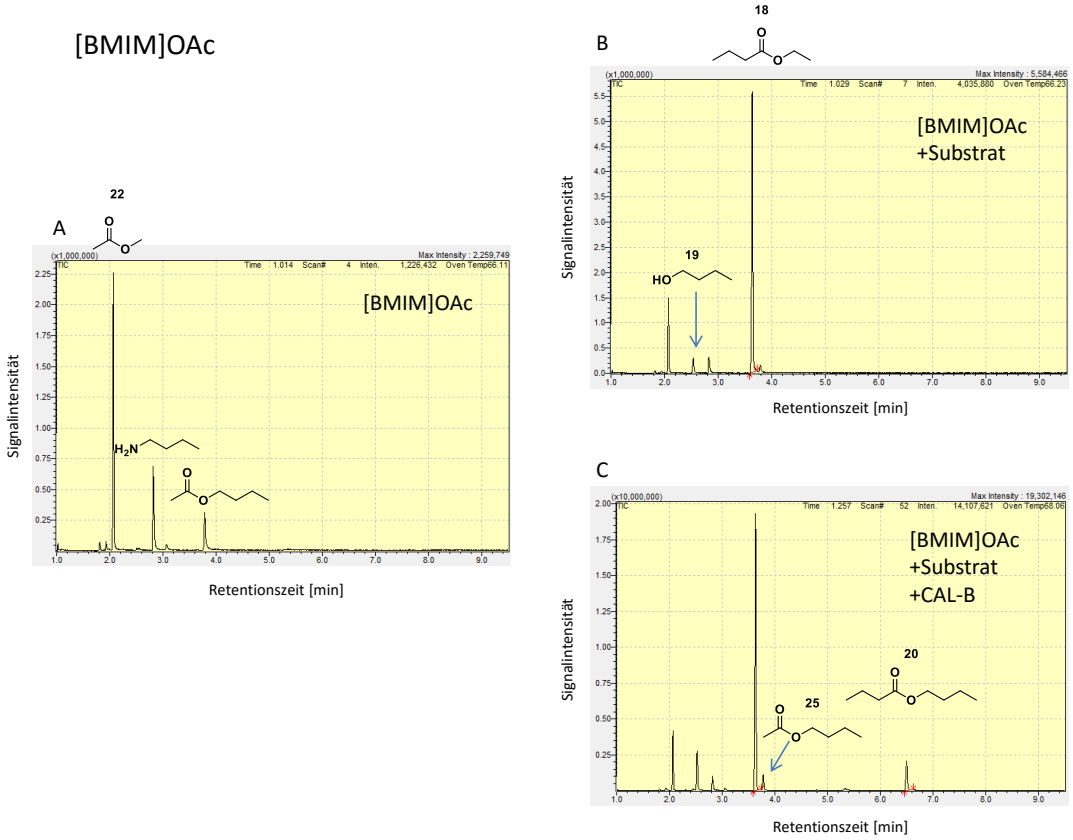
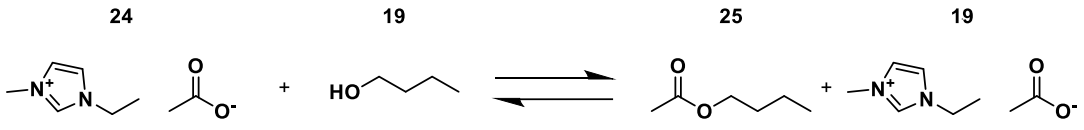


Abbildung 3: Enzymaktivität in [BMIM]OAc.
GC-MS-Headspace Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [BMIM]OAc vor der Zugabe von Substrat (**A**), nach der Zugabe von Substrat (**B**), und nach enzymatischer Umsetzung durch CAL-B (**C**). Betrachtet wird die Reaktion von Buttersäureethylester mit Butanol zu Buttersäurebutylester und Ethanol (Schema 7). Es wurde 1 ml [BMIM]OAc in ein 20 ml „Headspacevial“ überführt und gegebenenfalls mit 11 mM Buttersäureethylester und 45 mM Butanol (**B**) sowie 25 mg immobilisierter CAL-B (**C**) versetzt. Die Reaktion wurde anschließend 2 Tage bei 50°C gerührt und anschließend mittels GC-MS analysiert (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1).

nachgewiesen (Abbildung 1B, Abbildung 2B, Abbildung 3B und Abbildung 4B). In der enzymatischen Umesterung wird die stärkste Produktbildung in [BMIM]PF_6 beobachtet (Abbildung 1C). In [EMIM]OAc und [BMIM]OAc werden, zusätzlich zu den Substraten und zu den erwarteten Produkten, Essigsäurebutylester (**25**) und Buttersäuremethyles-



Schema 8: Veresterung von Acetat aus der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc (24) mit Butanol (19) zu Essigsäurebutylester (25).

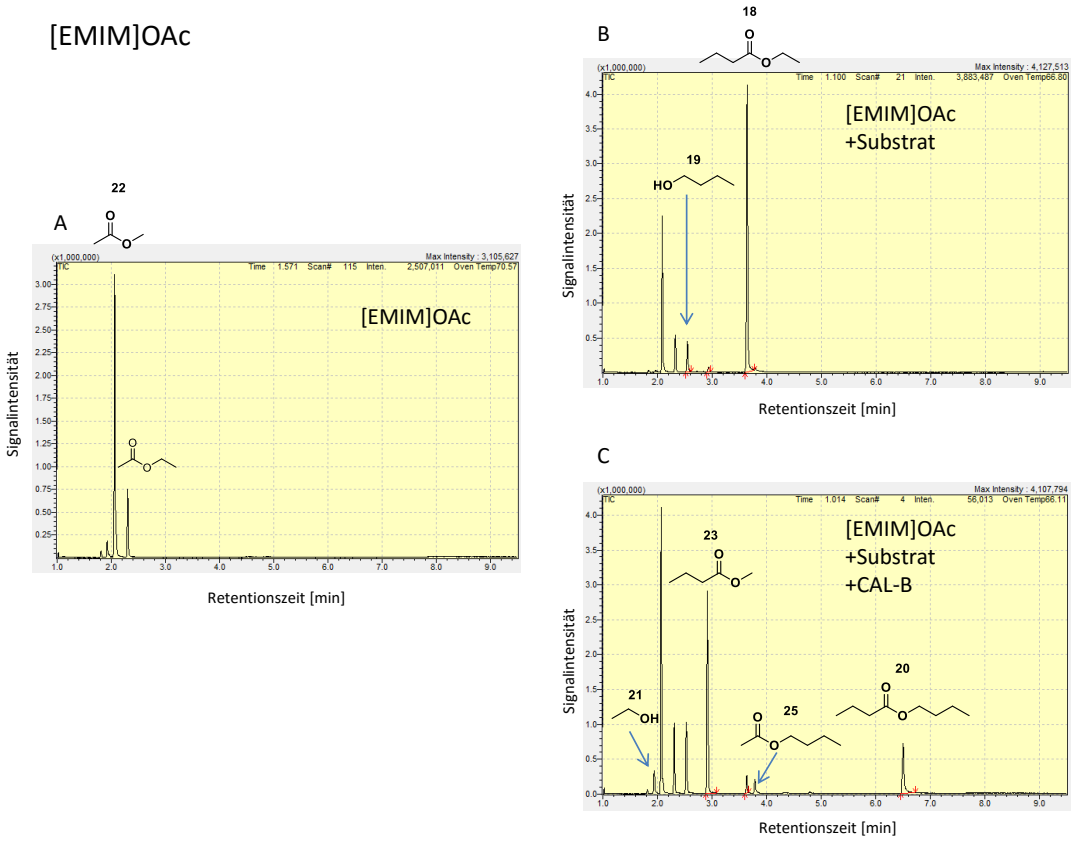
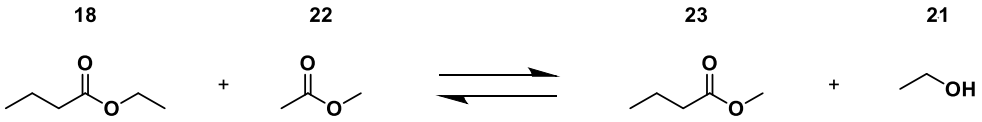


Abbildung 4: Enzymaktivität in [EMIM]OAc.
GC-MS-Headspace Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc vor der Zugabe von Substrat (**A**), nach der Zugabe von Substrat (**B**), und nach enzymatischer Umsetzung durch CAL-B (**C**). Betrachtet wird die Reaktion von Buttersäureethylester mit Butanol zu Buttersäurebutylester (**20**) und Ethanol (**21**) (Schema 7)). Es wurde 1 ml [EMIM]OAc in ein 20 ml „Headspacevial" überführt und gegebenenfalls mit 11 mM Buttersäureethylester und 45 mM Butanol (**B**) sowie 25 mg immobilisierter CAL-B (**C**) versetzt. Die Reaktion wurde anschließend 2 Tage bei 50°C gerührt und anschließend mittels GC-MS analysiert (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1).

ter nachgewiesen (Abbildung 3C und Abbildung 4C). Essigsäurebutylester ist nur in den Proben mit Substrat und Enzym nachweisbar und fehlt in den Proben, in denen nur das Substrat und kein Enzym zugegeben werden (Abbildung 3B, Abbildung 3C, Abbildung 4B und Abbildung 4C). Die Essigsäure, welche für die Synthese von Essigsäurebutylester notwendig ist, stammt vermutlich vom Anion der ionischen Flüssigkeit



Schema 9: Umesterung von Buttersäureethylester (18) mit Essigsäuremethylester (22).
Das Substrat Essigsäuremethylester (**22**) wurde nicht zu der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc (**24**) hinzugegeben, es liegt als Verunreinigung vor.

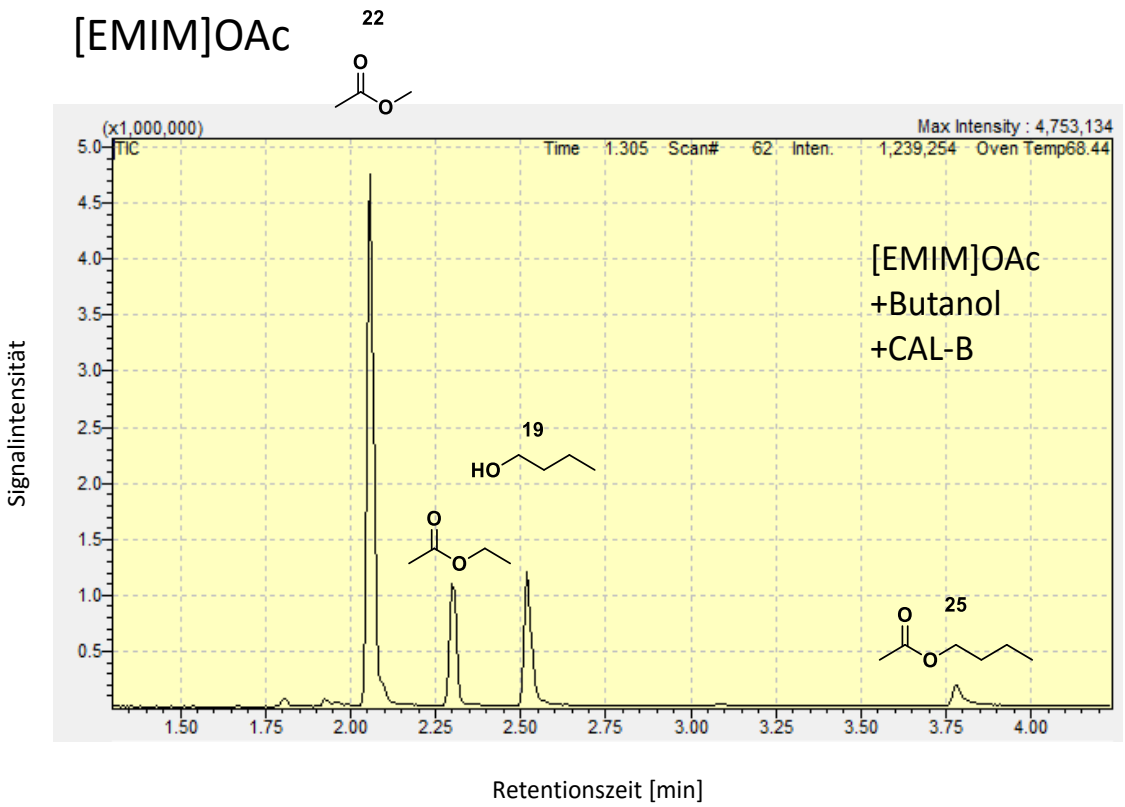
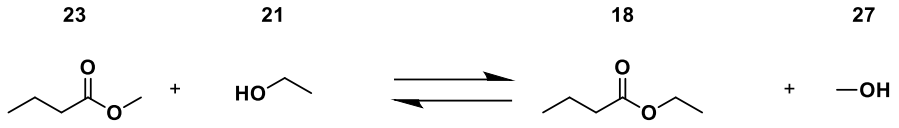


Abbildung 5: Enzymatische Acetylierung in Acetat-basierten ionischen Flüssigkeiten.
GC-MS-Headspace Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc nach der enzymatischen Umsetzung durch CAL-B. Betrachtet wird die Reaktion von [EMIM]OAc mit Butanol zu Essigsäurebutylester. Es ist auch möglich, dass Essigsäuremethylester oder Essigsäureethylester als Substrat für die Synthese von Essigsäurebutylester agieren, da sie als Verunreinigungen in [EMIM]OAc vorhanden sind (Abbildung 4A). Es wurde 1 ml [EMIM]OAc in ein 20 ml „Headspacevial" überführt und mit 45 mM Butanol, sowie 25 mg immobilisierter CAL-B versetzt. Die Reaktion wurde anschließend 2 Tage bei 50°C gerührt und anschließend mittels GC-MS analysiert (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1).

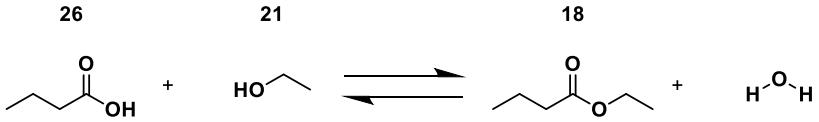
selbst oder von Verunreinigungen der ionischen Flüssigkeit mit Essigsäuremethylester (**22**) und Essigsäureethylester, welche in den kommerziell erhältlichen ionischen Flüssigkeiten vorhanden sind (Abbildung 3A und Abbildung 4A). Da sich die Peaks von Essigsäurebutylester und des Substrates Buttersäureethylester (**18**) teilweise überlagern, wurde die Synthese von Essigsäurebutylester in Abwesenheit von Buttersäureethylester reproduziert, wobei Essigsäurebutylester erneut nachgewiesen wurde (Abbildung 5, Schema 8). Eine weitere beobachtete Nebenreaktion in [EMIM]OAc (**24**) ist die enzymatische Synthese von Buttersäuremethylester, wobei die Methanol-Komponente vermutlich aus der Verunreinigung der ionischen Flüssigkeiten mit Essigsäuremethylester stammt (Schema 9, Abbildung 4C). Diese enzymatischen Nebenreak-



Schema 10: Umesterung von Buttersäuremethylester (23) mit Ethanol (21) zu Buttersäureethylester (18) und Methanol (27).

tionen stehen einer definierten und effizienten Modifikation von Cellulose entgegen. So kann die Methanolkomponente der Methylesterverunreinigungen mit den Substraten, welche bei einer Veresterung von Cellulose eingesetzt werden, reagieren und dadurch die Veresterungseffizienz der Cellulose verringern. Die definierte Modifikation von Cellulose kann wiederum durch die Veresterung von Acetaten aus der ionischen Flüssigkeit an das Cellulosegrundgerüst gestört werden, da neben den gewünschten Seitenketten auch Acetatseitenketten entstehen. Daher wurde in den nächsten Experimenten auf Acetat-basierte ionische Flüssigkeiten verzichtet.

Außerdem wurde weiterhin kein Fokus auf [BMIM]PF_6 gelegt, da diese ionische Flüssigkeit Cellulose nicht lösen kann. Darum wurden weitere Reaktionen in [BMIM]Cl untersucht. Neben der bereits gezeigten Umesterung, ausgehend von Ethylestern, sollte überprüft werden, inwieweit sich auch Methylester als Acyldonoren für Umesterungen in [BMIM]Cl eignen. Daher wurde in [BMIM]Cl die Umesterung von Buttersäuremethylester mit Ethanol zu Buttersäureethylester und Methanol untersucht (Schema 10). Auch bei dieser Reaktion können alle Produkte nach der enzymatischen Umsetzung nachgewiesen werden, wobei Reaktionsansätze ohne Lipase keine Produktbildung zeigen (Anhang 2). Zusätzlich zu Umesterungsreaktionen wurde die Veresterung, ausgehend von Buttersäure (**26**) und Ethanol zu Buttersäureethylester und Wasser untersucht (Schema 11). Zunächst wurde hierbei kaum Buttersäuremethylester nachgewiesen. Mit dem Ziel, die Produktbildung durch Wasserabzug zu be-

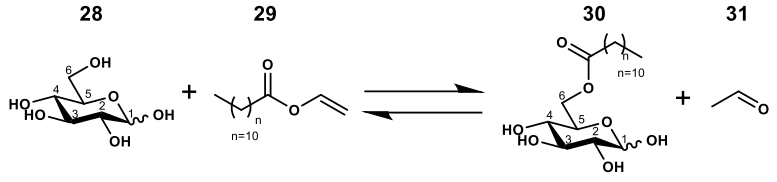


Schema 11: Veresterung von Buttersäure (26) mit Ethanol (21) zu Buttersäureethylester (18) und Wasser.

günstigen, wurde die Reaktion in der Gegenwart von Molekularsieb wiederholt, wobei nun die enzymatische Synthese von Buttersäureethylester in [BMIM]Cl gezeigt werden konnte (Anhang 1).

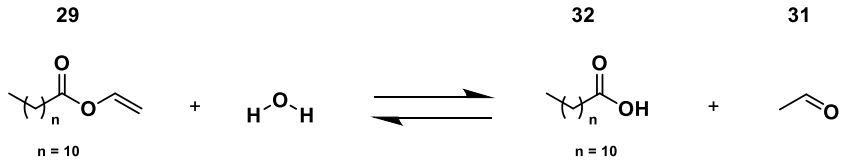
Die Kontrolle des Wassergehalts für die enzymatische Veresterung in [BMIM]Cl ist also ein kritischer Faktor, während Umesterungsreaktionen auch ohne aktive Kontrolle des Wassergehaltes beobachtet werden. Daher wurde der Fokus in nachfolgenden Experimenten auf Umesterungsreaktionen gelegt.

3.1.2 *Enzymatische Synthese von Glucoselaurat in ionischen Flüssigkeiten*



Schema 12: Umesterung von Glucose (28) mit Laurinsäurevinylester (29) zu Glucosemonolaurat (30) und Acetaldehyd (31).
Der Ester ist an der Position 6 der Glucose eingezeichnet. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde allerdings nicht die Stereochemie der Esterbindung bestimmt. Die Esterbindung kann also auch an einer anderen Position erfolgen und ist nur beispielhaft an Position 6 eingezeichnet. Dennoch ist in der Literatur eine Präferenz der CAL-B für die Position 6 beschrieben.[89,71]

Die enzymatische Synthese von Glucoselaurat wurde zunächst in der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl untersucht, wobei keine CAL-B katalysierte Synthese, ausgehend von Laurinsäuremethylester, nachgewiesen werden konnte. Enzymaktivität kann allerdings in Form der hydrolytischen Spaltung von Laurinsäuremethylestern bzw. von Laurinsäurevinylestern (**29**) in freie Laurinsäure (**32**) durch LC-MS nachgewiesen werden (Schema 13, Kapitel 2.2.2 und 2.3.3). Diese Spaltung wurde bei den Reaktionen mit Buttersäureethylester in Kapitel 3.1.1 nicht detektiert, da Buttersäure mit der zu Grunde liegenden GC-MS-Headspace Analytik – aufgrund ihres hohen Siedepunktes (163,5°C) – nicht nachgewiesen wird (Schema 7, Abbildung 3). Diese starke Tendenz zur enzymatischen hydrolytischen Spaltung konnte ebenfalls in der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc nachgewiesen werden. Um die Effizienz der Glucoselaurat-Synthese zu erhöhen, wurde sie unter Einsatz von aktivierten Laurinsäurevinylestern wiederholt, wobei die ionischen Flüssigkeiten [BMIM]BF_4 und [BMIM]PF_6 zusätzlich als Positivkontrolle untersucht wurden. Die CAL-B katalysierte Synthese von Glucoselauraten ist in den ionischen Flüssigkeiten [BMIM]BF_4 und [BMIM]PF_6 eindeutig nachweisbar, wobei



Schema 13: Hydrolyse von Laurinsäurevinylester (29) zu freier Laurinsäure (32) und Acetaldehyd (31).

hauptsächlich Glucosemonolaurat, und nur in geringen Mengen Glucosedilaurat, entstehen (Schema 12, Anhang 3). Die Identifikation erfolgte mittels LC-MS, wobei sich bei positiver Ionisierung hauptsächlich das Addukt der Masse von Glucosemonolaurat plus Ameisensäure minus der Masse eines Protons (*M + FA - H*: 407,3 m/z), sowie das Addukt aus zwei Massen minus der Masse eines Protons (*2M - H*: 723,3 m/z), bildeten (Abbildung 6). Diese Massen sind in Kontrollen ohne Enzym nicht nachweisbar. Glucosedilaurat wurde über dieselben Addukte mit den Massenladungsverhältnisse 589,3 m/z (*M + FA - H*), sowie 1087 m/z (*2M - H*), identifiziert (Anhang 4).

Da diese charakteristischen Addukte von Glucosedilaurat in zwei separaten Peaks im LC-MS-Chromatogramm nachgewiesen werden können, katalysiert die CAL-B vermutlich die Modifikation an mindestens drei der fünf Hydroxygruppen der Glucose (**28**) und erzeugt somit verschiedene Isomere von Glucosedilaurat (Anhang 3). In [BMIM]Cl konnten auch nach dem Einsatz von Laurinsäurevinylestern kein Glucoselaurat nachgewiesen werden, wobei die CAL-B allerdings erneut die hydrolytische Spaltung des Vinylesters zur freien Säure katalysiert (Schema 13). Dieses Ergebnis deutet

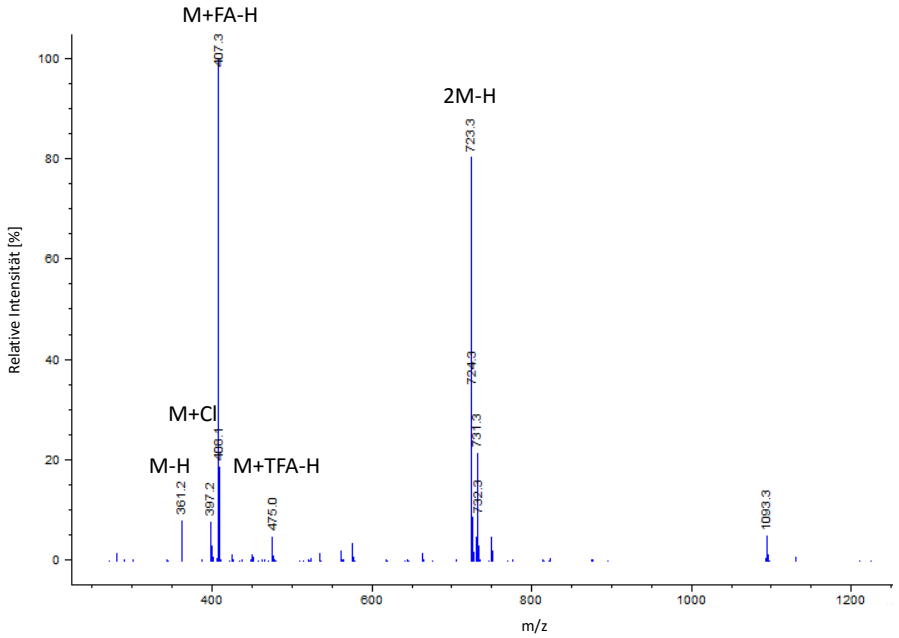


Abbildung 6: Massenspektrum von Glucosemonolaurat, synthetisiert in [BMIM]BF_4 durch CAL-B. Glucosemonolaurat wurde in [BMIM]BF_4 mit CAL-B und Laurinsäurevinylester (**29**) synthetisiert (Kapitel 2.2.2). Die Addukte, die zur Identifikation verwendet wurden, sind jeweils markiert: Masse Glucoselaurat: 362,2; *Masse - H (M - H)*: 361,2 m/z; *Masse + Chlor (M+Cl)*: 397,2 m/z; *Masse + Ameisensäure - H (M + FA - H)*: 407,3 m/z; *Masse + Trifluoressigsäure - H (M + TFA- H)*: 475,0 m/z; *2 x Masse - H (2 x M - H)*: 723,3 m/z (Kapitel 2.3.3).

darauf hin, dass Wasser für die hydrolytische Spaltung in [BMIM]Cl vorhanden ist und die Estersynthese mit Glucose in dieser ionischen Flüssigkeit nicht enzymatisch katalysiert wird bzw. das chemische Gleichgewicht sehr stark auf der Seite der Hydrolyse liegt. In der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc wurden nach der Vinylester-basierten Synthese verschiedene Glucoselaurat-Peaks im LC-MS Chromatogramm identifiziert. Die Menge an Glucoselaurat war allerdings in den Proben mit Enzym deutlich geringer als in den Kontrollen ohne Enzym. Zudem konnte in den Proben mit Enzym erneut die Hydrolyse zur freien Fettsäure beobachtet werden (Schema 13). Somit katalysiert die ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc die Umesterung von Laurinsäurevinylester mit Glucose zu Glucoselaurat, während die CAL-B die enzymatische Hydrolyse von Estern katalysiert (Schema 13). Genauere Untersuchungen hinsichtlich der katalytischen Aktivität von [EMIM]OAc werden ab Kapitel 2.2 beschrieben. Aufgrund der großen Hintergrund-Aktivität bei den Vinylester-basierten Synthesen von Glucoseestern in [EMIM]OAc wurden keine weiteren enzymatischen Experimente in dieser ionischen Flüssigkeit durchgeführt.

Grundsätzlich ist zu beachten, dass die Löslichkeit von Glucose in den unpolaren ionischen Flüssigkeiten [BMIM]BF_4 und [BMIM]PF_6 sehr niedrig ist und nicht der gesamte Zucker während der Reaktion in Lösung vorlag. Im Gegensatz dazu lösten die ionischen Flüssigkeiten [EMIM]OAc und [BMIM]Cl (**5**), in denen keine enzymatische Synthese von Glucoseestern gezeigt werden konnte, die kompletten 14 % w/w der eingesetzten Glucose.

Als nächstes wurde die enzymatische Glucoselauratsynthese in Mischungen aus [BMIM]Cl und [BMIM]BF_4 untersucht (Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.3.3). Die Zugabe von 30 % w/w [BMIM]Cl inhibiert die enzymkatalysierte Synthese, sodass weniger als 1 % Glucoselaurat, im Vergleich zur Synthese in reinem [BMIM]BF_4, nachgewiesen wurde. Eine weitere Erhöhung der [BMIM]Cl-Konzentration auf 50 % und 70 % resultierte in einer noch geringeren Produktbildung (Tabelle 6). Zusätzlich stieg die durch enzymatische Hydrolyse synthetisierte Menge an Laurinsäure in 70 % w/w-igem [BMIM]Cl um den Faktor drei gegenüber reinem [BMIM]BF_4 (Abbildung 7). Um die Hydrolyse zu begrenzen, wurde das Experiment in der Anwesenheit von Wasser-absorbierendem Molsieb wiederholt. Die Menge an Glucosemonolaurat wurde dadurch in reinem

[BMIM]BF_4 fast verdoppelt, wobei sich die Menge an freier Laurinsäure um den Faktor 7,5 reduzierte (Tabelle 6 und Tabelle 7). Bei höheren Konzentrationen an [BMIM]Cl war der Effekt von verwendetem Molekularsieb deutlich schwächer bzw. nicht beobachtbar (Tabelle 6 und Tabelle 7).

Tabelle 6: Produktverhältnisse nach der enzymatischen Vinylester-basierten Synthese von Glucoselaurat in Mischungen aus [BMIM]BF_4 und [BMIM]Cl (5).

		Ohne Molekularsieb	
[BMIM]Cl [% w/w]	[BMIM]BF_4 [% w/w]	Glucosemonolaurat [%]*	Laurinsäure [%]*
0	100	55,71	28,51
30	70	0,36	20,17
50	50	0,07	46,78
70	30	0,03	83,10

* Die Produktmenge ist Prozentual zu der höchsten detektierten Produktpeakfläche aus Tabelle 6 und Tabelle 7 im LC-ELSD-Chromatogramm angegeben.

Tabelle 7: Produktverhältnisse nach der enzymatischen Vinylester-basierten Synthese von Glucoselaurat in Mischungen aus [BMIM]BF_4 und [BMIM]Cl in der Gegenwart von Molekularsieb (3Å).

		Mit Molekularsieb	
[BMIM]Cl [% w/w]	[BMIM]BF_4 [% w/w]	Glucosemonolaurat [%]*	Laurinsäure [%]*
0	100	100,00	3,80
30	70	0,79	11,09
50	50	0,14	39,60
70	30	0,07	100,00

* Die Produktmenge ist Prozentual zu der höchsten detektierten Produktpeakfläche aus Tabelle 6 und Tabelle 7 im LC-ELSD-Chromatogramm angegeben.

Der Umstand, dass die Zugabe von [BMIM]Cl zu [BMIM]BF_4 die Glucoselaurat-Produktion deutlich stärker inhibiert, als es die Hydrolyse von Laurinsäure beschleunigt, führt zu der Überlegung, dass neben dem chemischen Gleichgewicht bzw. der hohen Wasseraktivität noch weitere Effekte für die reduzierte Glucoselaurat-Synthese relevant sein könnten. Aufgrund der enzymatischen Hydrolyse von Laurinsäureestern in polaren ionischen Flüssigkeiten sind die Interaktion zwischen CAL-B und Laurinsäureestern im aktiven Zentrum des Enzyms, sowie die Aktivität des Enzyms, nachgewie-

sen. Um zu überprüfen, ob eine mangelnde Interaktion zwischen Enzym und Glucose ein limitierender Faktor bei der Synthese von Glucoselaurat in [BMIM]Cl ist, wurde die Reaktion mit höheren Glucosekonzentrationen durchgeführt. Hierbei konnten sehr geringe Mengen Glucoselaurat nachgewiesen werden. Möglicherweise verhindert die signifikant erhöhte Viskosität von hoch konzentrierten Glucoselösungen in [BMIM]Cl und dem daraus resultierenden reduzierten Massentransfer, eine noch bessere Synthese. Um die Hypothese der reduzierten Interaktion von Glucose und Enzym zu untersuchen, wurden weiterführende Experimente in dem polaren organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid durchgeführt, welches eine geringere Viskosität als [BMIM]Cl besitzt.

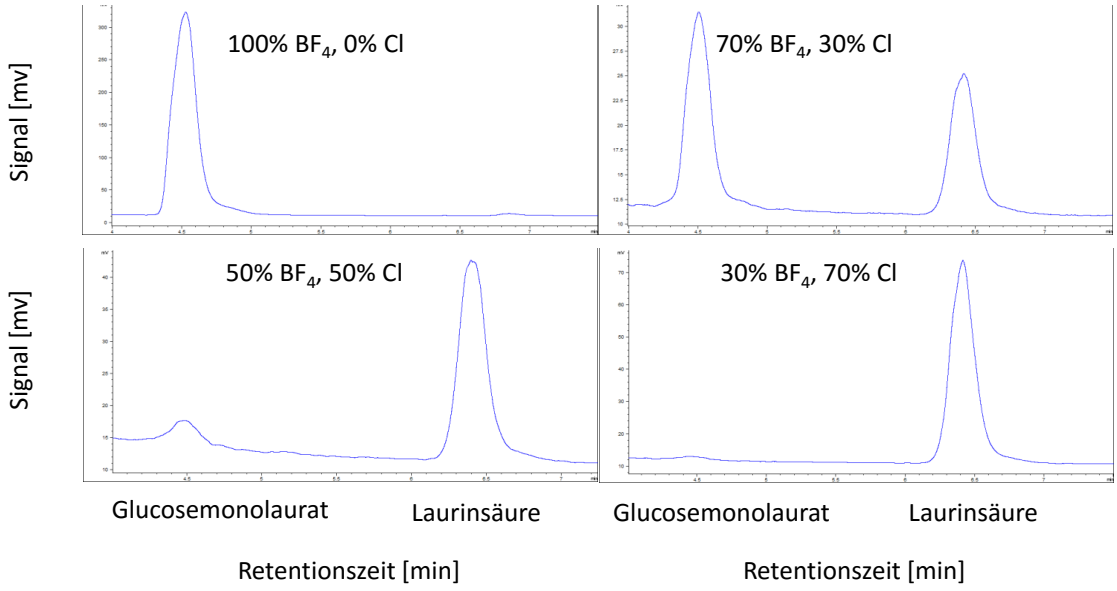


Abbildung 7: Enzymatische Synthese in Mischungen aus [BMIM]Cl und [BMIM]BF_4.
Es wurden jeweils 300 mg der jeweiligen ionischen Flüssigkeitsmischung verwendet und mit 50 mg Glucosemonohydrat (0,25 mmol) und 130 µl Laurinsäurevinylester (**29**) (0,5 mmol) versetzt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 25 mg immobilisierter CAL-B gestartet und für 16 Stunden bei 50°C und 400 rpm geschüttelt. Die Produktbildung wurde mittels HPLC-ELSD verfolgt und die entstehenden Produkte mit LC-MS identifiziert (Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.3.3).

3.1.3 Enzymatische Modifikation von Zuckern in polaren organischen Lösungsmitteln

Die bisherigen Ergebnisse zur Enzymaktivität in ionischen Flüssigkeiten zeigen, dass Wasser eine kritische Größe bei der enzymatischen Vinylester-basierten Synthese von Glucoseestern darstellt. Dennoch sollte überprüft werden, inwieweit eine mögliche mangelnde Interaktion von Glucose mit Enzym in polaren organischen Lösungsmitteln zu der reduzierten Glucoselaurat-Bildung beiträgt. In Glucoselösungen von 2 % w/v - 40 % w/v sind nur sehr geringe Mengen an Glucoselaurat nach enzymatischer Umsetzung mit CAL-B nachweisbar und die Erhöhung der Glucosekonzentration um den Faktor 40 führt lediglich zu einer 1,72-fachen Steigerung der Glucoselauratkonzentration. Hierbei entsprechen 40 % w/v Glucose im Experiment einem 2,7-fachen Überschuss an Glucose gegenüber der Menge an Laurinsäurevinylester (Abbildung 8). Die Erhöhung

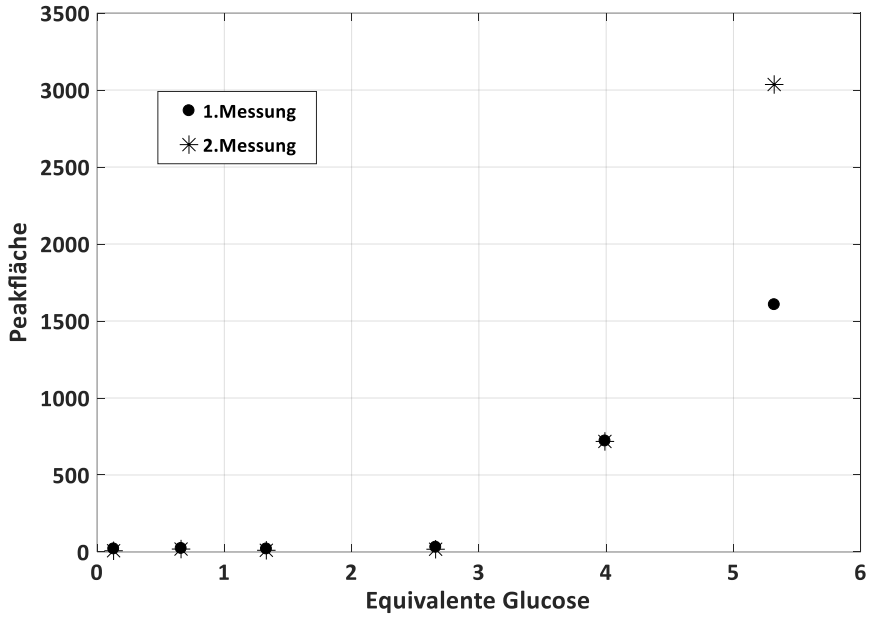


Abbildung 8: Glucoselauratsynthese in Abhängigkeit der Glucosekonzentration in DMSO.
Es wurden jeweils 100 µl Laurinsäurevinylester und 500 µl DMSO in ein Mikroreaktionsgefäß vermengt. Anschließend wurden jeweils unterschiedliche Mengen Glucosemonohydrat zugegeben um in der DMSO-Phase die entsprechenden Konzentrationen zu erhalten. Die Reaktionsansätze wurden für 16 Stunden bei 50°C und 400 rpm geschüttelt und die Produktbildung anschließend mittels HPLC-ELSD verfolgt (Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.3.3). Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, wobei sich die Messreihen lediglich in der Glucoselauratmenge bei 80 %-iger Glucosekonzentration nennenswert unterscheiden. Diese erhöhte Varianz der Messung bei diesem Messpunkt kann zum einen durch die erhöhte Viskosität und zum anderen durch den möglicherweise exponentiellen Verlauf der Messkurve begründet sein.

der Glucosekonzentration von 40 % auf 60 % bzw. von 2,7 auf 4 Glucoseäquivalente führt hingegen zu einer 29-fachen Steigerung der synthetisierten Glucoselauratmenge. Anschließend erhöht sich die Glucoselauratmenge mit ansteigender Glucosekonzentration auf 80 % weiter (Abbildung 8). Die Synthese bei 60 % w/v Glucose war ebenfalls mit der *Humicola insolens* cutinase erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Somit ist die enzymatische Glucoselauratsynthese auch in polaren organischen Lösungsmitteln wie DMSO möglich, sofern ausreichend hohe Glucosekonzentrationen eingesetzt werden. DMSO selbst löst Cellulose nicht, führt aber zu einem Aufquellen der Cellulose-Partikel, was die Zugänglichkeit für Enzyme erhöhen kann. Daher wurden in den folgenden Experimenten (Kapitel 3.1.4) hoch konzentrierte Disaccharidlösungen (37,5 % w/w) in DMSO für die enzymatische Synthese verwendet, um sich weiter an den polymeren Charakter der Cellulose anzunähern. Dieser Ansatz ist in [BMIM]Cl nicht durchführbar, da die große Viskosität von hochkonzentrierten Zuckerlösungen in [BMIM]Cl den Massentransfer und damit die enzymatische Reaktion inhibiert.

Ein Patent von Klohr und Kollegen beschreibt die enzymatische Vinylester-basierte Modifikation von Cellulose in einer 50 %-igen Mischung aus *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMMO, **2**) und DMSO.[55] Dieses Reaktionssystem wurde auf Basis des Modelsubstrates Glucose (8 % w/w-igen Glucoselösung) und unter Verwendung der CAL-B ebenfalls untersucht. Dieses System verhält sich ähnlich wie die ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc: In der Probe ohne Enzym und mit Laurinsäurevinylester entsteht hauptsächlich Glucosemonolaurat, sowie in niedrigen Mengen Glucosedilaurat (Abbildung 9C), während in den Proben mit Enzym zusätzlich freie Laurinsäure nachweisbar ist (Abbildung 9D). Somit katalysiert NMMO ebenso wie in [EMIM]OAc die Vinylester-basierte Veresterung von Glucose. Im Gegensatz zu Vinylestern, scheinen Methylester nicht als Substrat für die durch NMMO-katalysierte Glucose-Veresterung geeignet, da kein Glucosemonolaurat nach Umsatz mit Methylestern identifiziert werden konnte (Abbildung 9A). Die Hydrolyse von Laurinsäuremethylestern zu freier Laurinsäure wird allerdings enzymatisch katalysiert (Abbildung 9B). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Vinylester-basierte Modifikation von Cellulose, die von Klohr und Kollegen beschrieben wurde, möglicherweise nicht durch das verwendete Enzym, sondern durch die Lösungsmittelkomponente NMMO katalysiert wurde.

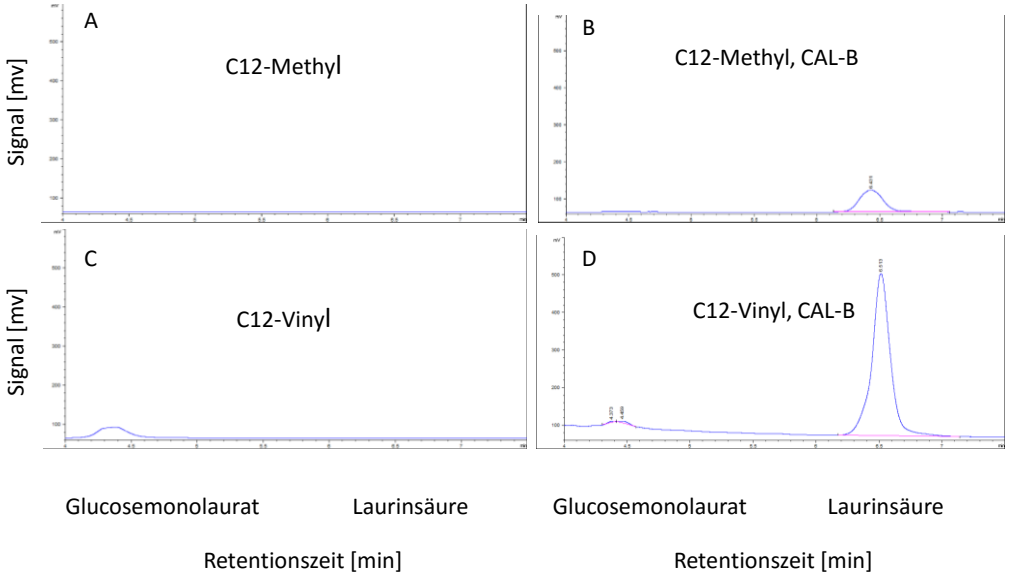
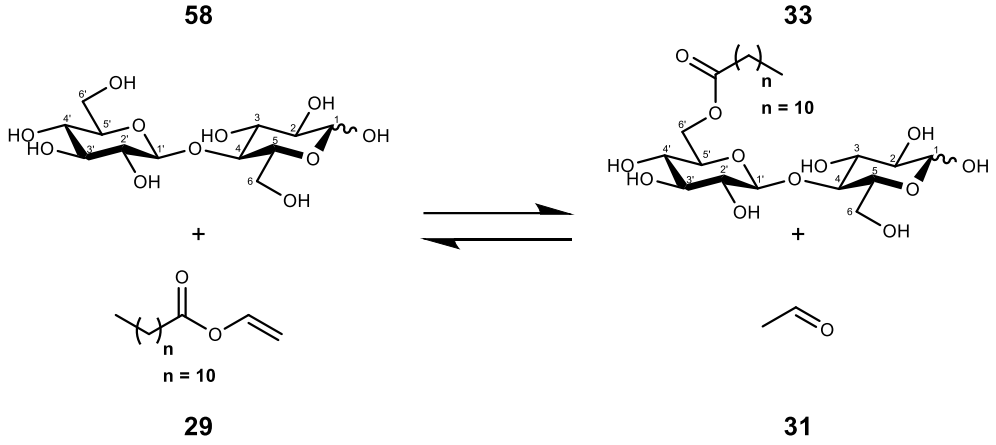


Abbildung 9: Methyl- bzw. Vinylester-basierte Umesterung in NMMO-DMSO-Wasser.
Es wurden jeweils 50 mg Glucosemonohydrat in einer Mischung aus 0,28 mg NMMO, 0,28 ml DMSO und 40 µl Wasser gelöst. Anschließend wurden entweder 100 µl Laurinsäuremethylester (**A, B**) oder Laurinsäurevinylester (**C, D**) hinzugegeben und gegebenenfalls 25 mg CAL-B zugesetzt (**B, D**). Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 16 Stunden bei einer Temperatur von 50°C und einer Schüttelfrequenz von 400 rpm geschüttelt. Die Bestimmung der Produktbildung erfolgte mit HPLC-ELSD und die Identifikation der Produkte mit LC-MS (Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.3.3).

3.1.4 Enzymatische Modifikation von Disaccharidien



Schema 14: Umesterung von Cellobiose (58) mit Laurinsäurevinylester (29) zu Cellobiosemonolaurat (33) und Acetaldehyd (31).
Der Ester ist an der Position 6‘ der Cellobiose (**58**) eingezeichnet. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde allerdings nicht die Stereochemie der Esterbindung bestimmt. Die Esterbindung kann also auch an einer anderen Position erfolgen und ist nur beispielhaft an Position 6‘ eingezeichnet.

Die bisherigen Experimente deuten darauf hin, dass die enzymatische Veresterung von Zuckern in polaren organischen Lösungsmitteln nur bei hohen Zuckerkonzentrationen durchgeführt werden können. Da die Cellulose-lösende ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc die Vinylester-basierte Synthese selbst katalysiert und die ionische Flüssigkeit [BMIM]Cl (**5**), insbesondere bei hohen Zuckerkonzentrationen und moderaten Temperaturen (<80°C) eine sehr hohe Viskosität besitzt, die die Reaktion inhibiert, wurden folgende Experimente in dem Cellulose-quellenden Lösungsmittel DMSO durchgeführt. DMSO ist ein ungiftiges, hochsiedendes polares organisches Lösungsmittel, welches 80 % w/v Glucose bei Raumtemperatur vollständig löst. Im Gegensatz dazu ist die Löslichkeit von 80 % w/v Cellobiose (**58**) bei Raumtemperatur nicht vollständig. Daher wurden lediglich 40 % w/v Cellobiose eigesetzt, was immer noch ausreichend ist, um eine Sättigung von Cellobiose in DMSO zu gewährleisten.

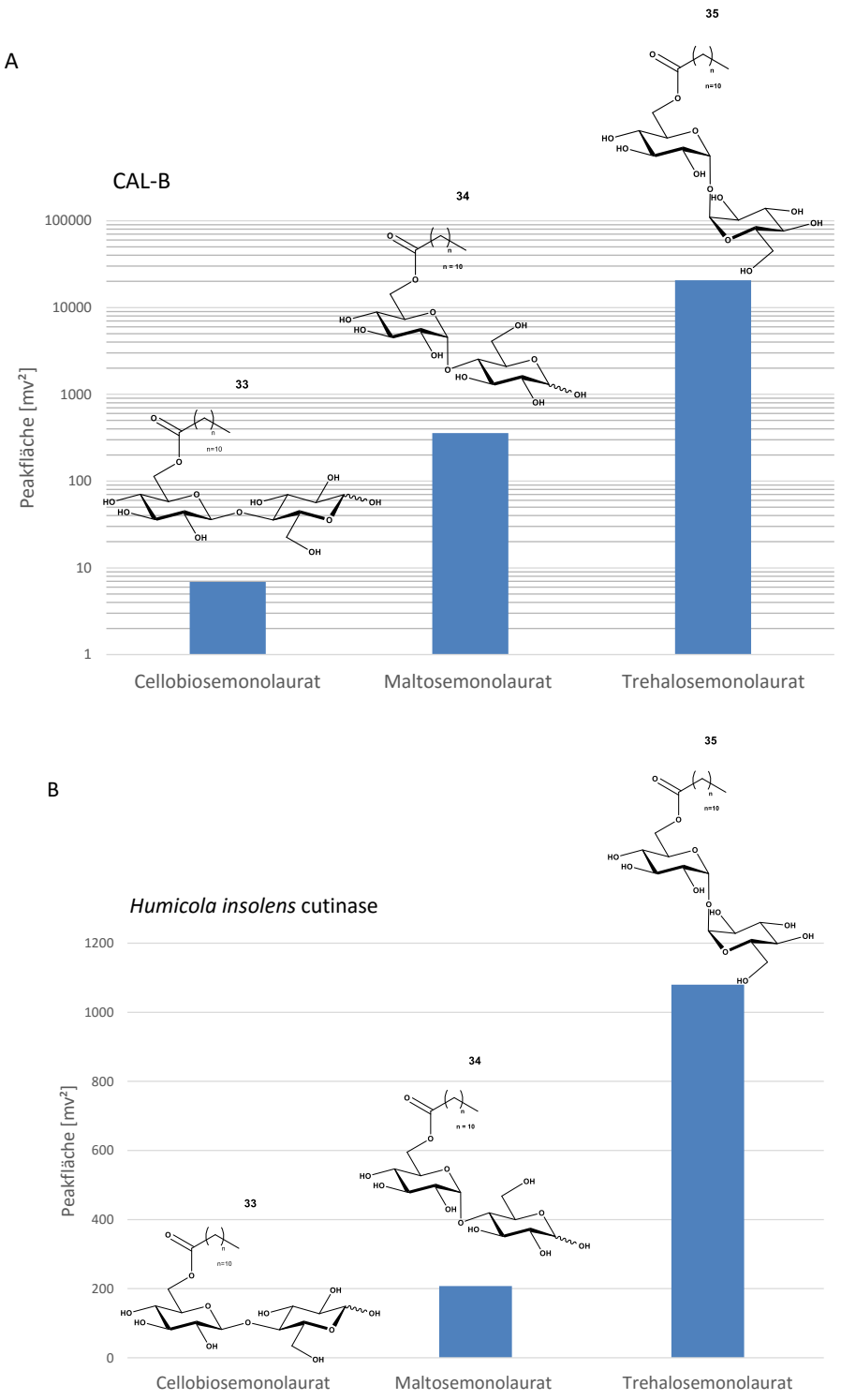


Abbildung 10: Vergleich der enzymatischen Synthese von Disaccharidlauraten.
Verglichen wird die enzymatische Synthese von Cellobiosemonolaurat (**33**), Maltosemonolaurat (**34**) und Trehalosemonolaurat (**35**) nach Umsatz mit CAL-B (**A**) bzw. *Humicola insolens* cutinase (**B**, Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.3.3). Die Peakfläche der Produkte der CAL-B ist logarithmisch aufgetragen (**A**), während bei der *Humicola insolens* cutinase eine lineare Darstellung gewählt wurde (**B**). Bei der Synthese von Trehaloselaurat wurden zusätzlich Trehalosedilaurat detektiert, welches nicht in der Grafik dargestellt wird. Die Esterbildung ist jeweils am primären Alkohol eingezeichnet. Da keine stereochemischen Untersuchungen durchgeführt wurden, kann die Esterbildung auch an anderen Alkoholen erfolgt sein.

Der Umsatz mit CAL-B lieferte nur sehr geringe Mengen an Cellobiosemonolaurat (**33**) (Schema 14). Im Gegensatz dazu zeigt die CAL-B deutlich höhere Umsätze bei der Synthese von Maltosemonolaurat (**34**). Die höchste Aktivität erzeugte die CAL-B bei der Synthese von Trehaloselaurat (**35**), wobei sowohl Trehalosemonolaurat als auch große Mengen an Trehalosedilaurat nachweisbar sind (Abbildung 10A). In diesem Fall korrelieren die Unterschiede in den synthetisierten Disaccharidlauraten mit der Löslichkeit der Disaccharide in DMSO: 40 % w/v Cellobiose löst sich bei 99°C nicht vollständig, während Maltose und Trehalose bei dieser Temperatur vollständig gelöst vorliegen. Im Gegensatz dazu löst sich Trehalose bereits bei Raumtemperatur vollständig. Die Katalyse der Disaccharidsynthese mit *Humicola insolens* cutinase resultiert in vergleichbaren Ergebnissen, wobei Cellobioselaurat nicht nachweisbar ist (Abbildung 10B). Um zu überprüfen, ob andere Enzyme eine bessere Synthese von Cellobioselaurat ermöglichen, wurden 19 verschiedene Enzyme getestet (Anhang 15, Anhang 16). Die höchste Aktivität zeigt die immobilisierte Schweineleberesterase (PLE), gefolgt von einer Lipase

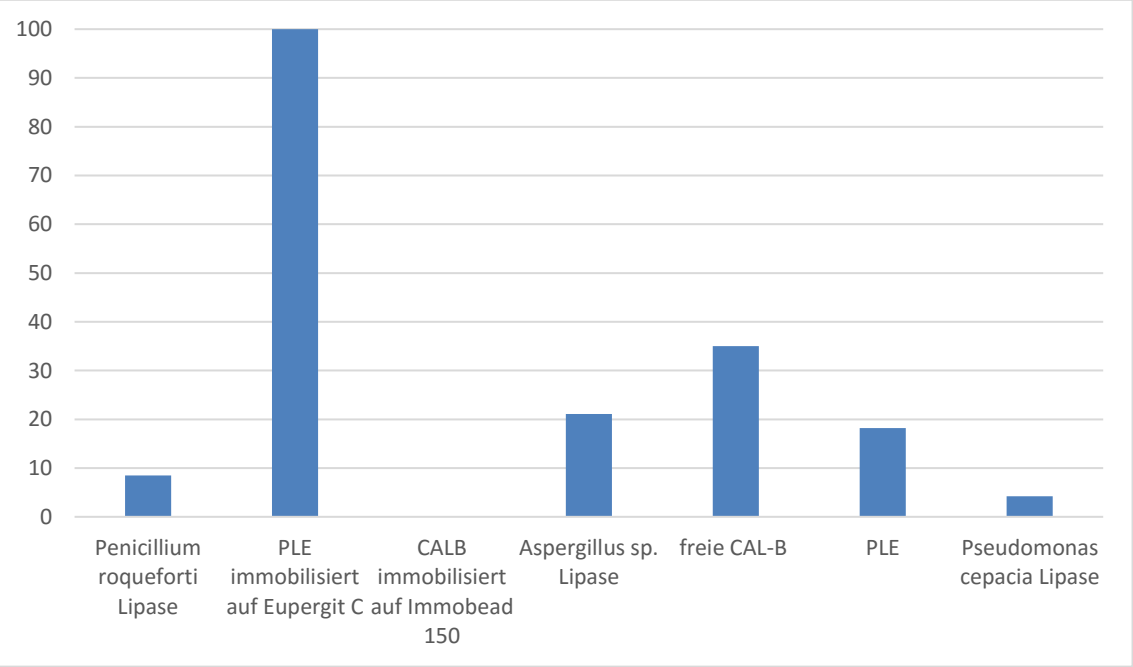


Abbildung 11: Enzymaktivität für die Synthese von Cellobioselaurat bei verschiedenen Enzymen. Die Produktmenge ist prozentual, relativ zu dem Enzym mit der höchsten Enzymaktivität (PLE immobilisiert auf Eupergit C), angegeben. Es wurden jeweils 200 mg Cellobiose mit 500 µl DMSO und 100 µl Laurinsäurevinylester vermengt (Kapitel 2.2.2). Anschließend wurden 30 mg (bei festen Enzympräparationen) bzw. 30 µl bei flüssigen Präparationen eingesetzt und die Reaktion über Nacht bei 30°C und 400 rpm geschüttelt. Die Bestimmung der Produktbildung erfolgte mit HPLC-ELSD und die Identifikation der Produkte mit LC-MS (Kapitel 2.3.3).

aus *Aspergillus*, der „freien CAL-B“ und der „freien Schweineleberesterase“ (Abbildung 11). Geringe Aktivitäten konnten auch bei Enzympräparationen von einer Lipase aus *Pseudomonas cepacia* und einer Lipase aus *Penicillium roqueforti* beobachtet werden. Die bisher verwendete immobilisierte CAL-B zeigt keine nennenswerte Enzymaktivität (Abbildung 11).

Nach der enzymatischen Synthese von Cellobioselaurat mit der Schweineleberesterase (PLE) sind im LC-MS-Chromatogramm vier Peaks identifizierbar, welche die charakteristischen Addukte für Cellobiosemonolaurat zeigen (569,3 m/z (*M + FA - H*) und 1047,3 m/z (*2M - H*), Abbildung 12). In geringen Mengen ist auch Cellobiosedilaurat mit den Addukten 751,3 m/z (*M + FA - H*) und 1411,7 m/z (*2M - H*) nachweisbar (Anhang 5). Dies deutet daraufhin, dass die PLE mindestens vier verschiedene Hydroxygruppen der Cellobiose verestern kann und es sogar möglich ist, zwei unterschiedliche Hydroxygruppen am selben Molekül zu modifizieren. Da die PLE die höchste Aktivität bei der Synthese von Cellobioselaurat zeigt, wurde sie in weiterführenden Experimenten für die Modifikation von Cellulose eingesetzt.

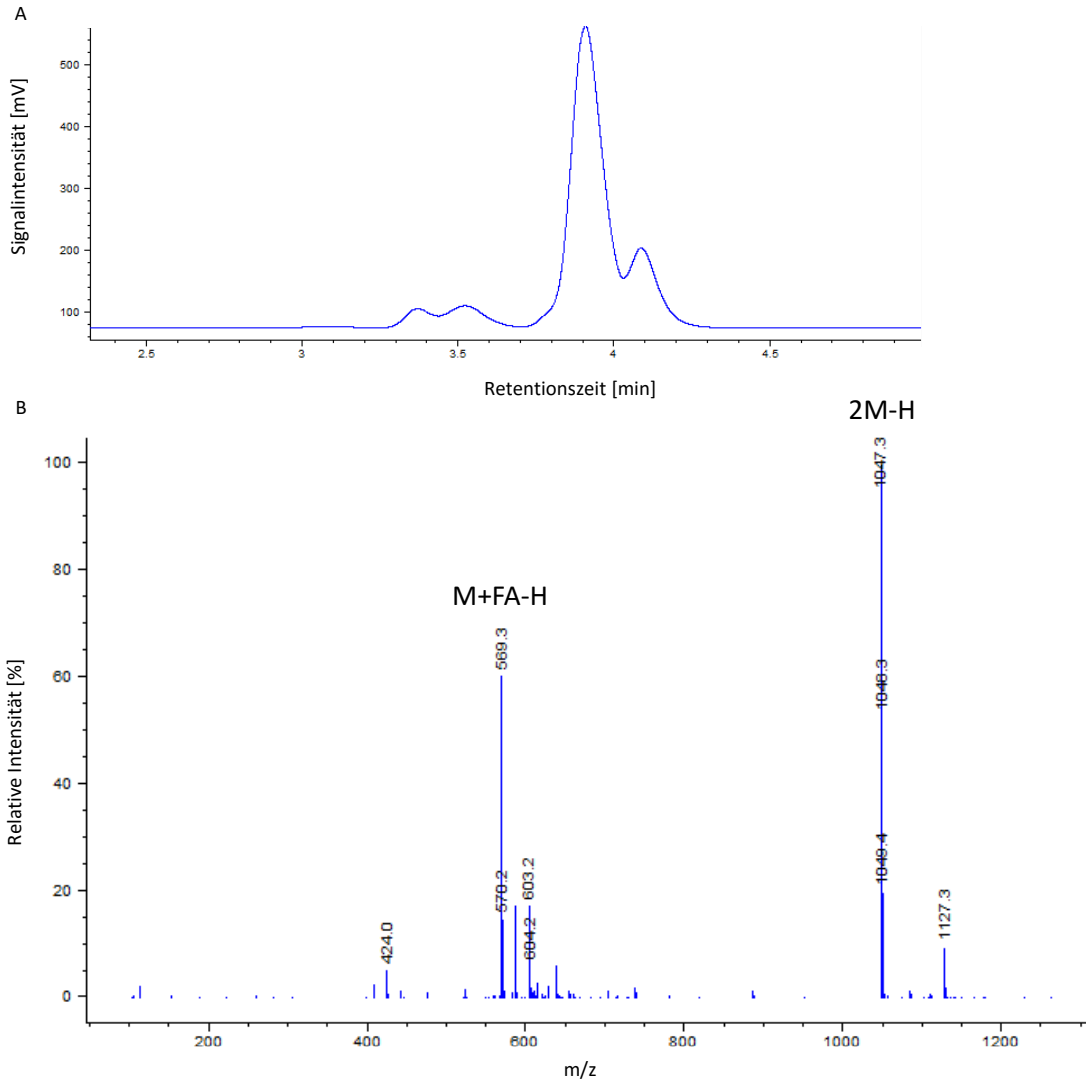


Abbildung 12: LC-ELSD Chromatogramm und zugehöriges Massenspektrum von Cellobiosemonolaurat. Die zugrundeliegende Synthese wurde bei 30°C für 16 Stunden mit 30 mg PLE, 100 µl Laurinsäurevinylester und 200 mg Cellobiose durchgeführt und anschließend mit LC-ELSD (**A**) und LC-MS (**B**) analysiert. Die Addukte, die für die Identifikation verwendet wurden, sind jeweils markiert: Masse Cellobiosemonolaurat: 524,3; Masse + Ameisensäure - H (M + FA - H): 569,3 m/z und 2 x Masse - H (2 x M - H): 1047,6 m/z (**B**, Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.2.3).

3.1.5 Enzymatische Modifikation von Cellulose

Die enzymatische Veresterung von Cellulose wurde mit Schweineleberesterase (PLE) durchgeführt, da dieses Enzym beim Cellobiosescreening die höchste Enzymaktivität für die Synthese von Cellobiose zeigte. Hierbei wurde mikrokristalline Cellulose verwendet, da diese Cellulosesorte einen geringeren Polymerisationsgrad besitzt, was die Oberfläche der Celluosepartikel erhöht. Nach 16-stündiger Umsetzung mit PLE und Laurinsäurevinylester tritt in den FT-IR-Spektren der Celluloseprodukte ein charakteristischer Esterpeak bei ca. 1758 cm^{-1} auf (Abbildung 13A). Dieser Esterpeak ist allerdings ebenfalls in den Kontrollen ohne Enzym nachweisbar (Abbildung 13B). Nach zusätzlichen Waschschritten (Aufreinigung) der Cellulose mit Methanol werden sowohl in Proben mit Enzym, als auch in den Kontrollen ohne Enzym, keine Esterpeaks beobachtet (Abbildung 13D). Die Esterbande einer Celluloselaurat-Probe (Positivkontrolle), welche in [EMIM]OAc synthetisiert wurde, zeigt im Gegensatz zu der Esterschwingung (1758 cm^{-1}), die bei der enzymatischen Synthese beobachtet wurde, ein Esterssignal bei ca. 1741 cm^{-1} (Abbildung 13C). Dies deutet daraufhin, dass der nach der enzymatischen Synthese beobachtete Esterpeak (1758 cm^{-1}) durch das Substrat Laurinsäurevinylester hervorgerufen wird, was durch die Messung des FT-IR-Spektrums von Laurinsäurevinylester bestätigt wurde (1757 cm^{-1}) (Anhang 7). Die Messung des FT-IR-Spektrums von Laurinsäuremethylester lag mit 1740 cm^{-1} im Bereich des Esterpeaks von Celluloselaurat (Anhang 8). Zusätzlich zur PLE wurden noch weitere Enzyme, die beim Cellobioselaurat-Screening positive Ergebnisse lieferten, getestet. Es konnte allerdings unter den gegebenen Reaktionsbedingungen kein Enzym gefunden werden, welches die enzymatische Modifikation von Cellulose mit daraus resultierenden charakteristischen Esterpeaks im FT-IR-Spektrum, katalysiert.

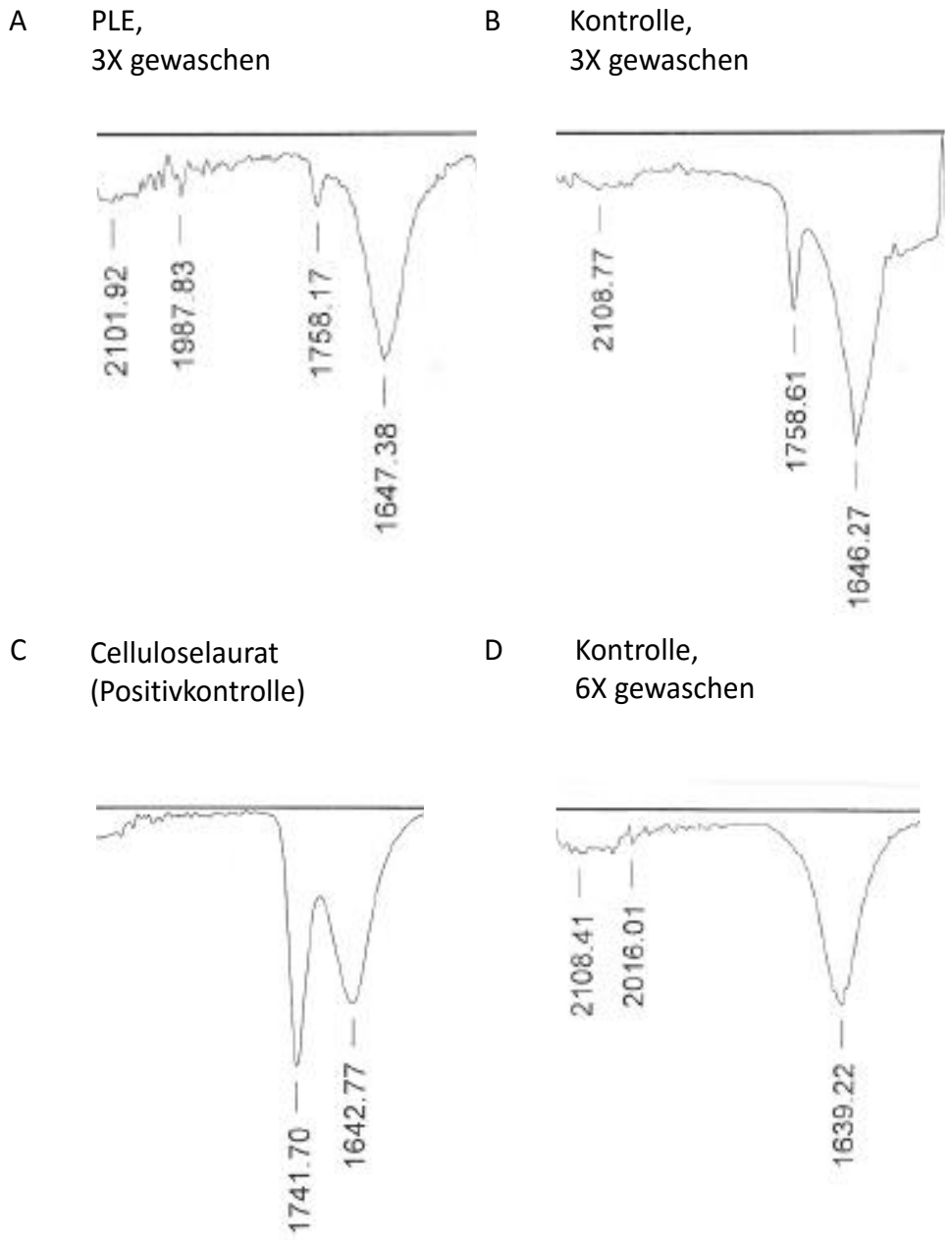
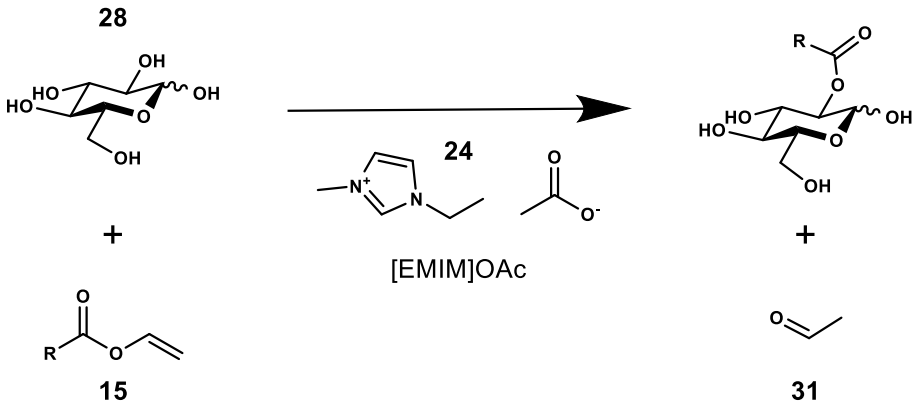


Abbildung 13: Enzymatische Umsetzung von Cellulose.
Auszug aus FT-IR-Spektren von Cellulose nach Umsatz mit PLE und Laurinsäurevinylester (**A**); Kontrolle ohne Enzyme mit 3 Waschschritten (**B**); Positivkontrolle aus der chemischen Synthese in[EMIM]OAc (**C**) und Kontrolle mit 6 Waschschritten (**D**). Es wurden jeweils 50 mg mikrokristalline Cellulose mit 200 µl Laurinsäurevinylester und 500 µl DMSO vermengt und gegebenenfalls 30 mg PLE zugesetzt (**A**). Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C für 72 Stunden bei 400 rpm geschüttelt (Kapitel 2.2.3). Anschließend wurde die Reaktion durch mehrfaches Waschen mit Methanol (ein Waschschritt entspricht 50 ml Methanol) beendet und das Polymer aufgereinigt. Zuletzt wurde das Produkt bei 70°C für zwei Stunden getrocknet und mittels FT-IR analysiert (Kapitel 2.3.4).

3.2 Das Zucker-Vinylester-[EMIM]OAc-System



Schema 15: Vinylester-basierte Synthese von Glucoseestern in [EMIM]OAc.
Die ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc (**24**) agiert als Lösungsmittel und Katalysator für die Vinylester-basierte (**15**) Umesterung mit Glucose (**28**) zu Glucoseestern und Acetaldehyd (**31**). Grundsätzlich kann die Veresterung von Glucose an allen Hydroxygruppen stattfinden, wobei auch Mehrfachmodifikationen mit bis zu 4 Laurinsäureseitenketten und einer zusätzlichen Acetatseitenkette detektiert wurden.

Bei Experimenten bezüglich der enzymatischen Veresterung von Glucose in [EMIM]OAc wurde festgestellt, dass ausgehend von Vinylestern eine Veresterung von Glucose auch ohne Enzym abläuft (Abschnitt 2.1.3). Diese Reaktion wurde bei unterschiedlichen Temperaturen und bei variierenden Reaktionszeiten untersucht. Diese Experimente sind in Zusammenarbeit mit Julian Wissner im Rahmen einer betreuten Bachelorarbeit entstanden.[93] Zusätzlich sind diese Ergebnisse bereits teilweise in „Green Chemistry“ unter dem Titel „Homogeneous vinyl ester-based synthesis of different cellulose derivatives in 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate“ veröffentlicht.

3.2.1 Chemische Glucoselaurat Synthese in [EMIM]OAc

Die Vinylester-basierte Synthese von Glucoselaurat führt in der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc zu einer großen Anzahl von unterschiedlichen Produkten, die mithilfe der LC-MS und den korrespondierenden Massenspektren analysiert werden konnten (Kapitel 2.3.3 und Kapitel 2.2.4). Die Synthese begann biphasisch, da sich der verwendete Laurinsäurevinylester nicht mit [EMIM]OAc mischt. Mit voranschreitender Reaktion bzw. unter Temperatureinfluss bildet das Reaktionsgemisch jedoch eine einzige homogene Phase. Es sind im LC-MS Spektrum Massenaddukte nachweisbar, die den Produk-

ten Glucosemonolaurat, Glucosedilaurat, Glucosetrilaurat und Glucosetetralaurat zugeordnet werden können (Tabelle 8). Hierbei sind einige Addukte bei negativer Ionisierung als Ameisensäureaddukt nachweisbar (*M + FA - H*). Die meisten Produkte bilden ein Massenaddukt mit dem Kation der ionischen Flüssigkeit, dem 1-Ethyl-3-methylimidazolium (M + EMIM) (Tabelle 8). Es können LC-MS Addukte für Glucosemonolauratmonoacetat, Glucosedilauratmonoacetat, Glucosetrilauratmonoacetat, Glucosetetralauratmonoacetat nachgewiesen werden. Es wurden allerdings keine Massenaddukte von Glucosepentalaurat nachgewiesen. Die Peaks zwischen den jeweiligen Glucoselauraten und den zusätzlich acetylierten Glucoselauraten sind für Mono und Dilaurate/acetate mittels HPLC teilweise trennbar, während bei Glucosetrilauraten/acetaten und Glucosetetralauraten/acetaten keine Auftrennung erfolgte. Anhand der Doppelpeaks der Monolaurate/acetate und Dilaurate/acetate kann gezeigt werden, dass die Acetylierung deutlich schwächer als die Acylierung mit Laurinsäure ist (Anhang 6). Dennoch fällt die Acetylierung ins Gewicht und ist nicht vernachlässigbar. Für die anschließende semiquantitative Bestimmung der jeweiligen Produkte, wurden die jeweiligen Glucoselaurate immer mit ihren korrespondierenden Acetaten integriert.

Im Folgenden wird aus Gründen der Vereinfachung immer der Begriff „Glucoselaurat“ verwendet, obwohl eigentlich eine Peakfläche gemeint ist, die sich hauptsächlich aus Glucoselaurat und teilweise aus Glucoselaurat mit zusätzlicher Acetylierung ergibt.

Es konnte gezeigt werden, dass die größte Menge von Glucoselaurat bei ca. 60°C erhalten wird, während bei höheren und niedrigeren Temperaturen signifikant weniger Produkt gebildet wird bzw. durch etwaige Folgereaktion weiter umgesetzt wird. Die Menge an Glucosedilaurat, Glucosetrilaurat sowie Glucosetetralaurat zeigt bei einer Reaktionszeit von 2 - 4 Stunden ein Maximum, wobei die Produktmenge anschließend wieder abnimmt und nach ca. 18 Stunden zu einem Plateau tendiert. Das zeitliche Maximum für Glucosedilaurat geht dem Maximum für Glucosetrilaurat voraus (Abbildung 15). Glucosemonolaurat konnte nicht bei jedem Zeitpunkt quantifiziert werden, da der entsprechende Peak bei hoher Produktbildung mit dem Peak der freien Laurinsäure überlagert und demnach nicht separat integrierbar ist. Daher wurde nur der Verlauf von Di-, Tri- und Tetralauraten über die Zeit abgebildet. Bei der Ermittlung des Tempe-

raturoptimums war die gemessene Menge an Glucosetetralaurat sehr gering, weswegen sie nicht in der Grafik dargestellt ist. Im Anschluss an die Optimierung der Glucoselauratsynthese wurde die Reaktion auf die Celluloseebene übertragen.

Tabelle 8: Produkte, Massen und LC-MS-Addukte der Glucoselauratsynthese in [EMIM]OAc.

Molekül	Masse	Addukt positiv[a]	Addukt negativ[b]
Glucosemonolaurat	362,46	473,3 (*M+EMIM*)	407,3 (*M + FA - H*)
Glucosemonolauratmonoacetat	449,3	-	449,3 (*M + FA - H*)
Glucosedilaurat	544,76	655,97 (*M+EMIM*)	589,3 (*M + FA -H*)
Glucosedilauratmonoacetat	586,76	697,96 (*M+EMIM*)	-
Glucosetrilaurat	727,76	837,6 (*M+EMIM*)	771,5 (*M + FA - H*)
Glucosetrilauratmonoacetat	769,06	879,6 (*M+EMIM*)	-
Glucosetetralaurat	909,36	1020,0 (*M+EMIM*)	-
Glucosetetlauratmonoacetat	951,36	1062,0 (*M+EMIM*)	-
EMIM	111,21	111,21 (*M*)	-

[a] Kation der verwendeten ionischen Flüssigkeiten bildet bei der LC-MS-Analyse Addukte mit dem jeweiligen Glucoseester (M+EMIM).

[b] Bei der negativen Ionisierung bilden einige Glucoseester Addukte mit Ameisensäure (*M + FA - H*).

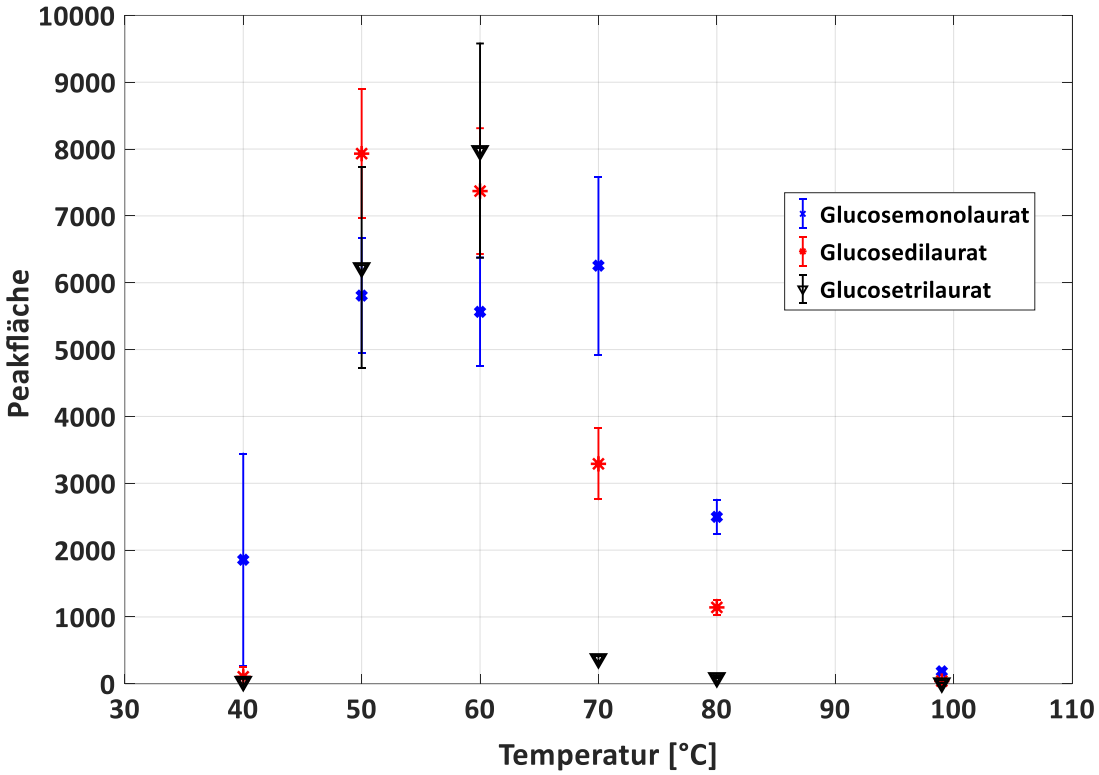


Abbildung 14: Temperaturabhängigkeit der Glucoselauratsynthese in [EMIM]OAc.
Es wurden 0,83 mmol/mg Glucose in [EMIM]OAc eingesetzt und mit 2 mol Laurinsäurevinylester (**29**) je mol Glucose für 22 Stunden bei unterschiedlichen Temperaturen und 600 rpm geschüttelt (Kapitel 2.2.4). Die Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt. Die semiquantitative Bestimmung der Produktbildung erfolgte mit HPLC-ELSD und die Identifikation der Produkte mit LC-MS (Kapitel 2.3.3).

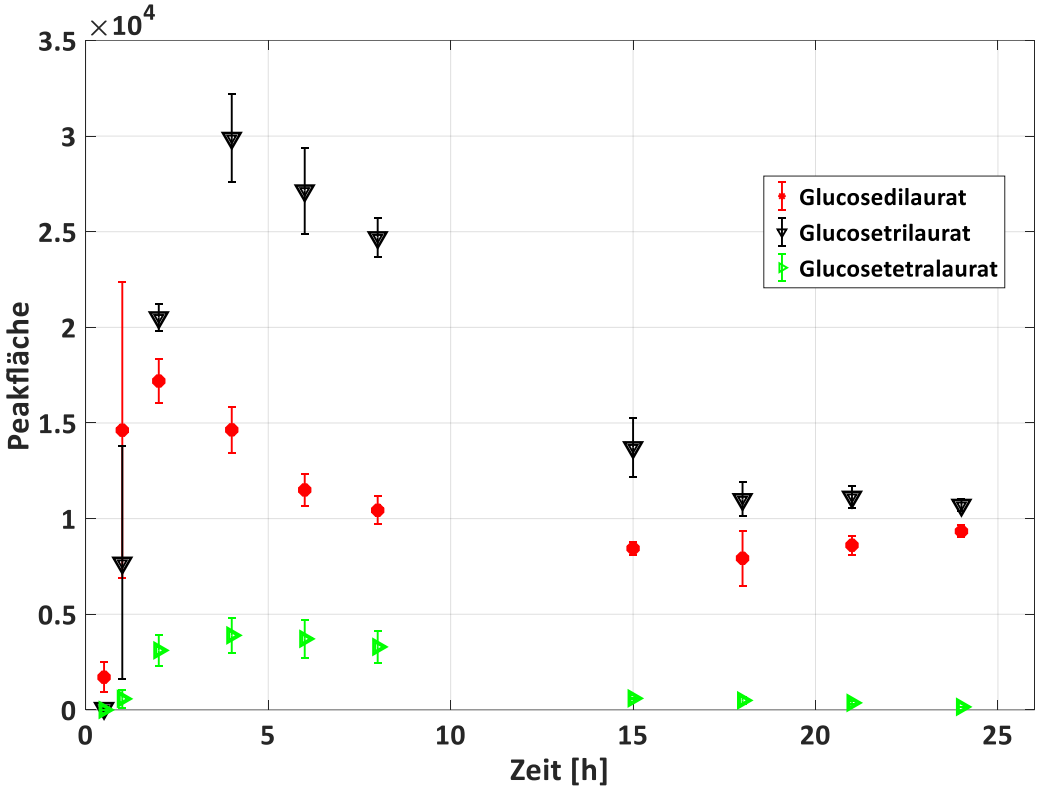
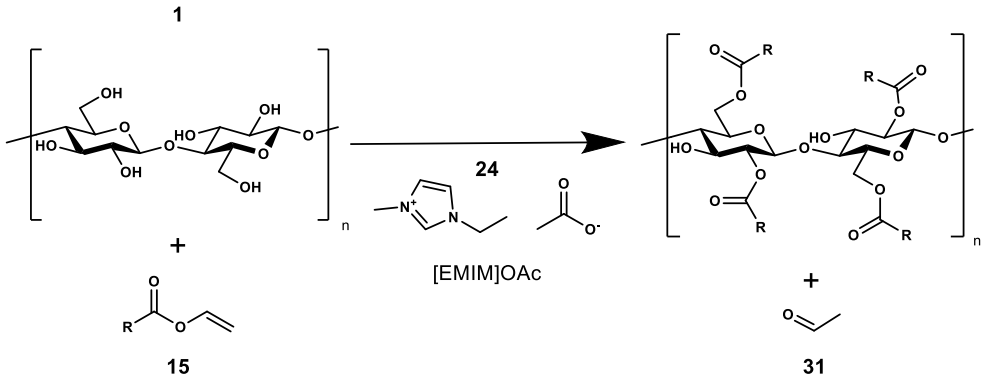


Abbildung 15: Zeitkinetik der Glucoselauratsynthese in [EMIM]OAc.
Es wurden 0,83 mmol/mg Glucose in [EMIM]OAc eingesetzt und mit 3 mol Laurinsäurevinylester (**29**) je mol Glucose bei 60°C und 600 rpm unterschiedlich lange geschüttelt (Kapitel 2.2.4). Da die Peakhöhe von Glucosemonolaurat nicht von der Peakfläche von freier Laurinsäure getrennt werden konnte, ist Glucosemonolaurat in der Abbildung nicht berücksichtigt. Die semiquantitative Bestimmung der Produktbildung erfolgte mit HPLC-ELSD und die Identifikation der Produkte mit LC-MS (Kapitel 2.3.3). Die Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt.

3.3 Das Cellulose-Vinylester-[EMIM]OAc-System



Schema 16: Vinylester-basierte Veresterung von Cellulose in [EMIM]OAc.
Die ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc (**24**) agiert als Lösungsmittel und Katalysator für die Vinylester-basierte Umesterung mit Cellulose (**1**) zu Celluloseestern und Acetaldehyd (**31**). Grundsätzlich kann die Veresterung von Cellulose (**1**) an allen Hydroxygruppen ablaufen, wobei eine Modifikation mit einem DS von bis zu 2,9 gemessen wurde.

Die Vinylester-basierte Veresterung von Alkoholen in [EMIM]OAc wurde im vorherigen Abschnitt bereits anhand der Veresterung von Glucose gezeigt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Parameter Zeit und Temperatur untersucht. Im Folgenden wurde die Reaktion auf die Celluloseebene übertragen, der Einfluss von Temperatur, Zeit und Substratmenge erneut untersucht und die Art verwendeten Acyldonoren variiert (Schema 16). Teile der hier gezeigten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Ann-Katrin Beurer erhalten, die sie im Rahmen einer betreuten Bachelorarbeit durchgeführt hat.[94] Zusätzlich wurden große Teile bereits in „Green Chemistry“ publiziert.

3.3.1 Synthese, Identifikation und Optimierung

In einer typischen Celluloseester-Synthese wurden 3 % w/w Cellulose in der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc gelöst und anschließend bei 80°C mit Vinylestern (2 - 5 mol je AGU) umgesetzt. Nach der Synthese wurde das Polymer ausgefällt, gereinigt und mittels FT-IR analysiert. Das FT-IR-Spektrum zeigt typische Celluloselaurat-Signale: Im Bereich zwischen 3200 cm^{-1} - 3500 cm^{-1} sind die Signale von nicht modifizierten Alkoholgruppen der Cellulose zu erkennen, welche deutlich geringer ausfallen, als in dem FT-IR-Spektrum von reiner Cellulose (Anhang 10). Bei 2921 cm^{-1} und 2852 cm^{-1} erscheinen Signale der CH_2- und CH_3-Gruppen der Laurinsäureseitenketten und bei 1741 cm^{-1} das charakteristische C=O Stretching einer Esterschwingung. Im Bereich um 1050 - 1150 cm^{-1} erscheinen charakteristische Signale von C-C, C-OH und C-H Gruppen des Cellulosegrundgerüstes.[95] Der Peak bei ca. 1050 cm^{-1} ist charakteristisch für die C-O-C Bindung in der glycosidischen Bindung.[96] Das Signal bei 721 cm^{-1} ist charakteristisch für Alkane mit mehreren Kohlenstoffatomen, kann also in diesem Fall der Laurinsäure zugeordnet werden (Schema 16). Um das Produkt der Vinylester-basierten Synthese

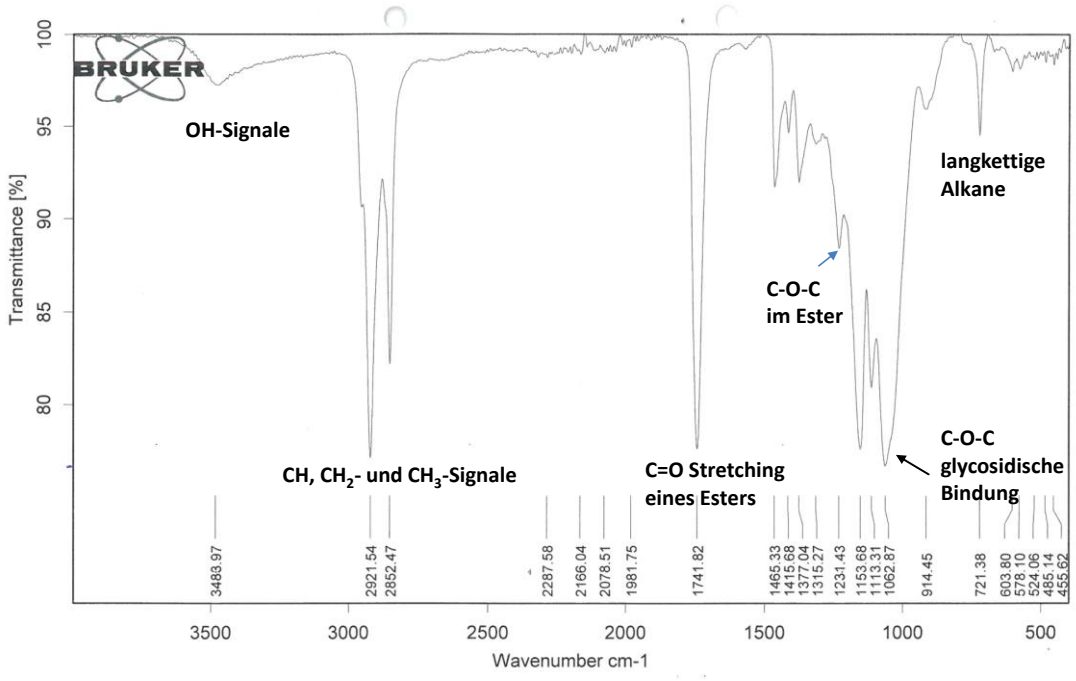


Abbildung 16: Typisches FT-IR-Spektrum von Celluloselaurat.
Celluloselaurat wurde unter der Verwendung von 3 mol Laurinsäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol aufgereinigt (Kapitel 2.2.5 und Kapitel 2.3.4). Einige charakteristische Peaks des Polymers sind im Spektrum ihren zugrundeliegenden Strukturmerkmalen zugeordnet.

weiter zu charakterisieren, wurde ein ^{1}H-NMR Spektrum aufgenommen. Die Signale der Anhydroglucoseeinheit (AGU) des Cellulosegrundgerüstes sind bei einer Verschiebung von 3,50 - 5,50 ppm sichtbar. Zusätzlich können die Signale bei einer Verschiebung von 2,20 - 2,40 ppm dem α-Kohlenstoff, sowie die Signale bei 1,40 - 1,70 ppm den β-Kohlenstoff des veresterten Laurates zugeordnet werden. Die Signale bei 1,10 - 1,35 ppm sind charakteristische Alkan-Signale, welche von den inneren Kohlenwasserstoffen der Laurinsäure hervorgerufen werden, während das Signal bei 0,85 - 0,90 ppm der terminalen Methylgruppe zugeordnet werden kann (Schema 16). Aus dem Verhältnis der Peakfläche der terminalen Methylgruppe und der Peakfläche der AGU lässt sich der Substitutionsgrad des Celluloseesters berechnen (Kapitel 2.3.4).

Auf Basis dieser NMR-Analytik wurde der Einfluss der Menge an Laurinsäurevinylester auf den Substitutionsgrad der Cellulose untersucht. Bei der Verwendung von 2 mol je AGU wird ein Substitutionsgrad von 1,6 und bei 3 mol je AGU ein Substitutionsgrad von 2,4 erhalten. Bei einer Verwendung von einem leichten Substratüberschuss von 4 mol je AGU wurde eine fast vollständige Substitution von 2,9 erreicht, wobei eine weitere Erhöhung des Acyldonors auf 5 mol je AGU in keiner weiteren Steigerung der Sub-

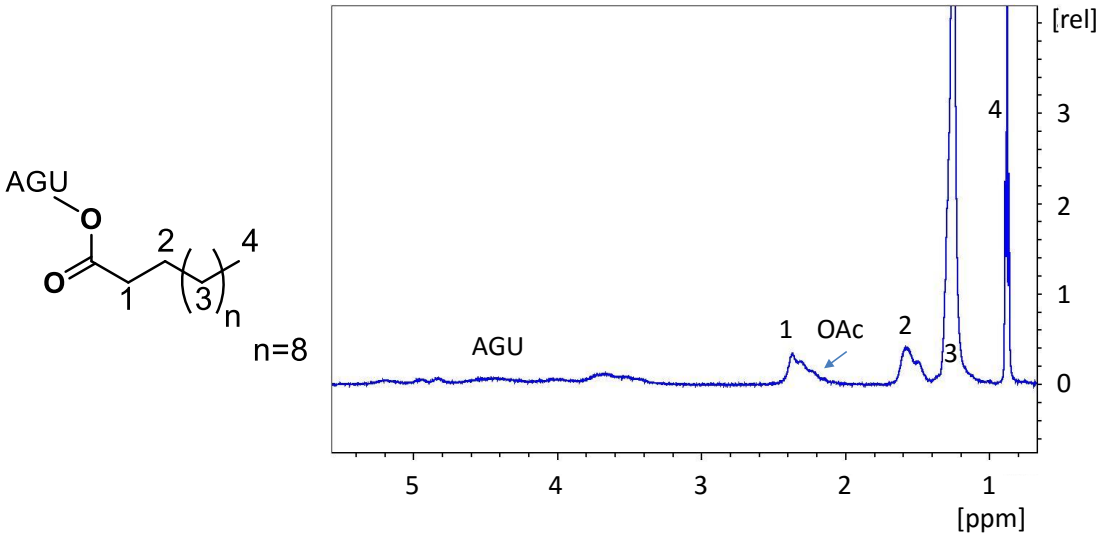


Abbildung 17: Struktur und korrespondierendes ^{1}H-NMR von Celluloselaurat.
Celluloselaurat wurde unter der Verwendung von 3 mol Laurinsäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol aufgereinigt (Kapitel 2.2.5 und Kapitel 2.3.4). Die einzelnen Peaks sind mit Nummern und Zeichen benannt, die den Abgleich mit der chemischen Struktur ermöglichen. Das mit „OAc“ markierte Signal kann dem α-Kohlenstoff von zusätzlich gebundenem Acetat zugeordnet werden.

stitutionsgrades (DS = 2,8) resultierte (Tabelle 9). Nachdem der Einfluss der Substratmenge untersucht wurde, schlossen sich Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur an. Bei Reaktionstemperaturen von 43 - 64 °C werden niedrigere Substitutionsgrade als 2,1 gemessen, während die höchsten Substitutionsgrade bei den Synthesetemperaturen von 74°C bzw. 80°C gemessen werden. Höhere Synthesetemperaturen von 90°C oder 110°C führen zu niedrigeren Substitutionsgraden (Abbildung 18). Als nächstes wurde der Einfluss der Reaktionszeit auf die Celluloselauratsynthese bei 80°C und einer Substratmenge von 3 mol je AGU untersucht. Innerhalb der ersten 30 Minuten verläuft die Reaktion sehr schnell und erreicht Substitutionsgrade von ca. 2,1. Nach 60 Minuten ist die Reaktion beendet und es werden DS-Werte zwischen 2,1 und 2,4 gemessen. Es wird in den anschließenden drei Stunden keine weitere Zunahme oder Abnahme im Substitutionsgrad beobachtet (Abbildung 19).

Tabelle 9: Einfluss der Menge von Laurinsäurevinylester auf den Substitutionsgrad.

Produkt*	Laurinsäurevinylester [mol je AGU]	DS
Celluloselaurat	2	1,6
	3	2,4
	4	2,9
	5	2,8

* Die Synthesen wurden bei 80°C und einer Reaktionszeit von 4 Stunden in Triplikaten durchgeführt

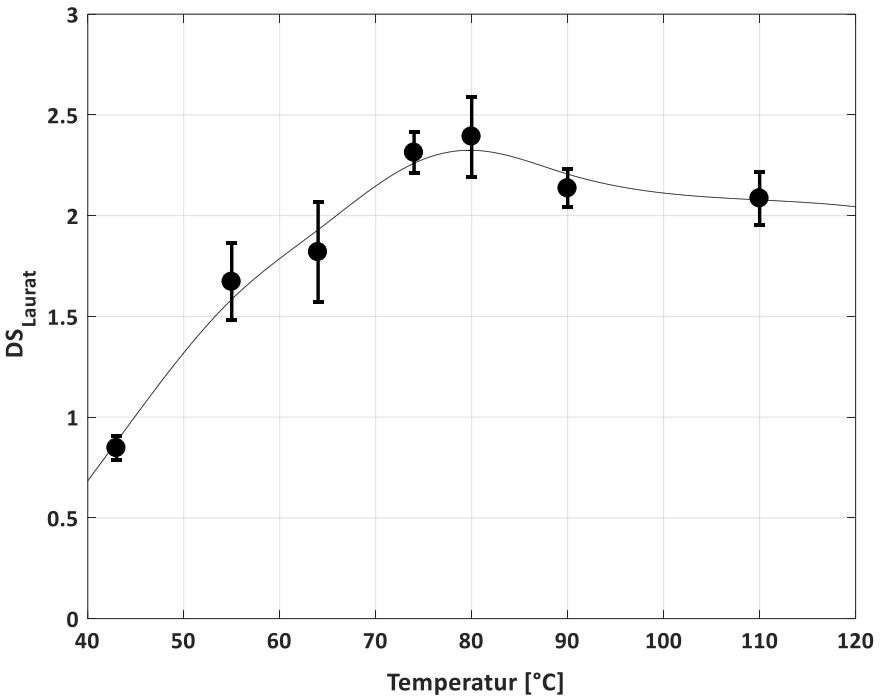


Abbildung 18: Temperaturabhängigkeit der Vinylester-basierten Celluloselauratsynthese.
Die Celluloselauratsynthese in [EMIM]OAc wurde mit 3 mol/AGU Laurinsäurevinylester bei einer Reaktionszeit von 4 Stunden und variierenden Temperaturen in Triplikaten durchgeführt (Kapitel 2.2.5 und Kapitel 2.3.4). Die Bestimmung des DS_{Laurat}-Wertes erfolgte mittels ^{1}H-NMR. Der Verlauf des Graphen wird mit einem „Smoothing Spline“ angenähert, um einen möglichen Verlauf anzudeuten.

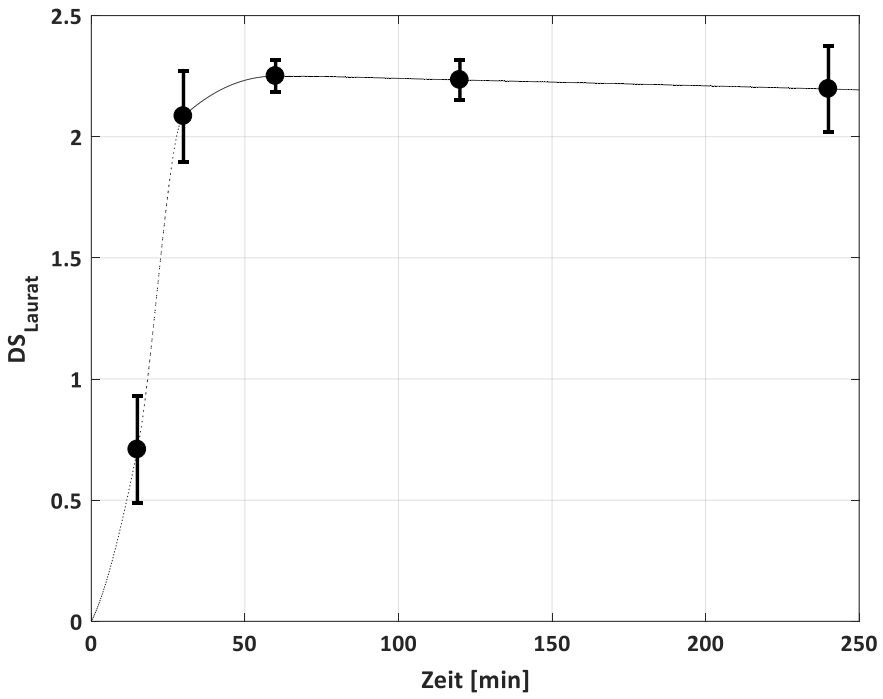


Abbildung 19: Reaktionskinetik der Celluloselauratsynthese bei 80°C.
Die Celluloselauratsynthese in [EMIM]OAc wurde mit 3 mol/AGU Laurinsäurevinylester bei 80°C in Triplikaten durchgeführt (Kapitel 2.2.5 und Kapitel 2.3.4). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und der Substitutionsgrad mittels ^{1}H-NMR bestimmt. Der Verlauf des Graphen wird mit einem „Smoothing Spline“ angenähert, um einen möglichen Verlauf anzudeuten.

3.3.3 Vergleich der Synthese mit anderen Syntheserouten

Um die Bedeutung der Vinylester-basierte Synthese besser abschätzen zu können, wurde sie mit einer auf Fettsäurechloriden-basierenden Synthese von Barthel und Heinze, welche in der Literatur sehr häufig zitiert und angewendet wurde, verglichen.[39] Dafür wurde die Synthese in der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl reproduziert und das Produkt dem Produkt der Vinylester-basierten Synthese gegenübergestellt (Tabelle 10). Sowohl die Synthese nach Barthel und Heinze als auch die Vinylester-basierte Synthese wurden bei äquimolaren Substratmengen und einer Synthesetemperatur von 80°C durchgeführt (Kapitel 2.2.5 und Kapitel 2.2.8). Nach den Synthesen zeigte die Reaktionsmischung nach Barthel eine deutliche Schwarzfärbung, während die Reaktionsmischung der Vinylester-basierten Synthese einen leichten Braunton besaß. Es waren deutlich mehr Waschschritte mit Methanol notwendig, um das Produkt der Fettsäurechlorid-basierten Synthese zu reinigen, als bei der Vinylester-basierten Synthese. Dennoch liefern beide Synthesen Celluloselaurat mit einem vergleichbaren Substitutionsgrad von 2,4 bzw. 2,3 (Tabelle 10). Das Molekulargewicht der Produkte unterscheidet sich jedoch signifikant. Während das Massenmittel M_w bei ca. 280.000 g/mol und das Zahlenmittel M_n bei 90.000 g/mol für die Vinylester-basierte Synthese lag, führt die Lauroylchlorid-basierte Synthese zu einem M_w von 9.000 und einem M_n von 6.000 (Kapitel 2.3.2). Die Fettsäurechlorid-basierte Synthese liefert also deutlich kleinere Celluloseester, obwohl die gleiche Cellulose für die Synthesen eingesetzt wurde.

Tabelle 10: Vergleich der Vinylester-basierten Synthese mit der Fettsäurechlorid-basierten Synthese*.

Acyldonor	Ionische Flüssigkeit	Menge an Acyldonor [mol je AGU]	Temp. [°C]	Zeit [h]	DS	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]
Laurinsäure-vinylester	[EMIM]OAc	3	80	4	2,4	280.000	90.000
Lauroylchlorid	[BMIM]Cl	3	80	2	2,3	9.000	6.000

* Die Fettsäurechlorid-basierte Synthese wurde gemäß den Vorschriften von Barthel und Heinze durchgeführt.[39]

3.3.4 Acetylierung als unerwünschte Nebenreaktion

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, ist die enzymatische Veresterung von Alkoholen in [EMIM]OAc mit definierten Acylgruppen unselektiv, da auch die Acetate der ionischen Flüssigkeit von dem Enzym als Substrat akzeptiert werden. Diese Acetylierungsproblematik ist jedoch nicht auf Enzyme beschränkt, da bereits gezeigt worden ist, dass auch die Verwendung von reaktiven Acyldonoren, wie beispielweise Carbonsäurechloride oder Carbonsäureanhydride (**14**), die Acetate der ionischen Flüssigkeit aktivieren und somit zu einer zusätzlichen Acetylierung der Cellulose führen.[33,44] Das Ausmaß der zusätzlichen Acetylierung der Cellulose bei der Vinylester-basierten Synthese wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersucht.

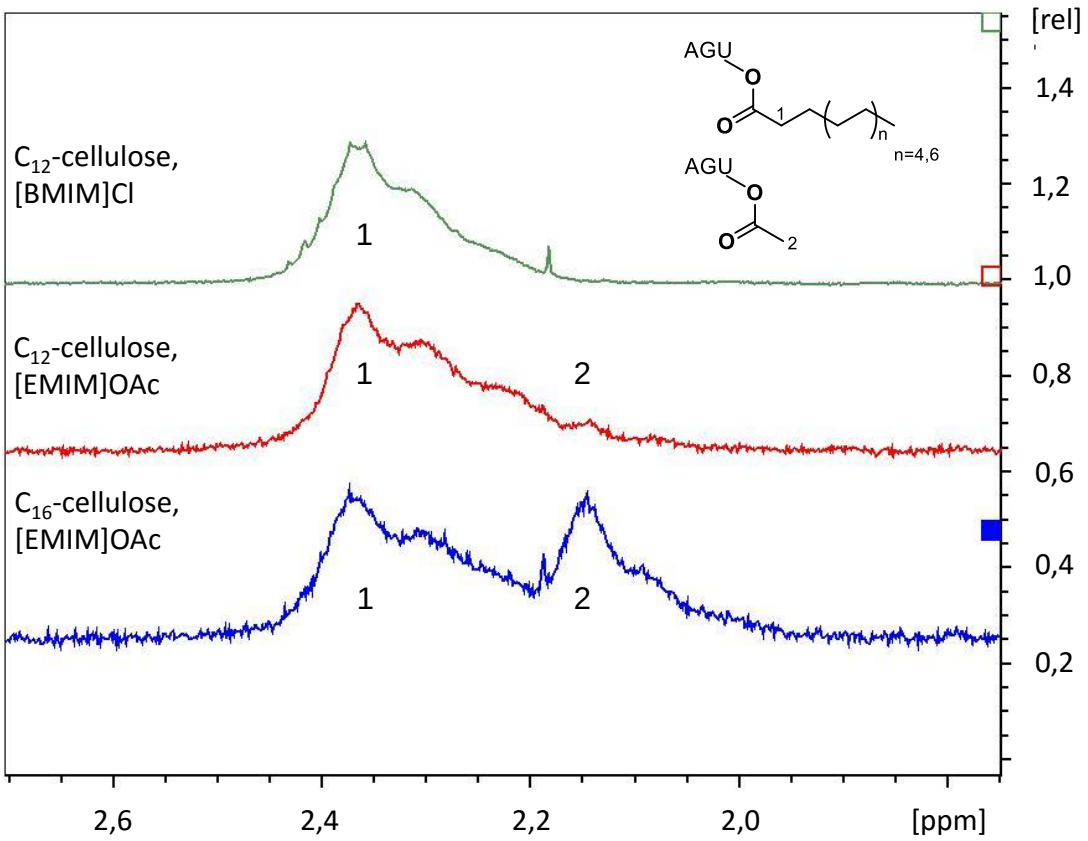


Abbildung 20: ^{1}H-NMR-Nachweis der unerwünschten Celluloseacetylierung.
Die Synthese von Celluloselaurat wurde in [BMIM]Cl durchgeführt, wobei 3 mol je AGU Lauroylchlorid verwendet wurden, während in [EMIM]OAc 3 mol je AGU Laurinsäurevinylester eingesetzt wurden (Kapitel 2.2.5 und Kapitel 2.2.8). Für die Synthese von Cellulosepalmitat wurden 3 mol je AGU Palmitinsäurevinylester in [EMIM]OAc verwendet. Das Signal der Protonen des α-Kohlenstoffs der Fettsäureseitenketten ist mit „1“ gekennzeichnet, während das Signal des α-Kohlenstoffs von Celluloseacetat mit „2“ gekennzeichnet ist (Kapitel 2.3.4). Das Celluloselaurat, welches in [BMIM]Cl synthetisiert wurde, zeigt keine zusätzliche Acetylierung, da kein Acetat als Anion in der ionischen Flüssigkeit zur Verfügung steht.

Die Bildung von Acetatestern wurde bereits auf Basis von Glucose gezeigt, da neben den Glucoselauraten auch Glucoselauratmonoacetate nachgewiesen wurden (Kapitel 3.2.1, Anhang 6). Diese zusätzliche Acetylierung der Glucose ist deutlich geringer als die Acylierung durch den jeweiligen Vinylester. Ein genaues Verhältnis zwischen acetylierten und nicht acetylierten Glucoselauraten konnte bei der Analyse der Glucoseester nicht bestimmt werden, da die jeweiligen Peaks nicht vollständig getrennt wurden (Anhang 6).

Die zusätzliche Acetylierung bei der Synthese von Celluloseestern in [EMIM]OAc konnte mittels ^{1}H-NMR analysiert werden. Der α-Kohlenstoff der Carbonylgruppe von Cellulosefettsäureestern, welche nach Barthel in [BMIM]Cl synthetisiert wurden, ergibt chemische Verschiebungen zwischen 2,10 ppm und 2,55 ppm. Im Gegensatz zu diesem Celluloseester zeigen Cellulosefettsäureester, welche in [EMIM]OAc synthetisiert wurden, eine zusätzliche Acetylierung. Dies kann im ^{1}H-NMR anhand eines zusätzlichen Signals bei 2,15 ppm gezeigt werden, welche der Methylgruppe von Celluloseacetaten zugeordnet werden kann (Abbildung 20). Die genaue Bestimmung des Acetat-Substitutionsgrades von hoch substituierten Cellulosefettsäureestern war nicht möglich, da die Signale im ^{1}H-NMR nicht vollständig getrennt werden konnten (Abbildung 20). Bei der Analyse von niedrig substituierten Celluloseestern konnten die Signale jedoch getrennt werden, was die Bestimmung des Acetylierungsgrades ermöglichte. Nach Celluloselaurat-Synthesen, ausgehend von Lauroylchlorid, Laurinsäureanhydrid oder Laurinsäurevinylester wurde jeweils der Acetylierungrad (DS_{Acetat}) bestimmt und relativ zum Acylierungsgrad von Laurinsäure (DS_{Laurat}) betrachtet.

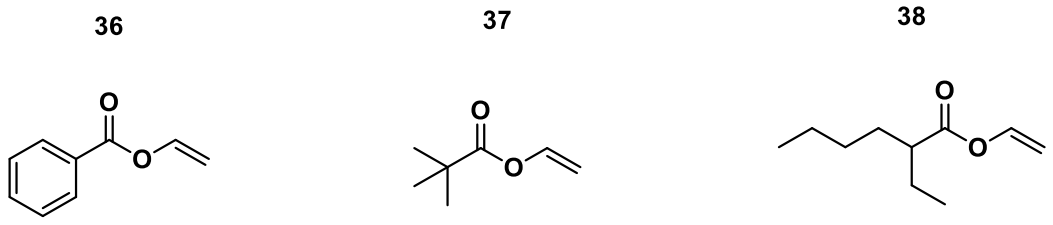
Die Reaktion, ausgehend von Lauroylchlorid und Laurinsäureanhydrid führt hauptsächlich zur Acetylierung, während die Acylierung mit Laurinsäure deutlich schwächer ausfällt. Das hoch reaktive Lauroylchlorid führt zu einer 88,2 %-igen Acetylierung, während das etwas weniger reaktive Laurinsäureanhydrid eine 83,3 %-ige Acetylierung aller substituierten Alkoholgruppen (DS_{Total}) zeigt (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu führt der Umsatz mit Laurinsäurevinylester zu einer 11,1 %-igen Acetylierung und dementsprechend zu einer 88,9 %-igen Acylierung der Cellulose. Zusätzlich zu der hohen Acetylierung bei der Verwendung von Lauroylchlorid und Laurinsäureanhydrid wurde eine

insgesamt geringere Substitution (DS_{Total}) von 0,34 bzw. 0,36 beobachtet, welche niedriger liegt als bei der Vinylester-basierten Synthese, bei der bei gleichen Substratäquivalenten der Substitutionsgrad über 2,1 lag (Abbildung 19). Die Menge der Acetylierung variiert nicht nur mit der Verwendung von unterschiedlich aktivierten Carbonsäuren (Fettsäurechloride, Anhydride, Vinylester), sondern auch mit der Verwendung von unterschiedlichen Seitenketten. Die Verwendung von sterisch anspruchsvollem und sehr unpolarem Palmitinsäurevinylester resultiert in einer Acetylierung von 20,0 % (Tabelle 11). Im Gegensatz dazu führen die kürzeren polareren Substrate, Laurinsäurevinylester und Octansäurevinylester, zu einer geringeren Acetylierung von 11,1 % bzw. 6,3 %. Die polaren Substrate Pivalinsäurevinylester (**37**) und Benzoesäurevinylester (**36**) resultieren in einer ebenfalls niedrigeren prozentualen Acetylierung zwischen 4 % und 5 %. Der moderat unpolare 2-Ethylhexansäurevinylester (**38**) führt hingegen zu einer Acetylierung von 18,1 % bei einem reduzierten DS_{Total} von 1,1, während der komplexe und verzweigte Neodecansäurevinylester mit 26,3 % die höchste Acetylierung der Cellulose bei gleichzeitig niedriger Totalsubstitution bewirkt (Tabelle 11, Schema 17).

Tabelle 11: Substitutionsmuster von verschiedenen Celluloseestern.

Acyldonor	Menge an Acyldonor [mol je AGU]	$DS_{Acyldonor}$	DS_{Acetat}	DS_{Total}	%-DS_{Acetat} [%] *
Octansäurevinylester (C_8)	2	1,5	0,1	1,6	6,3
Laurinsäurevinylester (C_{12})	2	1,6	0,2	1,8	11,1
Palmitinsäurevinylester (C_{16})	2	1,6	0,4	2,0	20,0
Benzoesäurevinylester	3	2,3	0,1	2,4	4,2
Pivalinsäurevinylester	3	2,1	0,1	2,2	4,5
2-Ethylhexansäurevinylester	3	0,9	0,2	1,1	18,1
Neodecansäurevinylester	3	0,24	0,086	0,326	26,3
Lauroylchlorid	3	0,04	0,3	0,34	88,2
Laurinsäureanhydrid	3	0,06	0,3	0,36	83,3

* Gibt den prozentualen Anteil der Acetylierung an der Gesamtsubstitution (DS_{Total}) an.



Schema 17: Zusätzliche Acyldonoren, welche für die Celluloseester-Synthese eingesetzt wurden. Dargestellt sind Benzoesäurevinylester (**36**), Pivalinsäurevinylester (**37**) und 2-Ethylhexansäurevinylester (**38**).

3.3.5 Zusätzliche Funktionalisierungen von Cellulose

Neben Cellulosefettsäureestern wurden, wie bereits im vorherigen Abschnitt vorweggenommen, andere Carbonsäureseitenketten durch die Vinylester-basierte Synthese an Cellulose gebunden. Beispielsweise konnte Cellulosebenzoat mit einem $DS_{Benzoat}$ von 2,3 und einem DS_{Acetat} von 0,1 synthetisiert werden. Das FT-IR-Spektrum des erhaltenen Cellulosebenzoats zeigt charakterisitische Peaks: Bei 1711 cm^{-1} (C=O im Ester (O=C-O-R)), bei 1264 cm^{-1} (C-O im Ester (O=C-O-R)), bei 3067 cm^{-1} (Benzolring C-H-Valenzschwingung), bei 1601 cm^{-1} und 1451 cm^{-1} (aromatische Ringschwingungen (C=C)) und bei 707 cm^{-1} (C-H-Deformationschwingungen des Aromaten (Anhang 9).[97] Das ^{1}H-NMR-Spektrum bestätigt ebenfalls die Bildung von Cellulosebenzoat durch charakteristische Aromatensignale bei δ = 6,80 - 8,20 ppm (Aromatische Protonen, 5H) und charakteristische Signale des Cellulosegrundgerüstes bei 2,80 - 5,50 ppm (Signale des Cellulosegrundgerüstes (AGU), 7H). Ein weiteres Signal bei δ = 1,55 - 2,10 ppm konnte wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, zusätzlich gebundenem Acetat zugeordnet werden.

Neben Cellulosebenzoat wurde auch Celluosepivalat mit einem $DS_{Pivalat}$ von 2,1 und einem DS_{Acetat} von 0,1 durch die Vinylester-basierte Synthese produziert (Tabelle 11). Die sieben Protonen des Cellulosegrundgerüstes (AGU) ergeben Signale bei δ = 3,00 - 5,50 ppm, während die Methylgruppen dem Signal bei δ = 1,30 - 0,90 ppm zugeordnet werden können (9H, Abbildung 21A). Die Protonen des α-Kohlenstoffs von zusätzlich gebundenem Acetat führen zu einem kleinen Signal bei ca. 2 ppm (3H). Das korrespondierende FT-IR-Spektrum zeigt ebenfalls charakteristische Peaks für Cellulosepivalat: Bei 2972 cm^{-1} und 2875 cm^{-1} (C-H Valenzschwingung innerhalb der CH_3 Gruppe), bei 1732 cm^{-1} (C=O im Ester (O=C-O-R), bei 1461 cm^{-1} und 1481 cm^{-1} (C-H asymmetrische Deformationsschwingung innerhalb der CH_3-Gruppe) und bei 1397 cm^{-1} und 1367 cm^{-1} (charakteristische Signale für die *t*-Butylgruppe des Pivalates) (Anhang 11).[97]

Zusätzlich wurde noch das verzweigte Cellulose-2-ethylhexyloat mit einem $DS_{2\text{-}Ethylhexyloat}$ und DS_{Acetat} von 0,2 synthetisiert. Das ^{1}H-NMR Spektrum zeigt charakteristische Signale: Die zwei terminalen Methylgruppen (ε, γ‘) führen zu Signalen bei

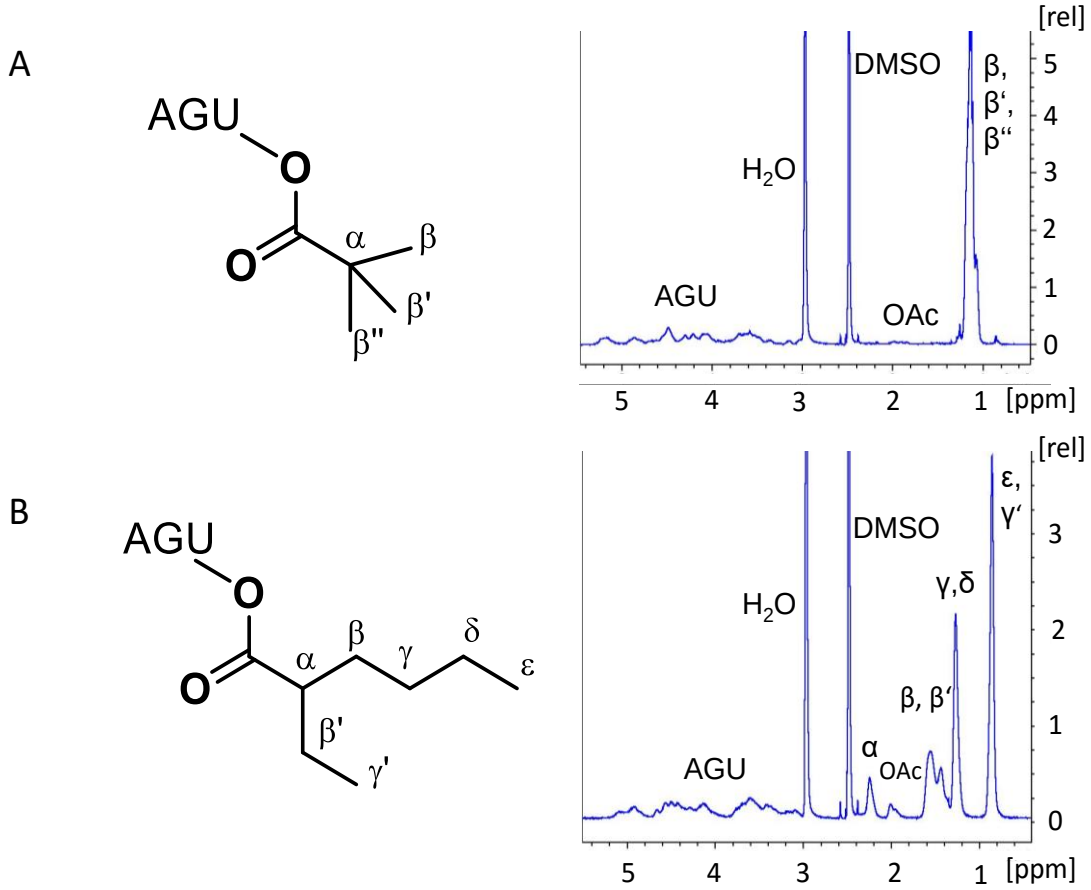


Abbildung 21: Struktur und ^{1}H-NMR Spektrum von Cellulosepivalat und Cellulose-2-ethylhexyloat. Cellulosepivalat (A) und Cellulose-2-ethylhexyloat (B) wurden in [EMIM]OAc mit 3 mol je AGU des jeweiligen Vinylesters bei 80°C synthetisiert (Kapitel 2.3.4). Der „OAc"-Peak kann den Protonen des α-Kohlenstoffs von zusätzlich gebundenem Acetat zugeordnet werden. Die restlichen Signale können durch Abgleich mit den links dargestellten Strukturen zugeordnet werden.

δ = 0.95 - 0.70 ppm (6H), die Protonen der γ- und δ-Kohlenstoffe der Hexylgruppe resultieren in Signalen bei δ = 1,35 - 1,10 ppm (4H) und die Protonen des β-Kohlenstoffes der Hexylgruppe und der β'-Kohlenstoff der Ethylseitenketten ergeben Signale bei δ = 1,65 - 1,35 ppm (Abbildung 21B). Zusätzlich gebundenes Acetat führt zu Signalen bei 1,85 - 2,10 ppm (3H). Die sieben Protonen des Cellulosegrundgerüstes (AGU) führen zu Signalen bei δ = 3,00 - 5,50 ppm. Im FT-IR-Spektrum waren ebenfalls charakteristische Signale beobachtbar: Im Bereich von 3500 cm^{-1} nicht-substituierte Alkoholsignale, bei 2872 cm^{-1} und 2958 cm^{-1} (C-H-Valenzschwingungen) und bei 1732 cm^{-1} (C=O im Ester (O=C-O-R), Anhang 12).

Des Weiteren wurde Celluloseneodecanoat synthetisiert, wobei die Synthese mit 3 mol Neodecansäurevinylester je AGU zu einem $DS_{Neodecanoat}$ von 0,24, einem DS_{Acetat} von

0,086 und einem RDS von 0,22 führt, während die Synthese mit 10 mol Neodecansäurevinylester je AGU zu einem RDS von 0,43 führt, wobei hier der $DS_{Neodecanoat}$-Wert und DS_{Acetat}-Wert, aufgrund der Unlöslichkeit des Produktes nicht durch ^{1}H-NMR analysiert werden konnte. Das ^{1}H-NMR-Spektrum von Celluloseneodecanoat (DS = 0,22) zeigt charakteristische Neodecansäuresignale im Bereich zwischen 0,70 und 1,80 ppm, zusätzliche Acetatsignale bei 2 ppm und AGU-Signale zwischen 3,10 ppm und 5,10 ppm (Anhang 17). Da Neodecansäure aus unterschiedlich verzweigten Isomeren der Decansäure besteht, können die einzelnen Signale nicht eindeutig spezifischen Strukturen zugeordnet werden. Das Zeichnen aller möglichen Isomere und die Vorhersage ihrer chemischen Verschiebung mit dem Programm „ChemDraw“ ergeben jedoch, dass alle Neodecanprotonen eine chemische Verschiebung unter 1,8 aufweisen müssen. Daher können alle Signale im ^{1}H-NMR unterhalb von 1,8 Neodecansäureestern zugeordnet werden. Das FT-IR-Spektrum zeigt im Bereich von 3500 cm^{-1} nicht substituierte Hydroxygruppen-Signale, bei 2872 cm^{-1} und 2929 cm^{-1} C-H-Valenzschwingungen und bei 1727 cm^{-1} ein charakteristisches O=C-O-R Signal (Anhang 18).

3.4 FT-IR-Analytik und relativer Substitutionsgrad (RDS)

Wie bereits im letzten Abschnitt angewendet, kann die FT-IR-Analytik genutzt werden, um Celluloseester qualitativ anhand charakteristischer Signale zu identifizieren. Hierbei ist die FT-IR-Analytik für sich alleine meist nicht ausreichend, um ein Produkt zu identifizieren, jedoch kann sie in Kombination mit anderen Analysemethoden, wie beispielsweise NMR oder Massenbestimmung sehr nützlich bei der Identifikation von Substanzen sein. Zusätzlich zu qualitativen Aussagen kann die FT-IR-Analytik auch zur quantitativen Bestimmung von Substanzen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz eingesetzt werden. Da im Laufe der hier vorliegenden Arbeit eine große Anzahl von FT-IR-Spektren von verschiedenen Celluloseestern mit unterschiedlichen Substitutionsgraden und unterschiedlichen funktionellen Gruppen vorlagen, wurde die Anwendbarkeit der Substitutionsbestimmung mittels FT-IR-Analytik untersucht.

Ein sehr charakteristisches Signal der synthetisierten Celluloseester ist das Estersignal welches zwischen 1720 - 1743 cm^{-1} auftritt. Ein anderes, für das Cellulosegrundgerüst charakteristische Signal, erscheint bei 1019 - 1070 cm^{-1} und kann der glycosidischen Bindung des Cellulosegrundgerüstes zugeordnet werden.[96] Das Verhältnis zwischen Estersignal und dem Signal des Cellulosegrundgerüstes sollte proportional zum DS sein, da dieselben Teile des Celluloseesters in Beziehung zueinander gesetzt werden: Cellulosegrundgerüst und Seitenkette. Daher wurde anhand der FT-IR-Spektren ein sogenannter „relativer Veresterungsgrad“ nach Formel 12 und Formel 13 definiert:

Formel 12: Berechnung der Absorption.

$$Absorption\ [\%] = 100 - Transmission\ [\%]$$

Formel 13: Berechnung des RDS-Wertes.

$$RDS = \frac{Absorption\ (1720 - 1743\ \mathrm{cm}^{-1})}{Absorption\ (1019 - 1070\ \mathrm{cm}^{-1})}$$

Die Auswahl der charakteristischen Peaks und das Ablesen der jeweiligen Transmission ist in Abbildung 20 schematisch dargestellt. Die Korrelation zwischen – mittels FT-IR gemessenem RDS und aus ^{1}H-NMR-Spektren abgeleitetem DS – wurde anhand einer Vielzahl von unterschiedlichen Celluloseestern, mit variierenden Seitenketten und vari-

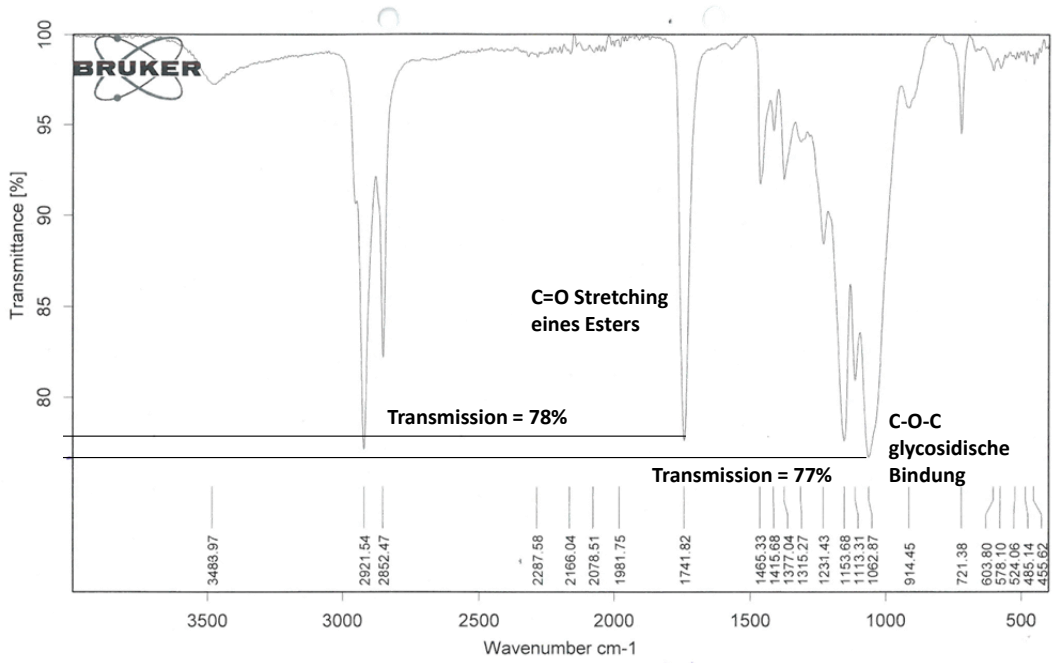


Abbildung 22: Schematische Darstellung der RDS-Berechnung.
Die bedeutenden Peaks sind ihren zugehörigen Strukturelementen zugeordnet. Die Synthese von Celluloselaurat erfolgte unter Verwendung von 3 mol Laurinsäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden (Kapitel 2.2.5). Die Peaks bei 1741 cm^{-1} kann der C=O-Valenzschwingung eines Esters zugeordnet werden. Das Cellulosesignal bei 1062 cm^{-1} wird durch die glycosidische Bindung der Cellulose hervorgerufen. Das hier gezeigte Spektrum zeigt gemäß **Formel 12** und **Formel 13** einen RDS-Wert von 0,96**.**

ierendem Substitutionsgrad, untersucht. In den Datensätzen sind sowohl RDS-DS-Paare von Celluloselaurat, Celluloseoctanoat, Cellulosepalmitat, Celluloseneodecanoat, Cellulose-2-ethylhexyloat und Cellulosepivalat enthalten. Der RDS-Wert steigt mit ansteigendem DS der Celluloseester. Im RDS-Bereich von 0,3 bis ca. 1,0 bzw. im DS-Bereich zwischen 0,24 und 2,3 ergibt sich eine lineare Regression mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,94 (Abbildung 23A). Dieses relativ hohe Bestimmtheitsmaß spricht für einen linearen Zusammenhang zwischen RDS und DS in den definierten Grenzen der Regression. Um die Robustheit des RDS-Wertes zu überprüfen, wurden ein Celluloselaurat mit einem RDS von 0,76 mit unterschiedlichen Mengen an modifizierter Cellulose gemischt und der RDS-Wert der Mischung gegen den prozentualen Anteil an Celluloselaurat aufgetragen (Abbildung 23B). Für RDS-Werte > 0,2 scheint ein relativ guter linearer Zusammenhang zwischen RDS und Menge an Celluloselaurat zu

bestehen. Für niedrige RDS-Werte wird der RDS, aufgrund eines schlechteren Signal-Rausch-Verhältnisses inakkurat (Abbildung 23B).

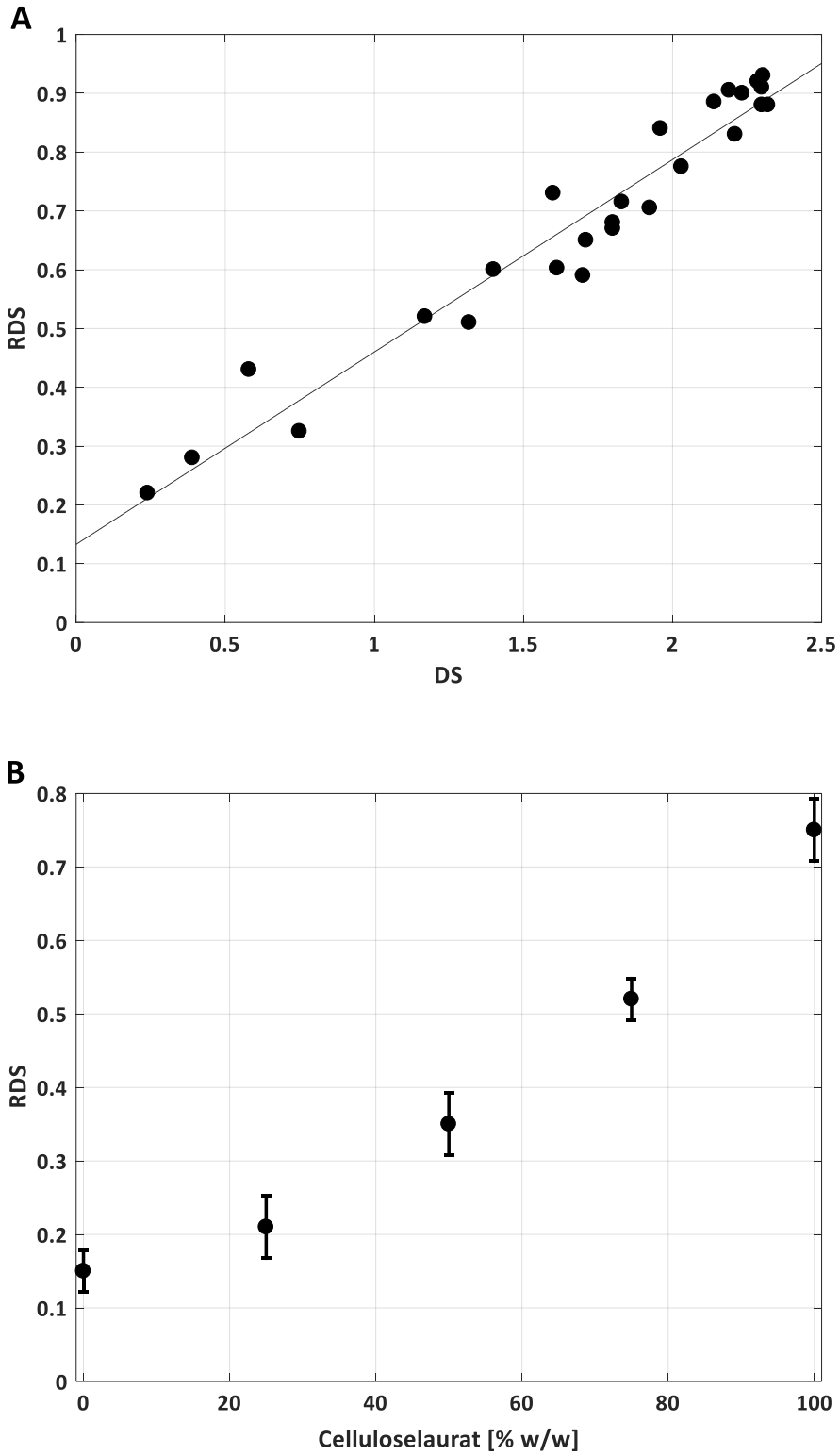


Abbildung 23: Charakteristische Beziehungen des RDS-Wertes.
Die Korrelation von RDS-Werten, welche aus FT-IR-Spektren abgeleitet wurden und DS-Werten, welche durch ^{1}H-NMR-Analytik bestimmt wurden (**A**). Zusätzlich wurden ein Celluloselaurat mit einem RDS von 0,76 mit nativer Cellulose vermengt und der RDS-Wert der Mischungen gegen den Anteil an Celluloselaurat aufgetragen (**B**).

3.5 Upscaling und Recycling der Vinylester-basierten Synthese

Um die Anwendbarkeit der vorgestellten Vinylester-basierten Synthese im größeren Maßstab zu untersuchen, wurde die Reaktion auf ein Lösungsmittelgewicht von 2,5 kg hochskaliert (Abbildung 24). Im Rahmen dieses Upscalings wurden weitere Parameter wie Massenbilanz und Recycling der beschriebenen Synthese genauer untersucht. Nach einer durchgeführten Synthese wurde die ionische Flüssigkeit recycelt und erneut für die Synthese eingesetzt, wobei insgesamt drei Synthese-Recycling-Zyklen durchlaufen wurden. Die gesamte Prozedur der Synthese und des Recyclings wurde allerdings nicht reproduziert, da die hohen Kosten für die ionische Flüssigkeit eine Reproduktion mit neuer ionischer Flüssigkeit erschweren. Die aus dem Upscaling- bzw. Recycling-Experiment gewonnenen Erkenntnisse, wie beispielsweise Nebenreaktionen wurden jedoch im kleineren Maßstab reproduziert und verifiziert.

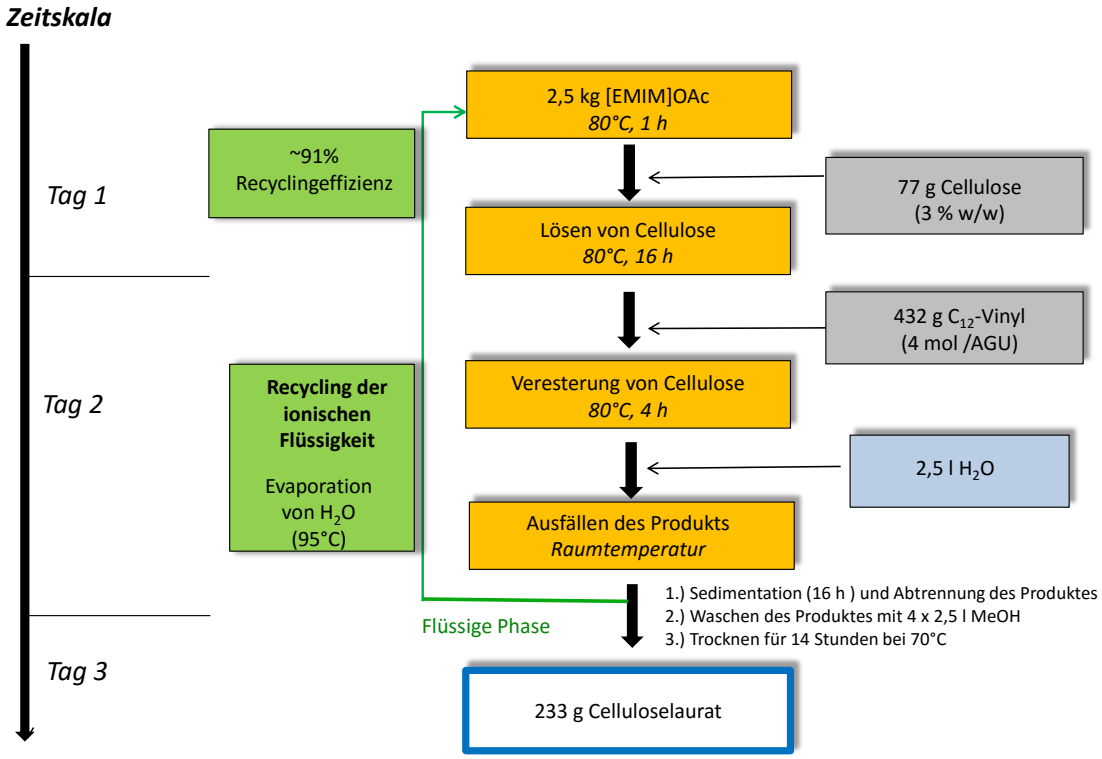


Abbildung 24: Flussdiagramm der Celluloselauratsynthese.
Das Flussdiagramm stellt am Beispiel der ersten Synthese des Upscaling den Prozessablauf dar. Die Zeitskala am linken Rand unterteilt den Prozess in die jeweiligen Synthesetage. Die Lösezeit wird im Flussdiagramm mit 16 Stunden angegeben, wobei zu beachten ist, dass sich diese Lösezeit mit voranschreitendem Recycling der ionischen Flüssigkeit verkürzt (Kapitel 3.6).

3.5.1 Das Upscaling (1. Synthese)

Die Vinylester-basierte Synthese von Celluloselaurat wurde in 2,5 kg [EMIM]OAc durchgeführt (Kapitel 2.2.6). Im ersten Reaktorlauf wurden 3 % w/w (77 g) Cellulose innerhalb von 16 Stunden bei 80°C gelöst. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 mol (413,6 g) Laurinsäurevinylester je AGU gestartet, was nach 4 h Reaktionszeit zu 233 g Celluloselaurat führte (Abbildung 24). Das erhaltende Celluloselaurat liegt als weißes Pulver vor und besitzt einen DS_{Laurat} von 2,3 (Tabelle 12). Die Menge an zusätzlicher Acetylierung konnte aufgrund der schlechten Signaltrennung im ^{1}H-NMR nicht genau bestimmt werden. Eine grobe Abschätzung, basierend auf Vergleichen mit anderen NMR-Spektren und den Ergebnissen aus Tabelle 11, deuten auf einen DS_{Acetat} von ca. 0,2 - 0,3 hin. Das Celluloselaurat war in $CDCL_3$ und THF löslich und besitzt ein Massenmittel (M_w) von 232.072 g/mol. Während der ersten 30 Minuten der Reaktion erhöht sich die Temperatur von 80°C auf ca. 100°C, was für einen exothermen Charakter der Vinylester-basierten Synthese spricht.

Tabelle 12: Prozessparameter der verschiedenen Reaktorläufe.

Reaktorlauf	RDS	DS	C_{12}-Vinyl [g][a]	Cellulose [g][b]	Celluloselaurat [g]	MW [g/mol]
1. Synthese	0,92	2,3	431,6	77	233	232.072
2. Synthese (1. Recycling)	0,88	2,3	401,7	72	272	257.942
3. Synthese (2. Recycling)	0,68	1,8	353,0	63	153	n.d.[c]
4. Synthese (3. Recycling)	0,60	1,4	336,6	60	120	n.d.

[a] entspricht 4 mol je AGU, [b] entspricht 3 w/w %, [c] nicht definiert

3.5.2 Recycling des Upscalings (Synthesen 2-4)

Ein Prozess, basierend auf ionischen Flüssigkeiten, ist unter ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkten nur mit einem erfolgreichen Recycling der ionischen Flüssigkeit vorstellbar. Daher wurde das Recycling der ionischen Flüssigkeit nach der Vinylester-basierten Synthese untersucht. Das synthetisierte Celluloselaurat wurde nach der Synthese durch die Zugabe von Wasser ausgefällt. Aufgrund seiner geringen Dichte schwimmt das Celluloselaurat nach der Sedimentation auf, wodurch es leicht abgetrennt werden konnte. Die ionische Flüssigkeit wurde anschließend durch Evaporation des Wassers bei 95°C und Anlegen eines Stickstoffstroms zurückgewonnen. Von den 2500 g [EMIM]OAc konnten nach der ersten Synthese 2323 g (93%) zurückgewonnen werden. Mit voranschreitenden Recyclingzyklen variiert die Recycling-Effizienz zwischen 88 % und 95 % (Tabelle 13), sodass mit einer durchschnittlichen Recyclingeffizienz von 91 % nach 4 Synthesen immer noch 1707 g der ursprünglichen 2500 g zur Verfügung stehen. Der erhaltene Substitutionsgrad bei der 2. Synthese mit recycelter ionischer Flüssigkeit führt zu einem ähnlichen Substitutionsgrad (2,3) wie in der 1. Synthese (Tabelle 13). Bei der 3. und 4. Synthese sinkt der Substitutionsgrad jedoch auf 1,8 bzw. 1,4 ab. Dieselbe Tendenz kann auch anhand des RDS-Wertes verfolgt werden, der in den ersten beiden Synthesen bei 0,92 bzw. 0,88 liegt und anschließend auf 0,68 bzw. 0,60 abfällt. Neben der Abnahme im Substitutionsgrad fällt auch die Produktmenge von 233 g bzw. 272 g auf 153 g und anschließend auf 120 g ab (Tabelle 13).

Tabelle 13: Recycling von [EMIM]OAc.

Reaktorlauf	Einsatz an [EMIM]OAc [g]	Recyceltes [EMIM]OAc [g]	Recycling Effizienz [%]
1. Synthese	2500	2323	93
2. Synthese (1. Recycling)	2323	2043	88
3. Synthese (2. Recycling)	2043	1940	95
4. Synthese (3. Recycling)	1940	1707	88

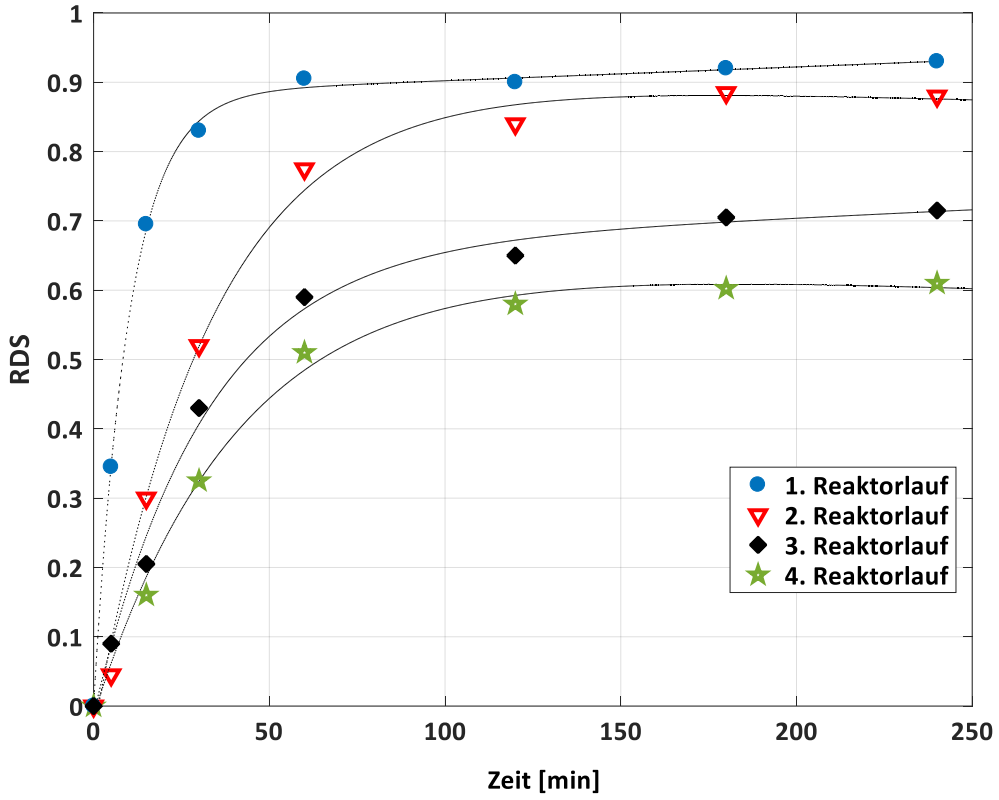


Abbildung 25: Zeitkinetik der Celluloselauratsynthese bei verschiedenen Reaktorläufen.
Während der Celluloselauratsynthese wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen und mittels FT-IR analysiert wurden. Die Berechnung des RDS-Wertes erfolgte nach Formel 12 und Formel 13. Nach jeder Synthese wurde die ionische Flüssigkeit recycelt und für den nächsten Reaktorlauf als Reaktionsmedium eingesetzt (Kapitel 2.2.6 und Kapitel 2.3.4).

Neben der „Endpunktbestimmung“ durch Messung der Substitutionsgrade nach 4 Stunden wurde auch die Reaktionskinetik der Reaktorläufe mittels RDS bestimmt. Im ersten Reaktorlauf ist die Veresterung der Cellulose nach 60 Minuten mit einem RDS von ca. 0,9 abgeschlossen und bleibt daraufhin für die nächsten drei Stunden auf demselben Niveau (Abbildung 25). Bei dem 2. Reaktorlauf ist die Reaktion deutlich langsamer. Während bei dem ersten Reaktorlauf nach 30 Minuten bereits ein RDS-Wert von 0,83 erreicht wird, ist der RDS beim 2. Reaktorlauf erst bei 0,52. Die RDS-Werte der Endprodukte sind mit 0,88 bzw. 0,92 auf einem ähnlichen Niveau. Bei Reaktorlauf 3 und 4 ist die Cellulose-Veresterung nach 30 Minuten mit RDS-Werten von 0,43 bzw. 0,32 erneut niedriger, wobei auch die Endprodukte deutlich geringere RDS-Werte von 0,68 bzw. 0,60 aufweisen (Abbildung 25). Neben der verringerten Effizienz der Synthe-

se bei wiederholtem Recycling wurde eine höhere Lösegeschwindigkeit der Cellulose in der ionischen Flüssigkeit beobachtet, die im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.6 Verbesserte Löslichkeit von Cellulose

Das Lösen von Cellulose ist ein langwieriger Prozess, der hohe Temperaturen und lange Reaktionszeiten erfordert. Niedrigere Temperaturen und kürzere Lösungszeiten sind für eine wirtschaftliche Cellulosemodifikation vorteilhaft, da sie die Prozessdauer verringern und damit die Degradation der Cellulose und des Lösungsmittels minimieren. Im Rahmen des im Kapitel 3.5.2 beschriebenen Recyclings wurde eine beschleunigte Löslichkeit von Cellulose nach voranschreitendem Recycling beobachtet, dessen molekulare Grundlagen in diesem Kapitel untersucht werden.

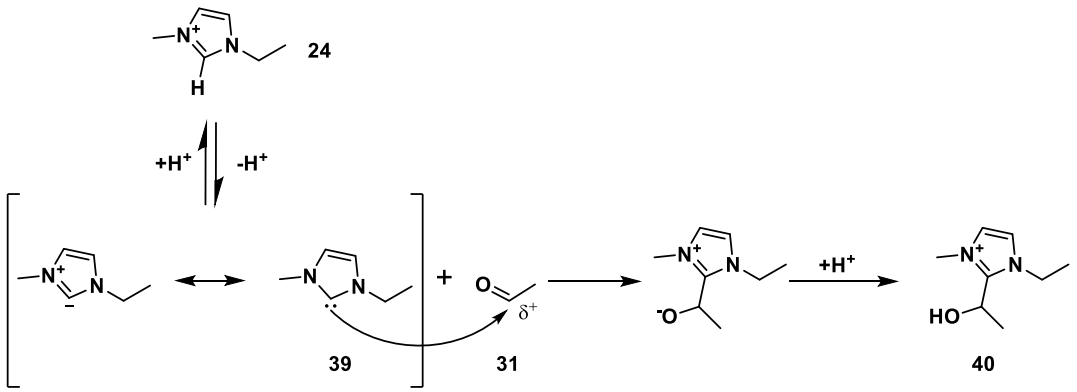
3.6.1 Cellulose-Löslichkeit und Kationen-Identifikation

Die Lösezeit von 3 % w/w Cellulose im 1. Reaktorlauf beträgt 16 h bei 80°C. Im 2. Reaktorlauf ist die Lösezeit auf 8 h halbiert, während die Cellulose bei der 3. Synthese nach 30 Minuten vollständig gelöst vorliegt. Bei der 4. Synthese ist die Cellulose schon nach 5 Minuten homogen gelöst. Um den Grund für die dramatisch reduzierte Lösezeit der ionischen Flüssigkeit zu finden, wurde mittels NMR-Analytik nach Veränderungen in der Struktur der ionischen Flüssigkeit gesucht. Im ^{1}H-NMR können zusätzliche Signale beobachtet werden, die auf eine Veränderung der Struktur der ionischen Flüssigkeit mit voranschreitendem Recycling hindeuten (Kapitel 2.3.5). Nach diesem Ergebnis wurde vermutet, dass Acetaldehyd – als Nebenprodukt der Vinylester-basierten Celluloseester-Synthese – mit [EMIM]OAc reagiert. Um dies zu überprüfen, wurde [EMIM]OAc bei Raumtemperatur mit äquimolaren Mengen an Acetaldehyd umgesetzt, was zu einer exothermen Reaktion und einem Produkt mit festem Aggregatszustand führt (Kapitel 2.2.9).

Tabelle 14: Verlauf der Lösezeit und des EHEMIM-Gehalts bei voranschreitendem Recycling.

Reaktorlauf	Lösezeit (3 % w/w Cellulose)	EHEMIM-Kationanteil [Kation-%]
1. Synthese	16 h	0
2. Synthese (1. Recycling)	8 h	14
3. Synthese (2. Recycling)	30 min	27
4. Synthese (3. Recycling)	5 min	38

Das zugehörige ^{1}H-NMR zeigt dieselben Signale wie die recycelte ionische Flüssigkeit und deutet auf eine unvollständige Umsetzung hin. Nachdem die Reaktion bei 80°C wiederholt wurde, konnte ein fast vollständiger Umsatz (85 %) erreicht werden. Das Produkt ist bei 80°C flüssig, verfestigt sich jedoch beim Abkühlen auf Raumtemperatur. Das zugehörige ^{1}H-NMR deutet auf einen 85 %-igen Umsatz hin und erlaubt die Identifikation des Produktes (Kapitel 2.3.5). Bei der vorgeschlagenen Struktur handelt es sich um 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazolium (EHEMIM) (**40**), welches vermutlich durch die Addition einer EMIM-Carben-Spezies (**39**) an den α-Kohlenstoff von Acetaldehyd (**31**) entsteht (Schema 18). Im Folgenden werden die im ^{1}H-NMR auftretenden Peaks einer Probe, bestehend aus einem Kationenanteil von 85 Kationen-% EHEMIM (**40**) bzw. 15 Kationen-% EMIM, den jeweiligen Protonen zugeordnet. Die Protonen der Methylgruppe von EHEMIM (**40**) ergeben ein Singulett bei 3,88 ppm während die Protonen der Methylgruppe von EMIM ein Singulett bei 3,86 ppm erzeugen (Abbildung 26A). Die vicinalen Protonen des α-Kohlenstoffes der Ethylgruppe von EMIM liefern ein Quartett bei 4,20 ppm (Abbildung 26A). Im Gegensatz dazu führt der chirale Charakter des EHEMIM Kations (**40**) zu einer geminalen Kopplung der Protonen des α-Kohlenstoffs der Ethylgruppe – diese Protonen sind also im ^{1}H-NMR nicht äquivalent.



Schema 18: Bildung von 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazoliumacetat (40), ausgehend von [EMIM]OAc (24) und Acetaldehyd (31).
Die Reaktion verläuft vermutlich über eine EMIM-Carbenspezies (**39**) und ist exotherm.

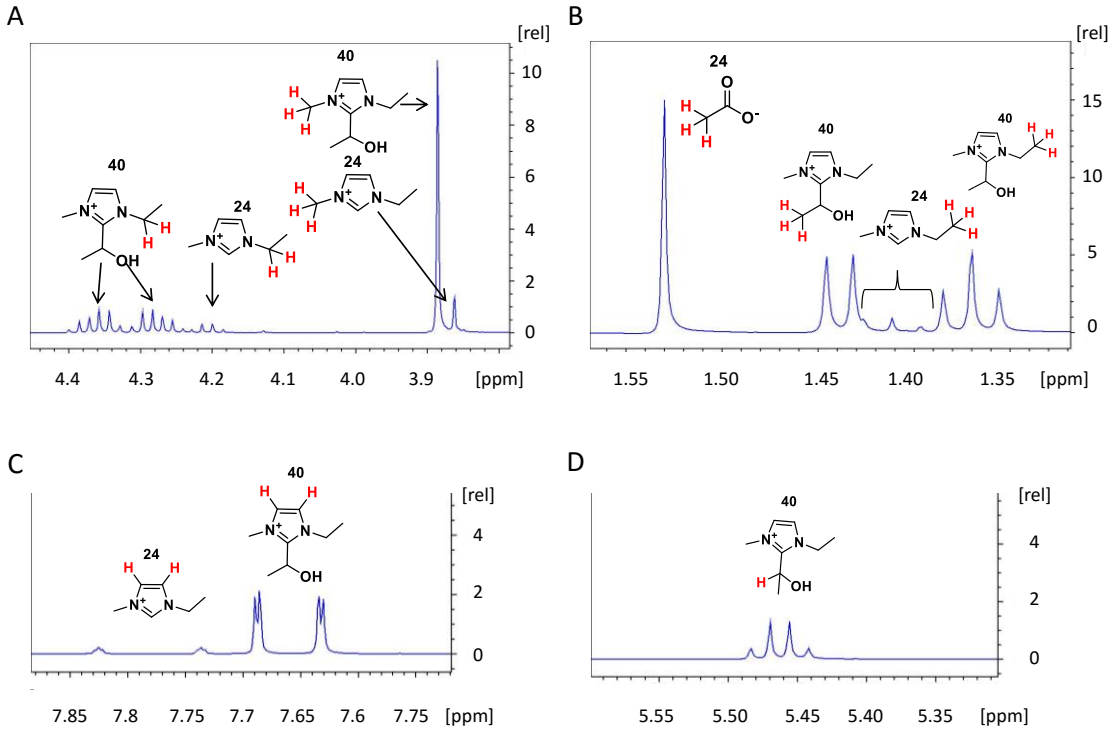


Abbildung 26: ^{1}H-NMR einer [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Mischung.
Den ^{1}H-NMR-Signalen wurden die entsprechenden Protonen (rot hervorgehoben) in den Strukturen EMIM (**24**), EHEMIM (**40**) und Acetat zugeordnet. Die Synthese der [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Mischung wurde bei 80°C durch Zugabe von 1,1 mol Acetaldehyd je mol EMIM unter Rückfluss synthetisiert (Kapitel 2.2.9). Das ^{1}H-NMR wurde in $CDCL_3$ bei 500 MHz vermessen. Das Proton an Position 2 von EMIM ist nicht dargestellt, erscheint aber als Singulett bei einer Verschiebung von 9,60 ppm.

Diese geminale Kopplung führt zu zwei Doubletts von Quartetten bei δ = 4,25 - 4,40 ppm (Abbildung 26A). Diese geminale Kopplung der beiden Protonen kann zum einen durch den Dach-Effekt der beiden Signale im ^{1}H-NMR, sowie durch die Kopplung der beiden Doubletts von Quartetten im ^{1}H, ^{1}H-COSY-Spektrum bestätigt werden (Abbildung 26A, Anhang 13). Die endständigen Methyl-Protonen der Ethylgruppe der beiden Kationen führen zu Tripletts bei 1,30 - 1,43 ppm, während die Protonen der Methylgruppe der Hydroxyethylseitenkette zu einem Doublett bei 1,44 ppm führen (Abbildung 26B). Die aromatischen Protonen im EHEMIM-Kation (**40**) zeigen eine geringere chemische Verschiebung als im EMIM-Kation (Abbildung 26C). Die Protonen des α-Kohlenstoffs der Hydroxyethylseitenketten von EHEMIM (**40**) führen zu einem Quartett bei 5,45 ppm (Abbildung 26D). Das Proton an Position 2 von EMIM ergibt ein Singulett bei 9,60 ppm. Die Bildung des EHEMIM-Kations (**40**) korreliert mit der schnelleren Löslichkeit der Cellulose in der recycelten ionischen Flüssigkeit (Tabelle 14).

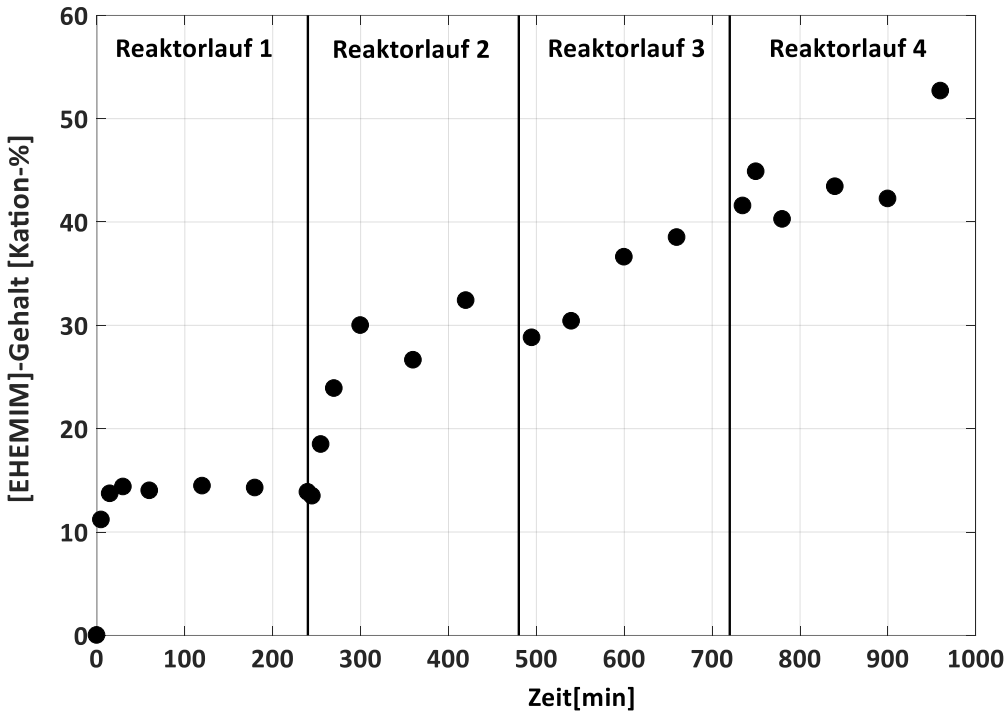


Abbildung 27: Kinetik der EHEMIM-Bildung.
Die EHEMIM-Bildung wurde während der Vinylester-basierten Synthese von Celluloselaurat während des Upscalings analysiert. Die Zeitskala ergibt sich aus der Addition der Reaktionszeiten der einzelnen Reaktorläufe, wobei der Beginn eines neuen Reaktorlaufs durch Parallelen zur Y-Achse markiert ist. Die Messung des prozentualen EHEMIM-Gehaltes erfolgte mit 1H-NMR über das Verhältnis der Fläche der EHEMIM-Methylgruppe zur Gesamtfläche der EHEMIM-Methylgruppe und der EMIM-Methylgruppe (Formel 7).

Daher wurde die EHEMIM-Bildung genauer untersucht. Die EHEMIM-Bildung durch Zugabe von Acetaldehyd zu [EMIM]OAc ist eine exotherme Reaktion, die innerhalb von Sekunden abläuft. Die Kinetik der EHEMIM-Bildung während Reaktorlauf 1 ist ebenfalls schnell und ist nach wenigen Minuten fast vollständig abgeschlossen (Abbildung 27). Insgesamt steigt der Kationenanteil an EHEMIM-Kationen über die Synthese-Recycling-Zyklen hinweg an (Abbildung 27). Im zweiten, dritten und vierten Reaktorlauf erscheint die EHEMIM-Bildung zunehmend langsamer (Abbildung 27). Insbesondere bei Reaktorlauf 3 und 4 konnten jedoch nicht alle Messpunkte analysiert werden. Auch müssen diese Daten vorsichtig interpretiert werden, da sie nicht reproduziert wurden.

3.6.2 Optimierung des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems

Um ein besseres Verständnis der verbesserten Löseeigenschaften von [EHEMIM]-[EMIM]OAc zu erhalten, wurden unterschiedliche Kationenverhältnisse auf ihre Lö-

seeigenschaften gegenüber Cellulose untersucht. Überraschenderweise zeigte keiner der untersuchten Kationenanteile eine verbesserte Fähigkeit, Cellulose zu lösen. Daraufhin wurde festgestellt, dass geringe Mengen an Wasser für die optimierte Löslichkeit des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Systems essentiell sind. Um die Abhängigkeit der Celluloselöslichkeit vom Kationenverhältnis und von dem Wasseranteil zu untersuchen, wurden Löslichkeitsmatrizen erstellt (Kapitel 2.3.6). Hierbei wurden unterschiedliche Mengen von Cellulose in Eppendorfgefäßen mit den jeweiligen Lösungsmitteln vermengt, 6 Stunden bei 80°C geschüttelt und die Löslichkeit bewertet. Hierbei muss beachtet werden, dass das Schütteln von Eppendorfgefäßen einen wesentlich geringeren Energieeintrag darstellt, als das externe Rühren, welches im Kolbenmaßstab realisiert werden kann. Daher sind die angegebenen Löslichkeitswerte sehr gering und dürfen nur relativ zu den anderen Löslichkeitswerten im kleinen Maßstab interpretiert werden.

Unter diesen Bedingungen kann reines [EMIM]OAc, bei einem optimalen Wassergehalt von 10 %, 0,5 - 1 % w/w Cellulose lösen (Tabelle 15). Unabhängig vom Kationenanteil zeigt das [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System die Tendenz, bei Wasserkonzentrationen über dem Optimum, eine Cellulosesuspension mit starker Trübung und niedriger Viskosität zu bilden, während bei Konzentrationen unter dem Optimum eine inhomogene Gelbildung zu beobachten ist. Bei erfolgreichem Lösen der Cellulose bzw. am Optimum ist das Lösungssystem klar, homogen und weist eine erhöhte Viskosität auf. Bei einem Kationenanteil von 20 % EHEMIM (**40**) ist 1 % w/w Cellulose bei einem Wassergehalt von 8,5 und 12,5 % vollständig gelöst (Tabelle 15). Bei einem Kationenanteil von 50 Kationen-% EHEMIM (**40**) und einem Wassergehalt von 7,5 - 8,5 % w/w kann mit 3 % w/w Cellulose die größte Cellulosekonzentration beobachtet werden. Ein weiterer Anstieg des Kationenanteils auf 75 Kationen-% EHEMIM (**40**) führt zu einer allgemein schlechteren Löslichkeit von Cellulose, wobei beim Wasseroptimum von 6,5 % w/w Wasser lediglich 0,5 %-Cellulose gelöst werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Wassergehalt von 8,5 % w/w und ein Kationenanteil von 50 Kationen-% EHEMIM (**40**) gewählt, um die Lösungskapazität gegenüber Cellulose im Kolbenmaßstab mit externer Rührung zu untersuchen. Innerhalb von 3 Stunden bei 80°C können dabei 14 % w/w Cellulose gelöst werden. Im Vergleich dazu kann reines [EMIM]OAc unter

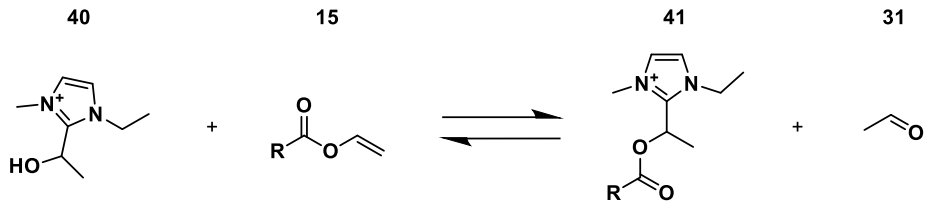
denselben Bedingungen lediglich 1 % w/w Cellulose lösen und [EMIM]OAc mit einem optimierten Wassergehalt von 10 % w/w lediglich 2 % w/w Cellulose lösen. Dieses Ergebnis zeigt das enorme Potenzial des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems.

Tabelle 15: Löslichkeitsmatrizen des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems.

Cellulose % w/w	Wassergehalt % w/w							
	3,5	**5**	**6,5**	**7,5**	**8,5**	**10**	**12,5**	**15**
	0 % EHEMIM, 100 % EMIM**							
0,5	0*	0	0	+++	0	+++	++	+
1	0	0	0	0	0	++	+	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
	20 % EHEMIM, 80 % EMIM							
0,5	0	0	0	+++	+++	+++	0	n.d.***
1	0	0	0	0	+++	+	+++	n.d.
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 % EHEMIM, 50 % EMIM							
0,5	0	0	0	+	++	++	0	0
1	0	0	0	++	++	++	0	0
2	0	0	0	+++	+++	0	0	0
3	0	0	0	+++	+++	0	0	0
	75 % EHEMIM, 25 % EMIM							
0,5	0	0	++	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0

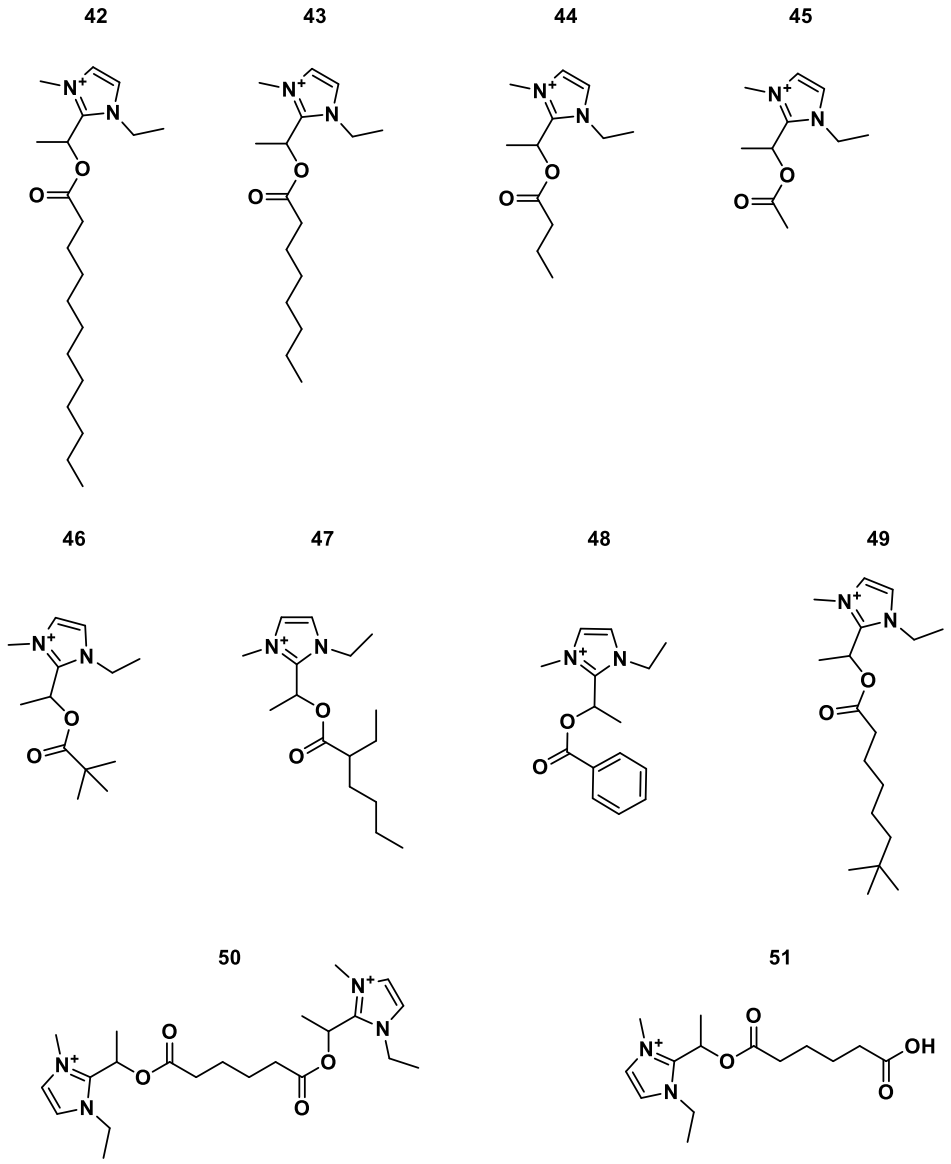
*Die Löslichkeit von Cellulose (**1**) ist bewertet auf einer Skala von 0 (nicht gelöst), + (leicht gelöst), ++ (gut gelöst) und +++ vollständig gelöst. ** Der Kationenanteil von EHEMIM bzw. EMIM ist in Kationen-% angegeben. *** nicht definiert

3.7 EHEMIM-Ester



Schema 19: Synthese von EHEMIM-Estern.
Die Synthese von EHEMIM-Ester (**41**) erfolgt ausgehend von Vinylestern und EHEMIM (**40**) in [EHEMIM][EMIM]OAc.

Die Nebenreaktionen der zusätzlichen Acetylierung und die Bildung des EHEMIM-Kations (**40**) wurde bereits beschrieben. Es gibt allerdings noch eine dritte Nebenreaktion bei der Vinylester-basierten Synthese, die allerdings nur qualitativ und nicht quantitativ untersucht wurde. Die Alkoholgruppe des 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazoliums (EHEMIM (**40**)) kann ebenfalls durch die Vinylester-basierte Synthese verestert werden (Schema 19). Die Zugabe von Vinylestern zu einer 50 %-igen [EHEMIM]-[EMIM]-Mischung führt zur Bildung der entsprechenden EHEMIM-Ester (**41**) (Kapitel 2.2.9). Diese Veresterung kann mit verschiedenen Vinylestern durchgeführt werden, und liefert die entsprechenden Ester, welche mittels LC-MS identifiziert werden konnten (Schema 20, Kapitel 2.2.3). Beispielweise ist es möglich, EHEMIM (**40**) mit Carbonsäuren unterschiedlicher Kettenlänge zu verestern (**42-45**), oder EHEMIM-Benzoat (**48**), EHEMIM-Neodecanoat (**49**), EHEMIM-2-Ethylhexyloat (**47**) und EHEMIM-Pivalat (**46**) zu erzeugen (Schema 20). Nach der EHEMIM-Umsetzung mit Divinyladipat wird ein Dikation (**50**) erzeugt, bei dem jeweils zwei EHEMIM-Kationen (**40**) über eine Adipatesterbrücke verbunden sind (Schema 20). Zusätzlich entsteht auch EHEMIM-Adipat (**51**) (Schema 20). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von EHEMIM-Estern (**41**) mit verschieden Vinylestern abläuft.



Schema 20: EHEMIM-Ester.
Die EHEMIM-Ester (**41**) wurden mittels LC-MS identifiziert. Die Synthese von EHEMIM-Estern wurde bei 68°C in einer 80 %-igen EHEMIM- bzw. 20 %-igen EMIM-Mischung mit 0,5 mol/EHEMIM Vinylester synthetisiert (Kapitel 2.2.9). Die Reaktionszeit beträgt 1 h. Für die Struktur **49** ist nur eines der verschiedenen möglichen Isomere von EHEMIM-Neodecanoat gezeichnet. Alle Moleküle wurden aufgrund ihrer positiven Ladung bei positiver Ionisierung detektiert, wobei das beobachtete m/z-Verhältnis ihrer Masse entspricht (Kapitel 2.2.3). Lediglich das Dikation (**50**) zeigt aufgrund der zwei positiven Ladungen ein m/z-Verhältnis, welches lediglich der halben Masse des Moleküls entspricht.

3.8 Mechanismus

Der Mechanismus der Vinylester-basierten Synthese von Estern in [EMIM]OAc wird in diesem Kapitel untersucht. Wie bereits beschrieben, katalysiert [EMIM]OAc die Vinylester-basierte Synthese von Glucoseestern. Im Gegensatz dazu katalysieren die ionischen Flüssigkeiten [BMIM]PF_6, [BMIM]BF_4, [BMIM]Cl und [EMIM]Cl die Reaktion nicht. Auch nach dem Vinylester-basierten Umsatz von Glucose in dem polaren organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO, **4**) kann keine Glucoselauratbildung beobachtet werden. Die ionische Flüssigkeit [BMIM]OAc katalysiert die Vinylester-basierte Glucoselauratsynthese jedoch ebenfalls (Tabelle 16). In diesem Kontext scheint das Acetat-Anion für den Mechanismus der Katalyse von Bedeutung. Die Zugabe von Natriumacetat zu [EMIM]Cl, [BMIM]Cl und DMSO ermöglicht die Vinylester-basierte Synthese von Glucoselaurat (Tabelle 16), was weiterhin die Bedeutung von Acetat-Anionen für den Katalyse-Mechanismus hervorhebt (Kapitel 2.2.4). Die Syntheseaktivität von Natrium-Acetat in DMSO ist allerdings deutlich geringer als in [EMIM]OAc, was möglicherweise mit einer schlechten Löslichkeit von Natriumacetat in DMSO zusammenhängt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zugabe von konzentrierter Essigsäure die katalytische Aktivität von Natriumacetat inhibiert.

Tabelle 16: Katalysatoreigenschaften für die Vinylester-basierte Umesterung.

Lösungsmittel	[EMIM]OAc	[EMIM]Cl	[BMIM]OAc	[BMIM]Cl	DMSO
Rein	++*	0	++	0	0
+[Na]OAc **	n.d.***	+	n.d.	+	+

* Die Katalysatoreigenschaften beziehen sich auf die Fähigkeit, gemäß Schema 15 die Vinylester-basierte Synthese von Glucoselaurat zu katalysieren. Hierbei wurden die Katalysatoreigenschaften in drei Gruppen unterteilt: 0 (kein Glucoselaurat nachweisbar), + (geringe Glucoselauratbildung) und ++ (starke Glucoselauratbildung). ** Beschreibt die Zugabe von Natriumacetat zum jeweiligen Lösungsmittel. *** nicht definiert

4

4 Diskussion

4.1 Enzymaktivität in Cellulose-lösenden ionischen Flüssigkeiten

Um die Aktivität von Enzymen in ionischen Flüssigkeiten besser zu verstehen, wurden einfache Veresterungs- und Umesterungsreaktionen in ionischen Flüssigkeiten untersucht. Anschließend wurden die Erkenntnisse aus diesen Modellreaktionen schrittweise auf Reaktionen mit größeren Molekülen übertragen – wobei die Veresterung von Glucose, Cellobiose und Cellulose im Fokus stand.

Die Umesterung von Butanol mit Buttersäureethylester zu Buttersäurebutylester und Ethanol wurde als Modellreaktion in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten mittels GC-MS analysiert. Sowohl in [BMIM]PF_6, [BMIM]Cl (**5**), [BMIM]OAc, als auch in [EMIM]OAc sind enzymatische Umesterungsreaktionen möglich, wie am Beispiel der Synthese von Buttersäurebutylester und Ethanol gezeigt werden konnte (Abbildung 1, Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4). Die stärkste Produktbildung wurde in der ionischen Flüssigkeit [BMIM]PF_6 beobachtet. Dieses Ergebnis passt gut zu verschiedenen Studien, die zeigen, dass unpolare ionische Flüssigkeiten wie [BMIM]PF_6 vorteilhaft für enzymatische Reaktionen sind.[88,71] Polare Lösungsmittel entziehen dem Enzym die Wasserhülle, was zu einer Denaturierung des Enzyms führt. Diese Konformationsänderung wird häufig als Grund für die schlechte Enzymaktivität in polaren organischen Lösungsmitteln bzw. ionischen Flüssigkeiten angeführt.[98,83] Chlorid-Ionen, sowie Acetat-Ionen besitzen eine besonders große Wasserstoffbrückenbasizität, was die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen begünstigt.[23] Daher erscheinen Acetat- und Chlorid-basierte ionische Flüssigkeiten wie [BMIM]OAc, [EMIM]OAc und [BMIM]Cl als potenziell denaturierende Lösungsmittel, was gut mit der beobachteten verringerten

Produktbildung in diesen ionischen Flüssigkeiten korreliert (Abbildung 1**,** Abbildung 2, Abbildung 3, Abbildung 4). In den Acetat-basierten ionischen Flüssigkeiten wurden als Verunreinigungen Essigsäuremethylester, Essigsäureethylester bzw. Essigsäurebutylester nachgewiesen, welche ebenfalls von Esterasen als Substrat akzeptiert werden. So entstand in [EMIM]OAc enzymkatalysiert das Nebenprodukt Buttersäuremethylester, wobei kein Methanol oder Methanolester als Substrat eingesetzt wurde. Vermutlich stammt die Methanolkomponente aus der ionischen Flüssigkeit bzw. aus der Verunreinigung mit dem detektierten Essigsäuremethylester (**22**, Abbildung 4). Eine weitere systemimmanente, aber nicht zwingend auf Verunreinigungen beruhende Nebenreaktion, ist die enzymatische Bildung von Essigsäureestern ausgehend von dem Acetat der ionischen Flüssigkeit (Abbildung 4, Abbildung 5). Die Fähigkeit des Enzyms CAL-B, Essigsäureester zu synthetisieren, wurde bereits häufig gezeigt.[99] Demnach ist die beobachtete enzymatische Bildung von Essigsäurebutylester, ausgehend von Butanol und [EMIM]OAc, nachvollziehbar und verhindert die gezielte Veresterung von Alkoholen mit definierten Acyldonoren, da als Nebenprodukt immer ein Essigsäureester zu erwarten ist. Es ist allerdings nicht klar, inwieweit das Acetat der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc von CAL-B zur Umsetzung genutzt wird, oder ob die im Gleichgewicht vorliegende Essigsäure, bzw. die ebenfalls vorliegenden Essigsäureester, als Substrat für die CAL-B dienen.

Somit würde bei der Synthese von Celluloseestern mit definierten Seitenketten als Nebenprodukt ebenfalls Celluloseacetat entstehen. Diese Nebenreaktion ist allerdings auch bei chemischen Synthesestrategien, ausgehend von Anhydriden und Fettsäurechloriden, in Acetat-basierten ionischen Flüssigkeiten beschrieben, wobei im Gegensatz zur gewünschten Celluloseseitenkette hauptsächlich Celluloseacetat entsteht.[33] Um diese Nebenreaktion zu umgehen, erscheint die ionische Flüssigkeit [BMIM]Cl als interessante Alternative, da sie ebenfalls Cellulose löst und kein Acetat enthält, welches als Substrat an einer Veresterungsreaktion teilnehmen kann. Bei der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl ist allerdings zu beachten, dass ihr Schmelzpunkt zwischen 65°C und 80°C liegt. Diese Temperaturen sind potenziell denaturierend für Enzyme, sodass die Verwendung von stabilen Enzymen als notwendig und sinnvoll erscheint. Daher wurde sich aufgrund der guten Stabilität und Temperaturtoleranz auf die immobilisier-

te CAL-B konzentriert.[79] Neben der Umesterung von Ethylestern wurden in [BMIM]Cl auch Umesterungen von Methylestern und Veresterungen, ausgehend von freien Säuren, enzymatisch katalysiert (Anhang 1 und Anhang 2).

Um sich schrittweise an die Veresterung von Cellulose anzunähern, wurde die Veresterung des Monomers der Cellulose, der Glucose, in [BMIM]Cl untersucht. Es konnten keine signifikant erhöhten Mengen an Glucoselaurat nach der enzymatischen Katalyse nachgewiesen werden. Daher wurden nachfolgende Experimente mit aktivierten Laurinsäurevinylestern durchgeführt, um die Syntheseeffizienz zu erhöhen. Es konnte allerdings ebenfalls keine Produktbildung beobachtet werden (Kapitel 3.1.2). Dennoch war das Enzym CAL-B aktiv, denn die Hydrolyse von Laurinsäuremethylester und Laurinsäurevinylester zu freier Laurinsäure wurde nur nach Umsetzung mit Enzym beobachtet. In anderen ionischen Flüssigkeiten wie [BMIM]BF_4 und [BMIM]PF_6 konnte die Synthese von Glucoselaurat allerdings erfolgreich realisiert werden, wie es auch schon von Ganske und Bornscheuer gezeigt wurde (Abbildung 6).[88,71] Hierbei ist anzumerken, dass im Gegensatz zu Ganske und Bornscheuer mittels LC-MS auch geringe Mengen von Glucosedilaurat nachgewiesen wurden, was zeigt, dass die CAL-B nicht ausschließlich die Position 6 der Glucose, sondern auch mindestens eine weitere Hydroxylgruppe verestern kann (Anhang 4).

Unter denselben Reaktionsbedingungen funktioniert die Reaktion in [BMIM]Cl nicht, während sie in [BMIM]BF_4 und [BMIM]PF_6 abläuft. Als Ursache für die reduzierte Synthese in [BMIM]Cl kann ein möglicher denaturierender Effekt des Lösungsmittels angeführt werden. Dieser Erklärungsansatz wurde bereits häufig gewählt, um eine geringe enzymatische Produktbildung in polaren Lösungsmitteln zu erklären.[100,72] Diesem Erklärungsansatz steht allerdings die beobachtete enzym-katalysierte Hydrolyse von Vinylestern und Methylestern zu freier Säure in [BMIM]Cl entgegen, da das Enzym offensichtlich aktiv ist. Natürlich kann aufgrund dieses Ergebnisses die denaturierende Wirkung von [BMIM]Cl nicht wiederlegt werden, sie scheint jedoch nicht so stark zu sein, um unmittelbar und vollständig die Enzymaktivität zu inhibieren. Auch eine potenzielle kompetitive Inhibition durch das Lösungsmittel [BMIM]Cl erscheint aufgrund der Fähigkeit der CAL-B, in [BMIM]Cl Fettsäureester zu hydrolysieren, als unwahrscheinlich. Eine derartige kompetitive Inhibition wurde für CAL-B in verschiedenen Lösungsmitteln

beschrieben.[101] Natürlich kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich dennoch um eine kompetitive Hemmung handelt, da es möglich ist, dass das Lösungsmittel nur die polaren Bindungsstellen im Enzym blockiert, während unpolare Substrate wie Fettsäureester dennoch hydrolysiert werden. Zumindest für Cellulasen wurde kürzlich eine kompetitive Inhibition durch [BMIM]Cl postuliert.[102]

Um weitere Einblicke zu erhalten, wurden Mischungen aus [BMIM]BF_4 und [BMIM]Cl auf Enzymaktivität untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bereits die Zugabe von 30 % w/w [BMIM]Cl zu [BMIM]BF_4 die Glucoselauratsynthese um mehr als das 100-fache reduziert (Tabelle 6, Tabelle 7). Im Gegensatz dazu stieg die Menge an Laurinsäure, welche durch enzymatische Hydrolyse entsteht, um den Faktor 3. Somit erscheint die Hydrolyse in [BMIM]Cl gegenüber [BMIM]BF_4 bevorzugt, was ebenfalls zu einer Reduzierung der Glucoselauratmenge beitragen kann. Diese Ergebnisse passen sehr gut zu den Arbeiten von Valivety und Kollegen, die eine gute Korrelation zwischen der Fähigkeit eines Lösungsmittels, Wasserstoffbrücken auszubilden und der Hydrolyseaktivität von Enzymen, zeigen.[103] In diesem Kontext ist die Wasseraktivität erhöht, was die Hydrolyse begünstigt. Dies ist im vorliegen Fall von besonderer Bedeutung, da Celluloselösungsmittel wie [BMIM]Cl eine besonders starke Tendenz zum Ausbilden von Wasserstoffbrücken besitzen, was ihnen ermöglicht, mit den Alkoholen der Cellulose zu interagieren und Cellulose dadurch zu lösen.[23] Somit erscheint die hohe Wasseraktivität und die dadurch begünstigte Hydrolyse in polaren ionischen Flüssigkeiten ein weiterer Faktor zu sein, der durch Verschiebung des Gleichgewichts die Synthese von Glucoselaurat reduziert. Allerdings reduzieren 30 % [BMIM]Cl die Glucoselauratmenge um mehr als das 100-fache, während die Menge an Laurinsäure-Hydrolyseprodukt lediglich um den Faktor 3 ansteigt (Tabelle 7). Dieser Unterschied deutet auf einen weiteren Faktor, der die reduzierte Glucoselauratsynthese in [BMIM]Cl hervorruft. Ein zusätzliches Indiz für einen weiteren negativen Faktor bei der Glucoselauratsynthese ist die erfolgreich ablaufende Veresterung von Ethanol mit Buttersäure zu Buttersäureethylester und Wasser in [BMIM]Cl (**5**, Anhang 1). Wäre die Wasseraktivität derart groß, dass sie die Esterbildung vollständig inhibiert, sollten Umesterungsreaktionen von kurzkettigen Alkoholen mit kurzkettigen Säuren, bzw. die enzymatische Synthese von Buttersäureethylester, ebenso nicht beobachtbar sein

(Anhang 1, Abbildung 2). Ein solch zusätzlicher negativer Faktor könnte eine mangelnde Interaktion zwischen Glucose und Enzym in polaren Lösungsmitteln darstellen. Starke Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Glucose könnten die korrekte Ausrichtung der Glucose im Aktiven Zentrum des Enzyms verhindern. Somit würde ein polares Lösungsmittel und das Enzym CAL-B um das Substrat Glucose konkurrieren. Um diese Konkurrenz zu entschärfen, wurden anstatt 50 mg Glucose, 300 mg Glucose je 300 mg [BMIM]Cl eingesetzt. Dies führt allerdings zu einer extrem großen Viskosität und daher zu einem stark reduzierten Massentransfer. Nach 24 Stunden enzymatischer Umsetzung ist keine signifikant erhöhte Menge an Glucoselaurat nachweisbar. Um die postulierte Konkurrenz von Lösungsmittel und Enzym um die polare Glucose dennoch zu untersuchen, wurde die enzymatische Glucoselauratsynthese in dem polaren organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) – welches eine niedrigere Viskosität als [BMIM]Cl aufweist – durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass die Erhöhung der Glucose von 2 % w/v auf 10 % w/v, später auf 20 % w/v bzw. 40 % w/v zu sehr geringen Steigerungen in der Glucoselauratsynthese führt, während bei einer Konzentration von 60 % w/v ein kritischer Schwellenwert überschritten wird, und die Glucoselauratproduktion stark ansteigt (Abbildung 8). Einen derartigen, vermutlich sigmoidal[2] verlaufenden Kurvenverlauf zeigen typischerweise Lipasen, wenn sie einer „Oberflächenaktivierung“ unterliegen. Da die CAL-B laut Literatur allerdings keine Oberflächenaktivierung zeigt, deutet dieser Verlauf auf einen zusätzlichen Einflussfaktor hin.[72]

Es wird ein Überschuss von mehr als 2,66 mol Glucose je mol Laurinsäurevinylester benötigt, um eine signifikante Steigerung der Produktbildung zu beobachten. Dies spricht dafür, dass die Glucose, welche in DMSO in Lösung vorliegt, dem Enzym erst ab einer kritischen Konzentration zur Verfügung steht. In dem Moment, in dem die Sättigung von DMSO einen kritischen Wert erreicht, scheint die enzymatische Synthese von Glucoselaurat abzulaufen. Nun kann das Enzym mit DMSO um Glucose konkurrieren.

Eine andere Studie optimierte die Synthese von Glucoselaurat in 1-Ethyl-3-Methylimidazoliumtrifluoromethansulfonat ([EMIM]TfO) sowie in der ionischen Flüs-

[2] Vermutlich sigmoidal, da bei stark ansteigenden Glucosekonzentrationen ein Abflachen der Kurve zu erwarten ist (Abbildung 8).

sigkeit 1-Butyl-3-Methylimidazoliumtrifluoromethansulfonat [BMIM]TfO und berichtete, dass die Herstellung von extrem übersättigten Glucoselösungen die Umsetzung von 8 % auf 96 % anhebt.[77] Prinzipiell ist dies vermutlich derselbe Effekt, wie er oben bereits für DMSO diskutiert wurde. Somit scheint dieser Effekt nicht auf DMSO beschränkt zu sein und kann auch auf ionische Flüssigkeiten und evtl. andere Lösungsmittel angewendet werden. Dies würde bedeuten, dass bei Studien zu Enzymreaktionen in organischen Lösungsmitteln die Substratkonzentrationen variiert werden müssen, um die Konkurrenz zwischen Enzym und Lösungsmittel zu berücksichtigen. Ansonsten schließt man möglicherweise auf „denaturierende Effekte“ des Lösungsmittels, wobei lediglich die Substratkonzentrationen für die jeweiligen Lösungsmittel zu niedrig sind. Das hier beschriebene Konzept von einer Konkurrenz zwischen Substrat und Lösungsmittel ist nicht komplett neu und wurde bereits in der Doktorarbeit von Linda Fransson diskutiert. Sie zeigt, dass bei einer Umesterung von Ethylestern verschiedener Kettenlängen die Reaktion von Estern mit langen unpolaren Seitenketten in dem unpolaren Lösungsmittel Hexan schlechter abläuft, als in dem polareren Lösungsmittel Acetonitril.[104] Im Gegensatz dazu läuft die Umesterung von kurzkettigen Estern in Hexan besser als in dem polareren Acetonitril. Sie folgert daraus, dass in dem polaren Lösungsmittel Acetonitril die unpolaren langkettigen Ester eher ins verhältnismäßig unpolare Aktive Zentrum des Enzyms gelangen, während sie im unpolaren Lösungsmittel Hexan im Lösungsmittel verbleiben.[104] Somit erscheint die postulierte Konkurrenz zwischen Enzym und polarem Lösungsmittel um die polare Glucose auch bei unpolaren Lösungsmitteln vorhanden zu sein, da das unpolare Hexan mit dem Enzym um unpolare Ester konkurriert.

Formal kann man die hier diskutierte Konkurrenz zwischen Lösungsmittel und Substrat als eine Lösungsmittelinhibition interpretieren. Hierbei würde es sich formal um eine Hemmung durch Reaktion eines Inhibitors mit dem Substrat handeln, wobei es sich nicht um eine Reaktion im klassischen chemischen Sinne, sondern eher um polare oder unpolare Wechselwirkungen handeln würde, die die effektive Konzentration des Substrates $[S_{eff}]$, welche für das Enzym nutzbar ist, reduziert (Formel 14).

Formel 14: Die effektive Substratkonzentration.

$$[S_{eff}] = [S_0] - [SI]$$

$$[S_{eff}] = Effektive\ Konzentration\ des\ Substrates$$
$$[S_0] = Konzentration\ des\ Substrates$$
$$[SI] = Durch\ einen\ Inhibitor\ bzw.\ das\ Lösungsmittel\ gebundenes\ Substrat$$

Aus theoretischen Überlegungen könnte man vermuten, dass der postulierte inhibitorische Effekt des Lösungsmittels mit der Fähigkeit des Lösungsmittels korreliert, ein Substrat zu lösen, da gute Lösungseigenschaften immer mit einer guten Interaktion zwischen gelöstem Stoff und Lösungsmittel einhergehen. Eine solch starke Interaktion schwächt theoretisch die Möglichkeit des Enzyms, mit dem Substrat zu interagieren.

Als ein weiterer Hinweis auf mangelnde Interaktion zwischen Enzym und polaren Substraten in polaren Lösungsmitteln können Ergebnisse von Wahlström und Kollegen gedeutet werden: Sie zeigen, dass intakte Cellulasen mit Kohlenhydratbindedomäne und Kerndomäne in Wasser-[EMIM]OAc-Mischungen dieselbe Hydrolyseaktivität besitzen, wie die isolierte Kerndomäne, während im rein wässrigen Milieu die Kohlehydratbindedomäne die Hydrolyse der Cellulose beschleunigt. Somit ist insbesondere die Kohlenhydratbindedomäne – die für die selektive Bindung mit der relativ polaren Cellulose verantwortlich ist – sensitiv gegenüber polaren ionischen Flüssigkeiten. Dies deutet daraufhin, dass die spezifischen Bindungen zwischen Enzymen und polaren Substraten in polaren Lösungsmitteln inhibiert sein könnten, wie es auch für die Lipaseaktivität in DMSO vermutet werden kann.

Im Fall von DMSO kann die Synthese von Glucoselaurat durch eine Erhöhung der Glucosekonzentration realisiert werden. Bei [EMIM]OAc und [BMIM]Cl ist dieser Ansatz aufgrund der großen Viskosität von hochkonzentrierten Glucoselösungen erschwert. Wenn Cellulose verwendet wird, ist die Viskositätszunahme aufgrund ihres polymeren Charakters signifikant größer, als bei Glucoselösungen, was den Massentransfer zusätzlich limitiert und enzymatische Reaktionen verlangsamt. In diesem Zusammenhang erscheint eine effiziente enzymatische Synthese von Celluloseestern schwierig. Eine mögliche Alternative zu ionischen Flüssigkeiten könnte ein relativ neues Celluloselö-

sungssystem, basierend auf dem Salz Triethyloctylammoniumchlorid sein, welches besonders niedrige Viskositäten bei gelöster Cellulose ermöglicht.[16] Allerdings ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass lediglich 2,4 % w/w Cellulose in diesem System gelöst werden können, was möglicherweise eine zu niedrige Enzym-Substrat-Interaktion ermöglicht, da in DMSO erst bei einer Glucosekonzentration über 40 % w/w eine signifikante Enzymaktivität beobachtet wird. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Enzymen, die ihre Aktivität in Celluloselösemitteln gegenüber Kohlenhydraten beibehalten. Derartige Enzymvarianten könnten auch durch „Gerichtete Evolution[3]“ generiert werden. Bisherige Anstrengungen, Enzyme, wie beispielsweise Cellulasen, auf Aktivität in Celluloselösemitteln, wie beispielsweise [BMIM]Cl, zu evolvieren, lieferten Enzymvarianten, die bei 7,5 % v/v [BMIM]Cl höhere Aktivität als das Wildtypenzym zeigen.[64] Um Celluloselöslichkeit in Salzlösungen zu gewährleisten, werden allerdings deutlich höhere Salzkonzentrationen benötigt, was wesentlich stabilere Varianten erfordert. Wie aber aus Ergebnissen zur Glucoselauratsynthese in DMSO hervorgeht, ist im Fall von Lipasen nicht ausschließlich ihre Stabilität, sondern ebenfalls die Bindung des polaren Substrates ein wichtiger limitierender Faktor. Möglicherweise sollten neue Enzymvarianten durch „Rationales Proteindesign[4]“ generiert werden, die polare Substrate besonders gut binden. Diese Enzymvarianten wären in Wasser möglicherweise inaktiv, da die Glucose bzw. Cellulose so stark gebunden wird, sodass die Produkte nicht aus dem Aktiven Zentrum freigesetzt werden können. Im Gegensatz dazu wären sie in stark polaren Lösungsmitteln aktiv, da sie Glucose bzw. Cellulose besser binden können und das Lösungsmittel die Produkte durch hydrophile Wechselwirkungen besser vom Enzym ablösen kann. Diese Überlegungen sind allerdings sehr theoretisch und überhaupt nur dann erfolgsversprechend, wenn Enzyme bekannt sind, die Cellulose verestern können und somit als Matrix für Optimierungsansätze, basierend auf „Rationalem Design“ und „Gerichtete Evolution“ dienen können. Trotz

[3] Das Konzept der Gerichteten Evolution bezeichnet hier die Optimierung von Enzymen durch zufallsbasierte Mutagenese und anschließende Selektion anhand einer vorgegebenen Fitnessfunktion, wobei mehrere Mutagenese-Selektions-Zyklen durchlaufen werden.

[4] Bezeichnet eine gezielte Modifikation von Proteinen durch ortsgerichtete Mutagenese der DNA, mit dem Ziel, neue Proteineigenschaften zu generieren.

der diskutierten Lösungsmittelinhibition wurde anschließend versucht, das Disaccharid der Cellulose, d.h. die Cellobiose, zu verestern, um ein tieferes Verständnis zu erhalten.

4.2 Enzymatische Veresterung von Cellobiose

Die enzymatische Synthese von Cellobioselaurat wurde in DMSO untersucht, da dieses Lösungsmittel die Fähigkeit besitzt, Cellulose zu quellen und damit die zugängliche Oberfläche bei einer enzymatischen Cellulose-Modifikation zu erhöhen. Wie bereits im Abschnitt 3.2 erläutert, werden für signifikante Umsätze in DMSO hohe Zuckerkonzentrationen benötigt. Anders als bei Glucose ist die Löslichkeit von Cellobiose allerdings niedriger, daher wurden anstatt 300 mg Glucose je 500 ml DMSO nur 200 mg Cellobiose je 500 ml DMSO eingesetzt. Im Gegensatz dazu lösen sich die Disaccharide Trehalose und Maltose vollständig, wobei sich Trehalose deutlich schneller löst. Die Synthese von Disaccharidlaurat mit dem Enzym CAL-B liefert große Mengen an Trehalosemonolaurat, sowie Trehalosedilaurat, während wesentlich weniger Maltosemonolaurat und kein Maltosedilaurat nachgewiesen wird. Die Menge an detektiertem Cellobiosemonolaurat war noch einmal deutlich geringer und nur knapp über der Nachweisgrenze der LC-ELSD (Abbildung 10). In diesem Fall korreliert die Löslichkeit der Disaccharide in DMSO mit der Produktbildung durch CAL-B. Dieser Zusammenhang ist überraschend, da bei der Glucoseveresterung die gute Löslichkeit in DMSO die Reaktion zu inhibieren scheint. Möglicherweise ist die gute Veresterungseffizienz gegenüber Trehalose und die schlechte Veresterungseffizienz gegenüber Cellobiose enzymatisch bedingt und kann durch bessere Bindung im Aktiven Zentrum des Enzyms erklärt werden. Cellobiose besitzt ebenso wie Cellulose, aufgrund der β-glycosidischen Bindung eine vollständig axiale Konfiguration, wodurch die Sesselkonformation stabilisiert wird und sich dadurch die Konformationsmöglichkeiten, im Vergleich zu α-glycosidisch verbundener Maltose, reduzieren.[4] Da die Konformationsmöglichkeiten der Cellobiose im Vergleich zu Maltose eingeschränkt sind, gibt es eine geringere Wahrscheinlichkeit für die Cellobiose im Aktiven Zentrum der CAL-B korrekt zu binden, was folglich eine geringere Produktbildung bewirkt. Vermutlich kann der gute Enzymumsatz der Trehalose ebenfalls durch eine große Anzahl von Freiheitsgraden erklärt werden, da bei der α, α‘-1, 1-glycosidischen Bindung beide Teile der glycosidischen Bindung axial stehen. Die Bedeutung von Molekülfreiheitsgraden bei der Disaccharidveresterung ist vermutlich durch den promiskuitiven Charakter der Reaktionen zu erklären. Die gewählten Substrate sind nicht die natürlichen Substrate des Enzyms, ihre Umsetzung ist also

promiskuitiv[5]. Da die CAL-B nicht auf die Umsetzung von Disacchariden evolviert ist, ist die Anzahl der Freiheitsgrade der Substrate bedeutend, um korrekt im Aktiven Zentrum zu binden.

Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung zu Degn und Zimmermann, die ebenfalls keine Cellobioseester mit CAL-B synthetisieren konnten.[81] Chen und Kollegen berichten hingegen von einer Synthese von Cellobioseestern mit CAL-B, beschreiben die Reaktion jedoch als deutlich langsamer, als mit anderen Disacchariden.[82] Diese Studien wurden alle mit der CAL-B durchgeführt, was zu der Frage führt, ob andere Enzyme eine bessere Effizienz bei der Cellobioselaurat-Synthese zeigen. Als interessante Alternative wurde die *Humicola insolens* Cutinase gewählt, da Cutinasen als natürliches Substrat das Polymer Cutin besitzen, was mit einem größeren und evtl. unspezifischem Aktiven Zentrum einhergehen könnte. Die *Humicola insolens* Cutinase zeigt allerdings dieselbe Tendenz wie CAL-B, Cellobiose nur geringfügig zu verestern, wobei in diesem Falle gar kein Cellobioselaurat nachgewiesen werden kann. Dies deutet daraufhin, dass die beobachteten, niedrigen Umsätze mit Cellobiose nicht nur auf die CAL-B beschränkt sind. Im Anschluss wurden verschiedene kommerziell erhältliche Enzympräparationen aus Lipasen, Esterasen und Proteasen auf die Fähigkeit, Cellobiose zu verestern, untersucht. Hierbei konnten einige Enzyme identifiziert werden, die eine bessere Aktivität als die immobilisierte CAL-B zeigen. Die höchsten Produktpeaks für Cellobiosemonolaurat werden nach Umsetzung mit der Schweineleberesterase (PLE) beobachtet, wobei die charakteristischen Massenaddukte in vier verschiedenen Peaks nachweisbar sind. Dies spricht dafür, dass die PLE mindestens vier verschiede Hydroxygruppen der Cellobiose verestern kann und nicht nur auf eine spezifische Hydroxygruppe beschränkt ist. Ein weiteres Indiz hierfür ist der Nachweis von Massenaddukten von Cellobiosedilaurat, welche im LC-Chromatogramm in vier verschiedenen Peaks nachweisbar sind (Anhang 5). Es ist allerdings anzumerken, dass die beobachteten Produktpeaks signifikant kleiner sind, als bei der enzymatischen Synthese von Glucoselaurat und Trehaloselaurat mit CAL-B. Dennoch erscheint die PLE, ausgehend von diesen Ergebnissen, als interessanter Kandidat für die Modifikation von Cellulose, da

[5] Promiskuitiv beschreibt hier die enzymatische Umsetzung eines für das Enzym nicht natürlichen Substrates.

sie sowohl Cellobiose verestern kann, als auch eine gewisse Unspezifität gegenüber verschiedenen Hydroxygruppen zeigt, was zu hohen Substitutionsgraden bei der Modifikation von Cellulose beitragen könnte.

4.3 Enzymatische Veresterung von Cellulose

Die homogene enzymatische Modifikation von Cellulose wurde bisher von vier verschiedenen Autoren beschrieben (Tabelle 2). Klohr und Kollegen beschreiben in einem Patent die enzymatische Modifikation von Cellulose in einer Mischung aus DMSO und NMMO.[55] Diese Reaktion wurde anhand der Modellreaktion, d.h. der Synthese von Glucoselaurat, untersucht. Interessanterweise kann Glucoselaurat – dem Protokoll von Klohr und Kollegen folgend – nach enzymatischer Umsetzung mit CAL-B, Laurinsäurevinylester und Glucose, nachgewiesen werden. Es ist allerdings auch Glucosemonolaurat in den Kontrollproben ohne Enzym nachweisbar (Abbildung 9). Da in einer weiteren Kontrolle reines DMSO die Reaktion nicht katalysiert, kann davon ausgegangen werden, das NMMO die Veresterung von Glucose und vermutlich ebenfalls von Cellulose, ausgehend von Vinylestern, katalysiert (Kapitel 3.1.3). Somit erscheint die von Klohr und Kollegen beschriebene enzymatische Synthese von Celluloseestern unabhängig von dem verwendeten Enzym abzulaufen. Bei einer Synthese, ausgehend von Methylestern, konnte jedoch kein Glucoselaurat nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Bedeutung des verwendeten Vinylesters bei der NMMO-basierten Synthese. Auch in dem NMMO-DMSO-System sind ebenso wie in [BMIM]Cl Enzyme aktiv, jedoch wird wieder ausschließlich die Hydrolyse von Methyl- und Vinylestern zu freier Säure beobachtet (Abbildung 9).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Wang und Kollegen wird die homogene enzymatische Veresterung von Cellulose in Mischungen aus 60 % w/w [BMIM]Cl und 40 % w/w [BMIM]BF_4 mit Substitutiongraden von bis zu 1,45 beschrieben.[57] In einem ähnlichen Reaktionssystem, bestehend aus 50 % w/w [BMIM]Cl und 50 % w/w [BMIM]BF_4 zeigt die CAL-B bei der Synthese von Glucoselaurat, im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit, lediglich eine Restaktivität von 0,14 % im Vergleich zu reinem [BMIM]BF_4 (Tabelle 6, Tabelle 7). Es überrascht, dass Wang und Kollegen trotz der stark gehemmten Glucoselauratsynthese relativ hohe Substitutionsgrade von Cellulose erreichen. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden unabhängig von Wang und Kollegen durchgeführt, was die unterschiedlich verwendeten Mischungsverhältnisse aus [BMIM]Cl und [BMIM]PF_6 erklärt. Dennoch ist

es unwahrscheinlich, dass die enzymatische Glucoselauratsynthese bei 50 % [BMIM]Cl inhibiert ist, und bei 60 % [BMIM]Cl abläuft. Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass die enzymatische Modifikation von Cellulose unter diesen Bedingungen funktioniert, während sie auf Glucoseebene nicht funktioniert. Ein weiterer Unterschied liegt bei den verwendeten Enzymen. Möglicherweise zeigt die von Wang und Kollegen genutzte *Candida rugosa* Lipase Typ VII ein anderes Verhalten in diesen Mischungssystemen. Erstaunlich ist, dass die Substitutionsgrade, die von Wang und Kollegen publiziert wurden, um mehr als das 4-fache gegenüber vergleichbaren Studien zur homogenen enzymatischen Modifikation erhöht sind (Tabelle 2).[57] Die Studie von Wang und Kollegen wurde publiziert, als die experimentellen Arbeiten zu der hier vorliegenden Arbeit bereits beendet waren und daher eine Reproduktion der Ergebnisse nicht mehr durchgeführt werden konnte. In zukünftigen Studien müssen die Arbeiten von Wang und Kollegen jedoch reproduziert werden. Sollten sich ihre Ergebnisse bestätigen, wären sie ein sehr bedeutender Beitrag zur enzymatischen Modifikation von Cellulose.

Basierend auf der Fähigkeit der Schweineleberesterase (PLE), Cellobioselaurat zu synthetisieren, wurden Experimente bezüglich der Veresterung von Cellulose im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführt. Hierfür wurde mikrokristalline Cellulose in DMSO gegeben und mit Laurinsäurevinylester und PLE für 72 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Polymer mit Methanol gewaschen, getrocknet und mittels FT-IR analysiert. Es kann ein eindeutiger Esterpeak bei 1758 cm^{-1} identifiziert werden, der jedoch auch in den Proben ohne Enzym nachweisbar ist. Nach zusätzlichem Waschen des Polymers verschwindet der Peak sowohl in Kontrollen, als auch in den Proben, mit Enzym (Abbildung 13). Dies spricht dafür, dass der beobachtete Esterpeak dem Substrat Laurinsäurevinylester zugeordnet werden kann und dieses Substrat lediglich am Polymer adhärent ist und nicht im chemischen Sinne Bestandteil des Polymers ist. Der Vergleich mit dem Esterpeak von chemisch synthetisiertem Celluloselaurat, der ein Signal bei 1740 cm^{-1} zeigt, deutet ebenfalls auf eine nicht erfolgreiche Synthese hin. So zeigt der Laurinsäurevinylester mit 1758 cm^{-1} und das Celluloselaurat mit 1740 cm^{-1} unterschiedliche C=O-Schwingungen im FT-IR-Spektrum. Somit kann in zukünftigen Experimenten, anhand der Schwingung des auftretenden Ester-Peaks, zwischen Cellu-

loseestern und Verunreinigungen mit Vinylestern differenziert werden. Dieser Unterschied kann auch bei der Gegenüberstellung von Laurinsäurevinylester (1756,6 cm^{-1}) mit Laurinsäuremethylester (1740 cm^{-1}) beobachtet werden (Anhang 7, Anhang 8). Eine derartige Verschiebung im FT-IR-Spektrum von Substratesterpeak zu Produktesterpeak wurde in keiner der bisherigen Publikationen zur Vinylester-basierten enzymatischen Veresterung von Cellulose beschrieben.[57,51] Gremos und Kollegen publizierten als Beweis für die Esterbildung ein FT-IR-Spektrum mit einem C=O-Signal von 1752 cm^{-1} bzw. 1755 cm^{-1}, was besser zu dem Spektrum von Laurinsäurevinylestern, als zu dem postulierten Celluloselauratprodukt passt.[50,51] Es ist allerdings problematisch, aufgrund dieser Spektren, die Bildung von Celluloseestern auszuschließen, da je nach Kalibrierung des FT-IR-Spektrometers kleine Abweichungen im Spektrum möglich sind. Werden jedoch am gleichen FT-IR-Spektrometer das Produkt Celluloseester und ein Standard bzw. ein vergleichbarer Methylester vermessen, kann in zukünftigen Studien zwischen Celluloseestern und Verunreinigungen durch Vinylester, die an der Cellulosematrix anhaften, unterschieden werden.

Wie bereits oben beschrieben, gibt es bei einigen Studien sowohl analytische, als auch methodische Probleme bezüglich der Cellulosemodifikation. Gremos und Kollegen zeigen FT-IR-Spektren, welche nicht zu den erwarteten Esterpeaks von Celluloselaurat passen; Wang und Kollegen beschreiben hohe Substitutiongrade in Mischungen aus ionischen Flüssigkeiten, die laut der hier vorliegenden Arbeit zumindest die Enzymaktivität bezüglich der Synthese von Glucoselaurat inhibieren. Und die von Klohr und Kollegen beschriebene enzymatische Acetylierung von Cellulose funktioniert, zumindest auf Glucose-Basis, auch in Abwesenheit von Enzymen, da die Lösungsmittelkomponente NMMO als Katalysator agiert. Diese Beispiele zeigen, dass die Verwendung von adäquaten Kontrollen und eine geeignete Analytik bei Studien zur Cellulosemodifikation nicht vernachlässigt werden dürfen und sich nachfolgende Studien, im Gegensatz zu den bisherigen Studien, mit dieser Problematik auseinandersetzen müssen.

4.4 Die chemische Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc

Die größte Produktausbeute an Glucosedilaurat, Glucosetrilaurat und Glucosetetralaurat wurde nach vier Stunden und 60°C bei einer Substratmenge von 3 Äquivalenten Laurinsäurevinylester je Glucose erhalten (Abbildung 14). Die bei längeren Reaktionszeiten und höheren Temperaturen auftretende Abnahme an Produkt kann durch Neben- bzw. Folgereaktionen erklärt werden (Abbildung 14, Abbildung 15). Eine mögliche Nebenreaktion könnte in diesem Zusammenhang die Reaktion der Imidazolium-Carbenspezies (**39**) von [EMIM]OAc mit der Aldehydfunktion der Glucose sein.[105,33] Es ist auch möglich, dass Glucosemonolaurat, Glucosedilaurat, Glucosetrilaurat und Glucosetetralaurat zu Glucosepentalaurat weiterreagieren, welche mit den verwendeten analytischen Methoden nicht detektiert werden konnten. Die Synthese von großen Mengen an Glucosepentalaurat ist allerdings unwahrscheinlich, da lediglich 2 bzw. 3 mol Laurinsäurevinylester je Glucose in den Systemen vorhanden sind. Grundsätzlich sind auch eine Hydrolyse von Glucoselaurat oder weitere nicht bekannte Nebenreaktionen vorstellbar, die die Abnahme von Glucoselaurat (Glucosemono- bis Glucosetetralaurat) erklären können. Nach diesen Vorexperimenten zur Vinylester-basierten Glucoselauratsynthese wurde das Synthesekonzept auf die Modifikation von Cellulose übertragen.

Die Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc ermöglicht die homogene Synthese von Celluloselaurat mit einem Substitutionsgrad von 2,9 bei einer Substratkonzentration von 4 mol je AGU. Da jede AGU drei freie Hydroxygruppen besitzt, entspricht dies einem Substratüberschuss von 33 %. Im Gegensatz dazu benötigt die Vinylester-basierte Synthese in DMSO/TBAF eine Substratmenge von 10 mol je AGU, also einen Substratüberschuss von 233 %, um einen Substitutionsgrad von 2,6 zu erhalten.[38] Der Vorteil der von Heinze und Kollegen vorgeschlagenen Vinylester-basierten Synthese in DMSO/TBAF liegt in der niedrigen Prozesstemperatur von 40°C, was Energiekosten und potenzielle Nebenreaktionen minimiert. Jedoch benötigt diese Synthese 72 Stunden, während die Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc innerhalb von 1-4 Stunden abläuft (Abbildung 19).[38] Auch Fettsäurechlorid-basierte Synthesen in LiCl/DMAc weisen üblicherweise lange Reaktionszeiten zwischen 16 h und 24 h auf (Tabelle 2).[34,15]

Satgé und Kollegen konnten diese Reaktionszeit zwar auf eine Minute reduzieren, benötigten dafür allerdings den giftigen Katalysator 4-(Dimethylamino)-pyridin, Mikrowellenstrahlung und Temperaturen von 140°C-165°C (Tabelle 2).[36] Hohe Temperaturen und Mikrowellenstrahlen benötigen viel Energie und bergen das Risiko von verstärkten unerwünschten Nebenreaktionen, wie beispielsweise eine Verringerung des Polymerisationsgrades der Cellulose.[106] Kürzlich wurde gezeigt, dass bei 50°C in LiCl/DMAc hohe DS-Werte (2,83) für Celluloseacetat innerhalb von 2 Stunden erreicht werden können, wenn 5 mol je AGU Acetylchlorid als Substrat eingesetzt werden.[37] Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die langkettigen Fettsäurechloride zum einen aufgrund von sterischer Hinderung unreaktiver sind und zum anderen aufgrund ihrer niedrigen Polarität eine schlechte Löslichkeit bzw. einen geringeren Massentransfer in die polaren Celluloselösungsmitteln zeigen. Daher dürfen Reaktivitäten nur zwischen Acyldonoren ähnlicher Kettenlängen verglichen werden.

Im Gegensatz zu LiCl/DMAc-Systemen ist die Synthese von langkettigen Celluloseestern in [BMIM]Cl (**5**), ausgehend von 3 mol je AGU Fettsäurechloriden wesentlich schneller und führt innerhalb von 2 Stunden zu einem Susbtitutionsgrad von 1,54.[39] Um die Vinylester-basierte Synthese besser mit der Fettsäurechlorid-basierten Synthese nach Barthel und Heinze vergleichen zu können, wurde Celluloselaurat in [BMIM]Cl bei 80°C durch Zugabe von äquimolaren Mengen von Lauroylchlorid reproduziert und führte zu einem DS von 2,3 (Tabelle 10). Dieser Substitutionsgrad liegt höher als von Barthel und Heinze beschrieben und ist besser vergleichbar mit den Ergebnissen von Huang und Kollegen, die bei einer ähnlichen Synthese von Cellulosestearat einen Substitutionsgrad von 2,15 bei äquimolaren Reaktionsbedingungen berichten.[41,39] Die Vinylester-basierte Synthese besitzt mit einem Substitutionsgrad von 2,4 und ähnlichen Synthesebedingungen eine vergleichbare Effizienz wie die Fettsäurechlorid-basierte Synthese in [BMIM]Cl (Tabelle 10).

Weitergehend wurde der Einfluss der Reaktionstemperatur und der Zeit unter äquimolaren Reaktionsbedingungen der Vinylester-basierten Synthese getestet. Das Temperaturoptimum bei der Vinylester-basierten Celluloselauratsynthese liegt mit 70-80°C über dem Temperaturoptimum der Glucoelauratsynthese (60°C, Abbildung 14). Dieser Unterschied kann zum einen durch die höhere Viskosität der Cellulose-[EMIM]OAc-

Lösungen, im Gegensatz zu Glucose-[EMIM]OAc-Lösungen, erklärt werden, welche aufgrund des reduzierten Massentransfers höhere Temperaturen erfordern. Eine andere Erklärung könnte in der niedrigeren Reaktivität der Cellulose – bedingt durch ihren polymeren Charakter – begründet sein, wodurch höhere Synthesetemperaturen für vergleichbare Syntheseoptima benötigt werden. Die Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc kann allerdings auch bei deutlich niedrigeren Temperaturen von 40°C oder 50°C durchgeführt werden, falls mildere Reaktionsbedingungen aus prozesstechnischer Sicht erforderlich sein sollten (Abbildung 18). Dies würde jedoch längere Reaktionszeiten und/oder höhere Acyldonorkonzentrationen erfordern, um vergleichbare DS-Werte zu erreichen. Der Einfluss der Reaktionszeit wurde beim Temperaturoptimum von 80°C untersucht. Innerhalb der ersten 30 Minuten verläuft die Reaktion schnell und führt zu DS-Werten von 2,1. Nach 60 Minuten war die Reaktion beendet und es wurden Substitutionsgrade zwischen 2,1 und 2,4 gemessen (Abbildung 19). Die Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc ist also wesentlich schneller als die Vinylester-basierte Synthese in DMSO/TBAF, welche von Heinze publiziert wurde.[38] Jedoch zeigen die Reaktionsparameter Zeit und Temperatur einen großen Einfluss auf die Syntheseeffizienz. Daher sollte in zukünftigen Experimenten die Synthese in [EMIM]OAc bei 40°C durchgeführt werden, um die Synthese besser mit der DMSO/TBAF-Synthese nach Heinze vergleichen zu können.[38] Dieser Ansatz wäre allerdings auch problematisch, da die Viskosität von Celluloselösungen in [EMIM]OAc deutlich über den Viskositäten von DMSO-Salzmischungen liegen und daher vermutlich der Massentransfer in [EMIM]OAc bei niedrigeren Temperaturen limitiert ist.[16] Um die beiden Synthesestrategien aussagekräftig vergleichen zu können, wären vergleichende Studien bezüglich Kosten, Effizienz, Zeit, Sicherheit und Recycling erforderlich. Insbesondere der Faktor Sicherheit und Recycling ist im Falle von DMSO/TBAF problematisch, da DMSO brennbar ist und aufwendigere Recyclingprozesse erforderlich sind.[44] Im Gegensatz dazu sind ionische Flüssigkeiten nicht brennbar und Recyclingprozesse leichter.

Die Produkte der Vinylester-basierten Synthese in [EMIM]OAc und die Produkte der Fettsäurechlorid-basierten Synthese in [BMIM]Cl zeigen, wie bereits diskutiert, ähnliche Substitutionsgrade. Ein deutlicher Unterschied zwischen den Celluloselauraten

liegt allerdings im Molekulargewicht. Das Zahlenmittel der Molmasse (M_n) ist nach der Vinylester-basierten Synthese 15-fach höher, während das Massenmittel der Molmasse (M_w) 32-fach über den Molekulargewichtsverteilungen von Celluloselaurat liegt, welches durch die Fettsäurechlorid-basierte Synthese erzeugt wurde (Tabelle 10). Hierbei muss allerdings angemerkt werden, dass die Molekulargewichtsverteilungen relativ zu einem Polystyren-Standard gemessen wurden, welcher im Vergleich zu Celluloselaurat ein nicht-verzweigtes Polymer ist. Dies kann zu Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Molekulargewichtsverteilungen des Polymers führen. Jedoch zeigen Unterschiede in den Molmassenverteilungen der synthetisierten Celluloselaurate in der Größenordnung von 15 (M_n) bis 32 (M_w), dass der Polymerisationsgrad bei der Fettsäurechlorid-basierten Synthese in [BMIM]Cl abnimmt. Der Abbau des Cellulosegrundgerüstes durch die Synthese mit Carbonsäurechloriden wurde bereits häufig in der Literatur beschrieben.[107,41] Eine derartige Abnahme des Polymerisationsgrades konnte beispielsweise auch schon bei anderen halogenhaltigen ionischen Flüssigkeiten, wie beispielsweise 1-Ethyl-3-Methylimidazoliumchlorid ([EMIM]Cl) gezeigt werden.[39] Diese Depolymerisation der Cellulose wird vermutlich durch die Bildung von hochreaktivem Chlorwasserstoff oder durch das reaktive Lauroylchlorid selbst induziert. Im Gegensatz dazu führt die Vinylester-basierte Synthese zu dem weniger reaktiven Nebenprodukt Acetaldehyd, und liefert Celluloseester mit höherem Polymerisationsgrad.

4.5 Acetylierung als unerwünschte Nebenreaktion

Die unerwünschte Acetylierung von Cellulose in einer Acetat-basierten ionischen Flüssigkeit ist offensichtlich eine systemimmanente Nebenreaktion. Dennoch ist die zusätzliche Acetylierung, die allein durch den Lösungsprozess bei 150°C auftritt, mit 1,7 mol-% aller Hydroxygruppen relativ gering.[25] Bei niedrigeren Lösetemperaturen wie in der hier vorliegenden Arbeit (80°C) könnte diese Grundacetylierung, welche nicht durch Acyldonoren induziert wird, aufgrund der geringeren thermischen Energie kleiner sein. Auch eine mögliche enzymatische Modifikation von Cellulose in Acetat-basierten ionischen Flüssigkeiten würde sehr wahrscheinlich zu einer zusätzlichen Acetylierung der Cellulose führen, da viele Lipasen und Esterasen, wie beispielsweise die CAL-B, Acetat bzw. Essigsäure als Substrat akzeptieren.[99] Somit ist eine enzymatische Veresterung von Alkoholen mit langkettigen Säuren in [EMIM]OAc immer nur mit zusätzlicher Acetylierung durchführbar. So entsteht bei der enzymatischen Umsetzung von Butanol in [EMIM]OAc Essigsäurebutylester, wobei die Acetatkomponente vom Anion der ionischen Flüssigkeit oder von Essigsäureester-Verunreinigungen stammt (Abbildung 5, Schema 8). Diese zusätzliche Acetylierung ist allerdings nicht auf Enzymreaktionen beschränkt, da ebenfalls chlorierte Substrate und Anhydride in [EMIM]OAc eine Aktivierung der Acetate und damit eine Acetylierung der Cellulose bewirken.[31,44] Beispielsweise wurde gezeigt, dass der Umsatz mit dem Substrat Propionsäureanhydrid in [EMIM]OAc hauptsächlich eine Acetylierung der Cellulose bewirkt und nur in geringem Maße eine Veresterung mit Propionsäure. In [EMIM]OAc ist die zusätzliche Acetylierung, die durch Vinylester induziert wird, mit 4 - 26,3 mol-% deutlich niedriger als bei der Verwendung von Anhydriden oder Fettsäurechloriden mit 83,3 - 88,8 % (Tabelle 11). Dieser Unterschied ist vermutlich auf die niedrigere Reaktivität von Vinylestern, im Vergleich zu Anhydriden und Fettsäurechloriden zurückzuführen. Neben der starken zusätzlichen Acetylierung, ausgehend von Fettsäurechloriden und Anhydriden, ist die gesamte Substitution mit einem DS_{Total} von 0,36 bzw. 0,34 unter äquimolaren Substratkonzentrationen deutlich niedriger, als bei der Vinylester-basierten Synthese mit $DS_{Acyldonor}$-Werten über 2,1 (Tabelle 11). Dieser Unterschied ist vermutlich auf Nebenreaktionen der hoch reaktiven Anhydride und Fettsäurechloride zurückzuführen, die allerdings nicht weiter untersucht wurden. Somit ermöglicht die Vinylester-basierte

Synthese eine deutlich größere Kontrolle über das Substitutionsmuster der Cellulose und ist bei äquimolarem Substrateinsatz mit DS-$_{Acyldonor}$ über 2,0 effizienter als die Synthese, ausgehend von Fettsäurechloriden und Anhydriden, mit DS-$_{Acyldonor}$-Werten unter 0,1 in [EMIM]OAc (Tabelle 11 und Abbildung 19). Das Ausmaß der zusätzlichen Acetylierung variiert allerdings nicht nur zwischen Fettsäurechloriden, Anhydriden und Vinylestern, sondern auch zwischen unterschiedlichen Vinylesterseitenketten. Die Veresterung mit dem sterisch anspruchsvollen und sehr unpolaren Palmitinsäurevinylester führt zu einer hohen Acetylierung von 20,0 %, während kürzere und polarere Substrate wie Laurinsäurevinylester und Octansäurevinylester lediglich eine Acetylierung von 11,1 % bzw. 6,3 % zeigen (Tabelle 11, Abbildung 20). Zusätzlich führen die ebenfalls vergleichsweise polaren Substrate, Pivalinsäurevinylester und Benzoesäurevinylester, zu einer prozentualen Acetylierung von 4,2 % bzw. 4,5 %. Die zusätzliche Acetylierung scheint allerdings nicht nur von der Polarität des Substrates abzuhängen, sondern ist auch nach Verwendung des moderat unpolaren 2-Ethylhexansäurevinylesters mit 18,1 % vergleichsweise hoch und geht mit niedrigeren Substitutionsgraden von $DS_{Acyldonor}$ 0,9 einher (Tabelle 11). Möglicherweise behindert die verzweigte 2-Ethylhexansäure hohe $DS_{Acyldonor}$-Werte durch ihre sterisch anspruchsvolle Struktur und begünstigt dadurch die Acetylierung mit den kleineren Acetatgruppen. Diese Argumentation passt ebenfalls zu Celluloseneodecanoat, welches mit 26,3 % eine vergleichsweise hohe prozentuale Acetylierung vorweist (Tabelle 11). Bei den Neodecansäureseitenketten handelt es sich um ein Isomer-Gemisch aus ebenfalls stark verzweigten Alkanketten.

Die Erklärung der hohen Acetylierung im Falle des Palmitinsäurevinylesters kann möglicherweise über kinetische Überlegungen erklärt werden. Bezüglich der Reaktionszeit kann spekuliert werden, dass die Aktivierung von Acetat in [EMIM]OAc während der Vinylester-basierten Synthese deutlich langsamer ist, als bei der Anhydrid- oder Fettsäurechlorid-basierten Synthese, was zu der beobachteten reduzierten Acetylierung führt. Zusätzlich ist die Acylierung der Cellulose, ausgehend von Vinylestern (**15**), schneller, als die unerwünschte Aktivierung von Acetat bzw. dessen Bindung an die Cellulose. Mit abnehmender Polarität der Vinylester sinkt die Löslichkeit, sowie der Massentransfer in dem polaren Lösungsmittel [EMIM]OAc und müsste daher zu einer

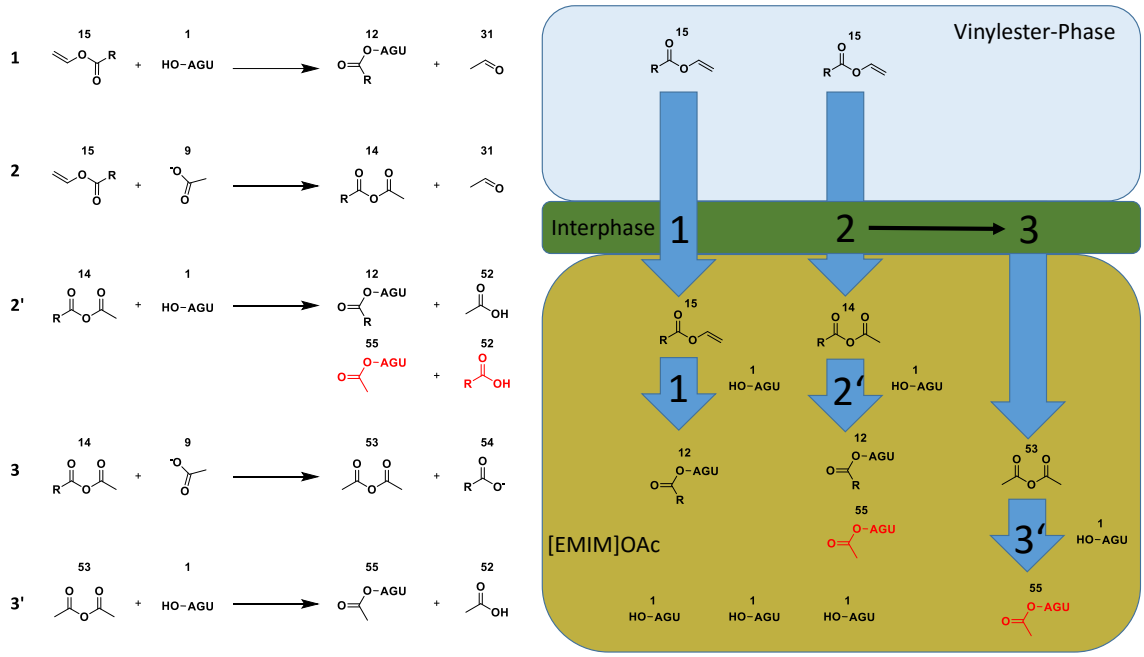


Abbildung 28: Mögliche Acylierungs- und Acetylierungswege der Vinylester-basierten Synthese in [EMIM]OAc.
Die Zahlen 1, 2, 2‘, 3 und 3‘ bezeichnen Reaktionswege, welche aus den **links** beschriebenen Reaktionen und dem korrespondierenden Massentransfer, welcher **rechts** als blauer Pfeil eingezeichnet ist, aufgebaut sind. Ein mögliches Konzept zur Erklärung der zusätzlichen Acetylierung basiert auf der Vinylester-induzierten Anhydridbildung. Die Vinylester-basierte Acylierung der Cellulose verläuft direkt, wobei der Massentransport von unpolaren Vinylestern (**15**) in die [EMIM]OAc-Phase die Reaktion limitiert (**Weg 1**). An der Phasengrenzfläche kann der Vinylester mit dem Acetat der ionischen Flüssigkeit ein gemischtes Anhydrid bilden (**Weg 2**). Der Massentransfer des gemischten Anhydrids ist allerdings ebenfalls aufgrund der geringen Polarität seines Restes limitiert (**Weg 2**) und führt bei einer Reaktion mit Cellulose, sowohl zu dem Celluloseester – der den gleich Rest wie der ursprüngliche Vinylester trägt – sowie zu Celluloseacetat (**55**, **Weg 2‘**). Das gemischte Anhydrid kann allerdings mit einem weiteren Acetat der ionischen Flüssigkeit reagieren und bildet dann ein Carboxylat (**54**) und das Essigsäureanhydrid (**53**, **Weg 3**), welches deutlich polarer ist als der eingesetzte unpolare Vinylester (**15**) und das gemischte Anhydrid. Daher ist der Massentransfer von Essigsäureanhydrid (**53**) in die polare Phase der ionischen Flüssigkeit, im Gegensatz zu dem gemischten Anhydrid und dem unpolaren Vinylester (**15**), bevorzugt (**Weg 3**). Dieses Konzept kann die erhöhte Acetylierung bei der Verwendung von unpolaren Vinylestern erklären, da **Weg 3‘** gegenüber **Weg 2‘** und **Weg 1,** aufgrund der großen Konzentration an Essigsäureanhydrid (**53**) in [EMIM]OAc, bevorzugt abläuft. Im Falle von polareren Substraten ist **Weg 1** bevorzugt, da die Weg-Folge bestehend aus **Weg 2**, **Weg 3** und **Weg 3‘** langsamer ist, als die direkte Acylierung im **Weg 1**.

langsameren Celluloseveresterung führen (Abbildung 28, **Weg 1**). Unter der Annahme, dass die Vinylester-basierte Acetat-Aktivierung an der Phasengrenzfläche stattfinden kann, würde dies in Zusammenhang mit dem verlangsamten Massentransfer von unpolaren Acyldonoren in einer erhöhten Acetylierung der Cellulose resultieren

(Abbildung 28). Eine vorstellbare Form der Acetat-Aktivierung wäre die Bildung von gemischten Anhydriden (**14**), bestehend aus dem Acetat der ionischen Flüssigkeit und der Acylkomponente des eingebrachten Acyldonors (Abbildung 28, **Weg 2**). Der mögliche Mechanismus der Anhydridbildung wird in Kapitel 4.10 genauer diskutiert. Ein gemischtes Anhydrid (**14**), bestehend aus beispielsweise einem Acetat und einem Palmitat, welches an der Phasengrenzfläche entsteht, ist allerdings nicht wesentlich polarer als ein Palmitinsäurevinylester. Somit würde sich kein beschleunigter Massentransfer und keine erhöhte Acetylierung der Cellulose ergeben (Abbildung 28, **Weg 2'**). Da allerdings bekannt ist, dass Anhydride Acetat in [EMIM]OAc ebenfalls aktivieren, kann das postulierte gemischte Anhydrid mit einem weiteren Acetat reagieren und dadurch Essigsäureanhydrid (**53**) bilden, dessen Entstehung aufgrund der hohen Konzentration an Acetat in der ionischen Flüssigkeit bevorzugt ist (Abbildung 28, **Weg 3**). Das Essigsäureanhydrid (**53**) ist allerdings, im Gegensatz zu beispielsweise Palmitinsäurevinylester oder einem gemischten Anhydrid aus Acetat und Palmitat, deutlich polarer, was zu einem besseren Massentransfer in [EMIM]OAc führt und eine größere Acetylierung der Cellulose begünstigt (Abbildung 28, **Weg 3'**). Somit könnte die erhöhte Acetylierung, im Falle von Cellulosepalmitat, auf der postulierten Vinylester-basierten Anhydridbildung beruhen (Abbildung 28). Sofern die postulierte Vinylester-basierte Anhydridbildung zutrifft und für die erhöhte Acetylierung verantwortlich ist, könnte in nachfolgenden Studien versucht werden, die Anhydride durch die Zugabe von Wasser abzufangen, da sich Anhydride in Gegenwart von Wasser spontan zu freien Säuren zersetzen. Dies könnte dazu beitragen, die unerwünschte Acetylierung zu begrenzen, wobei dadurch vermutlich die Syntheseeffizienz, aufgrund des verstärkten Flusses der Acyldonoren in freie Fettsäure, reduziert werden würde. Unabhängig von diesen Annahmen kann festgestellt werden, dass die Vinylester-basierte Synthese eine schonende Modifikation von Cellulose mit vergleichsweise niedriger zusätzlicher Acetylierung gewährleistet. Insbesondere wenn nicht-verzweigte, relativ polare Vinylester verwendet werden, ist die Acetylierung auf geringe DS_{Acetat}-Werte beschränkt.

4.6 Robustheit der FT-IR-Analytik

Eine Möglichkeit, um die Veresterung von Cellulose nachzuweisen, ist die FT-IR-Spektroskopie. Wie in Kapitel 4.3 diskutiert, ergibt sich bei der Vinylester-basierten Synthese ein Wellenlängenwechsel des C=O-Signals zwischen dem Vinylestersubstrat und dem Celluloseesterprodukt. Dies ist beispielsweise bei der Vinylester-basierten Synthese in [EMIM]OAc zu beobachten, bei der das Substrat Laurinsäurevinylester mit 1756 cm^{-1} einen anderen Esterpeak vorweist, als das Celluloselauratprodukt mit 1741 cm^{-1} (Abbildung 16, Anhang 7). Neben diesen qualitativen Aussagen, kann mithilfe von FT-IR-Spektren auch eine quantitative Abschätzung der Veresterung gegeben werden, welche nachfolgend diskutiert wird.

Domínguez de María und Martinsson entwickelten eine FT-IR-Methode, die unabhängig von Fettsäureverunreinigungen ist, da sie Fettsäuren durch die Zugabe von Basen in Carboxylate umwandelt und dadurch die FT-IR-Signale verschiebt, was die Integration des Esterpeaks (C=O Schwingung zwischen 1720 cm^{-1} bis 1743 cm^{-1}) ermöglicht, welcher nicht mehr mit den Signalen der Fettsäuren überlagert.[108] Diese Methode ist sehr nützlich, basiert jedoch auf teuren ionischen Flüssigkeiten und benötigt zeitintensive Lösungsprozesse.

Im Gegensatz zur Integration des Esterpeaks wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Peakhöhe zur quantitativen Abschätzung der Veresterung genutzt. Die Verwendung der Peakhöhe ist vermutlich nicht so genau wie die Verwendung der Peakfläche, wird jedoch nicht von Verunreinigungen mit freien Fettsäuren beeinflusst, da diese nur die Peakfläche des Estersignals beeinflussen, aber nicht die Peakhöhe. Dennoch können Verunreinigungen die relative Höhe des Estersignals im FT-IR-Spektrum reduzieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit der relative Substitutionsgrad (RDS) genutzt, der sich aus Formel 12 und Formel 13 berechnet und die C=O-Esterpeakhöhe in Relation zu der Peakhöhe des Signals der glycosidischen Bindung (C-O-C-Schwingung bei 1019 cm^{-1} bis 1070 cm^{-1}) setzt. Der Celluloseetherpeak bei 1019 cm^{-1} bis 1070 cm^{-1} wurde als „Fixpunkt“ für die RDS-Kalkulation gewählt, um das Estersignal zu normieren, da das Ethersignal des zugrundeliegenden Cellulosegrundgerüstes sich nicht mit variierendem DS verändert.

Die Korrelation zwischen dem RDS-Werten, welche auf FT-IR-Daten beruhen und den DS-Werten, welche sich aus ^{1}H-NMR-Spektren ableiten, wurde für verschiedene Celluloseester untersucht (Abbildung 23A). Im Bereich zwischen 0,3 bis 1,0 (RDS-Wert) bzw. 0,24 bis 2,30 (DS-Wert) wurde ein linearer Zusammenhang von RDS und DS beobachtet. Es muss darauf hingewiesen werden, dass es schwierig ist, Cellulosematerial mit niedrigem Substitutionsgrad zu lösen, was zu einer gewissen Ungenauigkeit bei der ^{1}H-NMR-Analytik beitragen kann und die geringere Anzahl von RDS-DS-Wertepaaren für niedrige Substitutionsgrade erklärt (Abbildung 23A). Dennoch scheint die lineare Regression mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,94 einen linearen Verlauf zu beschreiben. Die Robustheit der FT-IR-Methode wurde weiterhin bestätigt, indem Celluloselaurat in unterschiedlichen Verhältnissen mit unmodifizierter Cellulose gemischt wurde. Die Auftragung des prozentualen Celluloselauratgehalts gegen den RDS-Wert der Mischungen ergab für RDS-Werte über 0,2 ebenfalls einen linearen Verlauf (Abbildung 23B). Für RDS-Werte unter 0,2 wurde der RDS-Wert aufgrund eines unzureichenden Signal-Rausch-Verhältnisses ungenau und weicht von dem linearen Verlauf ab.

Der RDS-Wert ist für die Analyse der Celluloseveresterung geeignet, kann aber nicht dafür genutzt werden, zwischen Acylierung und Acetylierung zu unterscheiden. Da die beobachtete Acetylierung allerdings meist unter 25 % liegt, besteht der RDS im Fall der Vinylester-basierten Synthese in [EMIM]OAc, hauptsächlich aus Estersingalen, welche durch die Acylierung der Cellulose hervorgerufen werden. Allerdings kann es aufgrund der unterschiedlichen Signale bei der Verwendung von verschiedenen Estern problematisch sein, den RDS anzuwenden, da beispielsweise im Falle von Cellulosebenzoat das C=O-Signal mit 1711 cm^{-1} stark von dem Signal anderer Celluloseester, wie beispielsweise Celluloselaurat mit 1741 cm^{-1} abweicht. Somit addieren sich im Fall von Mischestern nicht die Peakmaxima, sondern es kommt zu Überlagerung der „Nicht-Maxima-Signale[6]“, was zu neuen Peakmaxima führen kann. Dies kann weiterhin zu Ungenauigkeiten bei der RDS-Analytik beitragen.

[6] Bezeichnet das Messsignal, welches nicht am Scheitelpunkt eines Signalpeaks auftritt, aber dennoch zum Peak gehört.

Zusätzlich ist der RDS vom Polymerisationsgrad abhängig, da der zur RDS-Berechnung verwendete Etherpeak (glycosidische Bindung, 1019 cm^{-1} bis 1070 cm^{-1}) direkt mit der Länge des Polymers korreliert. Daher können Veränderungen im RDS-Wert sowohl DS-, als auch DP-Wert Veränderungen anzeigen und müssen daher vorsichtig interpretiert werden. Wenn es jedoch durch eine schonende Synthese gelingt, Änderungen im DP zu minimieren, ist der RDS ein aussagekräftiger Wert, um den Substitutionsgrad abzuschätzen. Veränderungen im Polymerisationsgrad beeinflussen den RDS allerdings deutlich schwächer, als Veränderungen im DS. Wenn sich der Polymerisationsgrad halbiert, wurde lediglich eine glycosidische Bindung der Cellulose gespalten. Cellulose besteht allerdings aus hunderten von glycosidischen Bindungen, weswegen sich die Halbierung des DP lediglich in einer geringfügigen Reduzierung des Signals für die glycosidische Bindung im FT-IR-Spektrum manifestiert. Daher haben nur hohe Fluktuationen im DP-Wert einen nennenswerten Effekt auf den RDS-Wert.

RDS-Werte wurden in dieser Arbeit genutzt, um die Reaktionskinetik der Celluloseestersynthese während des Upscaling-Prozesses zu untersuchen. Der RDS ermöglicht es, die Celluloseveresterung schon bei niedrigen Substitutionsgraden zu analysieren, welche beispielsweise am Anfang des Prozesses auftreten. Der RDS-Wert ist insbesondere für die Analytik von Celluloseestern mit niedrigen Substitutionsgraden und der damit einhergehenden Unlöslichkeit in üblichen NMR-Lösungsmitteln nützlich, da hier eine Bestimmung der Veresterung mittels NMR nicht möglich ist.

4.7 Upscaling, Recycling und Wiederverwendbarkeit

Die Vinylester-basierte Synthese wurde im 2,5 kg [EMIM]OAc durchgeführt, anschließend wurde die ionische Flüssigkeit recycelt und erneut für die Synthese eingesetzt. Insgesamt wurden vier Synthese-Recycling-Zyklen durchlaufen. In dem ersten Reaktorlauf konnte durch den Einsatz von 431,6 g Laurinsäurevinylester und 77 g Cellulose eine Ausbeute von 233 g Celluloselaurat erzielt werden. Das Celluloselaurat hat eine DS von 2,3, einem RDS von 0,92 und eine massenmittlere Molmasse (M_w) von 232.072 g/mol (Tabelle 12). Dies entspricht einer deutlich höheren Produktausbeute, im Vergleich zur Fettsäurechlorid-basierten Synthese in [BMIM]Cl (**5**), welche nach Barthel und Heinze unter Verwendung von 2,14 ml Lauroylchlorid und 0,5 g Cellulose lediglich 0,35 g Celluloselaurat mit einem Substiutionsgrad von 1,54 liefert.[39] In dieser Synthese entsteht in Bezug auf die Masse weniger Celluloselaurat (Produkt), als Cellulose (Substrat) eingesetzt wurde, obwohl die zusätzliche Masse der Seitenketten (Acylkomponente) die Gesamtmasse nach der Synthese erhöhen müsste. Die höhere Ausbeute der Vinylester-basierten Synthese kann durch die niedrigere Depolymerisation des Cellulosegrundgerüstes, im Gegensatz zu der Fettsäurechlorid-basierten Synthese, erklärt werden (Tabelle 10). So würde ein Abbau des Cellulosegrundgerüstes während der Fettsäurechlorid-basierten Synthese zu einer komplexen Mischung von Celluloselaurat-Oligomeren und Celluloselaurat-Polymeren führen, was die Produktaufarbeitung erschwert und damit die Massenbilanz des gesamten Prozesses negativ beeinflusst. Kleine Oligomere der Celluloseester sind vermutlich teilweise in den Aufarbeitungslösungsmitteln wie Methanol und Wasser löslich und würden daher ausgewaschen werden. Eine genaue Bestimmung der Produktausbeute bezogen auf die theoretisch mögliche Produktausbeute der Vinylester-basierten Synthese von Celluloselaurat ist nicht möglich, da von hoch substituierten DS-Werten die Bestimmung des prozentualen Acetatgehalts schwierig ist, welcher aber für die Kalkulation des Produktmolekulargewichts und damit der Ausbeute von Bedeutung ist. Grobe Abschätzungen, unter Annahme eines konstanten Acetatgehalts von 11 %, ergeben Ausbeuten zwischen 80 % und 99 % in den ersten 2 Synthesen und Ausbeuten zwischen 80 % und 70 % für die 3. und 4. Synthese (Kapitel 2.3.8). Diese Abnahme der Ausbeute korreliert allerdings auch mit dem reduzierten Substitutionsgrad, welcher bei der dritten Synthese auf 1,8 und

anschließend in der vierten Synthese auf 1,4 fällt. Zusätzlich sinkt die Massenausbeute von 233 g bzw. 272 g in den ersten zwei Reaktorläufen auf 153 g im dritten und 120 g im vierten Reaktorlauf. Eine mögliche Erklärung für diesen Rückgang in der Syntheseeffizienz könnte in der zunehmenden Akkumulation von EHEMIM (**40**) mit steigenden Recyclingschritten liegen. EHEMIM (**40**) besitzt eine sekundäre Alkoholgruppe, die ausgehend von Vinylestern in [EMIM]OAc verestert werden kann, und konkurriert damit um das Substrat der Celluloseestersynthese (Schema 19). Ob dies jedoch wirklich der Grund für die reduzierte Syntheseeffizienz ist, konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden. Ein ähnlicher Effekt wurde während der Phosphorylierung in der ionischen Flüssigkeit 1-Butyl-3-methylimidazoliumchlorid beobachtet, wobei der Substitutionsgrad innerhalb von fünf Recyclingzyklen von 0,55 auf 0,45 sinkt.[109] Diese Beispiele zeigen, dass das Recycling von ionischen Flüssigkeiten durchaus problematisch ist und die Syntheseeffizienz beeinflussen kann. Wie am Beispiel der EHEMIM-Bildung gezeigt, sind ionische Flüssigkeiten nicht immer inert, was das Recycling erschwert. In Bezug auf die Masse lag die Recyclingeffizienz der ionischen Flüssigkeit bei der Vinylester-basierten Synthese bei durchschnittlich 91 % und variierte nur geringfügig (Tabelle 13). Das Recycling von ionischen Flüssigkeiten ist aufgrund ihres hohen Preises ein Schlüsselfaktor bei der Entwicklung von ökonomisch und ökologisch effizienten Prozessen. In diesem Zusammenhang diskutieren King und Kollegen die Möglichkeit, [EMIM]OAc unter bestimmten Bedingungen zu destillieren, sind jedoch sehr kritisch bezüglich der Reinheit und Korrosivität der wiedergewonnenen ionischen Flüssigkeit, weshalb die Evaporation vermutlich keine sinnvolle Möglichkeit für das Recycling von [EMIM]OAc ist.[110] Darum wurde in der hier vorliegenden Arbeit die häufig angewendete „Anti-Solvent-Strategie“ genutzt, bei der die Zugabe eines Lösungsmittels das Ausfällen des Polymers induziert und dadurch dessen Abtrennung ermöglicht.[111,112] Anschließend wird durch Evaporation des flüchtigen „Anti-Solvents“, in diesem Fall Wasser, die ionische Flüssigkeit recycelt. Die Verwendung von anderen „Anti-Solvents“ wie Ethanol oder Aceton kann aufgrund des niedrigeren Siedepunktes das Recycling vereinfachen, allerdings würden diese Lösungsmittel aufgrund ihrer Brennbarkeit eine sichere Prozessführung erschweren. Der beobachtete Verlust von ca. 10 w/w % ionischer Flüssigkeit, kann unter anderem durch das Anheften von [EMIM]OAc an das Cel-

luloselaurat-Rohprodukt nach dem Wasser-induzierten Ausfällen erklärt werden, welches erst während dem Waschen mit Methanol von Celluloselaurat abgetrennt wird.

Neben den Ergebnissen zur Massenbilanz und zum Recycling wurde während des Upscalings auch bemerkt, dass die Vinylester-basierte Synthese exotherm ist. Diese Temperaturentwicklung ist zum einen in der Bildung des EHEMIM-Kations (**40**) aus EMIM und Acetaldehyd begründet. Inwieweit die Umesterung, ausgehend von Vinylestern einen exothermen Charakter besitzt, wurde allerdings nicht untersucht. Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich mit voranschreitendem Recycling die Löslichkeit der Cellulose in der ionischen Flüssigkeit verbessert. Dieser Effekt soll im nächsten Kapitel diskutiert werden.

4.8 Verbesserte Löslichkeit von Cellulose

Das Phänomen der schnelleren und verbesserten Löslichkeit von Cellulose in recyceltem [EMIM]OAc nach der Vinylester-basierten Synthese soll nun betrachtet werden. Die verbesserte Löslichkeit beruht zum einen auf der Bildung von EHEMIM (**40**) und zum anderen auf der Anwesenheit von geringen Mengen an Wasser. Das Wasser kann sowohl durch unvollständige Evaporation während des Recyclings akkumulieren, als auch während des Lösungsprozesses aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften der ionischen Flüssigkeit in das System gelangen. Die Bildung des EHEMIM-Kations (**40**) basiert auf der Addition der EMIM-Carben-Spezies (**39**) an Acetaldehyd, welches als Nebenprodukt bei der Vinylester-basierten Cellulosemodifikation entsteht (Schema 18).

Bereits geringe Mengen an EHEMIM (**40**) von 14 oder 27 %-Kation verkürzen die Lösezeit signifikant, wobei sich bei einer EHEMIM-Konzentration von 38 % die Lösezeit von 16 Stunden auf 5 Minuten reduziert, was einer 192-fachen Reduzierung der Lösezeit entspricht. Dieser Lösungsprozess wurde in 2,0 ml Eppendorfreaktionsgefäßen und das Erzeugen von Löslichkeitsmatrizen untersucht, welche durch visuelle Beobachtung der Löslichkeit, sowie der damit korrelierenden Viskosität erstellt wurden. Die Matrizen zeigen ein Löslichkeitsoptimum bei einem Kationenanteil von 50 %- EHEMIM. Die verbesserte Löslichkeit unter diesen Bedingungen konnte anschließend durch Experimente im Kolbenmaßstab verifiziert werden. So lösten sich bei 80°C in 50 %-igem EHEMIM (**40**) mit 8,5 % w/w Wasser innerhalb von 3 Stunden 14 % w/w Cellulose, während unter denselben Bedingungen bei 0 %-igem EHEMIM (**40**) bzw. 100 %-igem EMIM lediglich 1 % w/w Cellulose und bei 0 % EHEMIM (**40**) bzw. 100 %-igem EMIM und 10 % w/w Wasser lediglich 2 % Cellulose lösten.

Somit ergeben sich kürzere Lösungszeiten, als auch quantitativ optimierte Lösungseigenschaften des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems. Im Vergleich zur Literatur wird ersichtlich, dass es durchaus möglich ist, höhere Prozentsätze an Cellulose in der ursprünglichen ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc zu lösen, dies allerdings Vorbehandlungen oder den Einfluss von hohen Temperaturen und lange Lösezeiten erfordert (Tabelle 1).[28,31,26] Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Art der verwendeten Cellulo-

se, die sich je nach Polymerisationsgrad und Partikeldurchmesser unterschiedlich gut löst. Beispielsweise wird häufig mikrokristalline Cellulose (MCC) verwendet, die aufgrund einer Salzsäurevorbehandlung geringere Polymerisationsgrade aufweist und daher eine verbesserte Löslichkeit zeigt. Köhler löste innerhalb von 12 Stunden bei 70°C mit 10 % w/w deutlich mehr MCC, als es für α-Cellulose in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (3 % w/w, 80°C, 16 Stunden).[31] Gericke und Kollegen konnten 15 % w/w MCC und „Spruce sulfite pulp“ (SSP) in [EMIM]OAc lösen, benötigen hierfür allerdings 48 h bei 100°C.[26] Zavel und Kollegen nutzten hingegen α-Cellulose und lösten 5 w/w bei 90°C innerhalb von 12 Stunden in [EMIM]OAc.[27] Diese Angabe ist in derselben Größenordnung wie in der hier vorliegenden Arbeit, in der 3 % w/w bei 80°C innerhalb von 16 Stunden gelöst werden konnten. Die angeführten Beispiele zeigen, dass der Lösungsprozess von Cellulose in ionischen Flüssigkeiten üblicherweise langwierig ist und hohe Temperaturen erfordert. Ergebnisse von Karotzos und Kollegen verdeutlichen allerdings, dass niedrig konzentrierte Celluloselösungen von 2,47 % in [EMIM]OAc auch innerhalb von 20 Minuten bei 150°C zugänglich sind.[25] Die Anwendung von hohen Temperaturen, aber auch langen Lösezeiten, kann zu einer Degradation der ionischen Flüssigkeiten beitragen, was das Recycling dieser erheblich erschwert. Daher ist eine Verringerung der Lösezeit und Lösetemperatur für eine nachhaltige Anwendung von ionischen Flüssigkeiten als Lösemittel für Cellulose bedeutend. In diesem Kontext ist die Vorbehandlung der Cellulose eine Option, den thermischen Stress auf die ionischen Flüssigkeiten zu begrenzen. Kuzmina mischte [EMIM]OAc mit Wasser, ließ es 12 Stunden inkubieren, wonach das Wasser bei 110°C unter Vakuum abgezogen wurde, wodurch konzentrierte Celluloselösungen von bis zu 18 % entstanden.[28] Dieses Beispiel zeigt, dass mit dem richtigen experimentellen Aufbau und entsprechender Vorbehandlung auch hochkonzentrierte Celluloselösungen in [EMIM]OAc hergestellt werden können. Jedoch benötigt die Anwendung von Vakuum zusätzlichen prozesstechnischen Aufwand.

Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Literaturquellen bietet das [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System eine wesentlich kürzere Lösezeit von 3 Stunden bei einer moderaten Lösetemperatur von 80°C und führt daher zu einer niedrigen thermischen Belastung der ionischen Flüssigkeit, was eine hohe Recyclingeffizienz begünstigt. Ande-

re Lösungssysteme wie beispielsweise LiCl/DMAc sind aufgrund ihrer hohen Kosten und des komplizierten Recyclings auf die Verwendung im Labormaßstab limitiert.[9] Das NMMO-System wird bereits industriell für die Produktion von Regeneratfasern genutzt und ist damit vermutlich das ausgereifteste nicht derivatisierende Celluloselösungssystem. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, ist das NMMO-System bezüglich der chemischen Modifikation von Cellulose aufgrund seiner hohen Reaktivität problematisch. Interessant ist allerdings die Frage, inwieweit für die Produktion von Celluloseregeneratfasern das [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System mit dem NMMO-System konkurrieren kann. Kosan und Kollegen verglichen in diesem Zusammenhang verschiedene ionische Flüssigkeiten wie [EMIM]OAc mit dem NMMO-System und betonen den großen Nutzen von ionischen Flüssigkeiten.[113] So konnten Spinnversuche in [EMIM]OAc, im Gegensatz zu dem NMMO-System bei einer höheren Celluloselkonzentration von 19,6 % w/w, im Vergleich zu dem NMMO-System mit 13,5 % w/w durchgeführt werden.[113] Die hohe Celluloselöslichkeit in dieser Studie erklärt sich durch die Prozessführung, bei der durch die Zugabe von Wasser zu der ionischen Flüssigkeit eine homogene Verteilung der Cellulosepartikel erreicht wird. Durch das anschließend unter Vakuum erfolgte Abziehen des Wassers entsteht eine homogene Lösung. Zusätzlich ist der verwendete Eukalyptuszellstoff mit einem Polymerisationsgrad von 569 deutlich kleiner als der Polymerisationsgrad, der in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Cellulose (1072). Nachdem Kosan und Kollegen bereits die ursprüngliche ionische Flüssigkeit [EMIM]OAc bei ihrer vergleichenden Studie mit NMMO als technisch bedeutend bewerten, unterstreicht dies das Potenzial der optimierten Löseeigenschaften des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System. Um die Unterschiede in der Effizienz des NMMO-Prozesses und eines potenziellen [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Prozesses zu analysieren, sind weiterführende Studien notwendig. Ein möglicher Schwachpunkt des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems besteht in der Anzahl der Komponenten. Eine große Anzahl von verschiedenen Komponenten, in diesem Fall EHEMIM (**40**), EMIM, Wasser und Acetat könnte beim Recycling zu Problemen führen, da sich die Rückgewinnung erschweren kann. So bestehen industrielle Celluloselösemittel optimalerweise aus einer oder höchstens aus zwei Komponenten, damit sich deren Rückgewinnung nicht zu kompliziert und kostenintensiv gestaltet [114]. Inwieweit

sich dies beim [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System tatsächlich als problematisch erweist, muss in zukünftigen Studien geklärt werden. Neben diesen potenziellen Recyclingherausforderungen verspricht der beschleunigte und schonendere Lösungsprozess im [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System einen effektiven Prozess zum Lösen von Cellulose und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Insbesondere vergleichende Studien zum NMMO-System sind angezeigt, um die ökonomische und ökologische Effizienz zu beurteilen.

4.9 Mechanismus der Löslichkeit

Der Mechanismus der optimierten Löslichkeit des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems beruht auf unterschiedlichen Prinzipien. Beispielsweise wird angenommen, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Alkoholgruppen der Cellulose und dem Celluloselösungsmittel für das Lösen von Cellulose wichtig sind [10]. Zusätzlich betonen einige Autoren die Bedeutung von unpolaren Wechselwirkungen beim Lösen der Cellulose.[411]

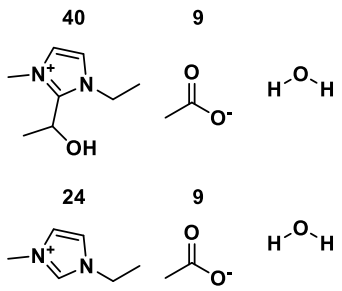
Grundsätzlich kann in diesem Kontext das 1-Ethyl-2-hydroxyethyl-3-methylimidazolium (EHEMIM) die Löslichkeit von Cellulose auf unterschiedlichen Wegen beeinflussen. Das Einbringen einer Hydroxyethylgruppe an der C2-Position des Imidazolkations hat eine Vielzahl von Auswirkungen. Einerseits wird die Carbenbildung in der ionischen Flüssigkeit reduziert, da die C2-Position substituiert vorliegt. Zusätzlich kann der erzeugte Alkohol des EHEMIMs Protonen liefern, welche ebenfalls die Carbenbildung reduzieren können. Dieser Effekt erhöht den protischen Charakter des Lösungssystems, was der Deprotonierung des EMIM-Kations entgegenwirkt und dadurch die Carbenbildung begrenzt. Dieser Mechanismus wurde kürzlich, ausgehend von Glycol, beschrieben, dessen Alkoholprotonen den protischen Charakter der ionischen Flüssigkeit erhöhen und dadurch die Carbenbildung in [EMIM]OAc inhibieren.[115] An der C2-Position des Imidazoliums, an der das Carben entsteht, koordiniert nach Zhang und Kollegen das Acetat in der ionischen Flüssigkeit [EMIM]OAc.[116] Möglicherweise sind höhere Konzentrationen von freien Acetaten (**9**), welche nicht an die C2-Position gebunden sind, vorteilhaft für das Lösen von Cellulose.

Das EHEMIM kann durch seine Hydroxygruppe allerdings auch die Löslichkeit der Cellulose direkt positiv beeinflussen. Der EHEMIM-Alkohol selbst kann Wasserstoffbrücken ausbilden und somit das Wasserstoffbrückennetzwerk der ionischen Flüssigkeit verändern und dadurch zu einer optimierten Celluloselöslichkeit beitragen. Da Acetat-basierte ionische Flüssigkeiten basisch sind, ist es auch möglich, dass der EHEMIM-Alkohol deprotoniert vorliegt, es sich also um EHEMIM-Alkoholate handelt, welche ebenfalls mit der Cellulose interagieren können. Eine derartige Deprotonierung ist realistisch, da die bereits diskutierte Carbenbildung durch die Deprotonierung des Protons

an der C2-Position des Imidazoliums (**7**) hervorgerufen wird, welches einen pKs von 22,1 besitzt, während Alkohole niedrigere pKs-Werte aufweisen, also leichter zu deprotonieren sind.[117] Interessanterweise zeigen einige Studien, dass das Einbringen von Hydroxygruppen in die Struktur von ionischen Flüssigkeiten in einer reduzierten Celluloselöslichkeit hervorruft.[22,118] Brandt und Kollegen weisen darauf hin, dass protische Kationen die Celluloselöslichkeit von ionischen Flüssigkeiten inhibieren und vermuten, dass eine zu starke Interaktion zwischen Kation und Anion diesen Effekt induziert.[22,119,48] Diese Hypothese passt zu den Ergebnissen bezüglich [EHEMIM]-[EMIM]OAc, da beobachtet wurde, dass hohe [EHEMIM]-Anteile zu einem festen Aggregatzustand führen, was durch eine starke Interaktion zwischen der Hydroxygruppe von [EHEMIM] (**40**) und Acetat erklärt werden kann. Diese starke Wechselwirkung zwischen den Kationen und Anionen würde die Interaktion mit Cellulose und damit die Löslichkeit von Cellulose, begrenzen. Erst die Zugabe von Wasser führt in dem [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System zu einem niedrigeren Schmelzpunkt bzw. niedrigerer Viskosität, einem erhöhten Massentransfer und dadurch zu einer besseren Celluloselöslichkeit. Grundsätzlich unterstreicht die gute Celluloselöslichkeit des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems, dass nicht nur das Anion, sondern auch das Kation, für die Löslichkeit von Cellulose bedeutend sind. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen von Zhang und Kollegen, welche weiterhin beschreiben, dass eine Substitution des Imidazoliumkations (**7**) an Position 2 durch eine Methylgruppe nur zu einer geringfügig erniedrigten Celluloselöslichkeit führt.[120] Somit erscheint das Proton an Position 2 von EMIM, welches in EHEMIM (**40**) nicht mehr vorliegt, nicht von herausragender Bedeutung für den Lösungsvorgang zu sein. Zusätzlich zeigen, Zhang und Kollegen, dass eine Substitution mit Methylgruppen an Position 2, 4 und 5 des Imidazoliumkations (**7**) die Celluloselöslichkeit vollständig inhibieren.[120] Daher sind die aromatischen Protonen am Kation an Position 4 und 5 für den Lösungsvorgang bedeutend, welche auch noch in EHEMIM (**40**) vorhanden sind.

Geringe Mengen von Wasser sind auch in anderen Celluloselösungsmitteln wie dem NMMO-System für das Lösen von Cellulose von besonderer Bedeutung. Zu große Mengen von Wasser führen in dem [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System zu einem Ausfällen der Cellulose und einer Suspension, während zu niedrige Mengen an Wasser

die Gelbildung begünstigen. Im Falle der Gelbildung scheinen die zwischenmolekularen Kräfte zwischen den Cellulosesträngen noch zu stark zu sein, um Löslichkeit zu ermöglichen bzw. der Lösungsprozess ist stark verlangsamt und erfolgt nicht innerhalb der untersuchten 6 Stunden (Kapitel 2.3.6). Bemerkenswert ist es, das Molekülverhältnis der einzelnen Komponenten unter optimierten Lösungsbedingungen zu betrachteten. EHEMIM (**40**), EMIM, Acetat und Wasser liegen hier ungefähr in einem Verhältnis von 1:1:2:2 vor (Schema 21). Es sind also gleich viele Wassermoleküle wie Acetatmoleküle im Lösungssystem vorhanden. Des Weiteren liegen je Kation-Spezies doppelt so viele Acetat-Ionen und Wasser im System vor. An dieser Stelle diese Molekülverhältnisse nicht überinterpretiert werden, da es zu einer Vielzahl von Interaktionen, basierend auf diesem Molekülverhältnis kommen kann. In zukünftigen Studien könnten eventuell Computermodelle dabei helfen, den genauen Mechanismus dieses spezifischen Verhältnisses beim Lösen von Cellulose zu verstehen. Die positiven Eigenschaften des EHEMIM-Kations gegenüber alkalisch vorbehandelter Cellulose wurde bereits für die ionische Flüssigkeit [EHEMIM]Cl gezeigt. [EHEMIM]Cl kann 5-7 % w/w alkalisch vorbehandelte Cellulose lösen, ist allerdings stark abhängig von dieser NaOH-basierten Vorbehandlung der Cellulose.[24] Dieser Unterschied könnte durch die unterschiedliche Wasserstoffbrückenbasizität der Acetationen (-40,17 kj/mol) im Vergleich mit Chloridionen (-30,72kj/mol) begründet sein.[23] Somit würde das Chlorid-basierte [EHEMIM]Cl eine vorausgehende NaOH-Aktivierung der Cellulose benötigen, während das neue [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System aufgrund seiner Acetationen ausreichend inhärente Basizität besitzt, um Cellulose direkt zu lösen.



Schema 21: Optimierte Molekülbeziehungen im [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System.
Grafisch dargestellt ist der molekulare Aufbau des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System, bei optimalem Kationenverhältnis und optimalem Wassergehalt. Die Komponenten EHEMIM (**40**), EMIM, Acetat und Wasser liegen bei optimaler Celluloselöslichkeit, wie dargestellt, im Verhältnis 1:1:2:2 vor.

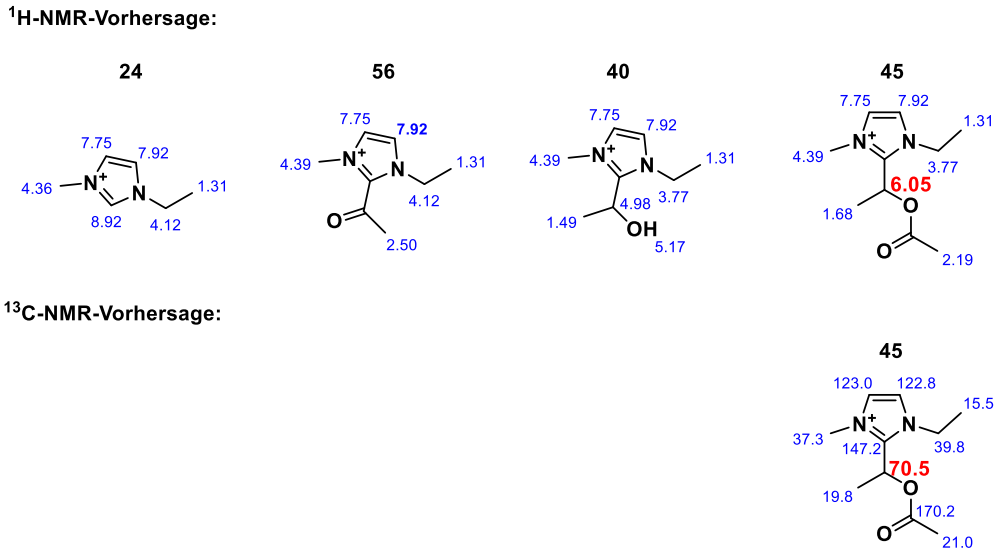
4.10 Mechanismus der Vinylester-basierten Synthese

Bisher wurde nicht auf den Mechanismus der Vinylester-basierten Synthese eingegangen. Hierzu gibt es in der Literatur unterschiedliche Meinungen, die in diesem Kapitel diskutiert und im Kontext eigener Ergebnisse betrachtet werden. Bezüglich des Mechanismus können grundsätzlich drei verschiedene Fälle unterschieden werden. Entweder agiert das Imidazolium-Kation, das Acetatanion oder beide gemeinsam als Katalysator der Reaktion. Es wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass Carbene, welche sich aus den Imidazoliumkationen bilden können, Umesterungsreaktionen katalysieren. Bei diesen Carbenen handelt es sich um sogenannte N-Heterozyklische-Carbene, welche im Folgenden als NHC bezeichnet werden. In diesem Zusammenhang wurden unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen: Einige Arbeitsgruppen postulieren die Existenz von Alkohol-NHC-Komplexen während andere die Bildung von Acyl-NHC-Komplexen postulieren.[121-124] Beide Mechanismen basieren auf der Existenz von Carbenen (NHC), welche, wie bereits diskutiert, in [EMIM]OAc gebildet werden können.[33] Somit ist es zunächst naheliegend, von einem Carbenmechanismus auszugehen. Andererseits gibt es Studien, die zeigen, dass auch Acetate (**9**), wie beispielsweise Natriumacetat, Vinylester-basierte Umesterungen katalysieren.[46] Die ionischen Flüssigkeiten [BMIM]Cl und [EMIM]Cl katalysieren die Vinylester-basierte Synthese nicht, erlangen allerdings nach der Zugabe von Natriumacetat katalytische Aktivität, was die Bedeutung der Acetate unterstreicht (Tabelle 16). Um der Frage nachzugehen, ob Acetat die Reaktion nur in Gegenwart von Imidazolium-Kationen katalysieren, wurde DMSO mit Natriumacetat vermengt, was zur Vinylester-basierten Synthese von Glucoseestern führte, während dies in Abwesenheit von Acetat nicht passierte. Somit scheint, dass Natriumacetat die Umesterung, ausgehend von Vinylestern, auch ohne Imidazolium-Kationen zu katalysieren. Somit ist das Vorhandensein von Imidazolium-Kationen für die katalytische Aktivität nicht zwingend notwendig. Die Vinylester-basierte Umesterung in DMSO mit Natriumacetat ist allerdings deutlich langsamer als die Reaktion in [EMIM]OAc. Dies kann einerseits durch die deutlich niedrigere Konzentration von Acetationen in DMSO begründet sein, welche sich aus der geringen Löslichkeit von Natriumacetat in DMSO ableitet. Andererseits kann ein zusätzlicher Carbenmechanismus nicht ausgeschlossen werden, da das basische Acetat die Carbenbil-

dung begünstigt und somit die Vinylester-basierte Umsetzung ebenfalls beschleunigen kann. Es ist allerdings zu beachten, dass die Existenz von Carbenen in [EMIM]OAc nicht zwingend einen Carbenmechanismus impliziert. Chiarotto zeigte, dass NHCs, welche in [BMIM]BF_4 durch elektrochemische Reduktion generiert wurden, auch die Umesterung, ausgehend von Essigsäureethylester, katalysieren.[121] Der Essigsäureethylester ist im Gegensatz zu Vinylestern allerdings nicht aktiviert. In [EMIM]OAc konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Verwendung von nicht aktivierten Estern, wie beispielsweise Laurinsäuremethylester und Buttersäureethylester, trotz mehrstündiger Inkubation keine Umesterung beobachtet werden. Somit scheint der von Chiarotto postulierte Carbenmechanismus auch nicht aktivierte Ester zu akzeptieren, während der Mechanismus in [EMIM]OAc aktivierte Ester benötigt.[121] Dies führt zu der Frage, ob es sich hierbei um denselben Carbenmechanismus handelt, oder ob doch eher ein Acetat-basierter Mechanismus vorliegt. Chen und Kollegen postulieren für die Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc einen Carbenmechanismus, welcher über die Bildung von NHC-Acyl-Komplexen abläuft (Schema 22).[123] Als Indiz für diesen Mechanismus identifizierten sie diesen EMIM-Acyl-Komplex (**56**) mittels NMR. Bei ihrem Molekülnachweis zeigen sie allerdings keine hochauflösenden ^{1}H-NMR-Spektren und ordneten nicht alle auftretenden Signale der postulierten Struktur zu. Insbesondere ein Signal[7] im ^{1}H-NMR bei 6,05 ppm scheint nicht zu der von Chen und Kollegen postulierten Struktur **56** zu passen, was anhand einer „ChemDraw"-Vorhersage[8] verdeutlicht werden kann (Schema 22).[123] Das Signal bei 6,05 ppm könnte allerdings durch die Struktur eines EHEMIM-Esters (**41**) mit einer Acetatkette erklärt werden, dessen Masse bei Experimenten in der hier vorliegenden Arbeit identifiziert werden konnte (**45**). Als weiteres Indiz für die Bildung von Struktur **45** kann die Kopplung im HSQC-Spektrum zwischen dem ^{1}H-NMR-Signal bei 6,05 ppm und einem ^{13}C-NMR bei ca. 70 ppm interpretiert werden, was mit der „ChemDraw"-Vorhersage von Struktur **45** übereinstimmt (Schema 22). Somit scheint das Hauptargument von Chen und Kollegen für einen Car-

[7] Das Signal kann in einem HSQC-Spektrum von den „Supporting Informations" von Chen und Kollegen entnommen werden (S. 13) [123].

[8] Eine „ChemDraw"-Vorhersage wird mit dem Programm „ChemDraw" durchgeführt und berechnet die chemischen Verschiebungen in NMR-Spektren, basierend auf einem Inkrementsystem.



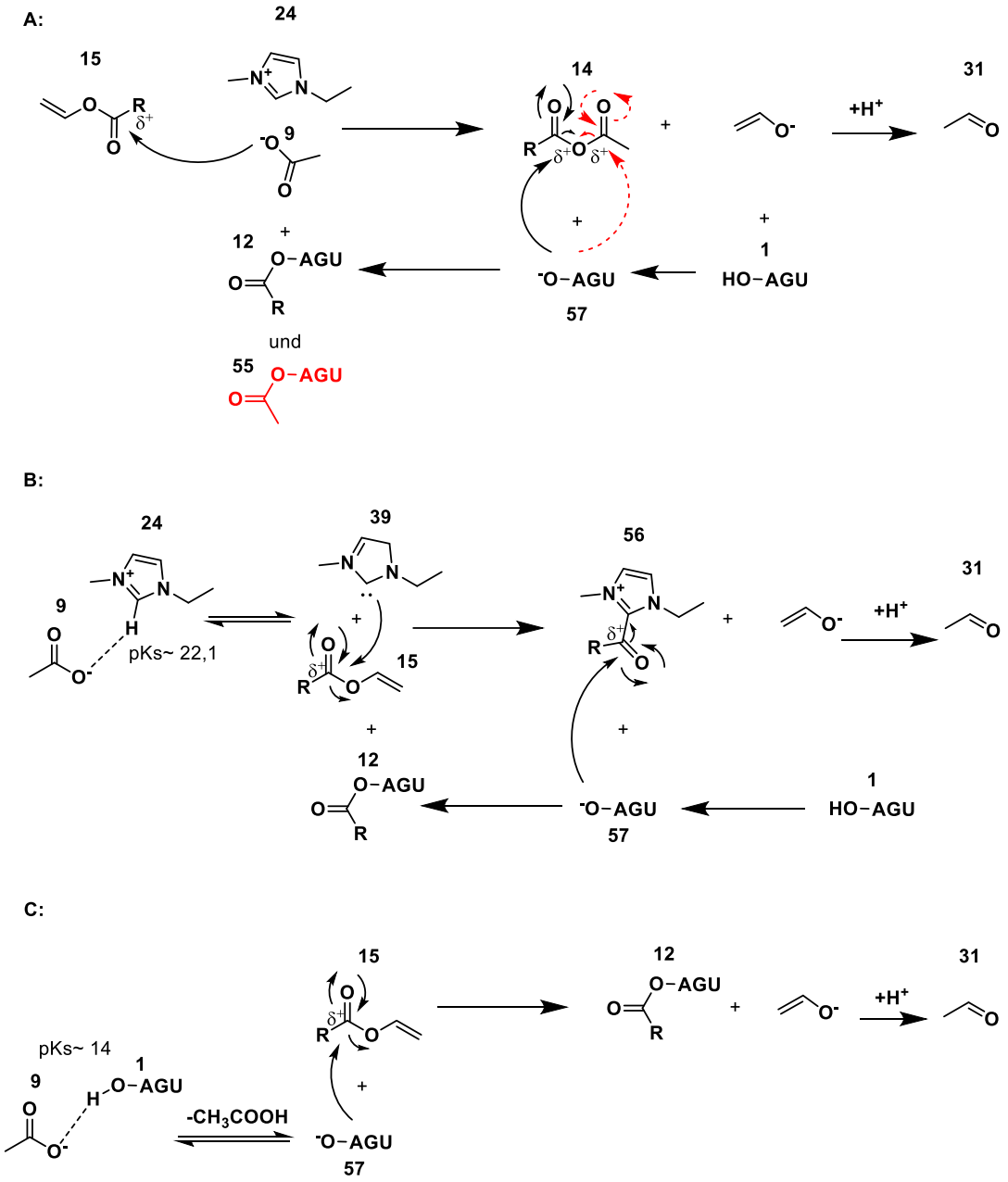
Schema 22: ^{1}H-NMR-Vorhersage und ^{13}C-NMR Vorhersage von Imidazoliumverbindungen.
Die Vorhersage der chemischen Verschiebungen wurde mit dem Programm ChemDraw durchgeführt und basiert auf einem Inkrementsystem. Dargestellt sind EMIM (**24**), ein EMIM-Acyl-Komplex (**56**), EHEMIM (**40**) und EHEMIM-Acetat (**45**). In rot sind Signale hervorgerufen, die in dem von Chen und Kollegen publizierten HSQC-Spektrum, welches nach der Umsetzung von [EMIM]OAc mit Vinylacetat beobachtet wird, enthalten sind und für die Synthese von Struktur **45** sprechen.[123]

benmechanismus fraglich, da es auf einer zweifelhaften Interpretation ihrer NMR-Spektren resultiert. Chen und Kollegen diskutieren noch einen weiteren möglichen Mechanismus, welcher auf der Anhydridbildung, ausgehend von Acetationen und Vinylestern, beruht. Sie schließen diesen Mechanismus allerdings aus, da die Bildung von gemischten Anhydriden neben der Acylierung der Cellulose zu einer Acetylierung führen würde, die sie nicht beobachtet haben.[123] Dies steht im Wiederspruch zu den Experimenten der hier vorgelegten Arbeit, in der eine geringfüge zusätzliche Acetylierung der Cellulose bei der Vinylester-basierten Synthese von Celluloseestern gezeigt wurde (Abschnitt 3.3.4, Tabelle 11, Abbildung 20). Somit ist aufgrund der beobachteten Acetylierung der Cellulose der Anhydridmechanismus plausibel. Jedoch kann dieser Mechanismus nicht der einzige Mechanismus sein, da die Bildung von gemischten Anhydriden als aktivierte Spezies zu einer mindestens 50 %-igen Acetylierung führen würde, die nicht beobachtet wurde. Somit ist der Anhydrid-Mechanismus vermutlich vorhanden und führt zu einer geringen Acetylierung der Cellulose, ist allerdings schwächer als ein weiterer alternativer Mechanismus. Ein derartiger Mechanismus könnte über die Deprotonierung des Alkohols durch das Acetation ablaufen, was zu einem Alkoholat

führen würde. Diese Deprotonierung ist vorstellbar, da Alkohole mit pKs-Werten von ungefähr 16 wesentlich einfacher deprotonierbar sind, als das Proton an der C2-Position des Imidazoliums mit einem pKs von 22,1.[117] Dieses Alkoholat würde anschließend direkt den partiell positiv geladenen Carbonylkohlenstoff des Vinylesters attackieren und in der Folge zu einer Umesterung führen. Dies wäre ein vorstellbarer Mechanismus, welcher unabhängig von Anhydriden und Carbenen erfolgt und somit hauptsächlich vom Acetat selbst katalysiert wird.

Neumann und Dove erläutern eine ähnliche Problematik für die Umsetzung von Lactonen in Gegenwart von NHCs; sie beschreiben die Konkurrenz zwischen einem „Nukleophilen Mechanismus“, welcher über die Bildung von NHC-Acyl-Komplexen abläuft und einem „Basischen Mechanismus“, wobei Alkoholate als Katalysatoren dienen.[125] Sie argumentieren, dass es nicht einfach ist, zwischen beiden Mechanismen zu unterscheiden, vermuten allerdings, dass die besondere Struktur der NHCs für den Mechanismus von Bedeutung ist.[125] Wie bereits oben diskutiert, würde zumindest im Fall der Vinylester-basierten Synthese diese Umsetzung auch ohne NHCs ablaufen. Sofern für die Vinylester-basierte Synthese die Existenz von NHC-Acyl-Komplexen nicht zweifelsfrei gezeigt ist, gibt es bisher keinen Grund, in [EMIM]OAc von diesem Mechanismus auszugehen.

Zusammengefasst erscheinen Acetat-basierte Mechanismen als wahrscheinlich, wobei diese einerseits die Bildung von Anhydriden katalysieren, welche teilweise eine zusätzliche Acetylierung der Cellulose bewirken. Der Hauptmechanismus läuft vermutlich ebenfalls über das Acetat (**9**), ist aber unabhängig von Anhydriden und könnte über die Bildung von Alkoholaten ablaufen. Grundsätzlich kann ein zusätzlicher Carbenmechanismus allerdings nicht ausgeschlossen werden, wenn auch keine Indizien dafür gefunden wurden.



Schema 23: Mögliche Reaktionsmechanismen der Vinylester-basierten Cellulosemodifikation.
Ein möglicher Reaktionsmechanismus verläuft über die Bildung von Anhydriden (**14, A**), über die Bildung von Imidazolium-Acyl-Komplexen (**56**, **B**) oder über den direkten Angriff eines Cellulose-Alkoholats (**57**) am α-Kohlenstoff von Vinylestern (**15**, **C**). Reaktionsmechanismus **A** liefert sowohl Celluloseacetat (**55**), als auch Celluloseester (**12**), die denselben Rest wie die eingebrachten Vinylester tragen. Da eine zusätzliche Acetylierung beobachtet wurde, ist dieser Mechanismus plausibel, vermutlich aber nicht der dominierende Reaktionsweg, da die zusätzliche Acetylierung deutlich niedriger ausfällt, als die beobachtete Acylierung. Reaktionsmechanismus **B** wurde von Chen und Kollegen vorgeschlagen, ist chemisch sinnvoll, wobei die von Chen und Kollegen gezeigte Identifikation von Struktur **56** zweifelhaft ist. Reaktionsmechanismus **C** verläuft ebenso wie Reaktionsmechanismus **A** und **B** über die Bildung von Cellulosealkoholaten (**57**), ist aber unabhängig von Imidazolium-Kationen. Für Mechanismus C spricht, dass eine Vinylester-basierte Umesterung auch in DMSO – in Abwesenheit von Imidazolium-Kationen – abläuft.

5

5 Zusatz

In diesem Kapitel werden die Untersuchungen bezüglich der thermoplastischen Eigenschaften der verwendeten Celluloseester zusammengefasst. Es handelt sich allerdings nicht um Ergebnisse, welche hauptsächlich von mir selbst bearbeitet wurden, sondern um Daten einer Kooperation mit Linda Göbel vom Institut für Kunststofftechnik. Im Rahmen dieser Kooperation wurden diverse Celluloseester mit der Vinylester-basierten Synthese erzeugt, mittels NMR, FT-IR und teilweise mit HPLC-SEC charakterisiert. Anschließend wurden von Linda Göbel verschiedene thermoplastische Parameter der Polymere untersucht. Der Inhalt dieses Themenbereichs wird nicht in Materialien und Methoden, Ergebnisse und Diskussion unterteilt, sondern lediglich hier zusammengefasst. Dennoch ist dieses Kapitel bedeutend, da eine mögliche praktische Anwendung der Vinylester-basierten Synthese aufgezeigt wird, wobei auch auf Limitationen und Herausforderungen eingegangen wird.

5.1 Thermoplastische Eigenschaften von Celluloseestern

Es wurden verschiedene Celluloseester auf ihr Schmelzverhalten hin untersucht. Celluloselaurat mit einem Substitutionsgrad von 2,3 (RDS = 0,91), Cellulosepalmitat mit einem Substitutionsgrad von 2,2 (RDS = 1,03) und Celluloseoctanoat mit einem RDS von 0,82 weisen einen homogenen Schmelzpunkt zwischen 180°C - 240°C auf. Celluloselaurat mit einem DS von 1,8 (RDS = 0,68) und 1,4 (RDS = 0,60) zeigt kein homogenes Schmelzverhalten, wobei Celluloseoctanoat und Cellulosepalmitat eine ähnliche Tendenz zeigen. Während Celluloseoctanoat mit einem DS von 1,8 (RDS 0,67) und Cellulosepalmitat mit einem DS von 1,6 (RDS = 0,67) nicht schmelzen, zeigt Celluloseoctanoat

mit einem RDS von 0,82 und Cellulosepalmitat mit einem DS von 2,2 (RDS = 0,71) ein homogenes Schmelzverhalten. Zusätzlich wurde für Cellulosefettsäureester ein Übergangsbereich von RDS-Werten zwischen 0,6 und 0,8 beobachtet, indem die Celluloseester zwar teilweise schmelzen und Tröpfchen bilden, der Hauptbestandteil des Polymers sich jedoch beim Erhitzen schwarz färbt und keine homogene Schmelze bildet. Noch niedrigere Substitutionsgrade liefern Materialien, welche weder Schmelzpunkt noch Schmelzbereich zeigen. Um diese Ergebnisse besser bewerten zu können, wurde kommerziell erhältliches Celluloseacetat mit einem DS von 2,4 untersucht, wobei ebenfalls kein Schmelzpunkt unterhalb von 240°C beobachtet wurde. Bei ungefähr 270°C zeigt Celluloseacetat einen teilweise schmelzenden Charakter und bildet feste Tröpfchen aus. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Cellulosebutyrat mit dem RDS von 0,86 bei Temperaturen über 300°C schmilzt, was zu der Schlussfolgerung führt, dass Celluloseester mit langen Seitenketten (C_8, C_{12}, C_{16}) bessere interne Weichmacher sind, als die kurzkettigen Acetate und Butyrate. Es kann vermutet werden, dass die längeren Seitenketten die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Alkoholen der Cellulose effizienter schwächen als kurzkettige, was in niedrigeren Schmelzpunkten resultiert. Frühere Studien zeigen eine ähnliche Tendenz für das Verhältnis zwischen Schmelzpunkt und Seitenkettenlänge.[126] Es ist jedoch zu beachten, dass in dieser Studie hoch substituierte Celluloseester untersucht wurden (DS > 2,8) und die beobachteten Schmelzpunkte von 44°C - 59°C deutlich niedriger liegen als die Ergebnisse, die im Rahmen der Kooperation mit Linda Göbel entstanden. Eine andere Studie beschreibt Schmelzpunkte zwischen 87°C - 121°C für hoch substituierte langkettige Fettsäureester.[127] Diese Diskrepanz in der Literatur und der gegenwärtigen Studie ist möglicherweise auf unterschiedliche Polymerisationsgrade der Cellulose zurückzuführen, welche auch aufgrund verschiedener Syntheserouten erheblich variieren können. Beispielsweise kann der Einsatz von Fettsäurechloriden zu deutlich kleineren Polymeren führen, wie in Kapitel 3.3 gezeigt wurde. Daher ist es notwendig, die Eigenschaften von Celluloseestern für jede Syntheseroute und jede Cellulosesorte separat zu analysieren und die Polymerisationsgrade zu vergleichen. Um noch ein tieferes Verständnis zu erhalten, wurden Celluloseester mit verzweigten Ketten wie Cellulose2-ethylhexyloat (DS = 0,9, RDS = 0,54) und Celluloseneodecanoat (DS = 0,24, RDS = 0,22) untersucht. Jedoch führ-

ten vergleichbare Syntheseprotokolle zu niedrigeren Substitutionsgraden. Diese Polymere zeigen keinen Schmelzpunkt, was vermutlich durch ihren niedrigen Substitutionsgrad begründet ist. Um einen höheren Substitutionsgrad zu erzeugen, wurde ein Überschuss von 10 mol je AGU eingesetzt, was in einem RDS-Wert von 0,9 für Cellulose2-ethylhexyloat und einem RDS von 0,43 für Celluloseneodecanoat resultierte. Dennoch zeigen auch diese höher substituierten Polymere keinen Schmelzpunkt. Daher sind Cellulose2-ethylhexyloate und Celluloseneodacanoate keine aussichtsreichen Celluloseester für thermoplastische Anwendungen

Zusätzlich zu den Schmelzpunkten wurde die Rheologie von Celluloselaurat mit einem Substitutionsgrad von 2,3 untersucht. Hierbei zeigt sich, dass Celluloselaurat (DS = 2,3) in einem bestimmen Frequenzbereich ein größeres Verlustmodul G‘ als das Speichermodul G‘‘ besitzt, was auf gute viskoelastische Eigenschaften und thermoplastische Prozessierbarkeit hindeutet.

Celluloselauratfilme können sowohl mittels einer Heizpresse, als auch durch „Solventcasting“[9] hergestellt werden. Der Vergleich zwischen Celluloseacetatfolien und Celluloselauratfolien zeigt, dass Celluloselaurat eine deutlich bessere Verformbarkeit besitzt und daher ein großes Potenzial für verschiedene thermoplastische Anwendungen aufweist. Beispielsweise sind Folienblasprozesse mit Celluloseacetat, aufgrund dieser schlechten Verformbarkeit, bisher nicht möglich.[8] Hier stellt Celluloselaurat eine interessante Alternative dar. Untersuchungen zur Verarbeitbarkeit von Celluloselaurat in einem Doppelschneckenextruder wurden ebenfalls von Linda Göbel durchgeführt, und lieferten ein homogenes „Compound“ (Extrusionsprodukt). Dies zeigt, dass Celluloselaurat prinzipiell in einem Doppelschneckenextruder verarbeitet werden kann. Während der Verarbeitung im Doppelschneckenextruder bei 180°C kam es allerdings zu einem thermischen Abbau, welcher mit einer Schwarzfärbung des Polymers einhergeht. Somit muss in zukünftigen Studien untersucht werden, inwieweit schonende Extrusionsprozesse für Celluloselaurat entwickelt werden können und ob möglicher-

[9] Beim „Solventcasting“ wird das Polymer in einem Lösungsmittel, wie beispielsweise Aceton oder Chloroform gelöst, anschließend in eine Form gegeben, wobei nach der Evaporation des Lösungsmittels ein Polymerfilm zurückbleibt.

weise durch die Addition von geeigneten Additiven eine schonendere Extrusion möglich ist.

6

6 Resümee und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine homogene enzymatische Veresterung von Cellulose bzw. Zuckern in ionischen Flüssigkeiten, welche Cellulose lösen, gezeigt werden. Dieses Ergebnis ist zunächst nicht unerwartet, da polaren Lösungsmitteln, wie den verwendeten ionischen Flüssigkeiten, in der Literatur denaturierende Eigenschaften gegenüber Enzymen zugesprochen werden. Es zeigte sich jedoch, dass das Unvermögen von Enzymen, Cellulose bzw. Zucker in diesen Systemen zu verestern, nicht ausschließlich auf die denaturierenden Eigenschaften der Lösungsmittel zurückzuführen ist. So sind Enzyme (CAL-B) in Celluloselösungsmitteln aktiv und katalysieren bei einfacheren Substraten sowohl eine Esterbildung, als auch eine Esterspaltung. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine starke Interaktion zwischen den polaren Lösungsmitteln und den Zuckersubstraten die Veresterung inhibiert, da das Enzym nicht mit dem Lösungsmittel um das Substrat konkurrieren kann. Um die Interaktion zwischen Glucose und Enzym (CAL-B) zu steigern, wurde daher die Zuckerkonzentration erhöht. Diese Strategie ist in ionischen Flüssigkeiten wie [BMIM]Cl allerdings problematisch, weil die hohe Viskosität von konzentrierten Glucoselösungen in diesen Lösungsmitteln die Interaktionswahrscheinlichkeit erneut reduziert und damit die Reaktion inhibiert.

In dem weniger viskosen, aber ebenfalls polaren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid führt das Erhöhen der Glucosekonzentration nach dem Überschreiten eines Schwellenwertes bei einer Glucosekonzentration von 60 % w/v jedoch zu einem signifikanten Anstieg in der enzymatischen Glucoselauratsynthese. Die Existenz eines Schwellenwertes kann als Indiz für die postulierte Inhibition durch zu starke Interaktion zwischen Zucker und Lösungsmittel interpretiert werden.

Neben dieser postulierten Lösungsmittelinhibition stand die Frage im Raum, inwieweit die verwendeten Enzyme Cellulose als Substrat akzeptieren. Um dies zu untersuchen, stand zunächst die enzymatische Veresterung der Disaccharid-Einheit der Cellulose, d.h. der Cellobiose, als weitere Modellreaktion im Fokus. Für die enzymatische Umsetzung in dem polaren Lösungsmittel DMSO konnte gezeigt werden, dass Cellobiose, im Gegensatz zu anderen auf Glucose-basierenden Disacchariden wie Maltose und Trehalose, am schwächsten umgesetzt wird. Dies kann durch die geringe Anzahl an Freiheitsgraden der Cellobiose gegenüber Maltose und Trehalose erklärt werden, was im Fall der Cellobiose das Ausbilden einer produktiven Konformation[10] im Aktiven Zentrum der CAL-B erschwert. Daher erscheint Cellobiose, ebenso wie Cellulose, für eine promiskuitive[11] enzymatische Umsetzung als schwierig, da sich diese Moleküle aufgrund ihrer starren β-glycosidischen Bindung kaum an die Struktur des Enzyms anpassen können. Somit sollten zukünftige Studien insbesondere mit Esterasen durchgeführt werden, welche Zuckerpolymere mit β-glycosidischer Bindung als natürliches Substrat besitzen. Hierbei kann ein Fokus auf Xylan- und Chitosanesterasen gelegt werden, weil die Monomere von Xylan und Chitosan ebenfalls durch β-glycosidische Bindungen verknüpft sind.

Sollte eine enzymatische Synthese von zunächst niedrig substituierten Celluloseestern erfolgreich sein, ist dennoch der Nachweis der Reaktion problematisch. Viele der bisherigen Studien zur enzymatischen Modifikation von Cellulose nutzen die FT-IR-Analytik, wobei ein beobachteter Esterpeak (C=O) als Beweis für die Veresterung von Cellulose gewertet wurde. Dies ist allerdings zweifelhaft, sofern Ester als Substrat eingesetzt werden, zumal in der Polymermatrix eingeschlossenes oder anhaftendes Substrat nach der Synthese ebenfalls ein Estersignal erzeugt. Um diese Problematik zu umgehen, werden in der vorliegenden Arbeit Vinylester als Substrat eingesetzt, um den Nachweis einer Celluloseveresterung zu führen. Da sich der Esterpeak (C=O) des Vinylestersubstrats und des Celluloseesterprodukts im FT-IR-Spektrum unterscheiden,

[10] Beschreibt diejenige Konformation, die ein Substrat im Enzym einnehmen muss, damit die enzymatische Umsetzung erfolgt.

[11] Promiskuitiv beschreibt hier die enzymatische Umsetzung eines für das Enzym nicht natürlichen Substrates.

kann die FT-IR-Analytik bei der enzymatischen Vinylester-basierten Veresterung von Cellulose als Beweis für die Bildung von Celluloseestern herangezogen werden. Infolgedessen ist eine bessere qualitative Analytik von niedrig substituierten Celluloseestern nach enzymatischer Umsetzung möglich. Zusätzlich zu der qualitativen FT-IR-Analytik konnte durch die Gegenüberstellung von RDS-Werten, welche sich aus FT-IR-Spektren ergeben und DS-Werten, welche aus ^{1}H-NMR-Spektren abgeleitet werden, eine lineare Korrelation gezeigt werden. Somit ist durch die FT-IR-Analytik sowohl eine qualitative Identifikation von Celluloseestern, als auch eine quantitative Abschätzung des Substitutionsgrades möglich.

Aufgrund der beschriebenen Probleme bei der enzymatischen Veresterung von Cellulose wurde eine chemische Synthese als Alternative entwickelt, welche Vinylester als Substrat einsetzt. Die Vinylester-basierte Synthese in [EMIM]OAc ist eine hocheffiziente und vergleichsweise schonende Synthese zur Produktion von verschiedenen, auch lange Seitenketten(C_8, C_{12}, C_{16})-tragenden Celluloseestern. Die Synthese wurde auf 2,5 kg Lösungsmittel hochskaliert, wobei 233 g Celluloselaurat synthetisiert werden konnten. Auch wenn keine genaue Berechnung der Prozessausbeute möglich ist, ergeben Abschätzungen Ausbeuten zwischen 80 % und 99 % (Kapitel 2.3.8). Außerdem ist es möglich, 91 % der ionischen Flüssigkeit ohne aufwendige Aufreinigungsschritte zu recyceln und erneute Synthesen darin durchzuführen. Im Fall einer weiteren Hochskalierung müsste allerdings die beobachtete exotherme Temperaturentwicklung während des Prozesses berücksichtigt werden.

Die durch die Vinylester-basierte Synthese erzeugten langkettigen Cellulosefettsäureester (C_8, C_{12}, C_{16}) zeigen bei Substitutionsgraden von ca. 2,2 - 2,3 gute thermoplastische Eigenschaften. Für die Verarbeitung der Materialien ist insbesondere eine beginnende thermische Zersetzung der Polymere im Bereich ihrer Schmelzpunkte als Problem zu benennen. Dem sollte in zukünftigen Studien durch die Erprobung schonenderer Prozessierungsstrategien oder durch die Optimierung der Materialeigenschaften, durch Compoundierung[12] oder Variation des Substitutionsmusters, begegnet werden.

[12] Unter Compoundierung wird hier die Modifikation der Materialeigenschaften eines Polymers durch die Zugabe von bestimmten Stoffen, so genannten Additiven, verstanden.

Neben der Bestimmung der Prozesseffizienz und der Produkteigenschaften wurden auch Nebenreaktionen der Synthese identifiziert. Beispielsweise tritt bei der chemischen Synthese eine unerwünschte, Vinylester-induzierte Acetylierung der Cellulose auf. Der Acetylierungsgrad liegt nach der Vinylester-basierten Synthese allerdings deutlich unter den Acetylierungsgraden, welche in [EMIM]OAc nach Anhydrid- oder Fettsäurechlorid-basierten Synthesen beobachtet werden. Es wurde noch eine weitere Nebenreaktion identifiziert. In [EMIM]OAc kommt es zur Bildung einer EMIM-Carbenspezies, welche mit Acetaldehyd reagiert und dadurch das EHEMIM-Kation bildet. Das EHEMIM-Kation ist gleichermaßen Fluch und Segen. Einerseits kann das EHEMIM-Kation während der Vinylester-basierten Synthese zu EHEMIM-Estern umgesetzt werden, was die Syntheseeffizienz des Prozesses begrenzen kann. Andererseits beeinflusst das EHEMIM-Kation, zusammen mit geringen Mengen an Wasser, den Lösungsprozess von Cellulose in der ionischen Flüssigkeit positiv. Das [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System zeigt bei einem 50 mol-%-igen Kationenanteil an EHEMIM bzw. EMIM und einem Wassergehalt von 8,5 % w/w optimierte Lösungseigenschaften gegenüber Cellulose. So löst sich bei 80°C im optimierten [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System innerhalb von 3 Stunden 14 % Cellulose, während sich unter gleichen Bedingungen in [EMIM]OAc und [EMIM]OAc mit einem optimalen Wassergehalt von 10 % w/w, lediglich 1 % w/w bzw. 2 % w/w der Cellulose lösen.

Dieser Vergleich unterstreicht das Potenzial des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems, welches nicht nur für die Synthese von Celluloseester, sondern auch für die Prozessierung von Cellulose – im Speziellen für die Produktion von Fasern – genutzt werden kann. Für eine Abschätzung der Wirtschaftlichkeit des [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-Systems sind vergleichende Studien notwendig, die das bereits industriell angewendete NMMO-System dem [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System gegenüberstellen. Wenn diese vergleichenden Studien das [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Wasser-System weiterhin positiv bewerten, hat dieses System das Potenzial, die industrielle Nutzung von Cellulose tiefgreifend neuzugestalten.

-Ohne Spekulation gibt es keine neue Beobachtung-

Charles Darwin

7

7 Literatur

1. Pinkert, A., Marsh, K. N., Pang, S. & Staiger, M. P. Ionic Liquids and Their Interaction with Cellulose. *Chem. Rev.* **109,** 6712–6728 (2009).

2. Fukuoka, A. & Dhepe, P. L. Catalytic Conversion of Cellulose into Sugar Alcohols. *Angew. Chemie Int. Ed.* **45,** 5161–5163 (2006).

3. Puls, J., Wilson, S. A. & Hölter, D. Degradation of Cellulose Acetate-Based Materials: A Review. *J. Polym. Environ.* **19,** 152–165 (2011).

4. Lindman, B., Karlström, G. & Stigsson, L. On the mechanism of dissolution of cellulose. *J. Mol. Liq.* **156,** 76–81 (2010).

5. Mascal, M. & Nikitin, E. B. Direct, High-Yield Conversion of Cellulose into Biofuel. *Angew. Chemie* **120,** 8042–8044 (2008).

6. Crépy, L., Chaveriat, L., Banoub, J., Martin, P. & Joly, N. Synthesis of Cellulose Fatty Esters as Plastics-Influence of the Degree of Substitution and the Fatty Chain Length on Mechanical Properties. *ChemSusChem* **2,** 165–170 (2009).

7. Siemann, U. Solvent cast technology–a versatile tool for thin film production. **130,** 1–14 (2005).

8. Bonten, C. *Kunststofftechnik, Einführung und Grundlagen*. *Kunststofftechnik, Einführung und Grundlagen* (Hanser Fachbuch, 2014).

9. Liebert, T. in *ACS Symposium Series* **1033,** 3–54 (ACS Symposium Series, 2010).

10. Glasser, W. G. *u. a.* About the structure of cellulose: debating the Lindman hypothesis. *Cellulose* **19,** 589–598 (2012).

11. Medronho, B., Romano, A., Miguel, M. G., Stigsson, L. & Lindman, B. Rationalizing cellulose (in)solubility: reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. *Cellulose* **19,** 581–587 (2012).

12. Harms, H. Lenzing LYOCELL: Potentiale und Chancen einer neuen Fasergeneration. *Materwiss. Werksttech.* **34,** 267–271 (2003).

13. Borbély, É. Lyocell, the new generation of regenerated cellulose. *Acta Polytech. Hungarica* **5,** 11–18 (2008).

14. Rosenau, T., Potthast, A., Sixta, H. & Kosma, P. The chemistry of side reactions and byproduct formation in the system NMMO/cellulose (Lyocell process). *Prog. Polym. Sci.* **26,** 1763–1837 (2001).

15. Willberg-Keyriläinen, P., Talja, R., Asikainen, S., Harlin, A. & Ropponen, J. The effect of cellulose molar mass on the properties of palmitate esters. *Carbohydr. Polym.* **151,** 988–995 (2016).

16. Kostag, M., Liebert, T. & Heinze, T. Acetone-Based Cellulose Solvent. *Macromol. Rapid Commun.* **35,** 1419–1422 (2014).

17. Armand, M., Endres, F., MacFarlane, D. R., Ohno, H. & Scrosati, B. Ionic-liquid materials for the electrochemical challenges of the future. *Nat. Mater.* **8,** 621–629 (2009).

18. Plechkova, N. V & Seddon, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chem. Soc. Rev.* **37,** 123–150 (2008).

19. Sheldon, R. A., Lau, R. M., Sorgedrager, M. J., van Rantwijk, F. & Seddon, K. R. Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem.* **4,** 147–151 (2002).

20. Swatloski, R. P., Spear, S. K., Holbrey, J. D. & Rogers, R. D. Dissolution of Cellose with Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 4974–4975 (2002).

21. Swatloski, R. P., Rogers, R. D. & David, J. H. Dissolution and processing of cellulose using ionic liquids. *The University Of Alabama* **2,** (2004).

22. Brandt, A., Gräsvik, J., Hallett, J. P. & Welton, T. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* **15,** 550 (2013).

23. Cláudio, A. F. M. *u. a.* Extended scale for the hydrogen-bond basicity of ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16,** 6593 (2014).

24. Ma, H., Zhou, B., Li, H.-S., Li, Y.-Q. & Ou, S.-Y. Green composite films composed of nanocrystalline cellulose and a cellulose matrix regenerated from functionalized ionic liquid solution. *Carbohydr. Polym.* **84,** 383–389 (2011).

25. Karatzos, S. K., Edye, L. A. & Wellard, R. M. The undesirable acetylation of cellulose by the acetate ion of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Cellulose* **19,** 307–312 (2012).

26. Gericke, M., Schlufter, K., Liebert, T., Heinze, T. & Budtova, T. Rheological Properties of Cellulose/Ionic Liquid Solutions: From Dilute to Concentrated States. *Biomacromolecules* **10,** 1188–1194 (2009).

27. Zavrel, M., Bross, D., Funke, M., Büchs, J. & Spiess, A. C. High-throughput screening for ionic liquids dissolving (ligno-)cellulose. *Bioresour. Technol.* **100,** 2580–2587 (2009).

28. Kuzmina, O. Research of Dissolution Ability of Ionic Liquids for Polysaccharides such as Cellulose. (Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2012).

29. Maton, C., De Vos, N. & Stevens, C. V. Ionic liquid thermal stabilities: decomposition mechanisms and analysis tools. *Chem. Soc. Rev.* **42,** 5963 (2013).

30. Mikkola, J. *u. a.* Ultrasound enhancement of cellulose processing in ionic liquids: from dissolution towards functionalization. *Green Chem.* **9,** 1229 (2007).

31. Köhler, S. *u. a.* Interactions of Ionic Liquids with Polysaccharides 1. Unexpected Acetylation of Cellulose with 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate. *Macromol. Rapid Commun.* **28,** 2311–2317 (2007).

32. Zenker, M. Nebenbestandteile von Chemiezellstoffen und ihre Veränderung im Herstellungsprozess von Celluloseacetat und Filtertow. (Universität Hamburg, 2010).

33. Gericke, M., Fardim, P. & Heinze, T. Ionic Liquids — Promising but Challenging Solvents for Homogeneous Derivatization of Cellulose. *Molecules* **17,** 7458–7502 (2012).

34. Sealey, J. E., Samaranayake, G., Todd, J. G. & Glasser, W. G. Novel cellulose derivatives. IV. Preparation and thermal analysis of waxy esters of cellulose. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **34,** 1613–1620 (1996).

35. El Seoud, O. A., Marson, G. A., Ciacco, G. T. & Frollini, E. An efficient, one-pot acylation of cellulose under homogeneous reaction conditions. *Macromol. Chem. Phys.* **201,** 882–889 (2000).

36. Satgé, C. Rapid homogeneous esterification of cellulose induced by microwave irradiation. *Carbohydr. Polym.* **49,** 373–376 (2002).

37. Achtel, C. & Heinze, T. Homogeneous Acetylation of Cellulose in the New Solvent Triethyloctylammonium Chloride in Combination with Organic Liquids. *Macromol. Chem. Phys.* **217,** 2041–2048 (2016).

38. Heinze, T. *u. a.* Effective preparation of cellulose derivatives in a new simple cellulose solvent. *Macromol. Chem. Phys.* **201,** 627–631 (2000).

39. Barthel, S. & Heinze, T. Acylation and carbanilation of cellulose in ionic liquids. *Green Chem.* **8,** 301–306 (2006).

40. Shogren, R. L. & Biswas, A. Acetylation of starch with vinyl acetate in imidazolium ionic liquids and characterization of acetate distribution. *Carbohydr. Polym.* **81,** 149–151 (2010).

41. Huang, K. *u. a.* Homogeneous synthesis of cellulose stearates with different degrees of substitution in ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Carbohydr. Polym.* **83,** 1631–1635 (2011).

42. Schenzel, A., Hufendiek, A., Barner-Kowollik, C. & Meier, M. a. R. Catalytic transesterification of cellulose in ionic liquids: sustainable access to cellulose esters. *Green Chem.* **16,** 3266 (2014).

43. Kakuchi, R. *u. a.* Efficient and rapid direct transesterification reactions of cellulose with isopropenyl acetate in ionic liquids. *RSC Adv.* **5,** 72071–72074 (2015).

44. Dorn, S. Ionische Flüssigkeiten: Neuartige Löse-und Reaktionsmedien in der Cellulosechemie. *Jena, Univ., Diss.* 1–113 (2009).

45. Cao, X. *u. a.* Rapid Synthesis of Cellulose Esters by Transesterification of Cellulose with Vinyl Esters under the Catalysis of NaOH or KOH in DMSO. *J. Agric. Food Chem.* **61,** 2489–2495 (2013).

46. Dicke, R. A straight way to regioselectively functionalized polysaccharide esters. *Cellulose* **11,** 255–263 (2004).

47. Williamson, S. L. & McCormick, C. L. Cellulose Derivatives Synthesized via Isocyanate and Activated Ester Pathways in Homogeneous Solutions of Lithium Chloride/N,N-Dimethylacetamide. *J. Macromol. Sci. Part A* **35,** 1915–1927 (1998).

48. Zhao, H. *u. a.* Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem.* **10,** 696 (2008).

49. Xie, J. & Hsieh, Y.-L. Enzyme-catalyzed transesterification of vinyl esters on cellulose solids. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **39,** 1931–1939 (2001).

50. Gremos, S., Zarafeta, D., Kekos, D. & Kolisis, F. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresour. Technol.* **102,** 1378–1382 (2011).

51. Gremos, S., Kekos, D. & Kolisis, F. Supercritical carbon dioxide biocatalysis as a novel and green methodology for the enzymatic acylation of fibrous cellulose in one step. *Bioresour. Technol.* **115,** 96–101 (2012).

52. Matamá, T., Casal, M. & Cavaco-Paulo, A. Direct enzymatic esterification of cotton and Avicel with wild-type and engineered cutinases. *Cellulose* **20,** 409–416 (2013).

53. Xiaoman, Z. *u. a.* Cutinase promotes dry esterification of cotton cellulose. *Biotechnol. Prog.* **32,** 60–65 (2016).

54. Božič, M., Vivod, V., Kavčič, S., Leitgeb, M. & Kokol, V. New findings about the lipase acetylation of nanofibrillated cellulose using acetic anhydride as acyl donor. *Carbohydr. Polym.* **125,** 340–351 (2015).

55. Klohr, E.-A., Koch, W., Klemm, D. & Dicke, R. Regioselectively substituted esters of oligo- and polysaccharides and a method of producing them. (2002).

56. Yang, K. & Wang, Y.-J. Lipase-Catalyzed Cellulose Acetylation in Aqueous and Organic Media. *Biotechnol. Prog.* **19,** 1664–1671 (2003).

57. Wang, F., Zhao, G., Lang, X., Li, J. & Li, X. Lipase-catalyzed synthesis of long-chain cellulose esters using ionic liquid mixtures as reaction media. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **92,** 1203–1210 (2017).

58. Gremos, S., Zarafeta, D., Kekos, D. & Kolisis, F. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresour. Technol.* **102,** 1378–1382 (2011).

59. Salvador, Â. C., Santos, M. D. C. & Saraiva, J. a. Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase. *Green Chem.* **12,** 632 (2010).

60. Lehmann, C., Bocola, M., Streit, W. R., Martinez, R. & Schwaneberg, U. Ionic liquid and deep eutectic solvent-activated CelA2 variants generated by directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98,** 5775–5785 (2014).

61. Wahlström, R., Rovio, S. & Suurnäkki, A. Partial enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in ionic liquids by Trichoderma reesei endoglucanases. *RSC Adv.* **2,** 4472 (2012).

62. Wahlström, R., King, A., Parviainen, A., Kruus, K. & Suurnäkki, A. Cellulose hydrolysis with thermo- and alkali-tolerant cellulases in cellulose-dissolving superbase ionic liquids. *RSC Adv.* **3,** 20001 (2013).

63. Wahlström, R., Rahikainen, J., Kruus, K. & Suurnäkki, A. Cellulose hydrolysis and binding with Trichoderma reesei Cel5A and Cel7A and their core domains in ionic liquid solutions. *Biotechnol. Bioeng.* **111,** 726–733 (2014).

64. Lehmann, C. *u. a.* Reengineering CelA2 cellulase for hydrolysis in aqueous solutions of deep eutectic solvents and concentrated seawater. *Green Chem.* **14,** 2719 (2012).

65. Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S. S. & Arora, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol. Proced. Online* **18,** 2 (2016).

66. Sereti, V., Stamatis, H., Koukios, E. & Kolisis, F. . Enzymatic acylation of cellulose acetate in organic media. *J. Biotechnol.* **66,** 219–223 (1998).

67. Baker, I. J. A. *u. a.* Sugar fatty acid ester surfactants: Structure and ultimate aerobic biodegradability. *J. Surfactants Deterg.* **3,** 1–11 (2000).

68. Neta, N. S., Teixeira, J. a & Rodrigues, L. R. Sugar Ester Surfactants: Enzymatic Synthesis and Applications in Food Industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55,** 595–610 (2015).

69. Karlová, T., Poláková, L., Šmidrkal, J. & Filip, V. Antimicrobial Effects of Fatty Acid Fructose Esters. *Czech J. Food Sci.* **28,** 146–149 (2010).

70. Yan, Y., Bornscheuer, U. T. & Schmid, R. D. Efficient water removal in lipase-catalyzed esterifications using a low-boiling-point azeotrope. *Biotechnol. Bioeng.* **78,** 31–34 (2002).

71. Ganske, F. & Bornscheuer, U. T. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **36,** 40–42 (2005).

72. Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E. & Miller, R. Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **147-148,** 237–250 (2009).

73. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemie*. *Biochemistry textbook* (2007). doi:10.1007/978-3-8274-2989-6

74. Martinelle, M., Holmquist, M. & Hult, K. On the interfacial activation of Candida antarctica lipase A and B as. *Biochim. Biophys. Acta* **1258,** 272–276 (1995).

75. Stauch, B., Fisher, S. J. & Cianci, M. Open and closed states of Candida antarctica lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J. Lipid Res.* **56,** 2348–2358 (2015).

76. Valivety, R. H., Johnston, G. A., Suckling, C. J. & Halling, P. J. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. *Biotechnol. Bioeng.* **38,** 1137–1143 (1991).

77. Gumel, a. M., Annuar, M. S. M., Heidelberg, T. & Chisti, Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochem.* **46,** 2079–2090 (2011).

78. Cabrera, Z., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Palomo, J. M. & Guisan, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from Candida antarctica B adsorbed on other hydrophobic supports. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **57,** 171–176 (2009).

79. Trodler, P. & Pleiss, J. Modeling structure and flexibility of Candida antarctica lipase B in organic solvents. *BMC Struct. Biol.* **8,** 9 (2008).

80. Plou, F. J. *u. a.* Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *J. Biotechnol.* **96,** 55–66 (2002).

81. Degn, P. & Zimmermann, W. Optimization of Carbohydrate Fatty Acid Ester Synthesis in Organic Media by a Lipase from Candida antarctica. *Biotechnol Bioeng.* **74,** 483–491 (2001).

82. Chen, J., Kimura, Y. & Adachi, S. Synthesis of linoleoyl disaccharides through lipase-catalyzed condensation and their surface activities. *J. Biosci. Bioeng.* **100,** 274–279 (2005).

83. Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409,** 241–246 (2001).

84. Wang, S. *u. a.* Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review. *Catalysts* **6,** 32 (2016).

85. Gog, A., Roman, M., Toşa, M., Paizs, C. & Irimie, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. *Renew. Energy* **39,** 10–16 (2012).

86. Itoh, T., Akasaki, E., Kudo, K. & Shirakami, S. Lipase-Catalyzed Enantioselective Acylation in the Ionic Liquid Solvent System: Reaction of Enzyme Anchored to the Solvent. *Chem. Lett.* **30,** 262–263 (2001).

87. Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S. & Chauhan, S. M. S. Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron* **61,** 1015–1060 (2005).

88. Ganske, F. & Bornscheuer, U. T. Lipase-Catalyzed Glucose Fatty Acid Ester Synthesis in Ionic Liquids. *Org. Lett.* **7,** 3097–3098 (2005).

89. Ganske, F. & Bornscheuer, U. T. Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **36,** 40–42 (2005).

90. Toral, A. R. *u. a.* Cross-linked Candida antarctica lipase B is active in denaturing ionic liquids. *Enzyme Microb. Technol.* **40,** 1095–1099 (2007).

91. Buchanan, C., Edgar, K., Hyatt, J. & Wilson, A. Preparation of cellulose acetates and determination of monomer composition by NMR spectroscopy. *Macromolecules* **24,** 3050–3059 (1991).

92. Samaranayake, G. & Glasser, W. G. Cellulose derivatives with low DS. II. Analysis of alkanoates. *Carbohydr. Polym.* **22,** 79–86 (1993).

93. Wissner, J. L. Synthese von Celluloseestern in ausgesuchten Ionischen Flüssigkeiten. (Universität Stuttgart, 2015).

94. Beurer, A.-K. Veresterung von Cellulose mit verschiedenen Acyldonoren in 1-Ethyl-3-methylimidazolium acetat. (Universität Stuttgart, 2015).

95. M. Fan, D. Dai, B. H. *Fourier transform infrared spectroscopy for natural fibres*. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres, Fourier Transform - Materials Analysis* (InTech, 2012).

96. Hubert Lobo; Jose V . Bonilla. *Hanbook of Plastic analysis*. *Journal of Chemical Information and Modeling* **53,** (CRC Press, 2003).

97. Auer-Welsbach, C. Spektroskopische Methoden der analytischen Chemie. *Monatshefte für Chemie* **43,** 387–403 (1923).

98. Naushad, M., ALOthman, Z. A., Khan, A. B. & Ali, M. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **51,** 555–560 (2012).

99. Graebin, N. G. *u. a.* Immobilization of lipase B from Candida antarctica on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. *Biotechnol. Prog.* **28,** 406–412 (2012).

100. Nordwald, E. M., Plaks, J. G., Snell, J. R., Sousa, M. C. & Kaar, J. L. Crystallographic Investigation of Imidazolium Ionic Liquid Effects on Enzyme Structure. *ChemBioChem* **16,** 2456–2459 (2015).

101. Graber, M. *u. a.* Solvent as a competitive inhibitor for Candida antarctica lipase B. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1774,** 1052–1057 (2007).

102. Nemestóthy, N. *u. a.* Enzyme kinetics approach to assess biocatalyst inhibition and deactivation caused by [bmim][Cl] ionic liquid during cellulose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **229,** 190–195 (2017).

103. Valivety, R. H., Johnston, G. A., Suckling, C. J. & Halling, P. J. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. *Biotechnol. Bioeng.* **38,** 1137–1143 (1991).

104. Fransson, L. Enzyme substrate solvent interactions. (AlbaNova University Center, 2008).

105. Ebner, G., Schiehser, S., Potthast, A. & Rosenau, T. Side reaction of cellulose with common 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids. *Tetrahedron Lett.* **49,** 7322–7324 (2008).

106. Budarin, V. L., Clark, J. H., Lanigan, B. A., Shuttleworth, P. & Macquarrie, D. J. Microwave assisted decomposition of cellulose: A new thermochemical route for biomass exploitation. *Bioresour. Technol.* **101,** 3776–3779 (2010).

107. Nagel, M. C. V. & Heinze, T. Esterification of cellulose with acyl-1H-benzotriazole. *Polym. Bull.* **65,** 873–881 (2010).

108. Domínguez de María, P. & Martinsson, A. Ionic-liquid-based method to determine the degree of esterification in cellulose fibers. *Analyst* **134,** 493–496 (2009).

109. Xie, W. & Shao, L. Phosphorylation of Corn Starch in an Ionic Liquid. *Starch - StÃ¤rke* **61,** 702–708 (2009).

110. King, A. W. T., Asikkala, J., Mutikainen, I., Järvi, P. & Kilpeläinen, I. Distillable Acid-Base Conjugate Ionic Liquids for Cellulose Dissolution and Processing. *Angew. Chemie Int. Ed.* **50,** 6301–6305 (2011).

111. Shi, J. *u. a.* Understanding the role of water during ionic liquid pretreatment of lignocellulose: co-solvent or anti-solvent? *Green Chem.* **16,** 3830 (2014).

112. Shill, K. *u. a.* Ionic liquid pretreatment of cellulosic biomass: Enzymatic hydrolysis and ionic liquid recycle. *Biotechnol. Bioeng.* **108,** 511–520 (2011).

113. Kosan, B., Michels, C. & Meister, F. Dissolution and forming of cellulose with ionic liquids. *Cellulose* **15,** 59–66 (2008).

114. Cibik, T. Untersuchungen am System NMMO / H 2 O / Cellulose. *Dissertation* (Technische Universität Berlin, 2003).

115. Clough, M. T., Griffith, J. A., Kuzmina, O. & Welton, T. Enhancing the stability of ionic liquid media for cellulose processing: acetal protection or carbene suppression? *Green Chem.* **18,** 3758–3766 (2016).

116. Zhang, J. *u. a.* NMR spectroscopic studies of cellobiose solvation in EmimAc aimed to understand the dissolution mechanism of cellulose in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12,** 1941 (2010).

117. Chu, Y., Deng, H. & Cheng, J. An Acidity Scale of 1,3-Dialkylimidazolium Salts in Dimethyl Sulfoxide Solution. *J. Org. Chem.* **72,** 7790–7793 (2007).

118. Xu, A., Wang, J. & Wang, H. Effects of anionic structure and lithium salts addition on the dissolution of cellulose in 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid solvent systems. *Green Chem.* **12,** 268–275 (2010).

119. Pinkert, A., Marsh, K. N. & Pang, S. Reflections on the Solubility of Cellulose. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49,** 11121–11130 (2010).

120. Zhang, J. *u. a.* Understanding cellulose dissolution: effect of the cation and anion structure of ionic liquids on the solubility of cellulose. *Sci. China Chem.* **59,** 1421–1429 (2016).

121. Chiarotto, I., Feroci, M., Sotgiu, G. & Inesi, A. Electrogenerated N -Heterocyclic Carbenes in the Room Temperature Parent Ionic Liquid as an Efficient Medium for Transesterification/Acylation Reactions. *European J. Org. Chem.* **2013,** 326–331 (2013).

122. Movassaghi, M. & Schmidt, M. A. N-Heterocyclic Carbene-Catalyzed Amidation of Unactivated Esters with Amino Alcohols. *Org. Lett.* **7,** 2453–2456 (2005).

123. Chen, M.-J. *u. a.* Homogeneous Transesterification of Sugar Cane Bagasse toward Sustainable Plastics. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **5,** 360–366 (2017).

124. Lai, C.-L., Lee, H. M. & Hu, C.-H. Theoretical study on the mechanism of N-heterocyclic carbene catalyzed transesterification reactions. *Tetrahedron Lett.* **46,** 6265–6270 (2005).

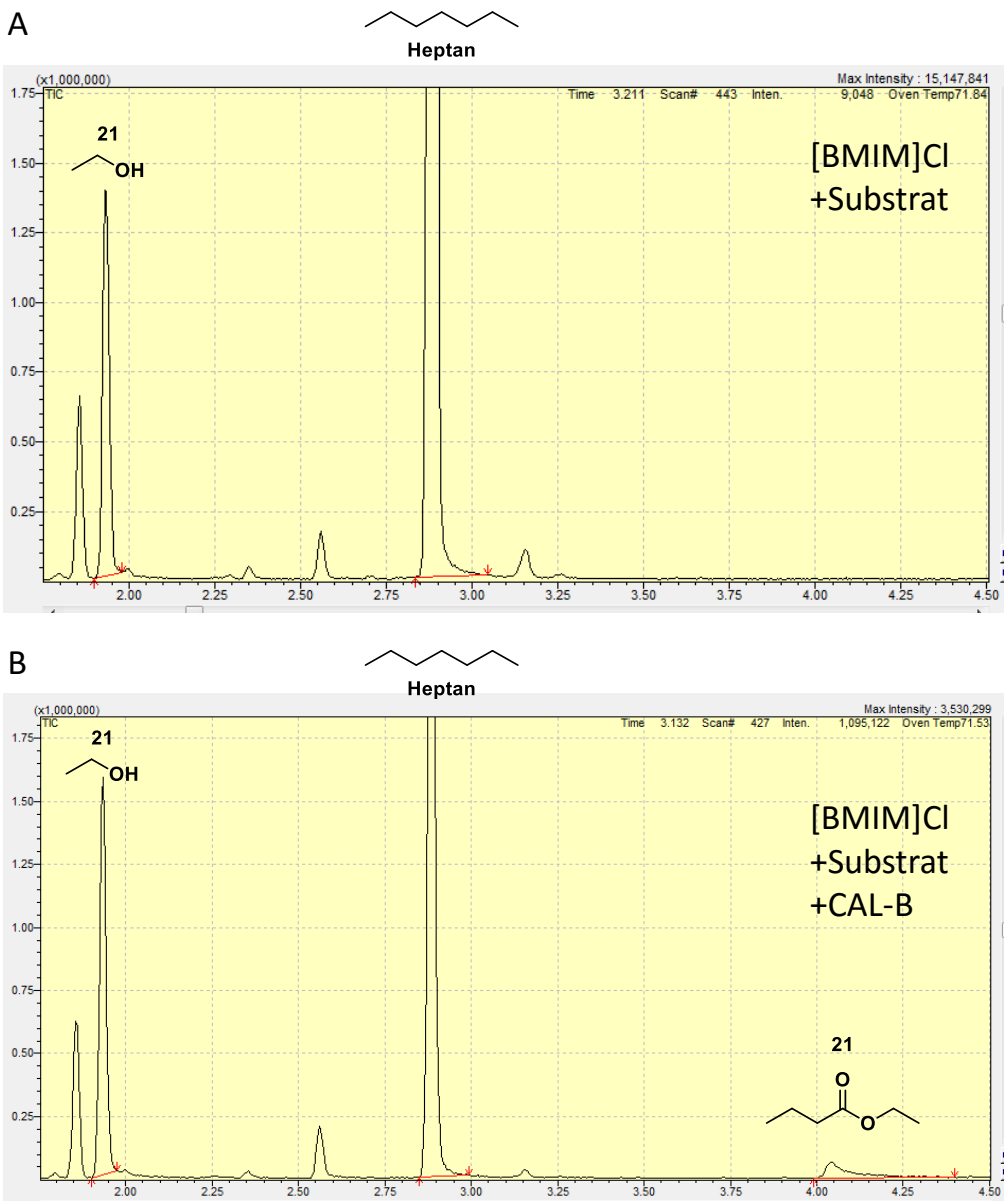
125. Naumann, S. & Dove, A. P. N-Heterocyclic carbenes as organocatalysts for polymerizations: trends and frontiers. *Polym. Chem.* **6,** 3185–3200 (2015).

126. Crépy, L., Miri, V., Joly, N., Martin, P. & Lefebvre, J.-M. Effect of side chain length on structure and thermomechanical properties of fully substituted cellulose fatty esters. *Carbohydr. Polym.* **83,** 1812–1820 (2011).

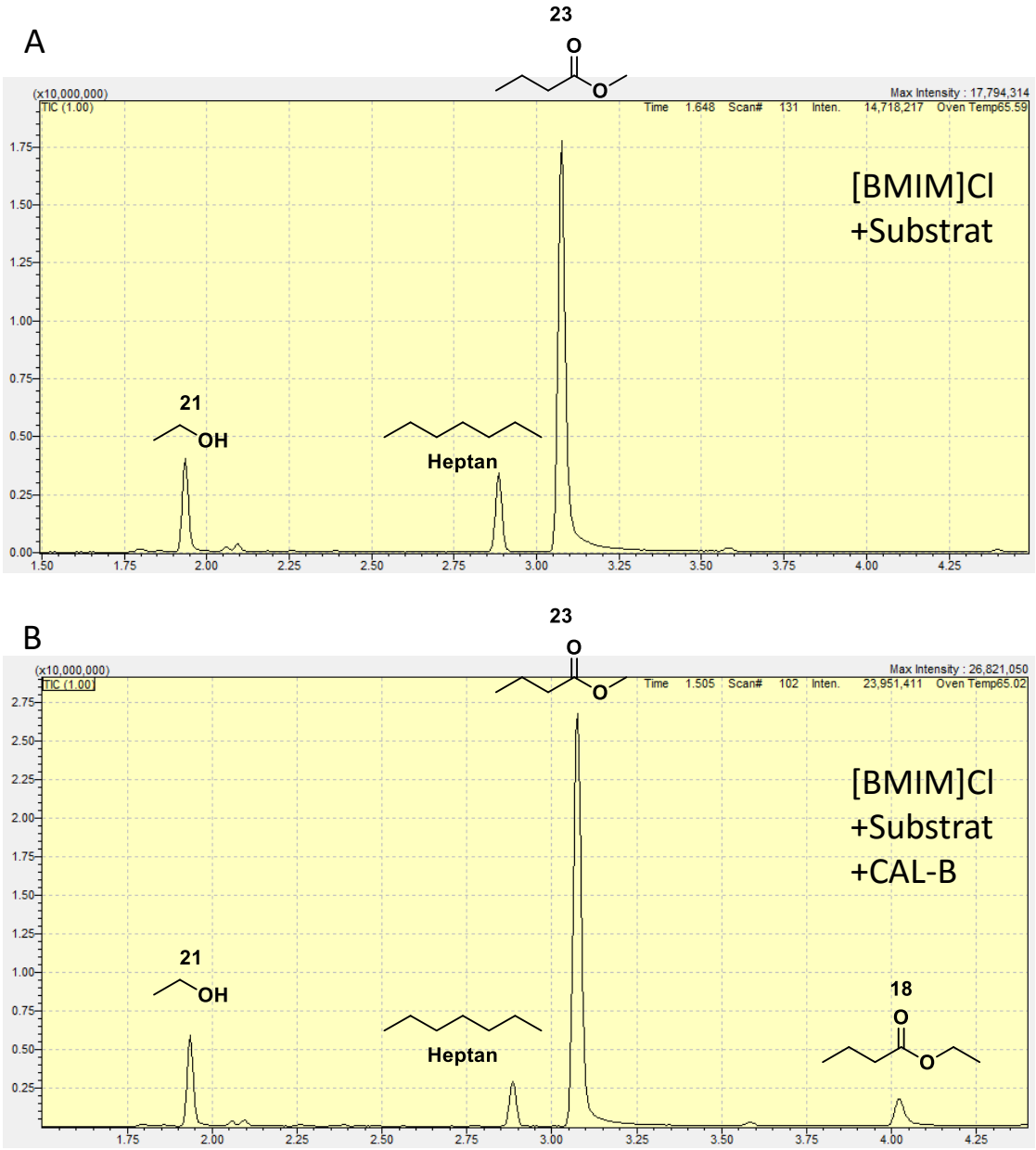
127. Toshiro Morooka, Misato Norimoto, Tadashi Yamada, N. S. Dielectric Properties of Cellulose Acylates. *J. Appl. Polym. Sci.* **29,** 3981–3990 (1984).

8

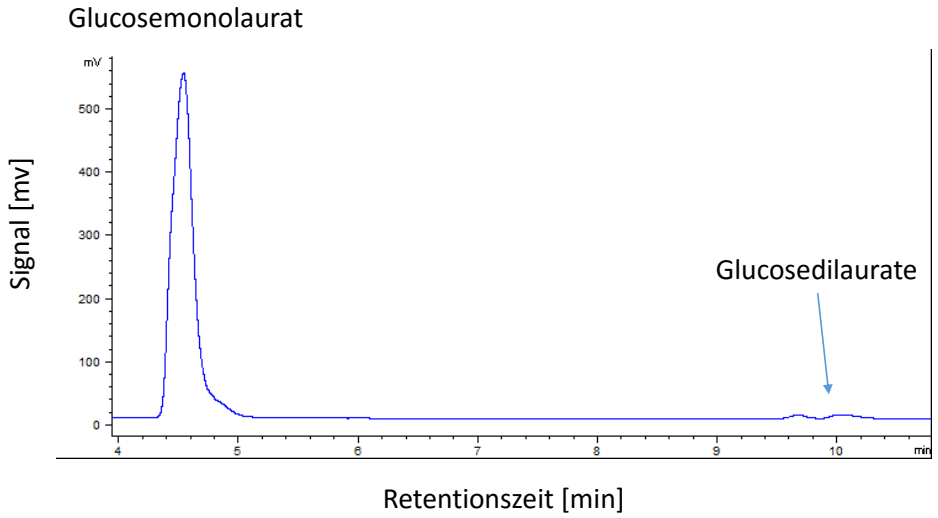
8. Anhang



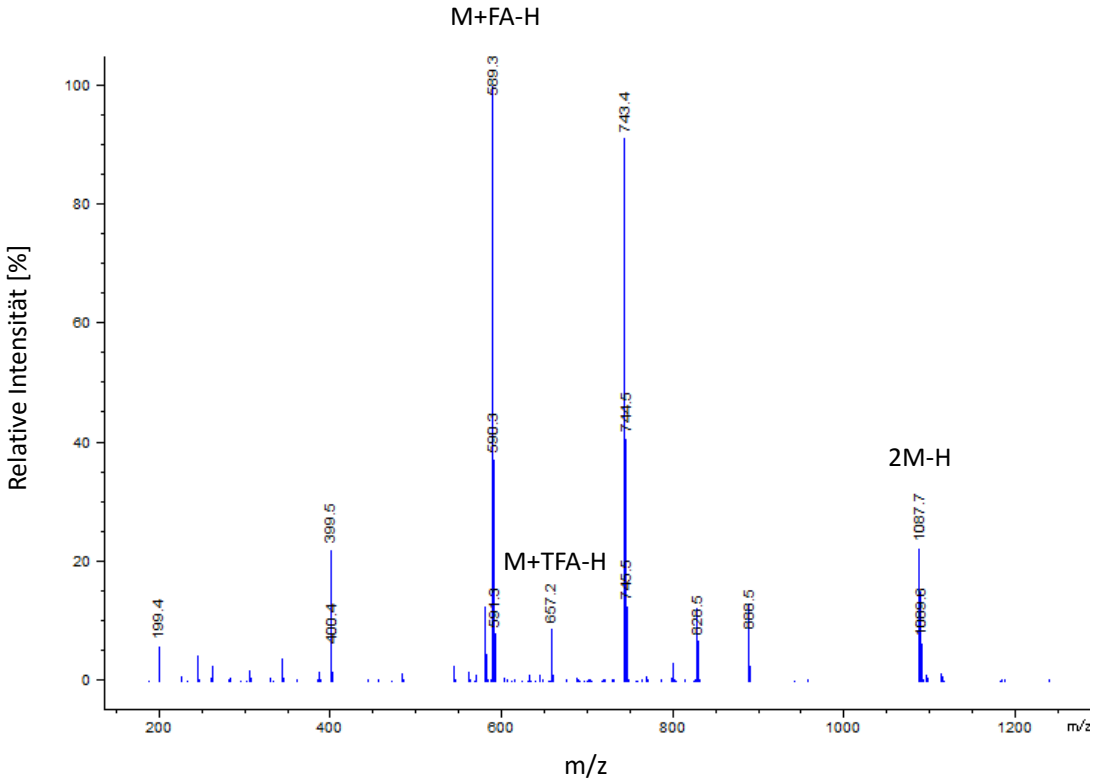
Anhang 1: GC-MS Veresterung von Buttersäure und Ethanol zu Buttersäureethylester.
GC-MS-Headspace-Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl vor der enzymatischen Umsetzung (**A**) und nach der enzymatischen Umsetzung durch CAL-B (**B**). Betrachtet wird die Reaktion von Buttersäure mit Ethanol zu Buttersäureethylester und Wasser (Schema 11). Es wurde 1 ml [BMIM]Cl in ein 20 ml-„Headspacevial“ überführt und gegebenenfalls mit 50 mM Buttersäure und 50 mM Ethanol (**A**), sowie 25 mg immobilisierter CAL-B (**B**) versetzt. Die Reaktion lief anschließend 4 Tage bei 67°C, bevor sie mittels GC-MS analysiert wurde (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1).



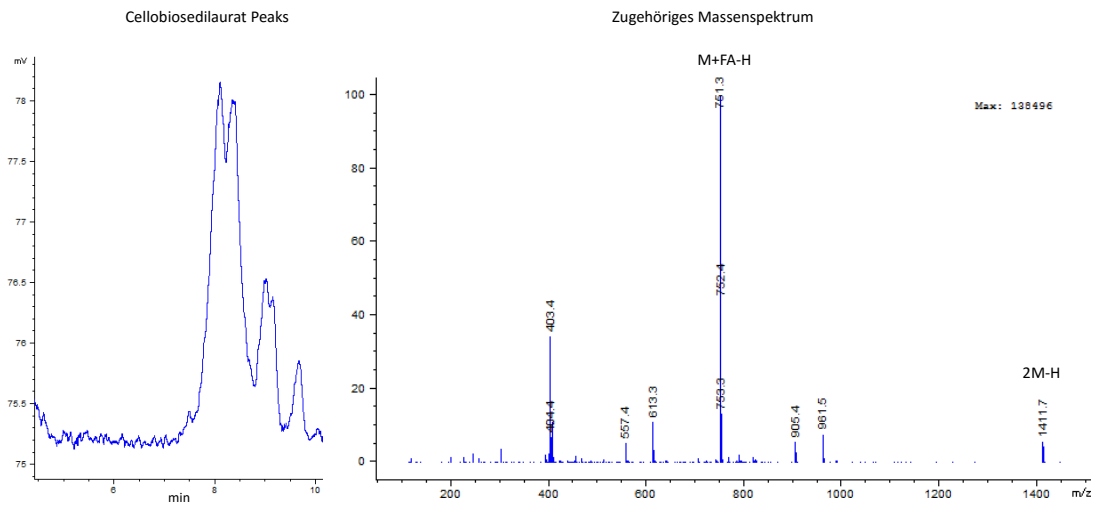
Anhang 2: GC-MS-Umesterung von Buttersäuremethylester mit Ethanol zu Buttersäureethylester. GC-MS-Headspace-Messung der Gasphase über der ionischen Flüssigkeit [BMIM]Cl vor der enzymatischen Umsetzung (**A**) und nach der enzymatischen Umsetzung durch CAL-B (**B**). Betrachtet wird die Reaktion von Buttersäuremethylester mit Ethanol (**21**) zu Buttersäureethylester und Methanol (**27**) (Schema 10). Es wurde 1 ml [BMIM]Cl in ein 20 ml-„Headspacevial“ überführt und gegebenenfalls mit 50 mM Buttersäuremethylester und 50 mM Ethanol (**21**, **A**) bzw. 25 mg immobilisierter CAL-B (**B**) versetzt. Die Reaktion lief anschließend 10 Tage bei 67°C, bevor sie mittels GC-MS analysiert wurde (Kapitel 2.2.1 und 2.3.1).



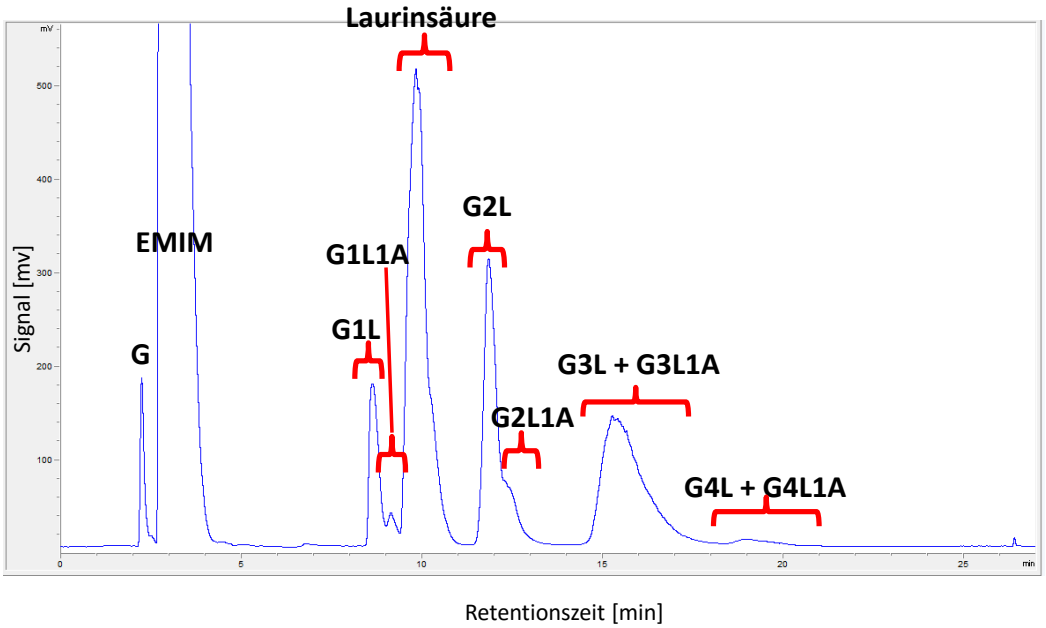
Anhang 3: ELSD-Chromatogramm mit Glucosemonolaurat und Glucosedilaurat.
ELSD-Chromatogramm nach der Synthese von Glucoselaurat in [BMIM]BF_4 durch CAL-B. Es wurde 300 mg [BMIM]BF_4, 130 µl Laurinsäurevinylester (**29**, 0,5 mmol), 50 mg Glucosemonohydrat (0,25 mmol) und 25 mg CAL-B in ein 2 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 50°C und 400 rpm geschüttelt und mittels LC-ELSD analysiert. Die Identifikation der Produkte erfolgte mit LC-MS (**Anhang 4**, **Abbildung 6**).



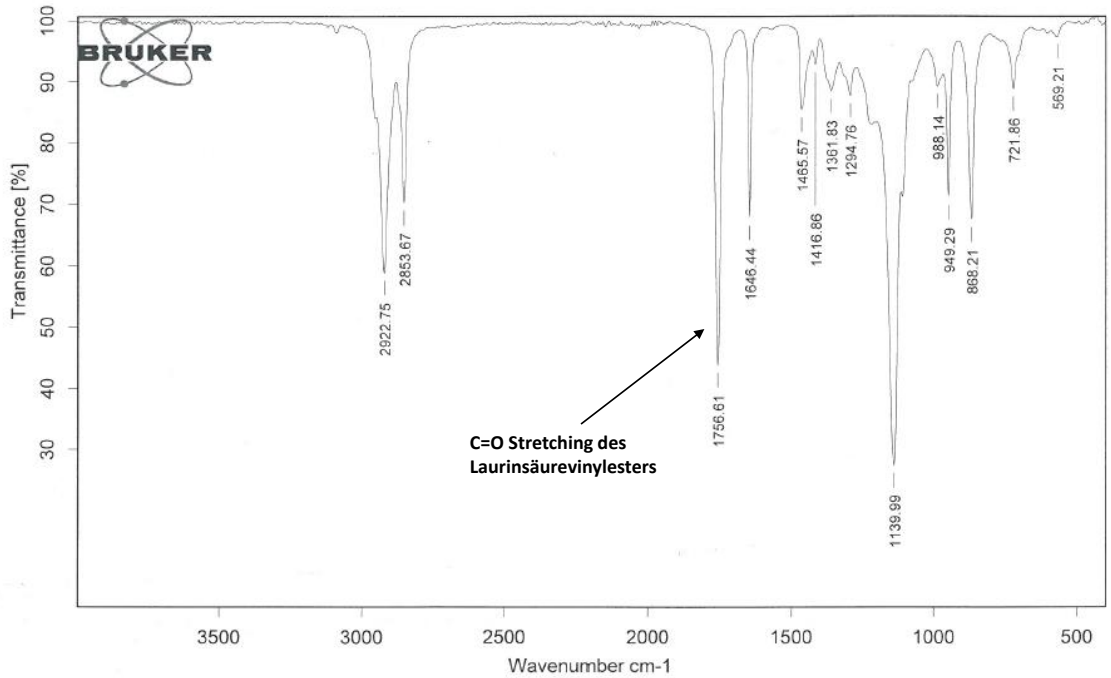
Anhang 4: Massenspektrum von Glucosedilaurat, synthetisiert in [BMIM]BF_4 durch CAL-B. Glucosedilaurat wurde in [BMIM]BF_4 mit CAL-B und Laurinsäurevinylester (**29**) synthetisiert. Die Addukte, die zur Identifikation verwendet wurden, sind jeweils markiert: Masse Glucosedilaurat: 544,8; *Masse + Ameisensäure - H (M + FA - H)*: 589,3 m/z; *M + Trifluoressigsäure -H (M + TFA - H)*: 657,2 m/z; *2 x Masse - H (2 x M - H)*: 1087,7 m/z.



Anhang 5: LC-ELSD-Chromatogramm und zugehöriges Massenspektrum von Cellobiosedilaurat.
Die zugrundeliegende Synthese wurde bei 30°C über Nacht mit 30 mg PLE, 100 µl Laurinsäurevinylester (**29**) und 200 mg Cellobiose durchgeführt und anschließend mit LC-ELSD (**A**) und LC-MS (**B**) analysiert. Die Addukte, die für die Identifikation verwendet wurden, sind jeweils markiert: Masse Cellobiosedilaurat: 706,9; *Masse + Ameisensäure - H (M + FA - H)*: 751,3 m/z und *2 x Masse - H (2 x M - H)*: 1411,7 m/z.

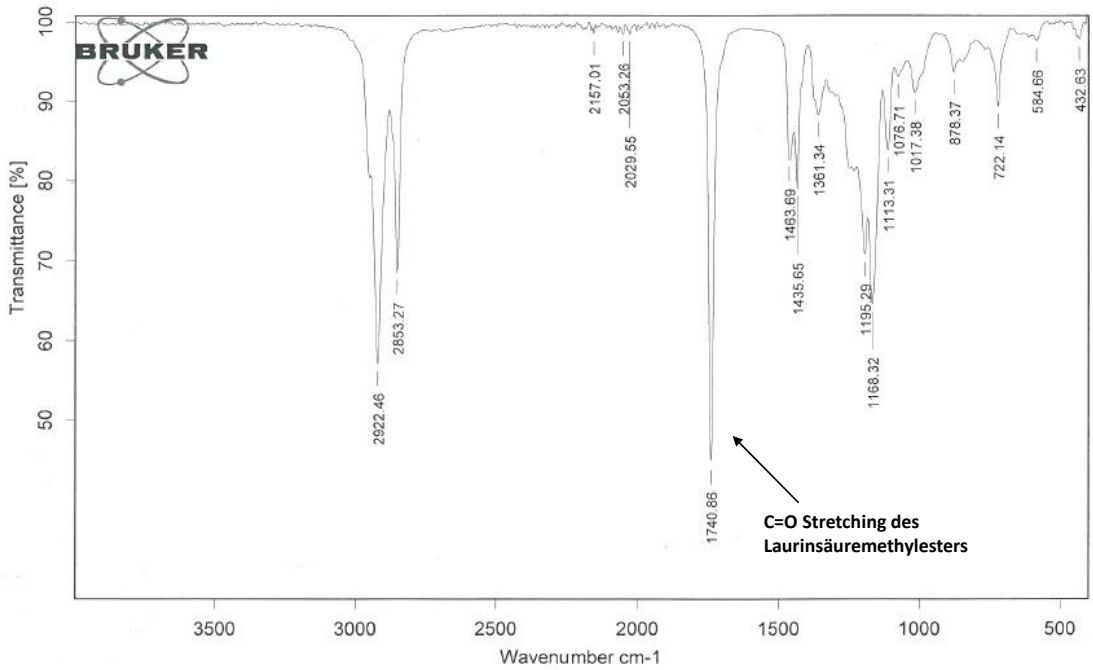


Anhang 6: Typisches ELSD-Chromatogramm nach der Glucoselauratsynthese in [EMIM]OAc.
Es wurden 0,83 mmol/mg Glucose (**28**) in [EMIM]OAc eingesetzt und mit 2 mol Laurinsäurevinylester (**29**) je mol Glucose (**28**) für 22 Stunden bei 60°C und 600 rpm geschüttelt und anschließend mit LC-ELSD analysiert. Das Chromatogramm zeigt die Peaks von Glucose (G), EMIM, Glucosemonolaurat (G1L), Glucosemonolauratmonoacetat (G1L1A), Laurinsäure, Glucosedilaurat (G2L), Glucosedilauratmonoacetat (G2L1A), Glucosetrilaurat (G3L), Glucosetrilauratmonoacetat (G3L1A), Glucosetetralaurat (G4L) und Glucosetetralauratmonoacetat (G4L1A). Die Identifikation der Produkte erfolgte mittels LC-MS.



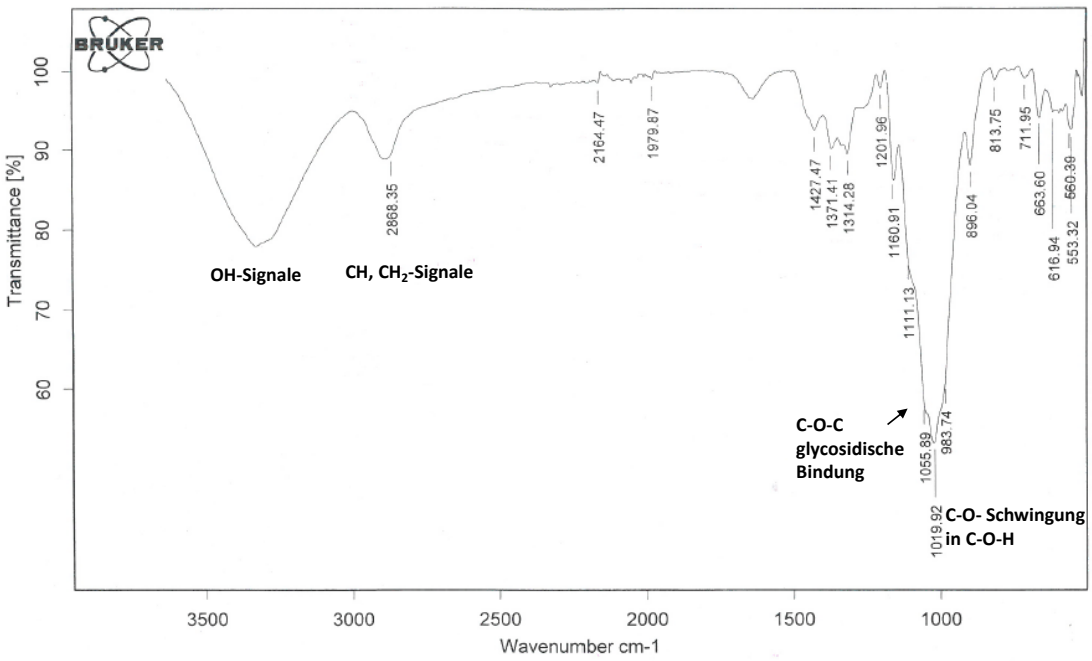
Anhang 7: FT-IR-Spektrum des Laurinsäurevinylesters.

Der Laurinsäurevinylester wurde von Sigma-Aldrich bezogen und mittels FT-IR vermessen.



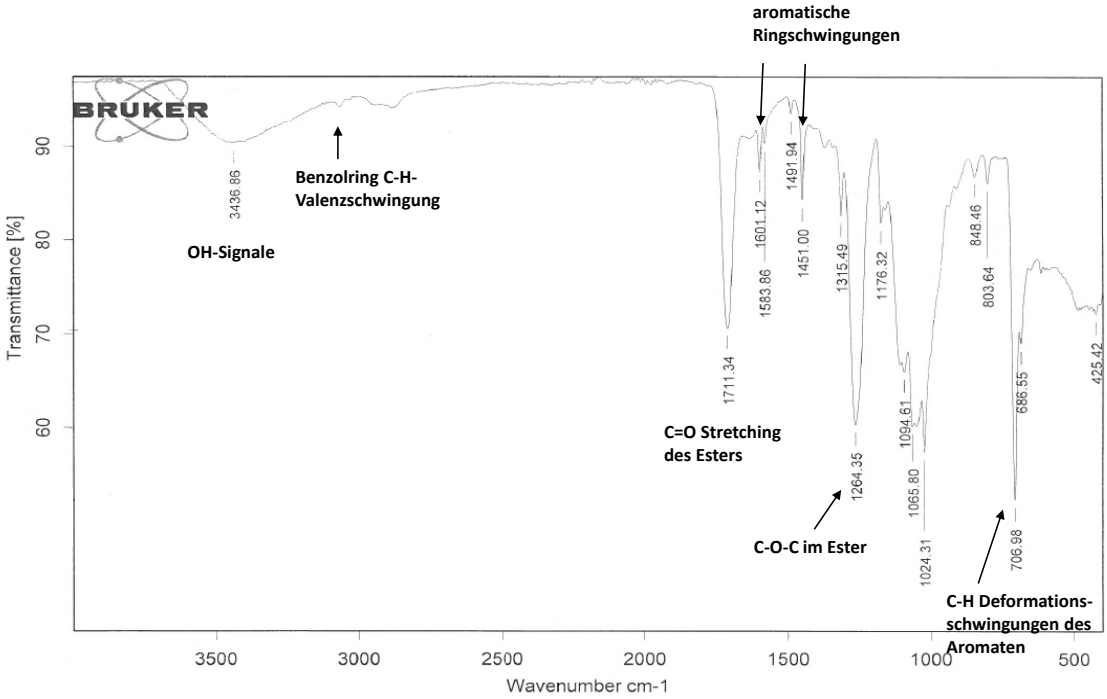
Anhang 8: FT-IR-Spektrum des Laurinsäuremethylesters.

Der Laurinsäuremethylester wurde von Sigma-Aldrich bezogen und mittels FT-IR vermessen.



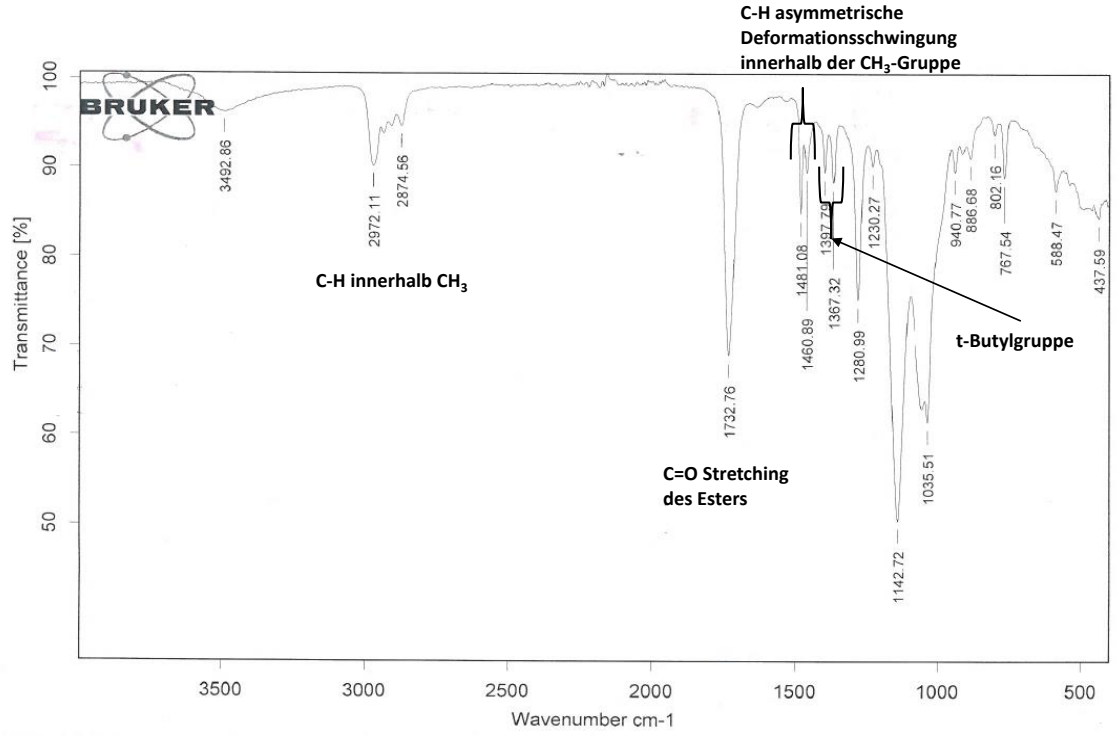
Anhang 10: FT-IR-Spektrum von Alpha-Cellulose.

Die α-Cellulose wurde von Sigma-Aldrich bezogen und mittels FT-IR vermessen.



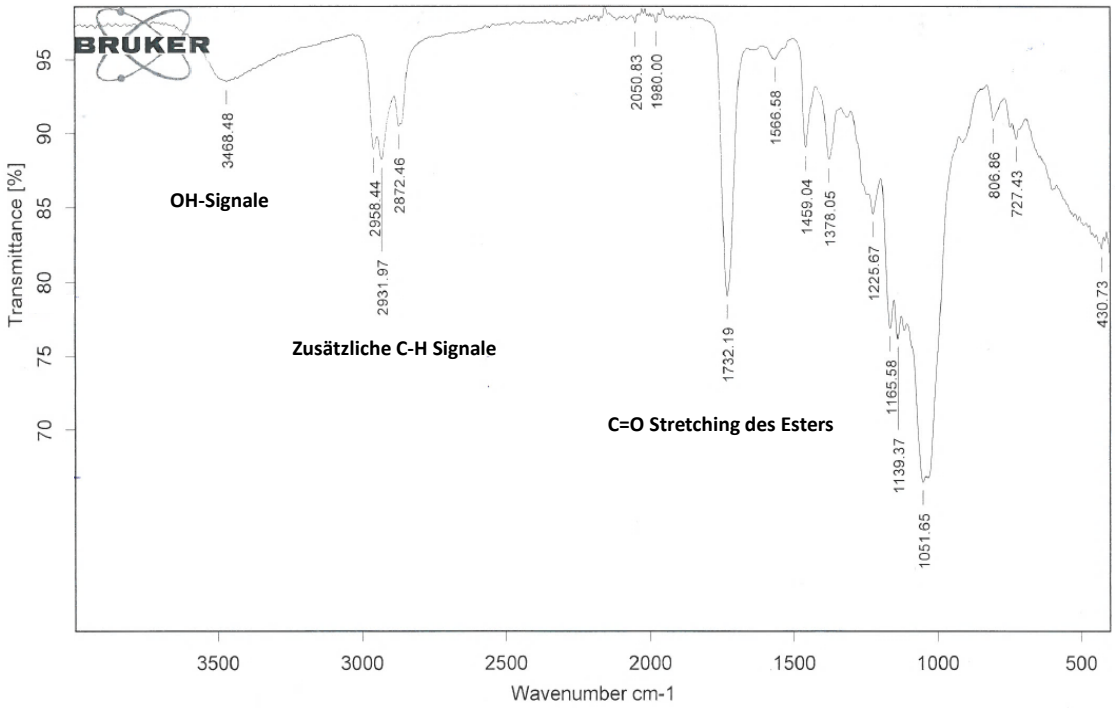
Anhang 9: FT-IR-Spektrum von Cellulosebenzoat.

Cellulosebenzoat wurde unter der Verwendung von 3 mol Benzoesäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol aufgereinigt. Einige charakteristische Peaks des Polymers sind im Spektrum ihren zugrundeliegenden Strukturmerkmalen zugeordnet.

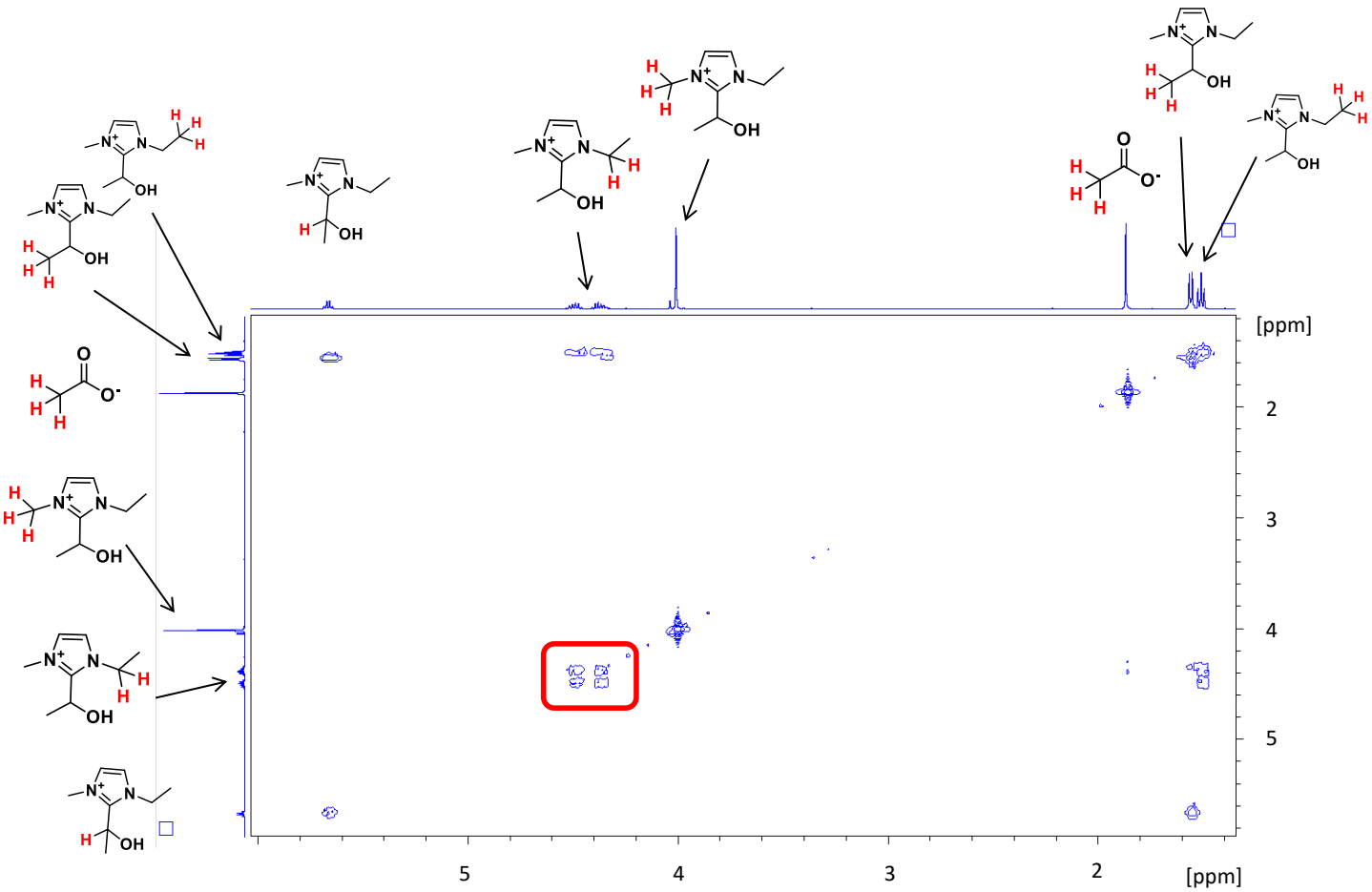


Anhang 11: FT-IR-Spektrum von Cellulosepivalat.

Cellulosepivalat wurde unter der Verwendung von 3 mol Pivalinsäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol (**27**) aufgereinigt. Einige charakteristische Peaks des Polymers sind im Spektrum ihren zugrundeliegenden Strukturmerkmalen zugeordnet.

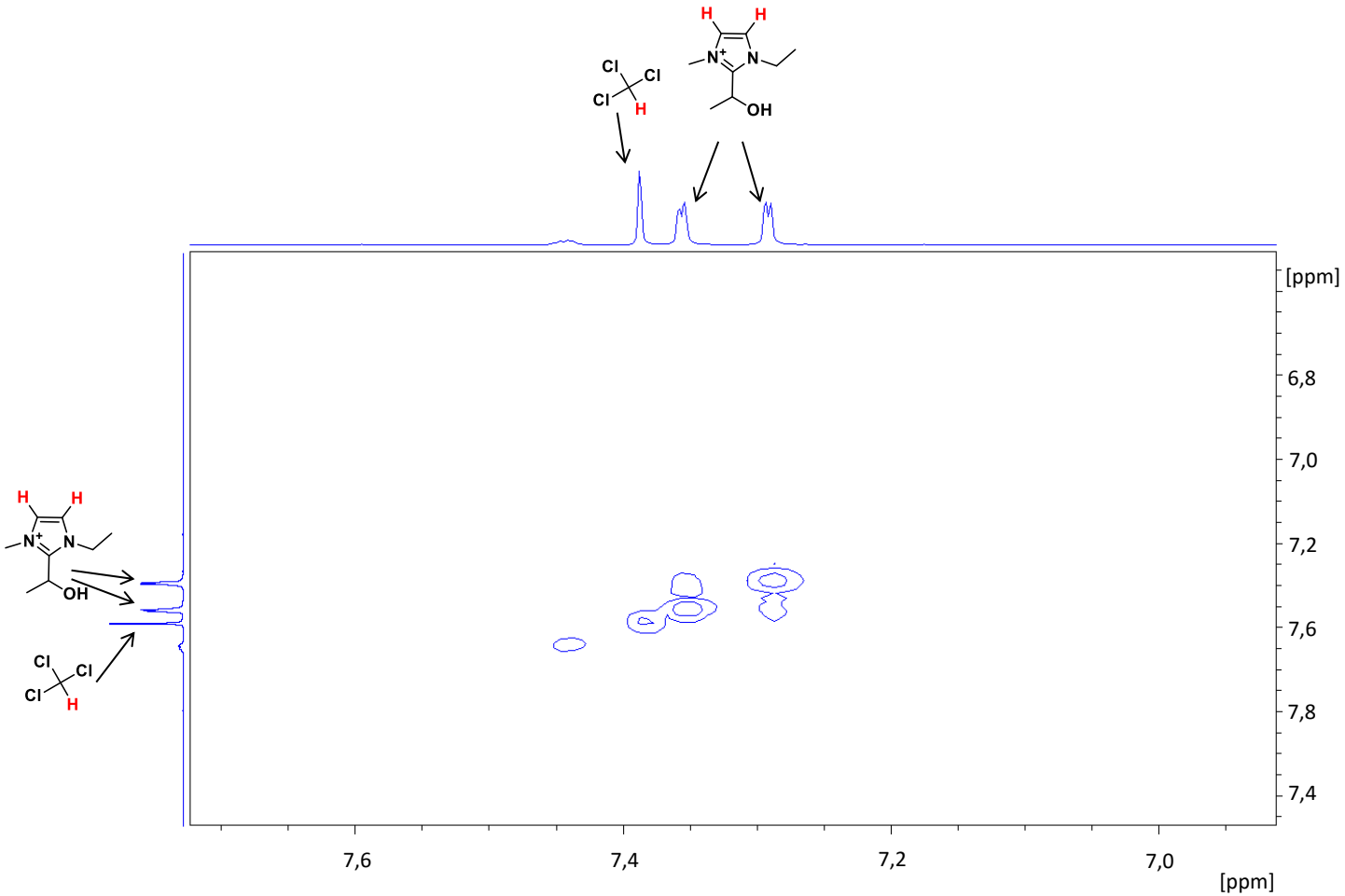


Anhang 12: FT-IR-Spektrum von Cellulose-2-ethylhexyloat.
Cellulose-2-ethylhexyloat wurde unter der Verwendung von 3 mol 2-Ethylhexansäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol (**27**) aufgereinigt. Einige charakteristische Peaks des Polymers sind im Spektrum ihren zugrundeliegenden Strukturmerkmalen zugeordnet.



Anhang 13: ^{1}H, ^{1}H-COSY-Spektrum einer [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Mischung im Bereich zwischen 1 ppm und 6 ppm.

Den ^{1}H-NMR-Signalen wurden die entsprechenden Protonen (rot hervorgehoben) in den Strukturen EMIM (**24**), EHEMIM (**40**) und Acetat zugeordnet. Die Synthese der [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Mischung wurde bei 80°C durch Zugabe von 1,1 mol Acetaldehyd (**31**) je mol EMIM unter Rückfluss synthetisiert. Das ^{1}H-NMR wurde in *d*-DMSO bei 500 MHz vermessen. Die Kopplung zwischen den beiden Doubletts von Quartetten bei δ = 4,25 - 4,40 ppm ist rot umrandet.



Anhang 14: ^{1}H, ^{1}H-COSY-Spektrum einer [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Mischung im Bereich der aromatischen Signale.

Den ^{1}H-NMR-Signalen wurden die entsprechenden Protonen (rot hervorgehoben) in den Strukturen EMIM (**24**), EHEMIM (**40**) und Acetat zugeordnet. Die Synthese der [EHEMIM]-[EMIM]OAc-Mischung wurde bei 80°C durch Zugabe von 1,1 mol Acetaldehyd (**31**) je mol EMIM unter Rückfluss synthetisiert. Das ^{1}H-NMR wurde in *d*-DMSO bei 500 MHz vermessen.

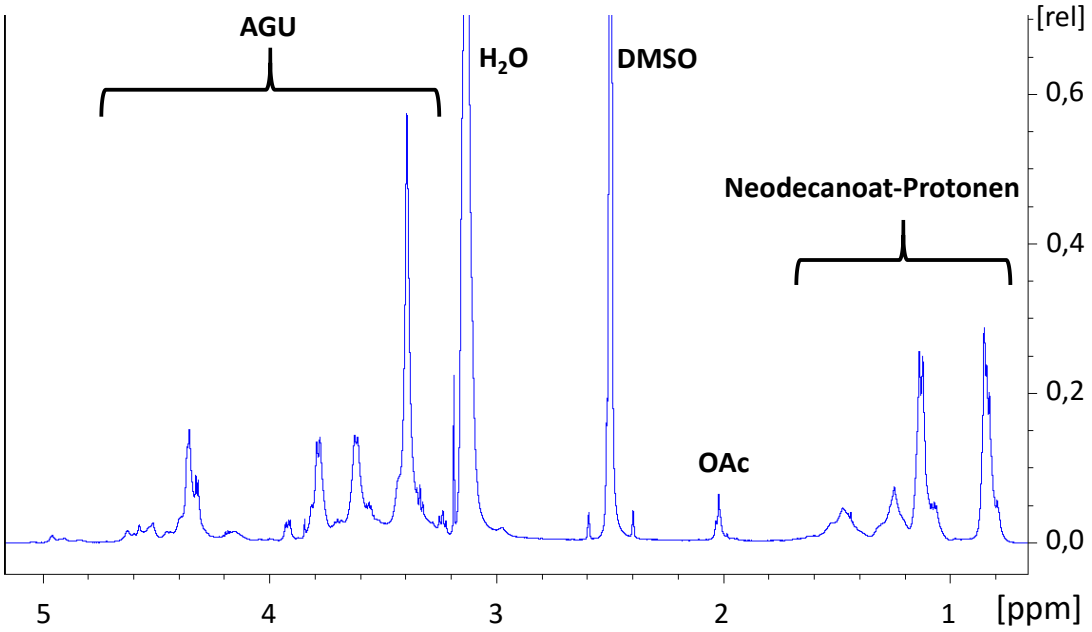
Anhang 15: Liste von Enzymen, welche die Synthese von Cellobioselaurat nicht katalysieren. *

Enzympräparation	Hersteller
Humicola insolens Cutinase	Novozymes, Bagsværd, Dänemark
Burkholderia cepacia Lipase	Amano-Enzyme.Inc, Nagoya Japan
Thermomyces lanuginosus Lipase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Papaya Lipase	Challenge Bio Products CO.,LTD, Touliu, Taiwan
Rhizopus arrhizus Lipase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aspergillus sp. Proteinase 6	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bacillus subtilis Proteinase	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bacillus subtilis Proteinase N	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bacillus licheniformis Protease	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
CAL-B immobilisiert auf Immobead 150	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pseudomonas fluorescens Lipase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rhizomucor miehei Lipase	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Rhizopus niveus Lipase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

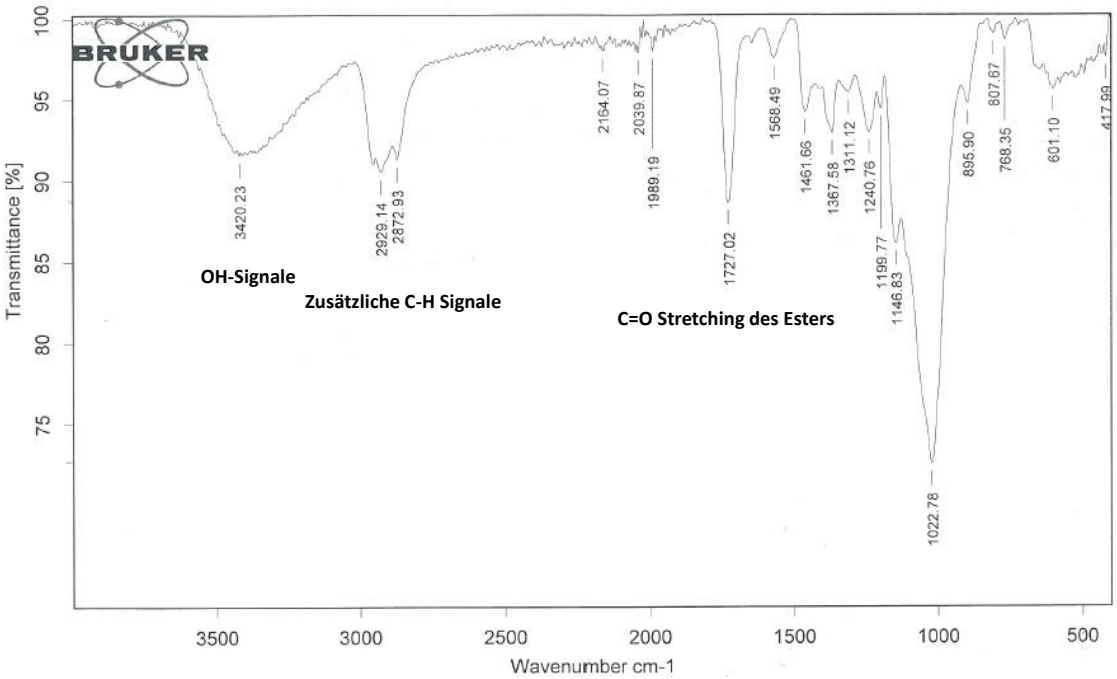
* Enzyme wurden als nicht katalytisch aktiv für die Synthese von Cellobioselaurat eingestuft, wenn die Peakfläche von Cellobioselaurat weniger als 1 % von der Peakfläche von Cellobioselaurat nach Umsatz mit dem besten Enzym (PLE), aufweist.

Anhang 16: Liste von Enzymen, welche die Synthese von Cellobioselaurat katalysieren.

Enzympräparation	Hersteller
Penicillium roqueforti Lipase	Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Schweineleberesterase (PLE) immobilisiert auf Eupergit C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aspergillus sp. Lipase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
freie CAL-B	c-LEcta, Leipzig, Deutschland
Schweineleberesterase (PLE)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pseudomonas cepacia Lipase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland



Anhang 17: ^{1}H-NMR von Celluloseneodecanoat.
Celluloseneodecanoat wurde unter der Verwendung von 3 mol Neodecansäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol (**27**) aufgereinigt. Das ^{1}H-NMR wurde in d-DMSO bei 100°C und 700 MHz vermessen. Einige charakteristische Peaks des Polymers sind im ^{1}H-NMR-Spektrum ihren zugrundeliegenden Strukturmerkmalen zugeordnet.



Anhang 18: FT-IR-Spektrum von Celluloseneodecanoat.
Celluloseneodecanoat wurde unter der Verwendung von 3 mol Neodecansäurevinylester je AGU bei 80°C innerhalb von 4 Stunden synthetisiert und anschließend durch Waschen mit Methanol aufgereinigt. Einige charakteristische Peaks des Polymers sind im FT-IR-Spektrum ihren zugrundeliegenden Strukturmerkmalen zugeordnet.

Anhang 19:

Hinner, L. P., Wissner, J. L., Beurer, A., Nebel, B. A. & Hauer, B. Homogeneous vinyl ester-based synthesis of different cellulose derivatives in 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chem.* 18, 6099–6107 (2016):

Green Chemistry

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

Cite this: *Green Chem.*, 2016, **18**, 6099

Homogeneous vinyl ester-based synthesis of different cellulose derivatives in 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate†

L. P. Hinner, J. L. Wissner, A. Beurer, B. A. Nebel and B. Hauer*

A homogeneous acylation of cellulose with different vinyl esters in the biodegradable and less toxic ionic liquid 1-ethyl-3-methyl-imidazolium acetate ([EMIM]OAc) is described for the first time. The reaction proceeds in the absence of any additional catalyst and glucose- and cellulose-esters with chain lengths of C_8 to C_{16} are accessible by using equimolar amounts of acyl donor. Cellulose esters with a degree of substitution (DS) in the range of 0.9–3.0 were synthesised successfully. Different reaction parameters like reaction time, temperature and amount of substrate were systematically changed and analysed by NMR, IR and HPLC-GPC. The highest DS was achieved at 80 °C and a reaction time of 2 hours. Taking into consideration the literature, the DS and degree of polymerisation (DP) of fatty acid chloride and vinyl ester-based synthesis routes were compared. Similar DS-values were obtained, but the DP was significantly reduced during the synthesis using fatty acid chlorides in [BMIM]Cl. As an undesirable side reaction, acetates from [EMIM]OAc are bound to the cellulose backbone. The quantity of bound acetate groups during vinyl ester-based synthesis rose with decreasing polarity of the substrates but overall proved to be much lower compared to the literature described anhydride or fatty acid chloride based synthesis routes in [EMIM]OAc. This novel process was extended by using further acyl donors like vinyl benzoate, pivalate and 2-ethylhexanoate to demonstrate the applicability of the vinyl ester-based cellulose modification in [EMIM]OAc. [EMIM]OAc was recycled with an efficiency of ~90% and reused for subsequent syntheses.

Received 22nd July 2016,
Accepted 10th August 2016

DOI: 10.1039/c6gc02005d

www.rsc.org/greenchem

Introduction

Cellulose as a part of plant cell walls is the most abundant biopolymer on Earth. With an estimated annual biosphere production of 9×10^{10} tons, cellulose is a remarkable natural resource, which is nowadays mainly used for the production of paper and pulp or is simply burned in order to produce heat.[1] In contrast, other applications based on the polymeric character of cellulose are also applied like for example the production of cellulose acetate. Thermoplastic and other kinds of polymeric materials based on cellulose have a great potential for reducing the dependency of our modern society on fossil fuels.

Cellulose consists of several anhydroglucose units (AGU), which are β-(1→4)-glycosidically linked, thereby forming long polymer chains and a very strong hydrogen bond network with both intra- and inter-chain hydrogen bonds. This strong hydrogen bond network makes it very difficult to process cellulose because cellulose is not soluble in common organic solvents.[2]

The modification of cellulose, among others, can be achieved by esterification of the free cellulose hydroxy groups. However, the present technologies for cellulose modifications are mainly limited to heterogeneous reaction processes, where cellulose is not solubilised and an excess of acyl donor is required.[3] Due to the strong steric hindrance of non-solubilised cellulose, such strategies are limited to the use of short acyl chains (C_2–C_4). In contrast, a homogeneous modification procedure of cellulose, where cellulose is solubilised, leads to benefits like control of the amount and distribution of substituents along the polysaccharide backbone, where even longer, sterically challenging acyl chains can be introduced.[4] A homogeneous modification of cellulose can be realised in ionic liquids capable of solubilising cellulose.[5–7]

Parameters like degree of substitution (DS) and degree of polymerization (DP) are important to characterize the modified cellulose. The DS defines how many alcohol groups of cellulose are modified (n = 0–3). For thermoplastic applications of cellulose acetate, a DS of 2.5 is often applied because this

Institut für Technische Biochemie, Allmandring 31, Universtität Stuttgart, D-70569 Stuttgart, Germany. E-mail: bernhard.hauer@itb.uni-stuttgart.de

† Electronic supplementary information (ESI) available: Influence of temperature and time on the production of glucose laurates in [EMIM]OAc. IR-spectra of cellulose 2-ethylhexyloate, cellulose pivalate, and cellulose benzoate. See DOI: 10.1039/c6gc02005d

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

value allows thermoplastic processability. However, the desired DS is dependent on the particular applications of produced materials and thus a good synthesis should permit a huge variety of modifications. The, *e.g.*, heterogeneous process for cellulose acetate production is a multi-step process where cellulose is first fully acetylated (DS = 3) followed by a partial deacetylation step. A homogeneous synthesis protocol would allow an active DS adjustment by using different amounts of acyl donors.

The esterification of cellulose is usually carried out with highly reactive and corrosive carboxylic acid chlorides or anhydrides.[4] The usage of anhydrides leads to high conversion rates but large amounts of acyl donor react to yield undesirable carboxylic acid side products. In addition, especially long-chain fatty acid anhydrides are highly nonpolar, which results in a minor solubility and a reduced mass transfer in polar cellulose solvent systems. In the case of carboxylic acid chlorides, acid scavengers are needed to avoid accumulation of highly reactive hydrogen chloride.[8] Despite this, the usage of acetyl chloride in combination with some halogen containing ionic liquids leads to significant degradation of the cellulose backbone and the ionic liquid.[9] In this context, the ionic liquid [EMIM]OAc displays a halogen free alternative with a high cellulose dissolution capability. In addition, [EMIM]OAc is, in comparison with halogen containing ionic liquids, less toxic and even biodegradable.[10] [EMIM]OAc shows further benefits like non-volatility and a low melting point, but is, in this combination, not a complete inert solvent because it leads to a slight acetylation of 1.5 mol% of all cellulose hydroxy groups.[11]

Additionally, it was shown that the usage of anhydrides or chlorinated substrates as an acetylation agent led to the activation of the ionic liquid acetates and thereby to an increased acetylation of cellulose.[10,12] This effect hampers the control of the substitution pattern of cellulose in the environmentally friendly ionic liquid [EMIM]OAc and limits its industrial application.

To reduce the acetylation effect induced by acyl donors and catalysed by [EMIM]OAc, the usage of less reactive acyl donors is recommended. A promising alternative to anhydride or acyl chloride based syntheses is the transesterification of cellulose originating from vinyl esters. A homogeneous vinyl ester-based synthesis of cellulose ester was already applied in a DMSO/tetrabutylammonium fluoride (TBAF) system, yielding cellulose esters with a high DS.[13] As a significant drawback, the reaction suffers from long reaction times, up to days, and high substrate excess, necessary to accomplish high DS-values. In addition, the difficult recycling process of the DMSO/TBAF system and its flammability hamper industrial scale applications.[12]

Recently, a vinyl ester-based cellulose modification was carried out in a heterogeneous reaction system in DMSO with NaOH or KOH being used as catalysts. This cellulose ester process requires high substrate concentrations and is limited to short acyl chains of C_2 to C_4. However, due to low steric hindrance, synthesis was achieved in only five minutes.[14] In contrast to this heterogeneous process, the vinyl ester-based synthesis of starch acetate in alkaline ionic liquids like [BMIM]OAc was described to be homogeneous.[15] The catalytic property of some low molecular salts like acetates for transesterification forming starch acetates is a well-known principle.[16] The catalytic principle in the context of ionic liquids was first described by Shogren and Biswas and recently used for the synthesis of cellulose acetate in [EMIM]OAc based on isopropenyl acetate as the acyl donor.[15] This reaction was shown to proceed in minutes, but still high acyl donor concentrations are required.

In the present study, the first vinyl ester-based synthesis of cellulose derivatives in [EMIM]OAc is demonstrated. A variety of cellulose esters using long chain fatty acids, aromatic, branched and sterically challenging substrates, like pivalate, as acyl donors are accessible. This process leads to a high DS requiring a low amount of acyl donor, it ensures a constant high degree of polymerisation and allows significantly lower acetate activation in comparison with the anhydride based synthesis in [EMIM]OAc. Apart from these facts the vinyl ester-based synthesis shows benefits like high conversion rates, volatile side products, no need for acid scavengers, reusability of [EMIM]OAc, mild reaction conditions, low toxicity and biodegradable solvents.

Results and discussion

Vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc

As a model reaction for initial parameter optimisation, glucose laurates were synthesised based on vinyl esters in [EMIM]OAc and product identification was carried out by LC-MS/ESI analysis. The highest yields of glucose dilaurate, glucose trilaurate and glucose tetralaurate using 3 mol vinyl laurate per mol glucose were achieved after 4 hours at 60 °C (S1†). Longer reaction times and higher reaction temperatures resulted in a decrease in glucose laurate yield probably owing to unknown side reactions (S2†). In addition to glucose as a model substrate, the esterification of cellulose with different vinyl esters, especially vinyl laurate, in [EMIM]OAc was also investigated (Fig. 1). 3% w/w of cellulose, solubilised in [EMIM]OAc, was esterified with different amounts of vinyl laurate (2–5 mol per AGU) at 80 °C for 4 hours under continuous stirring. The cellulose laurates were analysed by FT-IR and showed specific cellulose laurate signals. In the range of 3200–3500 cm^{-1} O–H stretching, at 2852–2920 cm^{-1} CH_2 and CH_3 signals of the

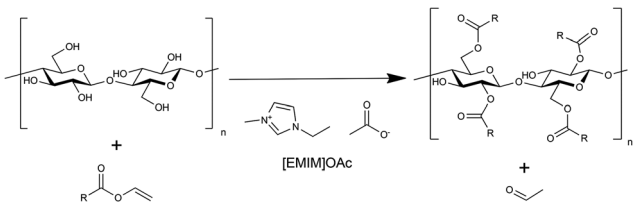


Fig. 1 Reaction scheme of vinyl ester-based cellulose esterification.

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

alkane chains, at 1740 cm^{-1} C=O stretching of ester groups and at 1049 cm^{-1} a further significant cellulose signal representing C–C, C–OH, C–H ring and side group vibrations of the cellulose backbone appear (S6†).[17] In addition, ^{1}H-NMR spectra confirm the formation of cellulose laurate with signals of the AGU at 3.5–5.5 ppm. Furthermore, shifts at 2.2–2.4 ppm induced by the protons of the α-carbon and shifts at 1.4–1.7 ppm caused by the β-carbon of the esterified laurate were observed (Fig. 2). Alkane protons of cellulose laurate shifted at 1.1–1.35 ppm and the terminal methyl group at 0.85–0.9 ppm (Fig. 2).

Equimolar concentration of acyl donor (3 mol per AGU) resulted in a DS of 2.4, representing a conversion of 80% of cellulose hydroxy groups. Increasing the amount of acyl donor to 4 mol per AGU led to a higher DS of 2.9, while a further increase of substrate to 5 mol per AGU did not result in a higher DS (Table 1). All produced cellulose laurates were soluble in [EMIM]OAc and product separation was achieved by the addition of water. In comparison with the DMSO/TBAF reaction system, based on 10 mol per AGU vinyl laurate to obtain a DS of 2.6, the present process with significantly lower acyl donor concentrations resulted in even higher DS-values.[13] Furthermore, the vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc is as efficient with regard to the amount of acyl donor as the synthesis using fatty acid chloride in [BMIM]Cl. For instance, it has been reported that 5 mol steroyl chloride per AGU led to DS values of 2.6.[8] In this case it has to be mentioned that a potentially higher steric hindrance in the case of a longer chain length (C_{18}) may cause a lower synthesis efficiency. For a better understanding we synthesised cellulose laurate in [BMIM]Cl at 80 °C using lauroyl chloride and achieved a DS-value of 2.3, showing comparable potency of vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc (DS 2.4) (Table 2). We further investigated the influence of the reaction temperature and time under equimolar reaction conditions. At reaction temperatures of 40–60 °C and 4 h reaction time the vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc created DS-values lower than 2.1. The highest DS in the range of 2.3 to 2.4 was achieved at 70 °C or 80 °C, respectively, while a further increase to 90 °C and 110 °C resulted in lower DS values in the range of 1.9 to 2.2 (Fig. 3). The temperature optimum between 70 °C and 80 °C differed from the previously investigated temperature optimum in the synthesis of glucose laurate synthesis at 60 °C (S1†). Those differences can be explained by a higher viscosity during the reaction, which can result in lower mass transfer rates of solutions of cellulose in [EMIM]OAc compared to glucose in [EMIM]OAc. The optimised reaction temperature of 80 °C has already been applied for the synthesis of cellulose esters using fatty acid chlorides.[8,9] The vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc could be carried out at lower temperatures between 40 °C and 50 °C, enabling even more mild reaction conditions. However, this requires a longer reaction time and/or a higher acyl donor concentration to achieve a comparable degree of esterification (Fig. 3). The influence of

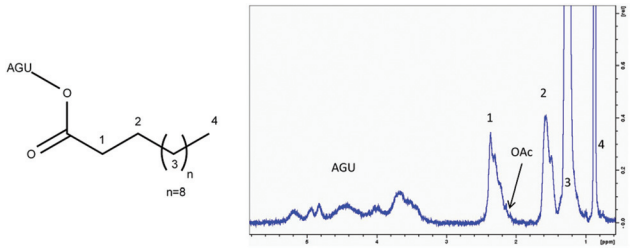


Fig. 2 Structure and corresponding ^{1}H-NMR of cellulose laurate. Cellulose laurate was synthesised in [EMIM]OAc using 3 mol per AGU vinyl laurate at 80 °C for 4 hours. Every peak is labeled to allow comparison with the structure drawn on the left side of the figure. The "OAc"-marked peak belongs to the α-carbon of additional bound acetate esters.

Table 1 Amount of acyl donor and DS of synthesised cellulose laurate at 80 °C after 4 hours reaction time in [EMIM]OAc

Product	Vinyl laurate [mol per AGU]	DS
Cellulose laurate	2	1.6
	3	2.4
	4	2.9
	5	2.8

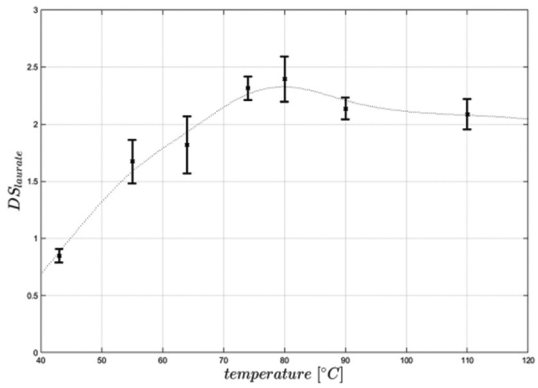


Fig. 3 Temperature dependence of cellulose laurate synthesis in [EMIM]OAc. Cellulose laurate was synthesised in [EMIM]OAc with a reaction time of 4 hours, using 3 mol per AGU vinyl laurate. The reaction was carried out in triplicate.

Table 2 Comparison of a vinyl ester- and a fatty acid chloride-based syntheses of cellulose laurate

Compound	Ionic liquid	Vinyl laurate [mol per AGU]	Temp. [°C]	Time [h]	DS	M_w [g mol^{-1}]	M_n [g mol^{-1}]
Vinyl laurate	[EMIM]OAc	3	80	4	2.4	280 368	89 936
Lauroyl chloride	[BMIM]Cl	3	80	2	2.3	8743	5630

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

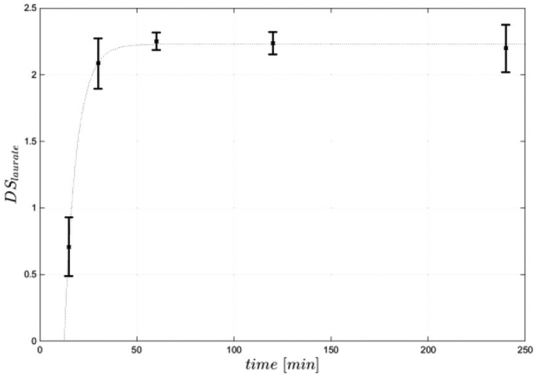


Fig. 4 Reaction kinetics of cellulose laurate synthesis at 80 °C. Cellulose laurate was synthesised in [EMIM]OAc using 3 mol per AGU vinyl laurate at 80 °C. The reaction lasted for 4 hours and at different time points samples were collected. The reaction was carried out in triplicate.

the reaction time was investigated at an optimum temperature of 80 °C. During the first 30 minutes, the reaction proceeded fast and led to a DS-value of 2.1. After 60 minutes, the reaction was finished and DS-values between 2.1 and 2.4 were measured. No further increase in the DS of cellulose laurate could be detected up to 4 hours (Fig. 4). The reaction was more than 10-fold faster compared to vinyl ester-based synthesis in DMSO/TBAF where a reaction time of 70 hours was needed.[13] We conclude that the reaction temperature and time have a great influence on the reaction speed and degree of substitutions of the produced cellulose ester.

Comparison with fatty acid chloride based synthesis routes

To demonstrate the differences of the present process and product quantification and qualification in comparison with the existing synthesis strategies, several experiments based on lauroyl chloride in [BMIM]Cl were carried out and compared to the vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc. For both synthesis strategies similar DS values were observed using equimolar acyl donor concentration (Table 2). We obtained a slightly higher DS value of lauroyl chloride modified cellulose than that described in the literature by Barthel and coworkers.[9] These data are more in accordance with results published by Huang *et al.*, where cellulose stearates with DS values of 2.6 in [BMIM]Cl were synthesised.[8] Those differences could be explained by different stirring conditions, causing different mass transfer behaviour. An important observation, besides comparable DS values discussed above, is the significant differences in molecular weight distributions between different synthesised cellulose derivatives. Relative to polystyrene standards, cellulose laurates synthesised using lauroyl chloride displayed a reduced molecular weight distribution. The number average molar mass (M_n) is about 15 times lower and the mass average molar mass (M_w) is actually 32 times lower compared to cellulose laurates synthesised from vinyl laurate (Table 2). It has to be mentioned that these values were calculated relative to polystyrene standards being, in comparison with cellulose laurate, non-dendritic polymers. This can lead to an inaccuracy in calculated values. Nevertheless, differences in molar mass distributions of various synthesised cellulose laurate derivatives with similar DS values in a magnitude of 15 to 32 are surprising and indicate that cellulose laurate synthesis in [BMIM]Cl with lauroyl chloride distinctly decreases the DP (Table 2). The degradation of the cellulose backbone with carboxylic acid chlorides has already been discussed in the literature.[8,18] In addition, the reduction of the degree of polymerisation has already been shown using acetyl chloride in the context with other halogen containing ionic liquids, such as 1-ethyl-3-methylimidazolium chloride ([EMIM]Cl).[9] This reduction may be caused by the formation of highly reactive hydrogen chloride or by reactive lauroyl chloride itself. We showed that the vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc resulted in a much higher DP. We assume that the non-acidic and volatile acetaldehyde is produced instead of highly reactive by-products (Fig. 1). Furthermore, the vinyl ester itself is less reactive in comparison with the carboxylic acid chloride causing gentler reaction conditions and thus a reduced depolymerisation of the cellulose backbone.

Acetylation of cellulose as an undesirable side reaction

Previous work demonstrated that the cellulose–[EMIM]OAc system undergoes different side reactions.[4] For instance, the acetylation of cellulose at low concentrations in [EMIM]OAc was reported in the absence of derivatising reagents. Even without any further basic catalyst, the imidazolium acetate containing ionic liquid can catalyse a deprotonation, which can lead to the formation of carbene species followed by a modification of reducing end-groups of cellulose. However, in the absence of an additional base the side reaction mentioned above is very slow and expires in days.[4] Another side reaction, which shifted into our focus, is the formation of mixed anhydrides after introducing chlorinated substrates or anhydrides into the synthetic approach, which results in increased acetylation of cellulose.[4,12] Furthermore it was reported that introducing propionic anhydride as an acyl donor, [EMIM]OAc catalyses the corresponding cellulose ester, but with a majority of acetylated hydroxy groups and only a small amount of propion esters.[12] The acetylation of cellulose in [EMIM]OAc was analysed by ^{1}H-NMR. The α-carbon of the cellulose laurate carbonyl group, synthesised with fatty acid chlorides in [BMIM]Cl, showed a chemical shift between 2.10 ppm and 2.50 ppm (Fig. 5). In contrast to cellulose esters with no additional acetylation, increased acetylation of the remaining and unmodified hydroxyl groups was obtained in [EMIM]OAc. This could be demonstrated by a second peak at 2.15 ppm, which refers to cellulose acetate methyl groups (Fig. 5). It is worth mentioning that the determination of the acetate degree of substitution ($DS_{acetate}$) by ^{1}H-NMR is not feasible for highly substituted long chain cellulose esters (C_8–C_{12}), because signals can hardly be separated. However, in the case of cellulose esters with a lower DS, peaks are separated in the corresponding ^{1}H-NMR spectra and thus the $DS_{acetate}$ can be calculated.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

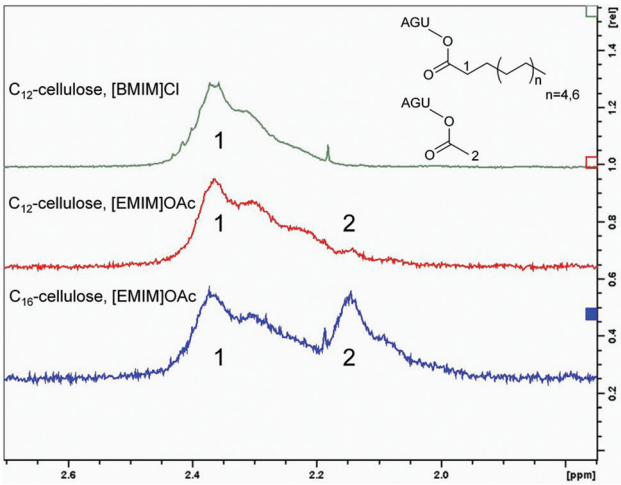


Fig. 5 Signals of the α-carbon of cellulose fatty acid ester and cellulose acetate in ^{1}H-NMR-spectra from different syntheses. The synthesis of cellulose laurate (C_{12}) was carried out in [BMIM]Cl using 3 mol per AGU lauroyl chloride and in [EMIM]OAc using 3 mol per AGU vinyl laurate. For the synthesis of cellulose palmitate in [EMIM]OAc 3 mol per AGU vinyl palmitate was used. The signal of the fatty acid ester α-carbon is indicated with 1, while the signal of the α-carbon of cellulose acetate is indicated with 2.

We compared the $DS_{acetate}$ after syntheses of cellulose laurates using lauroyl chloride, lauric anhydride and vinyl laurate in [EMIM]OAc. In accordance with the literature, we detected a majority of $DS_{acetate}$ towards $DS_{laurate}$ using lauroyl chloride and lauric anhydride, respectively.[10] The highly reactive lauroyl chlorides created 88.2% acetylation while lauric anhydride gave 83.3% acetylation of all substituted hydroxyl groups (DS_{total}) (Table 3). Vinyl laurate induced an acetylation of only 11.1%, which implies that the majority of 88.9% of all OH-groups is modified by the introduced acyl donor. These results show that the usage of vinyl esters allows a better control of the substitution pattern of cellulose in [EMIM]OAc in comparison with fatty acid chloride or anhydride based syntheses. In addition, the usage of fatty acid chlorides and anhydrides with equimolar substrate concentrations caused a significantly reduced $DS_{acyl\ donor}$ of 0.3 compared to the vinyl laurate synthesis, where the $DS_{acyl\ donor}$ is higher than 2.1. Furthermore, the amount of additional acetate groups varied not only between fatty acid chlorides, anhydrides and vinyl esters, but also different side chains resulted in differences in $\%\text{-}DS_{acetate}$. Esterification with sterically challenging and highly nonpolar vinyl palmitate gave a higher additional acetylation of 20.0%, while the application of shorter and less nonpolar vinyl laurate or vinyl octanoate resulted in significantly lower acetylation, of 11.1% and 6.3%, respectively (Fig. 5 and Table 3). In addition, a $\%\text{-}DS_{acetate}$ of 4.2% to 4.5% of cellulose was achieved using the shorter and less nonpolar vinyl pivalate and vinyl benzoate (Table 3). However, the moderate nonpolar but branched and sterically demanding vinyl 2-ethylhexyloate leads to a significantly smaller $DS_{acyl\ donor}$ of 0.9 and a combined elevated $\%\text{-}DS_{acetate}$ of 18.1% (Table 3). Such results suggest that polarity and steric properties have a great influence on additional acetylation.

Regarding the reaction time, it can be speculated that the activation of acetates in [EMIM]OAc using vinyl esters is much slower compared to anhydrides showing a reduced acetylation of cellulose. The acylation of cellulose with vinyl esters is faster compared to the undesirable activation of acetate. Decreasing the polarity of introduced vinyl esters resulted a low solubility as well as reduced mass transfer in polar [EMIM]OAc and therefore a slower reaction. Assuming that the vinyl ester-based acetate activation proceeds at the phase interface and is faster than the mass transfer of nonpolar acyl donor, an increased acetylation of the cellulose backbone, as observed, is consequential. For sterically demanding substrates like vinyl 2-ethylhexyloate, the acylation is hindered which supports acetylation. Apart from these assumptions, it can be pointed out that the vinyl ester-based synthesis allows a gentle modification of cellulose with a comparably low acetylation. Especially if unbranched, relatively polar vinyl esters are used, acetylation is limited to low $DS_{acetate}$ values.

Additional modes of functionalisation

Besides fatty acids, other functional groups were also tested to modify cellulose and to show the universal applicability of the developed vinyl ester-based cellulose modification. We synthesised cellulose benzoates with a $DS_{benzoate}$ of 2.3 and a $DS_{acetate}$ of 0.1. The corresponding IR-spectrum showed characteristic cellulose benzoate peaks at 1711 cm^{-1} (C=O in O=C–O–R), 1264 cm^{-1} (C–O in O=C–O–R), 3067 cm^{-1} (benzene ring C–H stretching), 1601 cm^{-1} and 1451 cm^{-1} (aromatic C=C) and 707 cm^{-1} for out of plane C–H bending of monosubstituted benzene (S5†). ^{1}H-NMR also confirmed the formation of cellulose benzoate at δ = 6.80–8.20 (phenyl protons, 5H) and

Table 3 Substitution pattern of various cellulose esters

Acyl donor	Acyl donor [mol per AGU]	$DS_{acyl\ donor}$	$DS_{acetate}$	DS_{total}	$\%\text{-}DS_{acetate}$ [%]
Vinyl octanoate (C_8)	2	1.5	0.1	1.6	6.3
Vinyl laurate (C_{12})	2	1.6	0.2	1.8	11.1
Vinyl palmitate (C_{16})	2	1.6	0.4	2.0	20.0
Vinyl benzoate	3	2.3	0.1	2.4	4.2
Vinyl pivalate	3	2.1	0.1	2.2	4.5
Vinyl 2-ethylhexyloate	3	0.9	0.2	1.1	18.1
Lauroyl chloride	3	0.04	0.3	0.34	88.2
Lauric anhydride	3	0.06	0.3	0.36	83.3

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

δ = 2.80–5.50 ppm (proton of cellulose backbone, 7H). In addition, a small signal at δ = 1.55–2.10 ppm appeared, which was considered to be the proton of the corresponding methyl group of acetate. In addition to cellulose benzoate, the sterically challenging cellulose pivalate with a $DS_{pivalate}$ of 2.1 and a $DS_{acetate}$ of 0.1 was synthesised using the corresponding vinyl esters (Table 3). The seven protons of the cellulose pivalate backbone gave ^{1}H-NMR signals at δ = 2.80–5.50 ppm, while the protons of methyl groups showed signals at δ = 1.30–0.90 ppm (9H) (Fig. 6A).[19] IR-spectrometry also confirmed the formation of cellulose pivalate and showed characteristic bands at 2972 cm^{-1} and 2875 cm^{-1} (C–H in CH_3 groups, stretching vibrations), at 1732 cm^{-1} (C═O in O═C–O–R), at 1461 cm^{-1} and 1481 cm^{-1} (C–H in CH_3, asymmetric deformation vibration), and at 1397 cm^{-1} and 1367 cm^{-1} (*t*-butyl groups) (S4†).[20]

The cellulose 2-ethylhexyloate with a $DS_{2\text{-ethylhexyloate}}$ of 0.9 and a $DS_{acetate}$ of 0.1 was also prepared. ^{1}H-NMR confirmed the formation of cellulose 2-ethylhexyloate. The two terminal methyl groups (ε,γ') displayed signals at δ = 0.95–0.70 ppm (6H), the protons of the γ- and δ-carbon of hexyl groups gave δ = 1.35–1.10 ppm (4H) and the protons of the β-carbon of the hexyl group and the β'-carbon of the ethyl side chain led to a peak at δ = 1.65–1.35 ppm (4H) (Fig. 6B). At δ = 2.10–1.85 ppm a signal from the α-carbon of the additional bound acetate appeared in the ^{1}H-NMR spectrum (Fig. 6B). The IR spectrum of cellulose 2-ethylhexyloate showed distinctive signals at 3500 cm^{-1} (O–H), signals between 2872 cm^{-1} and 2958 cm^{-1} (C–H) and a band at 1732 cm^{-1} (C═O in O═C–O–R) (S3†). The vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc enabled the gentle synthesis of a huge variety of cellulose esters with high and moderate degrees of substitution. The products were soluble in the ionic liquid and product separation was achieved by the addition of water. Not only fatty acid esters with different chain lengths, even aromatic, bulky and branched cellulose modifications were successfully synthesised.

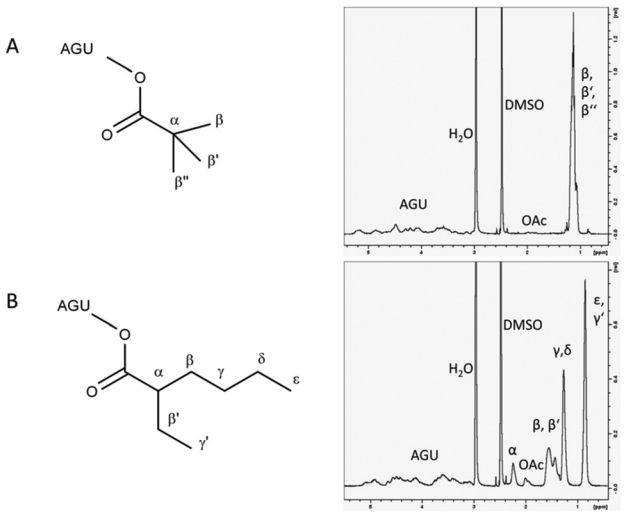


Fig. 6 Structure and ^{1}H-NMR of cellulose pivalate (A) and cellulose 2-ethylhexyloate (B). Cellulose pivalate and cellulose 2-ethylhexyloate were synthesised in [EMIM]OAc using 3 mol per AGU of the corresponding vinyl ester. The "OAc" peak belongs to the α-carbon of additional bound acetate esters.

Upscaling, product separation and IL reusability

To investigate the product separation and reusability of [EMIM]OAc, the novel synthesis was performed in a larger scale using 200 g of [EMIM]OAc, 4 mol vinyl laurate per AGU (34 g) and 3% w/w cellulose (6.2 g) at 80 °C (1. synthesis) (Table 4). The reaction was performed for 4 hours and quenched afterwards by the addition of 200 ml of water leading to immediate product precipitation followed by decantation to separate product and the ionic liquid/water mixture. The solid product was washed with methanol, and dried at 60 °C giving 18.8 g cellulose laurate with a $DS_{laurate}$ of 2.3 (Table 4). The degree of substitution is lower compared to syntheses, which were performed on a smaller scale (Table 1). Those differences might be explained as due to poor mixing in the used up-scaling equipment. To recover the ionic liquid out of the aqueous mixture, the system was heated up to 100 °C for 4 hours to evaporate the water. It was possible to recover 186 g of the ionic liquid, which represents a recycling efficiency of 93% (Table 5). After a repeated synthesis with a recycled ionic liquid (2. synthesis), using 5.8 g cellulose and 32 g vinyl laurate (Tables 4 and 5) a DS of 2.4, a product yield of 21 g and a recycling efficiency of 88% were obtained. Barthel and Heinze published a significantly smaller yield using lauroyl chloride where 0.35 g cellulose laurate (DS = 1.54) was obtained using 0.5 g cellulose and 2.14 ml lauroyl chloride.[9] The higher yield from the present synthesis might be explained by less depolymerisation of cellulose ester and a higher degree of substitution. In detail, a decreased degree of polymerization, induced by fatty acid chlorides, leads to a complex mixture of cellulose laurate oligomers and polymers,

Table 4 Mass balance and reusability

	Substrate		Product	
Synthesis	Vinyl laurate[b] [g]	Cellulose[a] [g]	$DS_{laurate}$	Cellulose laurate [g]
1. Synthesis	34	6.2	2.3	19
2. Synthesis (1. recycl.)	32	5.8	2.4	21
3. Synthesis (2. recycl.)	28	5.0	1.8	12
4. Synthesis (3. recycl.)	27	4.8	1.6	10

[a] Correlates with 3% w/w. [b] Correlates with 4 mol per AGU.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Table 5 Recycling efficiency

Reactor run	[EMIM]OAc input [g]	[EMIM]OAc recycled [g]	Recycling efficiency [%]
1. Synthesis	200	186	93
2. Synthesis (1. recycl.)	186	163	88
3. Synthesis (2. recycl.)	163	156	96
4. Synthesis (3. recycl.)	156	137	88

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

which complicate the downstream process (product recovery) and can negatively influence the mass balance of the whole process. Small oligomers of cellulose esters might be partial soluble in purification solvents like water and methanol and thus get washed out. In the following synthesis–recycling cycle (3. synthesis) the DS of produced cellulose laurate decreased to 1.8 and, after a further synthesis–recycling cycle (4. synthesis), to 1.6. Simultaneously, the amount of cellulose laurate obtained decreased to 12 g and 10 g, respectively (Table 4). A similar effect has already been observed for the phosphorylation of starch in 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM]Cl) where the obtained DS decreased from 0.55 to 0.45 within 5 recycling cycles.[21] The reduced DS can be caused by the loss of catalytic performance of the ionic liquid or can be explained by the formation of side products. Investigations to understand and prevent the mechanism of reduced synthesis efficiency after each recycling step have to be performed in further studies.

In general, the recycling of the ionic liquid is a key parameter for an ecologically friendly and economically feasible process. In that context, King *et al.* discussed the possibility of distilling [EMIM]OAc under special conditions, but they discussed this option very sceptically regarding the purity and corrosiveness of the recycled ionic liquid.[22] Therefore, evaporation strategies for ionic liquids seem inappropriate for [EMIM]OAc.

In our case we have chosen the often applied anti-solvent strategy where the addition of a solvent leads to product precipitation and enables separation.[9,23,24] Afterwards the evaporation of the volatile anti-solvent recovers the ionic liquid. The performed recycling experiments using water as an anti-solvent demonstrate a recycling efficiency of about 90%. In contrast to the synthesis efficiency, the recycling efficiency is not hampered by each recycling step. In addition, the ability of the ionic liquid to solubilize cellulose is not negatively affected. The usage of other anti-solvents like ethanol or acetone might be cost saving alternatives due to lower boiling points[24] but these solvents enhance the hazardousness of the process due to their flammability. The loss of about 10% w/w ionic liquid can be explained by the residual ionic liquid, which remained in the crude product after the water induced precipitation and was washed out during the methanol purification step.

Experimental

Materials

The utilized α-cellulose, vinyl laurate, vinyl pivalate, vinyl benzoate, trifluoroacetic acid-*d* (*d*-TFA), lauroyl chloride and chloroform-*d* ($CDCl_3$) were purchased by Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany. Vinyl octanoate, vinyl 2-ethylhexyloate, vinyl palmitate and lauric anhydride were obtained from TCI-Deutschland GmbH, Eschborn, Germany.

[BMIM]Cl and [EMIM]OAc were received from IoLiTec-Ionic Liquids Technologies GmbH, Heilbronn, Germany. ReadyCal-Kit Poly(styrene) Mp 474–2 520 000 Da and gel permeation column SDV, linear M 10 μM, 8 × 300 mm were purchased from Polymer Standard Service GmbH, Mainz, Germany. DMSO-d_6 was purchased from Euriso-Top GmbH, Saarbrücken, Germany.

Measurements

The DS of cellulose ester was analysed by ^{1}H-NMR on a 500 MHz NMR-spectrometer (Bruker, Avance 500) in $CDCl_3$, or a mixture of $CDCl_3$ and dimethyl sulfoxide-d_6 depending on the solubility of the particular modified cellulose. Those polymers, which were soluble in pure DMSO-d_6, were analysed at 100 °C on a 700 MHz NMR-spectrometer (Bruker, Ascend). 10 μg μl^{-1} cellulose ester was solubilised in the corresponding NMR-solvent. 1.67% of trifluoroacetic acid (*d*-TFA) was added to shift hydroxyl protons of cellulose or residual water signals into a region of non-interest or to deuterate hydroxy groups as reported previously.[25,26] The $DS_{\text{fatty acid}}$ of cellulose octanoate, -laurate and -palmitate was calculated from the ^{1}H-NMR spectrum from the integral of the terminal methyl groups (I_{methyl}) at 0.85–0.90 ppm and the area of the AGU signals (I_{AGU}) at 3.50–5.50 ppm according to:

$$DS_{\text{fatty acid}} = \frac{I_{\text{methyl}} \times 7}{I_{\text{AGU}} \times 3}$$

In the case of cellulose 2-ethylhexyloate the integral of the two terminal methyl groups ($I_{2\text{methyl}}$) at 0.78–0.92 ppm, for cellulose pivalate the integral of the three terminal methyl groups ($I_{3\text{methyl}}$) at 0.90–1.35 ppm and for cellulose benzoate the area of the phenyl protons (I_{phenyl}) at 6.90–8.10 ppm were used to determine the corresponding DS-values consistent with the following equations:

$$DS_{\text{pivalate}} = \frac{I_{3\text{methyl}} \times 7}{I_{\text{AGU}} \times 9}$$

$$DS_{\text{2-ethylhexyloate}} = \frac{I_{2\text{methyl}} \times 7}{I_{\text{AGU}} \times 6}$$

$$DS_{\text{benzoate}} = \frac{I_{\text{phenyl}} \times 7}{I_{\text{AGU}} \times 3}$$

For cellulose pivalate, ethylhexyloate, benzoate and for low to medium substituted cellulose fatty acid esters also the

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

$DS_{acetate}$ was calculated by using the area of the acetate methyl groups ($I_{acetate}$) at 1.85–2.07 ppm in relation to the integral of AGU (I_{AGU}) at 3.50–5.50 ppm according to the equation:

$$DS_{acetate} = \frac{I_{acetate} \times 7}{I_{AGU} \times 3}$$

The FT-IR spectra were recorded with a FT-IR spectrometer (Bruker, Vector 22, equipped with a MKII golden gate single reflection diamond ATR-system).

Gel permeation chromatography was performed using an Agilent Technology 1260 Infinity ELSD-HPLC system (Agilent, Santa Clara, USA) using a SDV, linear M 10 μM, 8 × 300 mm, column. The flow rate and temperature were 1.5 mL min^{-1} and 40 °C. THF was used as the eluent and the solvent for cellulose ester dissolution. The method stayed isocratic for 10 minutes. For molecular weight calibration, ReadyCal-Kit Poly(styrene) Mp 474–2 520 000 Da from PSS (Mainz, Germany) was used. The calculation of molecular weight distribution (M_w, M_n) was carried out using Agilent Cirrus GPC multi detector software.

Glucose laurates (mono-, di-, tri-, tetra-) were separated using an Agilent Eclipse XDP (CN-column, 150 × 4.6 mm, 5 μm). The flow rate and temperature were 0.8 mL min^{-1} and 35 °C. The method is isocratic at 5% ACN and 95% water (0.1% v/v formic acid) for the first 3 minutes. Afterwards an ACN–water (0.1% v/v formic acid) gradient increased from 3% ACN to 98% ACN in 15 minutes and stayed isocratic for 5 minutes. Glucose laurates were analysed by HPLC-ELSD (Agilent Technology 1260 Infinity HPLC-ELSD system) and identified by HPLC-MS (Agilent Technologies 6130 Quadrupole MS). The LC-MS was operated in API-ES mode under the following conditions: drying gas flow 10 L min^{-1}, nebuliser 40 psig, drying gas temperature 300 °C, and +/− Vcap 3000. The system was used in positive and negative scan modes with a fragmentor voltage of 70 eV to cover values between m/z 100 and 1500. The ELSD was operated at a nebuliser temperature of 90 °C, an evaporator temperature of 40 °C and a gas flow of 1 SLM. Quantification of glucose laurates was performed by using the peak area of the detector response because no standard of glucose laurates was available.

Acetylation of glucose in [EMIM]OAc

Glucose was solubilised in [EMIM]OAc to receive 350 mg of a 0.83 mmol mg^{-1} solution. For investigations regarding the temperature dependency of the reaction, 2 mol vinyl laurate per mol glucose was added to the solution and shaken in an Eppendorf thermomixer comfort at 600 rpm at different temperatures between 40 and 90 °C for 22 hours. In addition, the time kinetics of the reaction was analysed using 3 mol vinyl laurate per mol glucose at 60 °C. Afterwards the samples were diluted by a factor of 4 with acetonitrile and analysed by HPLC.

Acylation of cellulose in [EMIM]OAc

Dissolving of 3% w/w cellulose was achieved in [EMIM]OAc at 80 °C and mixed with a KPG-stirrer up to 12 h to accomplish complete dissolution. The reaction was started by the addition of 3 mol vinyl ester, lauric anhydride, or lauroyl chloride per AGU and mixed for 4 hours at 80 °C. 1 mL samples were taken at different time points and cooled to 4 °C. The polymer was separated from the ionic liquid by the addition of 50% w/w water followed by centrifugation. The supernatant was discarded and the cellulose pellet was washed with an excess amount of methanol and subsequently dried at 60 °C. The amount of introduced vinyl esters (2–5 mol per AGU) and the reaction temperature (40–110 °C) were varied systematically to investigate their influence. In the case of cellulose 2-ethylhexyloate and cellulose pivalate, the product was dissolved in methanol and precipitated with an excess amount of water and then dried by lyophilisation for 14 hours.

Upscaling and reusability

The upscaling was performed similarly to a described standard protocol, but using higher amounts of educts, solvents and a 1 litre reaction flask (Table 4). After the addition of water the product was separated from the ionic liquid/water mixture by filtration. The ionic liquid was recycled by evaporating the water from the ionic liquid/aqueous mixture at 100 °C for 4 hours. The recycled ionic liquid was weighed and reused for an additional synthesis.

Acylation of cellulose in [BMIM]Cl

The acylation of cellulose in [BMIM]Cl was carried out according to Barthel and Heinze,[9] but using a KPG-stirrer to assure sufficient stirring of the highly viscous cellulose solution.

Conclusions and outlook

In this study we developed a process that allows for the first time the synthesis of a variety of cellulose esters using the minor toxic and biodegradable ionic liquid [EMIM]OAc. The described synthetic strategy represents a new approach for homogeneous and gentle production of cellulose esters with a sensitive control over substitution pattern with even sterically demanding nonpolar side chains. In contrast to the fatty acid chloride based syntheses in halogen containing ionic liquids, the novel vinyl ester-based synthesis in [EMIM]OAc leads to a much higher DP. The acetylating character of [EMIM]OAc towards cellulose is significantly lower using vinyl esters in contrast to anhydrides or chlorinated acyl donors and allows a better regulation of the substitution pattern of cellulose. A variety, like branched and bulky side chains, fatty acids of C_8–C_{16} chain length and aromatic groups, can be introduced into the cellulose backbone. The ionic liquid [EMIM]OAc was recycled with an efficiency of about 90% and reused for three additional synthesis–recycling cycles. Investigations towards further upscaling and additional recycling studies of this reaction to examine the commercial applicability of the process will be carried out and may enable the implementation of a new homogeneous environmentally friendly modification of cellulose. These efforts will possibly

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2016

Open Access Article. Published on 15 August 2016. Downloaded on 24/10/2017 06:02:18.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported Licence.

attenuate the dependence of our society on fossil fuels for the synthesis of different kinds of polymeric materials.

Acknowledgements

We would like to thank the Bundesministerium für Bildung und Forschung for the funding within the framework of Cluster Bioindustrie 2021.

References

1 A. Pinkert, K. N. Marsh, S. Pang and M. P. Staiger, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 6712–6728.
2 T. Liebert, *Cellulose Solvents – Remarkable History, Bright Future*, ACS Symposium Series, Washington, DC, 2010, vol. 1033.
3 J. Zhang, J. Wu, Y. Cao, S. Sang, J. Zhang and J. He, *Cellulose*, 2008, **16**, 299–308.
4 M. Gericke, P. Fardim and T. Heinze, *Molecules*, 2012, **17**, 7458–7502.
5 R. P. Swatloski, S. K. Spear, J. D. Holbrey and R. D. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4974–4975.
6 R. P. Swatloski, R. D. Rogers and J. D. Holbrey, Univ. Alabama, *US* 6824599, 2004, 2.
7 T. Liebert and T. Heinze, *BioResources*, 2008, **3**, 576–601.
8 K. Huang, J. Xia, M. Li, J. Lian, X. Yang and G. Lin, *Carbohydr. Polym.*, 2011, **83**, 1631–1635.
9 S. Barthel and T. Heinze, *Green Chem.*, 2006, **8**, 301–306.
10 S. Köhler, T. Liebert, M. Schöbitz, J. Schaller, F. Meister, W. Günther and T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.*, 2007, **28**, 2311–2317.
11 S. K. Karatzos, L. A. Edye and R. M. Wellard, *Cellulose*, 2011, **19**, 307–312.
12 S. Dorn, *Jena*, Univ., Diss., 2009.
13 T. Heinze, R. Dicke, A. Koschella, A. H. Kull, E.-A. Klohr and W. Koch, *Macromol. Chem. Phys.*, 2000, **201**, 627–631.
14 X. Cao, S. Sun, X. Peng and L. Zhong, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 2489–2495.
15 R. L. Shogren and A. Biswas, *Carbohydr. Polym.*, 2010, **81**, 149–151.
16 R. Dicke, *Cellulose*, 2004, **11**, 255–263.
17 M. Fan, D. Dai and B. Huang, *Fourier transform infrared spectroscopy for natural fibres*, InTech, 2012.
18 M. C. V. Nagel and T. Heinze, *Polym. Bull.*, 2010, **65**, 873–881.
19 D. Xu, B. Li, C. Tate and K. J. Edgar, *Cellulose*, 2010, **18**, 405–419.
20 M. Hesse, H. Meier and B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 2005, vol. 2.
21 W. Xie and L. Shao, *Starch/Staerke*, 2009, **61**, 702–708.
22 A. W. T. King, J. Asikkala, I. Mutikainen, P. Järvi and I. Kilpeläinen, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 6301–6305.
23 K. Shill, S. Padmanabhan, Q. Xin, J. M. Prausnitz, D. S. Clark and H. W. Blanch, *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, **108**, 511–520.
24 J. Shi, K. Balamurugan, R. Parthasarathi, N. Sathitsuksanoh, S. Zhang, V. Stavila, V. Subramanian, B. A. Simmons and S. Singh, *Green Chem.*, 2014, **16**, 3830.
25 C. Buchanan, K. Edgar, J. Hyatt and A. Wilson, *Macromolecules*, 1991, **24**, 3050–3059.
26 G. Samaranayake and W. G. Glasser, *Carbohydr. Polym.*, 1993, **22**, 79–86.