

Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Biotechnologie

Diplom 2008

Pascal Wyden

*Telomerisation
von Poly-N-isopropylacrylamide
mit β -Glukosidase
und Bestimmung
der enzymatischen Aktivität*



Confidentiel / Vertraulich

☐ oui / ja ☒ non / nein

| | | |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> FSI <input checked="" type="checkbox"/> FTV | Année académique / Studienjahr 2007/2008 | No PS / Nr. PS bt/2008/64 |
| Mandant / Auftraggeber <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte | Etudiant / Student Pascal Wyden | Lieu d'exécution / Ausführungsort <input checked="" type="checkbox"/> HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Ecole hôte |
| Professeur / Dozent Fabian Fischer | Expert / Experte (données complètes) Andreas Layer | |

Titre / Titel

**Telomerisation von Glucosidase
 und Bestimmung der enzymatischen Aktivität**

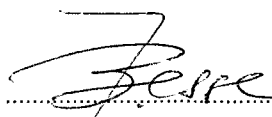
Description et Objectifs / Beschreibung und Ziele

Die Immobilisierung von Glucosidase mit Polyacrylamiden wird entwickelt und das Derivat getestet. Zum Einsatz gelangt ein Polymer mit thermoresponsiven Eigenschaften. Die Derivatisierung erfolgt an den Thiofunktionen des Enzyms mit einer als Telomerisation bekannten Technologie. Es handelt sich um eine radikalische Polymerisation, welche sich insbesondere für biologische Systeme eignet.

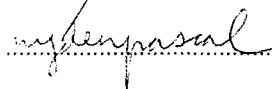
- Immobilisierung einer β -Glucosidase nach bestehendem und modifiziertem Protokoll. NMR der durch Dialyse gereinigten Probe, LCST Messung, Mikroskopie, Bradford-Bestimmung der Proteinmenge, SDS-PAGE der Derivate.
- Aktivitätsmessung der immobilisierten β -Glucosidase in wässrigem Milieu und in Ionischen Flüssigkeiten.
- Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Glucose, Cellobiose und Glucosidase in Ionischen Flüssigkeiten.
- Recycling der immobilisierten Glucosidase mit Hilfe des Lower Critical Solution Temperature Prinzips.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

 Resp. de filière
 Studiengangleiter:



Etudiant/Student:



Délais / Termine

 Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
 01.09.2008

 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
 30.01.2009 — 12.00

 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
 28.11.2008

 Défense orale / Mündliche Verfechtung: ¹
 semaine/Woche 7

Télomérisation de Poly-N-isopropylacrylamide avec β -glucosidase et détermination de l'activité enzymatique

Objectif Télomériser du Isoprylacrylamide avec de la β -glucosidase et isoler cette structure. La caractériser par des méthodes analytiques. Constater l'activité du dérivat formé, avant et après recyclage par une méthode établie. Déterminer la répartition du substrat cellobiose, de l'enzyme β -glucosidase et du produit glucose dans des mélanges liquide ionique/phase aqueuse

Résultats Le dérivat isolé et caractérisé par chromatographie d'exclusion de taille indique une part de β -glucosidase de 25-90% (m/m). Celle-ci est déterminée à 15 % par ^1H -NMR. Le reste est du PNIPAM lié à l'enzyme ou du PNIPAM non-lié. La spectroscopie FTIR prouve la présence de thioether, qui lie théoriquement l'enzyme au polymère. La microscopie électronique montre une structure liant boules et bâtonnets, ce qui conforte la réussite de la télomérisation. L'activité de l'enzyme dérivatisé est deux à huitante fois plus petite que pour l'enzyme libre. Cette activité chute régulièrement à chaque réutilisation et s'annule après la 4^e ou 5^e fois.

Le substrat, l'enzyme et le produit se répartissent presque autant dans la phase aqueuse et le liquide ionique.

Mots-clés β -glucosidase, β -glucosidase dérivatisée, PNIPAM, liquide ionique, LCST

Telomerisation von Poly-N-Isopropylacrylamide mit β -Glukosidase und Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Ziel Isoprylacrylamid mit β -Glukosidase telomerisieren und isolieren. Diese Struktur durch analytische Methoden charakterisieren. Die Aktivität dieses Derivats feststellen, vor und nach einer entwickelten Rezyklierungsmethode. Die Verteilung vom Substrat Cellobiose, vom Enzym β -Glukosidase und vom Produkt Glukose in ionischer Flüssigkeit/wässrige Phase Gemische bestimmen.

Resultate Das durch Size exclusion chromatography isolierte Derivat weist auf einen Anteil an reiner β -Glukosidase von 25-90% (m/m), ^1H -NMR Messungen ergeben 15%. Der Rest ist am Enzym gebundenes PNIPAM, möglicherweise auch ungebundenes PNIPAM. FTIR-Spektroskopie bestätigt die Präsenz von Thioeter, welch β -Glukosidase mit PNIPAM verbindet. Elektronen Mikroskopie zeigt eine Struktur, wo Stäbchen mit Kugeln verbunden sind, was dem Derivat entsprechen könnte. Die Aktivität der derivatisierten β -Glukosidase ist zwei bis achtzig mal kleiner als für reines Enzym. Nach Rezyklierung sinkt die Aktivität regelmässig, nach 4-5 Wiederverwendungen ist keine Aktivität mehr nachzuweisen. Substrat, Enzym und Produkt verteilen sich fast regelmässig in wässrige Phase wie in ionische Flüssigkeit.

Schlüsselwörter β -Glukosidase, derivatisierte β -Glukosidase, PNIPAM, ionische Flüssigkeit, LCST

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINFÜHRUNG | 4 |
| 2 | PRODUKTE UND MATERIAL | 8 |
| 2.1 | Produkte | 8 |
| 2.2 | Material | 13 |
| 3 | METHODEN | 14 |
| 3.1 | Derivatisieren des Enzyms β-Glukosidase | 14 |
| 3.1.1 | Telomerisationsreaktion | 14 |
| 3.1.2 | Isolierung des derivatisierten Enzyms | 14 |
| 3.1.3 | Dialyse und Lyophilisation | 14 |
| 3.1.4 | Size exclusion Chromatographie | 14 |
| 3.1.5 | Aktivitätsmessung | 15 |
| 3.1.6 | Rezyklieren des derivatisierten Enzyms | 16 |
| 3.2 | Charakterisierung des derivatisierten Enzyms | 17 |
| 3.2.1 | LCST Bestimmung | 17 |
| 3.2.2 | Thiol Gruppen Bestimmung | 17 |
| 3.2.3 | SDS-PAGE | 18 |
| 3.2.4 | ^1H -NMR | 20 |
| 3.2.5 | Infrarot Spektroskopie-FTIR | 21 |
| 3.2.6 | Maldi-Tof-MS | 21 |
| 3.2.7 | Elektronen Mikroskopie | 21 |
| 3.3 | Handlungen in ionischen Flüssigkeiten | 22 |
| 3.3.1 | Messung der Verteilungskoeffizienten von Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase in [BMIM][PF ₆]/Natrium Azetat Puffer | 22 |
| 3.3.2 | Messung der Verteilungskoeffizienten Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase in [BDMIM][PF ₆]/NatriumAzetat Puffer | 22 |
| 3.3.3 | Verteilung von derivatisierter β -Glukosidase und von PNIPAM in [BDMIM][PF ₆] und [BMIM][PF ₆]. | 23 |
| 3.3.4 | Karl Fischer Titration zur Bestimmung der Mischbarkeit von H ₂ O mit [BDMIM][PF ₆] und [BMIM][PF ₆] | 23 |
| 4 | RESULTATE | 24 |
| 4.1 | Derivatisierung von β-Glukosidase | 24 |
| 4.1.1 | Telomerisierungsreaktion | 24 |
| 4.1.2 | Isolierung der derivatisierten β -Glukosidase: Size exclusion Chromatographie | 26 |
| 4.1.3 | Messung der Aktivitäten von derivatisierter und nicht-derivatisierter β -Glukosidase, und von rezyklierter derivatisierter β -Glukosidase | 28 |
| 4.2 | Charakterisierung des derivatisierten Enzyms | 30 |
| 4.2.1 | LCST Messung | 30 |
| 4.2.2 | Thiol Gruppen Bestimmung | 30 |
| 4.2.3 | SDS-PAGE | 32 |
| 4.2.4 | ^1H -NMR | 35 |
| 4.2.5 | Infrarot Spektroskopie-FTIR | 38 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2.6 | Maldi-Tof-MS | 42 |
| 4.2.7 | Elektronen Mikroskopie | 43 |
| 4.3 | Handlungen in ionischen Flüssigkeiten | 47 |
| 4.3.1 | Messung der Verteilungskoeffizienten Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase im Zweiphasigen System [BMIM][PF ₆]/Natrium-Azetat Puffer | 47 |
| 4.3.2 | Messung der Verteilungskoeffizienten Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase im Zweiphasigen System [BDMIM][PF ₆]/NatriumAzetat Puffer | 48 |
| 4.3.3 | Verteilung von telomerisierter β -Glukosidase und von PNIPAM in [BDMIM][PF ₆] und [BMIM][PF ₆].50 | 50 |
| 4.3.4 | Karl Fischer Titration zur Bestimmung der Mischbarkeit von H ₂ O mit [BDMIM][PF ₆] und [BMIM][PF ₆] | 51 |
| 5 | DISKUSSION | 52 |
| 6 | SCHLUSS UND FOLGERUNG | 55 |
| 7 | BIBLIOGRAPHIE | 57 |
| 8 | ANHANG | 58 |

1 Einführung

Plurizelluläre Organismen produzieren im Zellinnern Aminosäure-Stränge (Fig.1) die sich zusammenfalten und so anordnen dass sie eine charakteristische Konformation einnehmen. Das gebildete Biopolymer ist ein Protein, welches durch seine Konformation und zugeteilten Aktiven Stellen eine ganz bestimmte Funktion durchführen wird. Manche Proteine dienen der Signal-Übertragung zwischen benachbarten Zellen. Andere Proteine sind wichtige Bestandteile des Zytoskeletts, des Bindegewebes, der Schale, des Knorpels, des Haars, der Nägel, der Federn, der Hufe, usf. Eine letzte Gruppe Proteine, die sogenannten Enzyme, beschleunigen Reaktionen indem sie deren Aktivierungsenergien senken. Essentielle Proteine sind diejenigen die ein Organismus zum überleben braucht, ohne sie selbst zu synthetisieren; sie müssen deshalb aufgenommen werden.



Fig.1: Die Kondensation zwischen zwei Aminosäuren führt zur Bildung einer Peptid Bindung

Im täglichen Leben sind Polymere, die meist synthetisch hergestellt sind, und unentbehrlich zu scheinen vermögen, häufig vertreten. Darunter gibt es zum Beispiel Bakelite, Neoprene, Nylon, PVC, Polystyrene, Polyacrylonitril, PVB, Silikon. Neuerdings werden Kombinationen von Enzymen und synthetischen Polymeren getestet, die kovalent miteinander verbunden sein sollen. Ein Zweck dafür ist die theoretisch vereinfachte Isolierung im Sinne einer Wiederverwendung. Diese Rezyklierung wird durch das Koagulationsvermögen des Polymers bei Erhöhung der Temperatur über den LCST hervorgerufen.

Sogenannte intelligente oder smarte Polymere sind Reiz- und Umgebungsempfindlich. Eingesetzt werden sie für Bioseparationen, in Medikamente, in künstlichen Muskeln, in homogenen Katalysen, in optische switches und sogar in Malfarben. Diese Polymere ändern ihre Löslichkeit und Benetzbarkeit bei pH und Temperatur-Änderungen, bei Bestrahlung sowie bei Zugabe eines Elektrolyts oder eines spezifischen Moleküls. Bei Anwendung dieser Technologie an Medikamenten werden Wirkstoffe erst bei bestimmten Temperatur- und pH- Bedingungen freigesetzt, was eine gezielte Dosierung im Körper ermöglichen kann. [1]

Bei Bioseparationen wird das Koagulationsvermögen dieser Polymere benutzt, das zu separierende Molekül wird darin eingefangen. Nach Zentrifugation wird das Zielmolekül isoliert. Poly-N-isopropylacrylamid (PNIPAM) ist eines der meist studierten Polymere aufgrund der sich im physiologischen Bereich befindenden tieferen kritischen Lösungstemperatur (LCST). Dieser Wert liegt bei PNIPAM in wässriger Lösung bei 32-34°C, über dem LCST wirkt PNIPAM hydrophob und koagulierte, unter dem LCST ist es im Wasser gelöst. Bisher führten Polymerisierungen zu heterogenen Polymeren. Kontrollierte radikalische

Polymerisierungen die die Struktur und die Masse der synthetisierten Polymere regulieren lassen werden erforscht. Eine dieser Technik ist die Telomerisation, wo die Länge der Polymere mit der Reaktionszeitverlängerung grösser wird, solange freie Monomere vorhanden sind. Diese Reaktion, auch radikalische Kettenübertragung Polymerisierung genannt, benötigt einen Regulator (Kettenübertragungsmittel), meistens ein Merkaptan wie Merkaptopropionische Säure. Im Fall der Derivatisierung vom Enzym β -Glukosidase ist das Enzym der Regulator. [1]

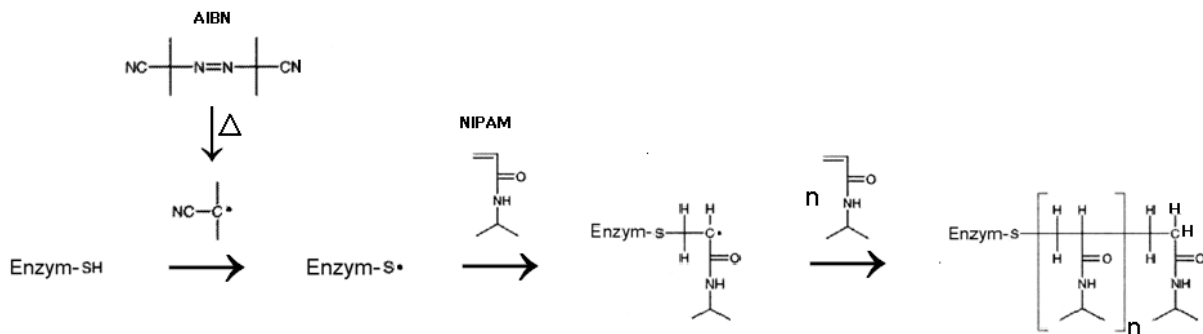


Fig.2: Radikalische Kettenübertragung: Polymerisierung von NIPAM an der Thiol Gruppe der Cystein Aminosäure eines Enzyms

Bei der Anwendung von Medikamenten wo Polymere mit pharmazeutischen Wirkstoffen verbunden sind, sind Temperatur und pH des Umfelds von erster Bedeutung. [2], [3]

Bei dieser Arbeit ging es darum, das Monomer NIPAM an die freien Thiol Gruppen die sich vermutlich an der Oberfläche des Enzyms befinden zu binden und polymerisieren lassen (Fig.2). Die Polymerisierung von NIPAM auf β -Glukosidase beginnt mit der Radikalisierung von AIBN bei 50°C, diese radikalische Gruppe greift die Thiol Gruppe des Enzyms an, Schwefel wird dann selbst zur radikalischen Gruppe. In Anwesenheit von NIPAM Monomer reagiert der Schwefel radikalisch mit der Olefin-Gruppe des Monomers, unter Verschiebung des Radikals, wo wiederum ein Monomer dazu gebunden wird, usw. Es bildet sich also ein Polymer am Enzym, was als Telomerisierung von NIPAM an β -Glukosidase bezeichnet wird.

Ob und in wie fern die Aktivität des Enzyms durch diese Derivatisierung beeinflusst wird ist natürlich von erster Bedeutung, sie wird durch den Abbau vom Substrat Cellobiose zum Produkt Glukose bestimmt. Dabei wird die Glukose-Konzentration mittels HPLC quantifiziert und die Menge an Enzym und die Reaktionszeit in betracht genommen.

Durch frühere Experimente wurden ideale Bedingungen zur Arbeit mit β -Glukosidase etabliert. Natriumacetat-Puffer 0.1M mit pH 4.8 eignet sich bestens dafür, das Enzym in optimalem Zustand aufzubewahren. Die Reaktionstemperatur von 50°C ergibt eine maximale Aktivität. Der maximale Betrag an gebildeter Glukose pro Zeiteinheit wird nach 30 Minuten Reaktionszeit erreicht. Das derivatisierte Enzym kann 5 mal wiederverwendet werden, jedoch sinkt die Aktivität nach jedem Rezyklierungsprozess. [4],[5]

Bevor die Aktivität vom derivatisierten Enzym gemessen wird muss dieses zuerst isoliert und charakterisiert werden, dies um sicherzustellen, dass die Telomerisierung wirklich stattfand.

Der Ellman Test (Fig.3), der die Anzahl an freien Thiol Gruppen auf dem Enzym bestimmt, gibt den Hinweis ob diese nach Telomerisationsreaktion vom Polymer besetzt sind oder nicht. [6], [7], [8].

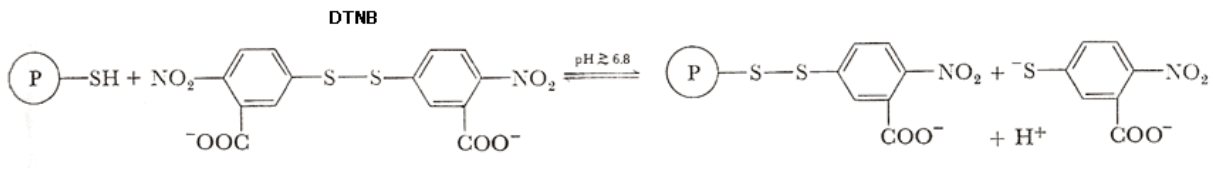


Fig.3: Ellman Test: DTNB reagiert mit den Thiol Gruppen des Proteins, die Absorbanz des resultierenden gelben Farbstoffs wird bei 412 nm gemessen (Spektrometer UV-VIS), sie ist proportional zur Anzahl Thiol Gruppen

Die Aminosäure Sequenzen von verschiedenen β -Glukosidasen beinhalten zwischen 2 und 8 Cystein pro Protein und sind im Anhang A wiedergegeben welcher mittels der Universal Protein Resource Databasis erstellt wurde. [9]

Zur Isolierung des Derivats wird die erhaltene Telomerisationslösung dialysiert, wobei Moleküle die eine grössere Masse haben als den MWCO der zur Dialyse verwendeten semipermeablen schlauchigen Membran bleiben darin gefangen. Dies ermöglicht die Trennung der Proteine von üblichen kleineren Partikeln wie Salze des Puffers, freie NIPAM Monomere oder sogar gebildete aber mit dem Enzym nicht gebundene PNIPAM Polymere. Das Dialysat wird dann lyophilisiert, d.h. zuerst eingefroren, dann wird unter Vakuum Wasser entzogen. Dieser Vorgang wird auch Gefriertrocknung genannt. Das Lyophilisat enthält das gewünschte Derivat, aber vermutlich auch noch Enzym das nicht derivatisiert wurde. Um diese zu trennen wird die chromatographische size exclusion (SEC) Methode angewendet, die Moleküle mit verschiedenen Molekularmassen eluieren mit verschiedenen Elutionszeiten. Je grösser die Masse eines Moleküls, desto schneller eluiert es, weil es kaum von den Poren der stationären Phase der Kolonne aufgehalten wird. Um zwei Moleküle mit fast gleichen Massen zu trennen, müssen zuerst deren Elutionszeiten bestimmt werden, indem das in Natrium Azid verdünnte Lyophilisat durch SEC charakterisiert wird. Wenn diese Zeiten einmal bekannt sind, kann der Fluss der aus der Infrarot Messzelle kommt während der zur Zielprotein gehörenden Zeitspanne abgezweigt und gesammelt werden. Die eigentliche Isolierung der **telomerisierten β -Glukosidase** erfolgt nach Lyophilisieren der bei SEC gewonnenen wässrigen Fraktion. Dieses isolierte, vermutlich reine Derivat wird zur Aktivitätsmessung benutzt. Zur Charakterisierung des erhaltenen Derivats werden verschiedene Methoden angewendet, wie $^1\text{H-NMR}$ (Proton Nuclear Magnetic Resonance), FTIR (Fourier transform infrared spectrometry), Maldi-Tof (Matrix Assisted Laser Desorption /Ionization-Time of Flight) und Elektronen Mikroskopie. [10]

Mittels SEC kann die Grösse des Derivats berechnet werden, nachdem zuerst eine Kalibrierungsgerade mit bekannten Proteinen verschiedener Molekularmassen

erstellt wird. Diese Gerade besteht aus dem Logarithmus der Molekularmasse in Funktion des Bruchs Elutionszeit des Proteins durch Elutionszeit von Dextran Blau, ein schweres Molekül 2 Millionen g/mol wiegend. (Theoretisch werden die Elutionsvolumen eingesetzt, aber eigentlich funktioniert es auch mit Elutionszeiten). Sehr wichtig ist der Fluss konstant zu halten, da die Elutionszeiten davon direkt abhängen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Grösse von Proteinen und deren Derivate ist die SDS-PAGE. Die Zugabe von 2-Mercaptoethanol und SDS spielt da eine Hauptrolle. SDS denaturiert das Protein, dieses entfaltet sich und nimmt dabei seine primäre Struktur wieder ein, der einfache Aminosäure-Strang. Dies bewirkt eine regelmässige Verteilung der Ladungsdichte, d.h. eine konstante negative Ladung per Länge-Einheit. Je länger die Kette, desto negativer ist sie geladen. 2-Mercaptoethanol vollbringt die Denaturierung indem es die möglichen Disulfid Brücken zwischen zwei Cysteine der Kette bricht. Die nachfolgende Elektrophorese trennt die denaturierten Proteine aufgrund ihrer Gesamtladung. Zur Bestimmung der Grösse der Partikel wird ein sogenannter Marker als Standard benutzt. Dieser besteht aus einer Lösung verschiedener Proteinen mit genau bestimmten Molekulargewichte. Aus der SDS-PAGE Analyse ergibt sich, ob sich reine Enzyme noch mit derivatisierten Enzymen im Isolat befinden, und was der Massenanteil an Polymer im Derivat ist [11]. Letzteres wird mit $^1\text{H-NMR}$ bestätigt, durch Quantifizierung mittels Pyrazin, einen Heteroaromaten der 4 symmetrisch verteilte Protone besitzt. Diese Eigenschaft ergibt einen einzigen und sauberen Peak, was Pyrazin zu einem häufig benutzten internen Standard macht. Sind in einer Mischung aus derivatisiertem Enzym und Pyrazin die Peaks, Integrale und die genauen Einwaagen bekannt, so kann die Menge an Polymer im Derivat daraus berechnet werden.

Um die Verteilungskoeffizienten von β -Glukosidase im Gemisch ionische Flüssigkeit/wässrige Phase zu bestimmen wird der Bradford Test an einer Probe aus der wässrigen Phase durchgeführt. Diese photometrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen wird in saurer Lösung gemacht. Der Farbstoff CBB bildet sowohl mit den kationischen als auch mit den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten der Proteine Komplexe. Der rote ungebundene Komplex wird blau wenn gebunden und absorbiert maximal bei 595 nm. Diese Absorbanz ist proportional zur Konzentration an Protein. Zur Bestimmung Verteilungskoeffizienten von Cellobiose und Glukose sowie die der Aktivität des Proteins werden die Mengen an Cellobiose und Glukose in der wässrigen Phase durch HPLC quantifiziert. Bei der High pressure liquid chromatography migriert der Analyt durch eine Kolonne wobei er aufgrund seiner spezifischen physikalischen und chemischen Wechselwirkungen mit der Phase mehr oder weniger lang in der Kolonne bleibt. Diese Retentionszeit, die ein Analyt charakterisiert, hängt auch von der Zusammensetzung der mobilen und der stationären Phase ab. Zudem ist die Konzentration an Analyt mit einer Peak Fläche verbunden, welche proportional zur Konzentration ist. Um den Proportionalitätsfaktor zu bestimmen muss eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen des Zielmolekülerstellt werden.[12], [13], [14]

In organischen Lösungsmitteln sinkt die Reaktionsrate bei zunehmender Polarität. In ionischen Flüssigkeiten hingegen steigt die Reaktionsrate bei zunehmender Polarität. Zudem sind manche Enzyme in ionischen Flüssigkeiten mehr enantio- und regioselektiv. Ionische Flüssigkeiten haben tiefe Schmelzpunkte, das heisst dass die darin enthaltenen Salze bei Raumtemperatur gelöst sind. Zudem verdampfen ionische Flüssigkeiten kaum, sind nicht brennbar; sind thermisch, mechanisch und elektrochemisch stabil. Sie sind gute Lösungsmittel, mischen sich mit Wasser oder organischen Lösungsmitteln kaum und bilden deshalb zweiphasige Systeme. Die Reinigung von ionischen Flüssigkeiten wird durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt. [15]

2 Produkte und Material


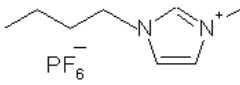

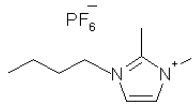

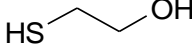

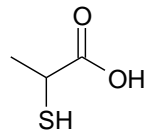

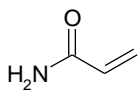

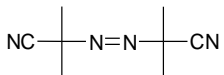

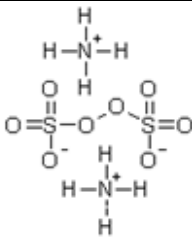


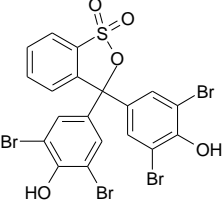


2.1 Produkte


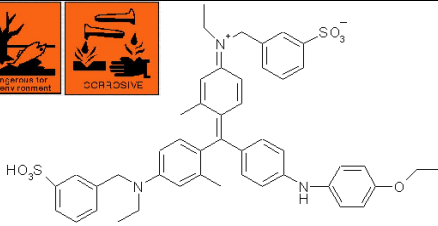
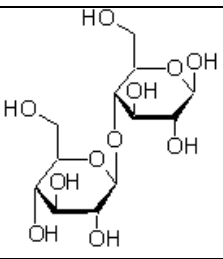
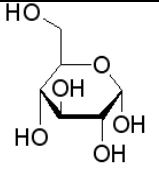
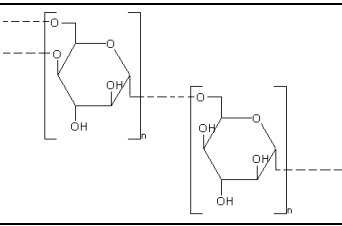

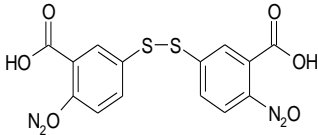

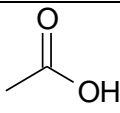

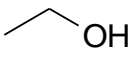

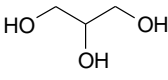
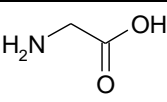

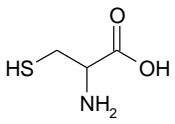
Die Toxizität der Produkte entspricht den Angaben des Herstellers sowie die des MSDS (material data safety sheet) der Chemischen Akademie in Oxford (UK). [16] Einige Produktnamen haben eine Kurzform, diese wird in der unteren Tabelle sowie im ganzen Bericht verwendet.



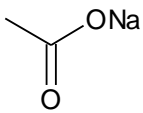





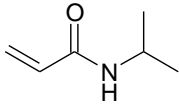



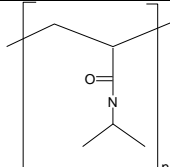

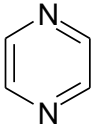



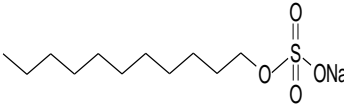
| | |
|---------------------------|---|
| [BDMIM][PF ₆] | 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium hexafluorophosphate |
| [BMIM][PF ₆] | 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate |
| AIBN | 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) |
| APS | Ammonium peroxidisulfate |
| Bromophenol Blue | 3',3'',5',5''-tetrabromophenolsulfonphthalein |
| BSA | Bovine Serum Albumin Fraction V |
| CBB | Coomassie ® Brilliant Blue G250 |
| DTNB | 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) |
| NIPAM | n-isopropylacrylamide |
| PNIPAM | poly-n-isopropylacrylamide |
| SDS | Sodium dodecylsulfate |
| Temed | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine |
| Tris-Base | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| Tris-HCl | Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride |




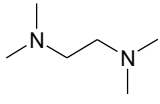



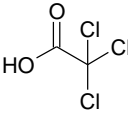

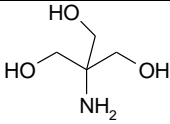

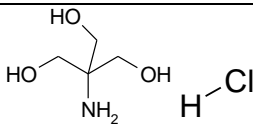
Die in den Tabellen 1 und 2 registrierten Produkte und Apparate sind im Bericht Fett gedruckt.

Tabelle 1

| Produkt und CAS Nummer | Toxizität und Struktur | Hersteller |
|---|---|---|
| [BMIM][PF₆] CAS 174501-64-5 $C_8H_{15}F_6N_2P$ |   | N° IL-0011-HP-0025 IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH & Co. KG, Denzlingen, D |
| [BDMIM][PF₆] CAS 227617-70-1 $C_9H_{17}F_6N_2P$ |   | N° IL-0057-HP-0050 IoLiTec Ionic Liquids Technologies GmbH & Co. KG, Denzlingen, D |
| 2-Mercaptoethanol CAS 60-24-2 C_2H_6OS |   | ≥98% N° M3148 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| 2-Mercapto-propionsäure CAS 79-42-5 $C_3H_6O_2S$ |   | Puriss ≥99.0%, N° 63770 Fluka, Buchs, CH |
| Acrylamid 30% CAS 79-06-1 C_3H_5ON |   | N° P1124 Applichem GmbH, Darmstadt, D |
| AIBN CAS 78-67-1 $C_8H_{12}N_4$ |   | Purum ≥98.0% GC N° 11630 Fluka, Buchs, CH |
| APS CAS 7727-54-0 $(NH_4)_2S_2O_8$ |   | HES-SO, Sion, CH |
| Azeton CAS 67-64-1 $(CH_3)_2CO$ |   | ≥99.5%, N°131007 Panreac Quimica SA, Castellar del Vallès, E |
| Bromophenolblau CAS 115-39-9 $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ |  | N°18030, Fluka, Buchs, CH |
| BSA CAS 9048-46-8 | MM ≈ 66.4 kDa | N°10735078001. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| Chlorwasserstoff CAS 7647-01-0 HCl |   | N°181021.1211 Panreac Quimica SA, Castellar del Vallès, E |

| | | |
|---|--|--|
| CBB CAS 6104-58-1 $C_{47}H_{50}N_3O_7S_2$ |   | N° 27815 Fluka, Buchs, CH |
| D-(+)-Cellobiose CAS 528-50-7 $C_{12}H_{22}O_{11}$ |  | $\geq 98\%$, N° C7252 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| D-(+)-Glukose CAS 50-99-7 $C_6H_{12}O_6$ |  | N° 1.08337.025 Merck, Darmstadt, D |
| Dextran blue von Leuconostoc ssp CAS 9004-54-0 |  | $2 \cdot 10^6$ kDa, N° 31393 Fluka, Buchs, CH |
| DTNB CAS 69-78-3 $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ |   | N° 027K0050 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Essigsäure CAS 64-19-7 $C_2H_4O_2$ |   | N° 45731/33209 Fluka, Buchs, CH, |
| Ethanol CAS 64-17-5 |   | Absolut, N° TEC 11825 Lavanchy, Département Chimie, Prilly, CH |
| Glyzerol CAS 56-81-5 $C_3H_8O_3$ |   | Glyzerol wasserfrei $\geq 99.5\%$, N° A1123-2500 Biochemica AppliChem GmbH, Darmstadt, D |
| Glyzin CAS 56-40-6 $C_2H_5NO_2$ |  | Purum, N° 50052 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, CH |
| Hydranal®-Composite 5 | | N° 34805 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| L-cysteine CAS 52-90-4 $C_3H_7NO_2S$ |   | $\geq 99\%$ N° 173601000 Acros Organics, Geel, Be |

| | | |
|--|---|---|
| Methanol trocken CAS 67-56-1 CH_3OH |   —OH | $\leq 0.005\% \text{ H}_2\text{O}$ N° DS 481091.1611 Panreac Quimica SA, Castellar del Vallès, E |
| Natrium Azetat CAS 127-09-3 $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ Nat. Azetat krist. CAS 6131-90-4 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ |  | Purum p.a $\geq 98.55\%$ N° 71181 Fluka, Buchs, CH N°6267 Merck, Darmstadt, D |
| Natrium Azide CAS 26628-22-8 NaN_3 |   | N° 71290 Fluka, Buchs, CH |
| Natronlauge CAS 1310-73-2 NaOH |   Na—O—H | Ultra $\geq 98\%$ N° 71687 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| NIPAM CAS 2210-25-5 $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{ON}$ |   | $\geq 97\%$ N° 415324 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Ovalbumin 9006-59-1 | Albumin von Hühner Eier MM $\approx 45 \text{ kDa}$ | N° 052K1275, Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| Phosphorsäure CAS 7664-38-2 H_3PO_4 |   HO—P(=O)(OH)—OH | N° 07/075 Laurylab sàrl, Fribourg, CH |
| PNIPAM |   | HES-SO, Sion, CH |
| Protein Marker | 17-190 kDa | N° EC-898 ProtoMarkers, National Diagnostics, USA |
| Protein Marker | 11-250 kDa peqGOLD prestained | N° 32839 Peqlab Biotechnologie GmbH, Linz, Ö |
| Pyrazine, CAS 290-37-9 $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2$ |   | Purum $\geq 98\%$, N° 82610 Fluka, Buchs, CH |
| Schwefelsäure CAS 7664-93-9 H_2SO_4 GK 2 |   $\text{HO—S(=O)}_2\text{—OH}$ | $\geq 96\%$ N° 410301 Carlo Erba Reagents, Rodano, I |
| SDS CAS 151-21-3 $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{SNa}$ |   | N° 20765 Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D |

| | | |
|---|---|---|
| Temed CAS 110-18-9 $C_6H_{16}N_2$ |     | N° 14451/2 Fluka, Buchs, CH |
| Trichloressigsäure CAS 76-03-9 $C_2HCl_3O_2$ |     | N° 91233 Fluka, Buchs, CH |
| Tris-Base CAS 77-86-1 $C_4H_{11}NO_3$ |   | $\geq 99.85\%$ N° 327360010 Acros, Geel, Be |
| Tris-HCl CAS 1185-53-1 $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ |   | N° T-3253 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| β-Glukosidase CAS 9001-22-3 | von Mandeln, grob lyophilisiertes Pulver hauptsächlich Salzfrei, 2.6 U/mg, MM \approx 135 kDa | N° G0395 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |
| β-Lactoglobulin A CAS 9045-23-2 | von Kuhmilch, MM \approx 18.4 kDa | $\geq 90\%$, N° L7880 Sigma-Aldrich, Steinheim, D |

2.2 Material

| Tabelle 2 | Referenzen | Hersteller |
|--|---|--|
| Filter für Spritze | Poren 0.45 µm Sartorius Minisart N°17594 | Sartorius, Göttingen, De |
| Freezer | -86 Freezer | Brouwer Engineering AG, Littau, CH |
| HPLC Kolonne HPLC Vorkolonne | HPLC Organic Acid Analysis Column Aminex® HPX-87H n° 125-0140 Serie n° 422321 | Biorad, Hercules, USA |
| Infrarot Spektroskop | Nicolet 5700 FT-IR | Thermo Electron Corporation, San Jose, Ca, USA |
| Klammern für Dialyse | PA6.6 | Weland AG, Smaalandssstenar, S |
| Lyophilisator | LSL Secfroid, Lyolab BII | Aclens-Lausanne, CH |
| Mikroskop | Zeiss Leo 1525 FEM Kolonne Gemini Detector-SE, In-Lens Kohlenstoff Flash mittels Bal-tec SCD 0050 Sputter Coater | Carl Zeiss, Jena, D Bal-tec AG, Balzers, FL |
| pH-Meter | Metrohm 691 | Metrohm AG, Herisau, CH |
| Photoapparat | Canon IXUS 85015 | |
| Plattenrührer | | Edmund Bühler, Hechingen, D |
| SDS-PAGE Migrationsapparatur Strom Zufuhr Photoapparat | Mini Protean® 3 Cell n°67S/15783 Bio Rad Power Pac 300 n°283BR00695 Gel Doc 1000 Multi Analyst | Bio Rad, Hercules, USA |
| SEC Kolonne SEC Vorkolonne | 5-150 kDa, VA 300/7.7 Nucleogel GFV 300-8, Cat. n°719447 VA 50/7.7 Nucleogel GFV 8P, Cat. n°719450 | Macherey-Nagel, Düren, D |
| Semipermeable Membran | Serva Spectra/Por® 6 dialysis tubing 1000, 7000 und 14000 kDa MWCO | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D |
| Spektrometer HPLC und SEC LCST NMR | Agilent 1100 Series, Entgaser n°G1379A; Kolben Pumpe Quat Pump n°G1311A; RI-Detektor n°G1362 Agilent 89090A UV-Vis, mit Peltier Element Bruker Advance™ 400, Ultrashield™ | Agilent Technologies, Böblingen, D Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, D |
| Spektrophotometer | Libra S12 | Biochrom, Cambridge, U.K |
| Thermomixer | Eppendorf Comfort | Vaudaux-Eppendorf AG, Schönenbuch/Basel, CH |
| Titrimeter | Titrand 835, Ti Stand 803, n° 6.2061.010 | Metrohm, Herisau, CH |
| Ultraschall | Sonarex TK30 | Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D |
| Waage | Discovery DV215CD | Ohaus® Corporation, Pine Brook, NJ, USA. |

3 Methoden

3.1 Derivatisieren des Enzyms β -Glukosidase

3.1.1 Telomerisationsreaktion

Der ganze Vorgang, auch Telomerisation genannt, ist die respektive Derivatisierung von β -Glukosidase durch Polymerisation von N-Isopropylacrylamid an den freien Sulfhydryl Gruppen der Oberfläche des Enzyms.

In einem Eppendorf Vial werden 750 μ l **Ethanol**, 567 mg **N-isopropylacrylamid** (5 mmol), 4.1 mg **AIBN** (0.025 mmol) und 20 mg **β -Glukosidase** ($1.5 \cdot 10^{-4}$ mmol) gemischt und im **Thermomixer** während mindestens 6 Stunden bei 60°C und 1100 rpm reagieren lassen. [4]

Es werden zwei komplementäre Tests durchgeführt: einmal wird 20 mg β -Glukosidase durch 20 μ l **2-Mercaptopropionsäure**, die eine Thiol Gruppe besitzt ersetzt, und einmal wird β -Glukosidase weggelassen und durch nichts ersetzt. Dies um herauszufinden ob die Polymerisation von NIPAM zu PNIPAM ohne Enzym und sogar ohne Thiol Gruppe erfolgt.

3.1.2 Isolierung des derivatisierten Enzyms

Die derivatisierten Enzyme sollen von den nicht-derivatisierten Enzymen und von den übrig bleibenden NIPAM Monomere und eventuell gebildeten PNIPAM Polymere getrennt werden. Dies erfolgt über Dialyse, Lyophilisation und schliesslich Size exclusion chromatography

3.1.3 Dialyse und Lyophilisation

Zur Dialyse wird eine 14 kDa MWCO (molecular weight cut-off) **Semipermeable Membran** verwendet. Diese flache Membran bekommt die Form eines Schlauches, nachdem sie mit Wasser zur Aufbereitung in Kontakt getan wird und mit Handschuhen sorgfältig an ihren Extremitäten gerieben wird. Die bei der Telomerisierung erhaltene schleimige Lösung wird in die Membran übertragen, mit Klammern wird die Membran dichtgemacht und in einem Wasserbehälter (ungefähr 1l) unter konstanter Rührung während 48 Stunden gelassen. Die Moleküle die grösser sind als 14 kDa bleiben im sogenannten Schlauch, während die kleineren durch die Membran diffundieren.

Zur Lyophilisation wird der Inhalt der Membran in Eppendorf Vials übertragen, im **Freezer** eingefroren und während mehreren Stunden bei Vakuum (0.15 mbar) im **Lyophilisator** tiefgetrocknet.

3.1.4 Size exclusion chromatography

Zur Size exclusion chromatography (SEC) wird die durch Lyophilisation gewonnene Probe in 0.02% **NaN₃** zu 1 mg/ml gelöst. NaN₃ als Eluent bewirkt die Erhaltung der **SEC Kolonne** und der **SEC Vorkolonne** indem es die Bildung von Bakterien-

Kolonien darin verhindert [17]. Das Injektionsvolumen wird auf 50 µl eingestellt, der Fluss 1 ml/min, der Druck 52 bar, die Temperatur 28°C. Es wird der Refraktionsindex Detektor verwendet. Die SEC hat zwei Zwecke. Erstens kann das derivatisierte Enzym vom nicht derivatisierten getrennt werden, indem der Fluss während einer definierten Zeitspanne abgezweigt wird. Dabei muss die Probe durch die Kolonne fließen. Es werden zwei Peaks entstehen. Der Peak des derivatisierten Enzyms eluiert folglich grösserer Molekularmasse vor dem Peak, der zum reinen Enzym gehört. Zur Isolierung muss also die Fraktion zwischen dem ersten Peak und dem zweiten Peak geerntet werden, indem der Fluss zwischen dem Detektor und dem Abfall Eimer in ein Falcon Tube abgezweigt wird. Zweitens kann die Grösse des derivatisierten Enzyms bestimmt werden, indem die Elutionszeit von Standard-Molekülen mit bekannten Molekularmassen bei gleichen Arbeitsbedingungen durch die SEC Kolonne eluiert werden. Diese Moleküle sind **BSA**, **Dextran Blau**, **Lactoglobulin**, **Ovalbumin**.

Nach der SEC wird der letzte Schritt zur Isolierung des derivatisierten Enzyms gemacht. Die durch SEC gewonnene Lösung wird lyophilisiert. Dieses Lyophilisat wird für die Aktivitätsmessung eingesetzt, muss aber noch analysiert werden. Dies mittels ¹H-NMR, MS, IR, SDS-PAGE, EM.

3.1.5 Aktivitätsmessung

Die Aktivität der β-Glukosidase vor und nach derivatisieren wird mittels **HPLC** bestimmt. Die Methode wurde von Ghose [14] entwickelt und von Druey [4] adaptiert.

Herstellung der Lösungen:

-0.1M Natrium Azetat Puffer (pH 4.8).

In einem 500 ml Messkolben, 6.804 g **kristallisiertes Natrium Azetat** einwiegen und 400 ml H₂O dazugeben, gut mischen und pH mittels einigen Tropfen **Essigsäure** auf pH 4.8 stellen. Mit H₂O auf 500 ml auffüllen.

-Enzym Lösung.

Die verwendete Enzym Lösung beinhaltet 10 mg/ml **β-Glukosidase** in Natriumazetat Puffer.

-Derivatisiertes Enzym in Lösung.

Die Lösung besteht aus 5 mg/ml **derivatisierte β-Glukosidase** in Natriumazetat Puffer.

-Substrat Lösung.

Die verwendete Cellobiose Lösung ist 15 mM. In einem 200 ml Messkolben, 1.048 g **Cellobiose** einwiegen und mit H₂O auffüllen.

Vorgang zur Aktivität Bestimmung.

1) In 1.5 ml Eppendorf Tubes, und mittels **Thermomixer**, bei 50 °C, 1100 rpm und während 5 Minuten werden 500 µl Substrat Lösung und 500 µl Enzymlösung getrennt voneinander gelagert.

2) Die beiden Lösungen mischen und bei 50 °C und 1100 rpm während einer bestimmten Zeit (10-40 Minuten) reagieren lassen.

- 3) Gestoppt wird die Reaktion indem die Reaktions-Lösung während maximal 5 Minuten in ein 100 °C Wasserbad gestellt wird.
- 4) Von dieser 1ml Reaktionslösung wird ein bestimmtes Volumen entnommen, mittels 0.45 µm **Filter** in ein HPLC Vial gefiltert, und mit H₂O auf minimum 500 µl gefüllt. Wichtig ist, die Verdünnung zu kennen, damit nach der HPLC Analyse berechnet werden kann, wieviel Glukose in diesem ml war.
- 5) Die durch Abbau von Cellobiose gebildete Glukose Konzentration wird mittels HPLC gemessen.

Normalerweise ist die Aktivität auf den Abbau von Substrat bestimmt. Es kann aber auch die Bildung von Produkt in Betracht genommen werden. Da Cellobiose zu 2 Moleküle Glukose abgebaut wird, muss die Aktivität die für die Bildung von Glukose berechnet wird durch zwei geteilt werden. Die Aktivität des derivatisierten Enzyms wurde bei 30 °C und bei 50 °C erprobt, dies jeweils während 30 Minuten.

Glukose Konzentration Bestimmung mittels HPLC:

Es wird eine Eichgerade mit **Glukose** Konzentrationen von 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, und 1.0 mg Glukose pro ml H₂O gemacht. Es sollte 1 mg/ml nicht überschritten werden, da sonst die Kolonne überlastet wäre. Die verwendete **HPLC Kolonne** ist die Aminex[®] HPX-87H die auf 35 °C erwärmt ist. Der Eluent ist 5 mM **Schwefelsäure**. Das Volumen der Probe Injektion ist 20 µl, der Fluss 0.35 ml/min, der erlaubte maximale Druck wird auf 110 bar gesetzt. Es wurde der Refraktions Index Detektor verwendet. Die Analyse dauert 30 Minuten pro Probe. Es wird eine 1 mg/ml Cellobiose Lösung analysiert, um dessen Elutionszeit zu etablieren.

Soll die Kolonne gewechselt werden muss zuerst der Eluent Fluss gestoppt werden. Anschliessend wird die Kolonne ausgewechselt und die Schutzdeckel auf die nicht mehr gebrauchte Kolonne geschraubt. Danach muss die Kolonne mit dem für das neue Experiment gebrauchten Eluent gereinigt werden (auf RID Piktogramm drücken, dann *clean cell* 20 Minuten) Schlussendlich wird eine H₂O Probe 2 Mal durch die Kolonne geschleust.

3.1.6 Rezyklieren des derivatisierten Enzyms

Die Wiederverwendung des reinen Enzyms wurde nicht erprobt. Es wurde jedoch die des derivatisierten Enzyms gemacht und dessen Aktivität bestimmt. Es soll bestimmt werden, wie oft ein solches Vorgehen gemacht werden kann, bis der totale Aktivitätsverlust erfolgt. Zur Aktivitätsbestimmung: Bei 50 °C koagulierte das derivatisierte Enzym und wird deshalb am Ende des Prozess einfach isoliert, indem nach der Probenahme zur Glukose Messung die Flüssigkeit weggenommen wird. Das Koagulat wird dialysiert und lyophilisiert und ist bereit für eine weitere Verwendung.

Bei 30 °C hingegen koagulierte das derivatisierte Enzym nicht, und bleibt deshalb noch in Lösung, die jedoch an gewissen Stellen trüb ist und an anderen klar. Nach der Reaktion kommt es sogar bei Erhöhung der Temperatur über den LCST nicht zur Koagulierung. Es wird also ein bestimmtes Volumen entnommen, indem aufgepasst wird, das nicht trübe Lösung, sondern klare entnommen wird. Diese Probe wird mittels HPLC analysiert. Die bleibende Lösung wird dialysiert und lyophilisiert und ist bereit zur Wiederverwendung.

3.2 Charakterisierung des derivatisierten Enzyms

3.2.1 LCST Bestimmung

Vor der Isolierung durch SEC wird eine LCST (lowest critical solution temperature) Messung durchgeführt, dies um die Temperatur zu bestimmen, bei welcher das Polymer koaguliert. Eigentlich sollte diese Messung für das derivatisierte Enzym gemacht werden. Es wird dazu ein **Spektrometer** mit Peltier Element und eine Quarz Küvette mit Magnet-Rührer verwendet. Die Lösung hat keine bestimmte Konzentration. Es wird nach der Dialyse direkt nach der Telomerisierungsreaktion 100 µl entnommen in die Quarz Küvette getan und mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt. Das Peltier Element ermöglicht die Temperatur stufenweise um 0.2 °C/Minute zwischen 30 °C und 38 °C zu regeln während die Absorbanz-Messung bei 600 nm mittels des Spektrometers als Funktion der Zeit gespeichert wird.

3.2.2 Thiol Gruppen Bestimmung

Die Anzahl an freien Sulfhydryl Gruppen vor und nach Derivatisieren wird mittels Ellman Test bestimmt. [6]

Herstellung der Lösungen:

-DTNB Stock.

In einem 200 ml Messkolben, 0.820 g **Natrium Azetat** (50 mM) und 0.159 g **DTNB** (2 mM) einwiegen und mit H₂O auffüllen.

-Tris Dilution.

In eine 1 l Flasche, 612 ml Tris-HCl 1 M und 388 ml Tris-Base 1 M einfüllen. Der pH wenn nötig mit entsprechender Säure oder Lauge auf 8,0 stellen. Tris-HCl 1 M entspricht 157.6 g **Tris-HCl** auf 1 l mit H₂O aufgefüllt. Tris-Base 1 M entspricht 121.1 g **Tris-Base** auf 1 l mit H₂O aufgefüllt.

L-Cystein Eichgerade:

Der verwendete Standard ist L-Cystein, in einer Verdünnungsreihe von 0.5 µM bis 2000 µM. Die 2000 µM Lösung entspricht 0.242 g **L-Cystein** in einem 100 ml Messkolben mit H₂O aufgefüllt.

Pro Probe je in eine 1ml Spektroskopie Küvette: 50 µl DTNB Stock, 100 µl Tris Dilution und 840 µl H₂O einfüllen und mittels Pipette mischen. Diese Lösung wird bei 412 nm als Blank betrachtet. 10 µl Standard zugeben, mischen mittels Pipette, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Absorbanz bei 412 nm messen.

L-cystein enthält pro Molekül eine Sulfhydryl Gruppe und eignet sich also gut zu dessen Quantifizierung, da die Anzahl freien Sulfhydryl Gruppen direkt proportional zur Konzentration an L-Cystein ist.

Durchführung des Experiments mit β -Glukosidase:

Pro Protein Probe, je in eine 1 ml Spektroskopie Küvette: 50 μ l DTNB Stock, 100 μ l Tris Dilution und 840 μ l H₂O einfüllen und mittels Pipette mischen. Die Absorbanz auf Null stellen. 10 μ l Protein Lösung (10mg/ml) zugeben, mischen mittels Pipette, 30 Minuten bei 1100 rpm und Raumtemperatur inkubieren. Die Absorbanz bei 412 nm messen.

Dasselbe Experiment wird mit derivatisiertem Enzym gemacht, indem während der Telomerisierungs Reaktion zu bestimmten Zeiten 10 μ l der Reaktionslösung entnommen werden. Dies soll zeigen, wie sich die am Anfang freien Thiol Gruppen an der Oberfläche des Enzyms im Laufe der Zeit mit Polymer verkoppeln und deshalb mittels Ellman Test nicht mehr detektierbar sind.

3.2.3 SDS-PAGE

Die Grösse des Enzyms β -Glukosidase vor und nach derivatisieren mit N-isopropylacrylamid wird neben der Size exclusion chromatographie auch mittels SDS-Page bestimmt. Die angewendete Methode zur Herstellung der Lösungen und Durchführung der SDS-Page dem Protokoll „Etude de la structure quaternaire des protéines par électrophorèse sur gel“ [11]. Die Herstellung der Gele entspricht dem zur Apparatur gehörenden Protokoll [18]. Es wurden für beide Methoden einige Anpassungen gemacht.

Herstellung der Lösungen:

Zur Erhaltung des vorgegebenen pH's wird der **pH-Meter** gebraucht sowie verdünnte Natronlauge oder Salzsäure.

- Tris Puffer 0.1 M pH 7.4: 1.21 g **Tris-Base** in 80 ml H₂O auflösen. pH mit HCl 6 N auf 7.4 richten. Mit H₂O auf 100 ml auffüllen.
- Tris Puffer 1.0 M (pH 6.8): 12.1 g **Tris-Base** + 80 ml H₂O. Abkühlen lassen. pH auf 6.8 richten mittels HCl 6 N. Mit H₂O auf 100 ml auffüllen. Bei 4 °C aufbewahren.
- Proteinlösung: 1 mg des Proteins+1.0 ml Tris Puffer 0.1 M pH 7.4.
- Probe Puffer 4.45 ml H₂O + 1.25 ml Tris Puffer 1.0 M + 2.5 ml **Glyzerol** + 0.8 ml **SDS** 25 % (w/v) + 0.9 mg **Bromophenolblau** (0.01% w/v). Gerade vor Gebrauch: 950 μ l dieser Mischung mit 50 μ l **2-Mercaptoethanol** mischen.
- Elektrode Puffer 10 x pH 8.3: 3.03 g **Tris-Base** + 14.4 g **Glyzin** + 1.0 g **SDS** + 60 ml H₂O. Auflösen. Auf 100 ml mit H₂O auffüllen. Bei 4 °C aufbewahren.

- Migrationspuffer 1X: 50 ml Elektrode Puffer + 450 ml H₂O
- Fixationslösung: 10 ml **Trichloressigsäure** 1.5 M + 40 ml H₂O
- Färbungslösung: 0.2 g **Coomassie Brilliant Blue** + 45 ml **Methanol** + 45 ml H₂O + 10 ml **Essigsäure**
- Entfärbungslösung: 15 ml **Methanol** und 5 ml **Essigsäure** mit 30 ml H₂O mischen.
- Resolving Gel Buffer: Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8). 2.364 g **Tris-HCl** in 10 ml Messkolben mit 7 ml H₂O mischen, mittels pH-Meter und konzentrierter **NaOH** auf den gewünschten pH bringen. Mit H₂O auf 10 ml auffüllen.
- Stacking gel buffer: 0.5 M Tris HCl (pH 6.8). 0.788 g **Tris-HCl** in 10 ml Messkolben mit 7 ml H₂O mischen, mittels pH-Meter und konzentrierter **NaOH** auf den gewünschten pH bringen. Mit H₂O auf 10 ml auffüllen.

Herstellung des Gels:

Die **Migrationsapparatur** besteht aus einem Behälter in welchem der Gel zwischen zwei Glasplatten festgehalten wird, und aus einem System bestehend aus Anode und Kathode, die durch Stromzufuhr die Migration der Proteine hervorruft. Zuerst müssen zwei dafür vorgesehene Glasplatten zusammenbracht werden so dass ein 1 mm Spalt entsteht, diese Platten werden zwecks Abdichtung auf einen Kunststoffboden gestellt und eingespannt, folgend der Gebrauchsanweisung.

Der zu herstellende Gel ist ein sogenannter diskontinuierlicher Gel, der aus zwei Bereichen mit verschiedener Konzentration an Acrylamid besteht. Je grösser dieser Anteil ist, desto kleiner sind die Maschen des Polyacrylamid Netzwerks und desto besser kommen die kleineren Teile voran als die grösseren. Dieser Gel wird bei SDS-Page angewendet, wo die Proteine durch 2-Mercaptoethanol denaturiert werden.

Bei kontinuierlichen Gelen ist überall die gleiche Konzentration an Acrylamid. Diese Gele werden bei der Native-Page angewendet, wo, im Gegensatz zur SDS-Page, die Proteine nicht denaturiert werden.

-Resolving Gel 14%

In ein Becherglas 2.8 ml H₂O + 4.7 ml **Acrylamid 30 %** + 2.5 ml Resolving Gel Buffer + 1g **SDS** tun. Kurz vor dem giessen in die Form 50 µl **APS** und 5 µl **TEMED** zugeben und mischen. (Die Flüssigkeit muss bis 1 cm unter den unteren Teil des Kamms gegossen werden. Das vorbereitete Volumen genügt für 2 Gels). Zum Schluss wird H₂O zugegeben. Somit wird die Oberfläche des Gels, einmal hart, eben und flach sein. Mindestens 45 Minuten polymerisieren lassen.

-Stacking Gel 4%

6.2 ml H₂O + 1.3 ml **Acrylamid 30%** + 2.5 ml Stacking gel buffer + 1 g **SDS**. Kurz vor dem giessen 50 µl **APS** und 5 µl **TEMED** zugeben und mischen. Die Mischung bis ganz oben im Spalten giessen und sorgfältig den Kamm platzieren, so dass keine Luftbläschen unter ihm übrig bleiben. Mindestens 45 Minuten polymerisieren lassen.

Der Stacking Gel, welcher zuletzt gegossen wird, hat weniger Acrylamid, also grössere Maschen, und lässt somit alle migrierenden Moleküle zur gleichen Zeit an den Resolving Gel zukommen. Dies um einen idealen Start zu gewährleisten.

Aufbewahrung des Gels:

Wenn er nicht sofort benutzt wird kann der Gel im Migrationspuffer aufbewahrt werden. Dazu wird er samt Glasplatten und Kamm in Papier eingewickelt.

Durchführung der SDS-Page:

- Pro Proteinprobe, in ein Eppendorf Tube, 50 µl Proteinlösung mit 50 µl Probe Puffer mischen und 5 Minuten bei 100 °C im Wasserbad erhitzen.
- Den Gel in die BioRad Cell 3 Apparatur geben und die Apparatur mit Migrationspuffer füllen, die Löcher des Gels müssen damit gefüllt sein.
- 12 µl der in 1) erhaltenen Mischung ins Loch laden. 7 µl des **Markers** in ein anderes Loch laden.
- Mit 200 V Spannung 45 Minuten wirken lassen.
- Die folgenden Waschungen und Einwirkungen werden in einem Behälter und auf dem **Plattenrührer** durchgeführt.
- 3 mal 5 Minuten mit 50 ml H₂O waschen.
- 15 Minuten mit 50 ml Fixationslösung einwirken lassen.
- 5 Minuten mit 50 ml H₂O waschen.
- 45 Minuten mit 50 ml Färbungslösung einwirken lassen.
- 30 Minuten mit 50 ml Entfärbungslösung waschen.
- Den SDS-Page Gel mittels **Gel Doc 1000 Multi Analyst** wie folgend fotografieren: Programm Live, Save after capture, Capture, Export to tiff, View 8 bit image, Export.

3.2.4 ¹H-NMR

Es soll der Anteil an Polymer im derivatisierten Enzym quantifiziert werden. Dies wird mit dem internen Standard Pyrazin gemacht. Das derivatisierte Enzym befindet sich im lyophilisierten Zustand, Pyrazin ist auch im festen Zustand. Beide lösen sich gut in H₂O auf. Die Protone von H₂O könnten mit den Protonen des zu analysierenden Produktes interferieren, deshalb wird D₂O, deuteriertes H₂O, als Lösungsmittel genommen. Zur Identifizierung der verschiedenen Peaks wurden **PNIPAM**, **β-Glukosidase** und **Pyrazin** jeweils einzeln analysiert. Dazu braucht es nur 1-2 mg Substanz. Mit Hilfe existierenden Tabellen [19] sowie die Voraussagen mittels Computer Programm [20], [21] können die chemischen Verschiebungen (ppm) der

verschiedenen Protonen und die Form von Peaks zum voraus ausgerechnet und theoretisch zugeordnet werden. Zur Quantifizierung vom Polymer im derivatisierten Enzym, werden ungefähr aber genau 10 mg **telomerisierte β -Glukosidase** und 2mg **Pyrazin** miteinander in ein $^1\text{H-NMR}$ Tube gebracht, in D_2O und mit Hilfe von Ultraschall aufgelöst. Die Spektren werden auf dem **Spektrometer** bei 400 MHz aufgezeichnet. PNIPAM ist ein in der HES-SO synthetisiertes Polymer, das nach den Vorschriften der Supplemental Methods der Publikation „Microwave induced chain transfer polymerization of a stimuli responsive polymer and determination of its critical solution temperature“ [1], [22] hergestellt wurde.

3.2.5 Infrarot Spektroskopie-FTIR

Die Infrarot Spektroskopie ermöglicht, die rasche Identifizierung von Funktional Gruppen in einer Probe, und vereinfacht somit die genaue Bestimmung dieses Produktes. Es werden 1-2 mg von **PNIPAM**, **β -Glukosidase** und **derivatisierte β -Glukosidase** einzeln analysiert. Diese Probe befinden sich zur Analyse im festen Zustand. Das **Spektroskop** soll ein Spektrum zwischen 500 und 4000 cm^{-1} registrieren, die gesuchte Verbindung die nur im derivatisierten Enzym vorkommen soll, enthält die Thioether Gruppe, die IR-Bande soll zwischen 670 und 770 cm^{-1} liegen.

3.2.6 Maldi-Tof-MS

PNIPAM, **β -Glukosidase** und **derivatisierte β -Glukosidase** (ungefähr je 1 mg) wurden einzeln und in festem Zustand der Atheris Laboratories in Bernex bei Genf zur Analyse geschickt, da der Massenspektrometer der HES-SO die Grösse von Molekülen nur bis ungefähr 2 kDa bestimmen kann. Die Proben werden in 0.1 % TFA Lösung in Wasser bei 10 mg/ml gelöst und in Form von dried droplet mittels α -cyano-4-hydroxy cinnamic Säure auf dem Massenspektrometer UltraflexTM TOF/TOF (Bruker Daltonics GmbH, D) analysiert.

3.2.7 Elektronen Mikroskopie

Es werden zwei Methoden zur Vorbereitung der Proben angewendet. Bei der ersten werden die Proben in destilliertem Wasser stark verdünnt ($3\text{ mg in }10^{11}\text{ ml H}_2\text{O}$), auf ein Plättchen das mit Gold besprüht (mittels Plasma) worden ist wird ein Tröpfchen Lösung gebracht und bei Raumtemperatur verdampft. Danach wird mittels Carbon Flash eine dünne Schicht Kohlenstoff über die Probe besprüht. Bei der zweiten Methode werden die lyophilisierten Proben auf ein Kohlenstoff Plättchen deponiert, flachgedrückt und mit Kohlenstoff besprüht. Der Carbon Flash wird folgendermassen erzeugt: es wird eine Baumwolle-Schnur die Kohlenstoff enthält 30 Sekunden bei 22°C und 0.05 mbar unter einem 1.5 A Strom entgast. Danach bewirkt ein Flash die Besprühung des Kohlenstoffs auf die Probe. Kohlenstoff und Gold dienen dazu, Ladungen, die neben den Proben elektromagnetische Wolken bilden zu eliminieren, indem sie diese Proben leitfähig machen. Die Auflösung des Mikroskops variiert zwischen 3 und 1.5 nm, die Elektronen werden unter 10^{-7} bis 10^{-9} mbar bei einer Spannung zwischen 0.1 und 30 kV beschleunigt. Es werden 3 Proben pro Methode angeschaut: **β -Glukosidase**, **PNIPAM**, **derivatisierte β -Glukosidase**.

3.3 Handlungen in ionischen Flüssigkeiten

3.3.1 Messung der Verteilungskoeffizienten von Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase in [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat Puffer

Es soll die Verteilung von Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase in einem Gemisch von [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat Puffer (1:1 (v:v)) gemessen werden. Das Gesamtvolumen ist 1 ml. Es werden Messungen bei Gemischen zwischen 10 % und 90 % (v:v) [BMIM][PF₆] gemacht. Es werden ungefähr aber genau je 2.5 mg Cellobiose und Glukose und 5 mg β -Glukosidase pro Probe verwendet. Am einfachsten ist, Lösungen zu präparieren (2.5 g **Cellobiose** in 100 ml Messkolben mit H₂O auffüllen, 2.5 g **Glukose** in 100 ml Messkolben mit H₂O auffüllen, 500 mg **β -Glukosidase** in 10 ml Messkolben mit H₂O auffüllen). Die erwünschten Mengen an Glukose (2.5 mg), Cellobiose (2.5 mg) und β -Glukosidase (5 mg) befinden sich in 100 μ l der zubereiteten Lösungen. Zum Beispiel soll ein Gemisch aus 30% [BMIM][PF₆] bestehen. Davon wird also 300 μ l [BMIM][PF₆] sein, 100 μ l Cellobiose oder Glukose oder β -Glukosidase und den Rest, 690 μ l **Natrium Azetat Puffer** 0.1 M pH 4.8. Die Arbeitsbedingungen sind die folgenden: 30 Minuten bei 50 °C und 1100 rpm mittels Thermomixer mischen. Danach wird vom Ueberstand, d.h. von der wässrigen Phase, eine genaue Menge entnommen und folgendermassen analysiert.

Die Quantifizierung von Cellobiose und Glukose erfolgt über HPLC Messungen, wie im Kapitel 3.1.5 unter Glukose Konzentration Bestimmung mittels HPLC beschrieben wird. Die Glukose Eichgerade wurde schon gemacht, es muss noch eine Eichgerade für Cellobiose gelöst in H₂O zwischen 0 und 1 mg/ml etabliert werden.

Die Quantifizierung von β -Glukosidase wird mittels Bradford Methode durchführt [13]. Das Bradford Reaktiv wird folgendermassen zubereitet: 10 ml **Phosphorsäure** 85% + 5 ml **Ethanol** 95% + 10 mg **CBB** in ein 100 ml Messkolben mit H₂O auflösen und mittels Filter Papier filtrieren. Davon wird 1 ml mit 20 μ l Protein- Lösung gemischt, es wird 5 Minuten gewartet und die Absorbanz bei 595 nm gemessen. Zuerst wird eine Eichgerade etabliert mit genau bekannten Mengen an Protein: zwischen 0 und 1 mg/ml in H₂O gelöster β -Glukosidase.

Die Mengen an Cellobiose, Glukose respektiv β -Glukosidase die in der wässrigen Phasen bestimmt werden sind kleiner oder gleich wie 2.5 mg respektive 5 mg. Wird die Menge an Cellobiose zu 1.5 mg bestimmt, heisst es, dass die fehlenden 1mg sich in [BMIM][PF₆] befindet. Die Verteilung von Cellobiose wäre also $1.5/2.5 = 60\%$ in der wässrigen Phase.

3.3.2 Messung der Verteilungskoeffizienten Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase in [BDMIM][PF₆]/Natrium-Azetat Puffer

In diesem Teil wird gleich gehandelt wie im Kapitel 3.3.1. Der einzige Unterschied ist, dass [BDMIM][PF₆] bis unter 40 °C im festen Zustand ist. Um bestimmte Volumen dieser ionischen Flüssigkeit zu nehmen muss sie im Wasserbad oder im Thermomixer gewärmt werden.

3.3.3 Verteilung von derivatisierter β -Glukosidase und von PNIPAM in [BDMIM][PF₆] und [BMIM][PF₆].

Statt Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase wird mit **PNIPAM** und **derivatisierter β -Glukosidase** gearbeitet. Bei 50°C, 1100rpm und während 30 Minuten einige mg der Proben in ein 1.5 ml Eppendorf der ein Zweiphasen System aus ionischen Flüssigkeit/Wasser im Verhältnis 1:1 (V/V) beinhaltet reagieren lassen. Danach werden davon **Fotos** gemacht

3.3.4 Karl Fischer Titration zur Bestimmung der Mischbarkeit von H₂O mit [BDMIM][PF₆] und [BMIM][PF₆]

Theoretisch mischen sich ionische Flüssigkeiten und H₂O kaum. Durch die Karl Fischer Titration soll gezeigt werden in welchem Verhältnis sie sich mischen. Es wurde jeweils 0.5 g H₂O mit 0.5 g Ionische Flüssigkeit in ein 1ml Eppendorf getan und 30 Minuten bei 50 °C und 1100 rpm im **Thermomixer** gemischt. Danach wird mittels einer Spritze ionische Flüssigkeit entnommen, gewogen und ein paar Tropfen ionische Flüssigkeit zur Titrierung gegeben. Danach wird wieder gewogen um die genaue Menge an titrierter ionischer Flüssigkeit zu bestimmen. Bevor H₂O in ionischer Flüssigkeit titriert werden kann muss bestimmt werden wieviel Titrationslösung (**Hydranal®-Composite 5**) gebraucht wird bei einer gewissen Menge vorhandenem H₂O (Eine mit H₂O gefüllte Spritze wird gewogen bevor und nachdem H₂O in den **Titrimeter** gespritzt wird). [22]

4 Resultate

4.1 Derivatisierung von β -Glukosidase

4.1.1 Telomerisierungsreaktion

Eine erste Angabe zum Erfolg der Telomerisierungsreaktion ist der Uebergang der durchsichtigen Lösung in ein weisses trübes Gemisch bei Erhöhung der Temperatur. Diese Trübung soll bei PNIPAM Polymeren vorkommen sobald die Temperatur über dem LCST liegt.

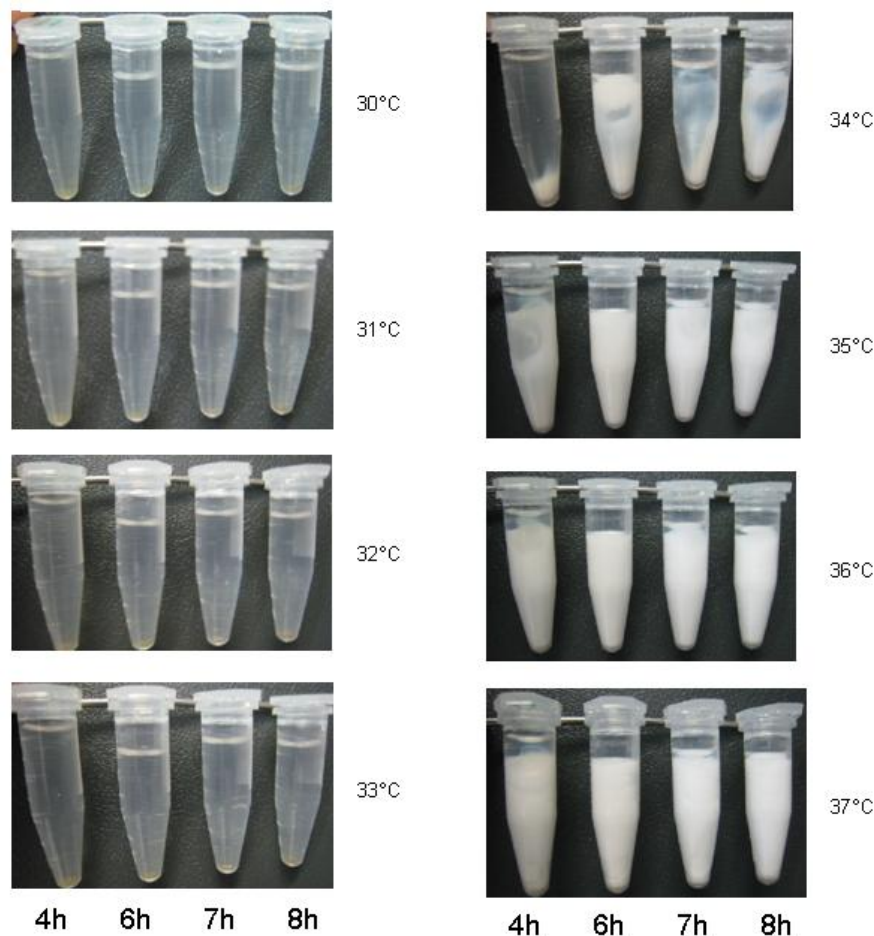


Fig.4: Telomerisation von N-Isopropylacrylamid mit β -Glukosidase, nach 48 Stunden Dialyse

In der Fig.4 ist klar sichtbar dass die Telomerisierung für vier verschiedene Reaktionszeiten gelungen ist, und dass der LCST sich bei 34 °C befindet. In Theorie ist er für PNIPAM bei 32.5 °C [3]. Die Bindung des Polymers an β -Glukosidase könnte diesen Unterschied hervorrufen.

Es soll nun gezeigt werden, ob die Polymerisierung von NIPAM auch erfolgen kann, ohne an β -Glukosidase gebunden zu sein. Dies wird erprobt, indem die Reaktion in Abwesenheit von β -Glukosidase abläuft (Fig.5).

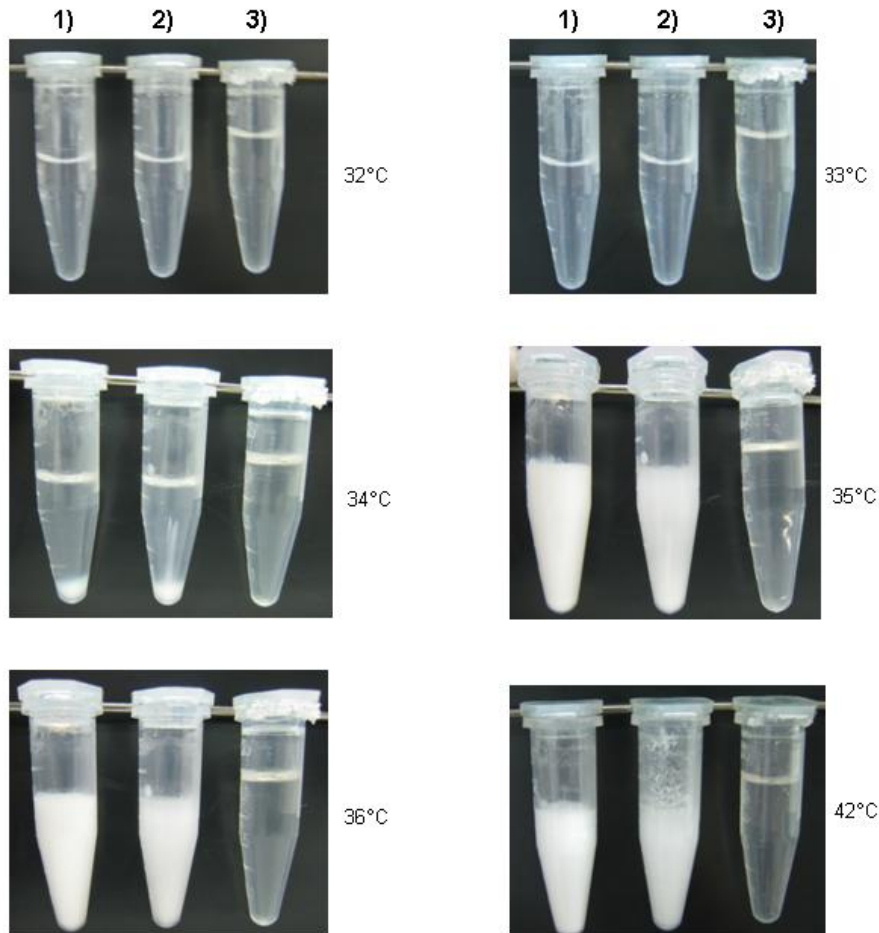


Fig.5: LCST Messung nach Telomerisation ohne Enzym. **1)** NIPAM und AIBN, ohne Enzym und ohne 2-Mercaptopropionsäure; **2)** NIPAM und AIBN, ohne Enzym mit 2-Mercaptopropionsäure; **3)** Ethanol und NIPAM

Bewiesen ist dass Muster 1) und 2) polymerisiert haben, da bei erhöhter Temperatur die klare durchsichtige Lösung weiss wird (1 wird sogar ein wenig fester, während 2 ebenso flüssig bleibt wie bei tieferer Temperatur). In 3) befindet sich nur Ethanol und Nipam, dieses Muster wird bei erhöhter Temperatur nicht weiss und absorbiert bei 595 nm kaum. Nipam Monomere färben sich also nicht weiss, während Polymere nach dem Prinzip des LCST ihre Konformation verändern und sich verfärben. Es scheint, dass allein die Anwesenheit von AIBN es dem NIPAM ermöglicht zu polymerisieren.

Nipam Monomere durchführen die Kettenreaktion in Abwesenheit einer Thiol Gruppe, da sogar ohne 2-Mercaptopropionsäure die Polymerisation abläuft und zur LCST Phenomen führt. Während der Kettenreaktion mit dem Enzym ist also zu erwarten dass solche Polymere entstehen. Ob diese grösser sind als 100 kDa und nach der Dialyse mit dem Enzym gebundenem Polymer in Lösung bleiben kann mittels SDS-Page definiert werden.

4.1.2 Isolierung der derivatisierten β -Glukosidase: Size exclusion Chromatographie

Die folgende Tabellen A und B enthalten die gemessenen Elutionszeiten der verschiedenen Standard Moleküle sowie von den derivatisierten Enzyme, für einen konstanten Fluss von 1ml/min.

Tabelle 3: Elutionszeiten entsprechen dem Peak Anfang

| | MM [kDa] | \log_{10} MM | Elutionszeit [min] | V_e [s] | V_o [s] | V_e/V_o |
|-------------------------------------|--------------|----------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| BSA | 66.43 | 1.822 | 6.3 | 378 | - | 1.145 |
| Dextran | 2000 | 3.301 | 5.5 | | 330 | 1.0 |
| Ovalbumin | 45 | 1.653 | 6.5 | 390 | - | 1.181 |
| β -Glukosidase | 135 | 2.130 | 6.2 | 372 | - | 1.127 |
| β -lactoglobulin | 18.4 | 1.264 | 6.6 | 396 | - | 1.200 |
| Derivatisierte β -Glukosidase | 150.2 | 2.177 | 6.14 | 368.4 | - | 1.116 |

Der sich in Tabelle 3 befindende Wert der Molekularmasse (MM) der derivatisierten β -Glukosidase wurde berechnet nachdem die Eichgerade der Standard Moleküle erstellt wurde für Elutionszeiten korrespondierend zum Anfang des Peaks (Fig.6).

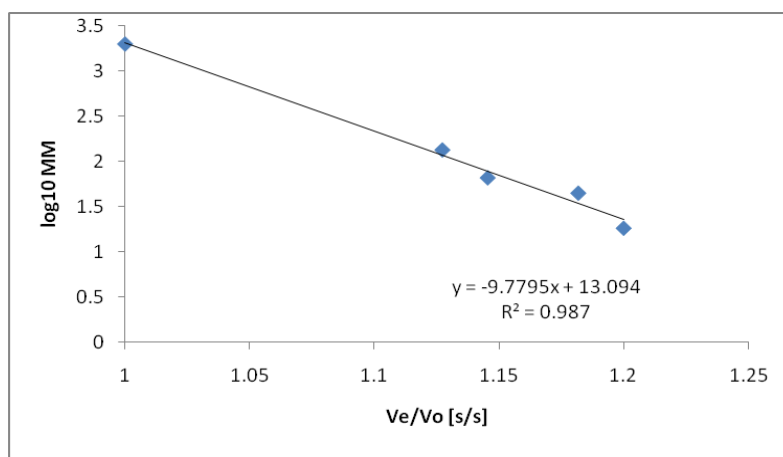


Fig.6: Eichgerade zur Bestimmung der Grösse von derivatisierter β -Glukosidase

Während die Tabelle 3 die Elutionszeiten am Anfang des Peaks beinhalten, befinden sich in Tabelle 4 die Elutionszeiten am höchsten Punkt des Peaks.

Tabelle 4: Elutionszeiten entsprechen des Peaks höchstem Punkt

| | MM [kDa] | \log_{10} MM | Elutionszeit [min] | V_e [s] | V_o [s] | V_e/V_o |
|-------------------------------------|------------|----------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| BSA | 66.43 | 1.822 | 7.078 | 424.7 | - | 1.198 |
| Dextran | 2000 | 3.301 | 5.908 | | 354.5 | 1.0 |
| Ovalbumin | 45 | 1.653 | 7.054 | 423.2 | - | 1.193 |
| β -Glukosidase | 135 | 2.130 | 6.3 | 378 | - | 1.066 |
| β -lactoglobulin | 18.4 | 1.264 | 7.495 | 449.7 | - | 1.268 |
| Derivatisierte β -Glukosidase | 547 | 2.738 | 6.14 | 368.4 | - | 1.039 |

Der sich in Tabelle B befindende Wert der Molekularmasse (MM) der derivatisierten β -Glukosidase wurde berechnet nachdem die Eichgerade der Standard Moleküle für Elutionszeiten korrespondierend zum Anfang des Peaks erstellt wurde (Fig.7)

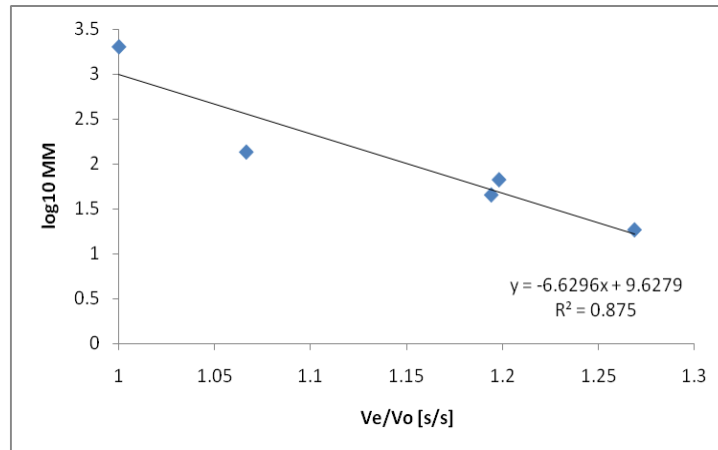


Fig.7: Eichgerade zur Bestimmung der Grösse von derivatisierter β -Glukosidase

Die Grösse des derivatisierten Enzyms befindet sich nach berechneten Werten zwischen 150 und 547 kDa. B-Glukosidase hat eine molekularmasse von 135 kDa. **Die Molekularmasse des Enzyms ist also zwischen (135/150=) 90% und (135/547=) 25% der Molekularmasse des derivatisierten Enzyms.**

Die folgenden Fotos (Fig.8) entstanden nach lyophilisieren der nach Size exclusion Chromatographie gewonnenen dialysierten Telomerisationsreaktionslösung.



Fig.8: Derivatisierte β -Glukosidase nach Size exclusion Chromatographie und Lyophilisation

Das Lyophilisat nimmt die Form von Baumwolle an.

4.1.3 Messung der Aktivitäten von derivatisierter und nicht-derivatisierter β -Glukosidase, und von rezyklierter derivatisierter β -Glukosidase

Die folgende Eichgerade (Fig.9) wird auch in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 für die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten benutzt.

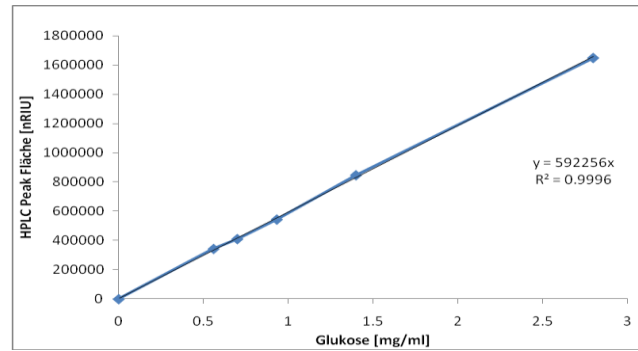


Fig.9: Eichgerade der HPLC Peak Flächen in Funktion der Glukose Konzentration

Ausgehend von der Eichgerade kann die Konzentration an Glukose in den Proben (C_{mass} [mg/ml]) berechnet werden, indem die peak Fläche durch 592256 dividiert wird. Die molare Konzentration an Glukose wird wie folgend berechnet:

$C_{\text{molar}} [\mu\text{mol/ml}] = (C_{\text{mass}} / M \cdot 1000) \cdot 10^6$, wobei M die Molarmasse von Glukose ist (180 [g/mol]). Die Anzahl Aktivitätseinheiten (A) von β -Glukosidase ist definiert durch die Anzahl Mikromol Glukose produziert pro Milliliter und pro Minute:

$$A [\text{U/ml}] = (C_{\text{molar}} / t) [\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}]$$

Die spezifische Aktivität A_m beträgt $A_m [\text{U/ml}] = (A/E) [\mu\text{mol/mg} \cdot \text{min}]$ wobei die Enzymkonzentration 10 mg/ml ist. Für die Berechnung der Aktivität des derivatisierten Enzyms wird diese entsprechen 10 mg/ml derivatisiertes Enzyms zu Enzym Konzentrationen zwischen 1.5 und 9 mg/ml. (da in den Kapiteln 4.1.2 und 4.2.4 der Massen Anteil an Enzym im Derivat zu Werte zwischen 15% und 90% bestimmt wurden).

Die Fig.10 beinhaltet die berechneten Werte der Aktivität für β -Glukosidase. Eigentlich wurde die berechnete spezifische Aktivität A_m durch die Reaktionszeit multipliziert. Dies gibt einen Hinweis darüber, was für eine Menge an Glukose pro mg Enzym während der ganzen Reaktionsdauer gebildet wurde. Klar ist dass je länger die Reaktion dauert, desto mehr Glukose gebildet wird.

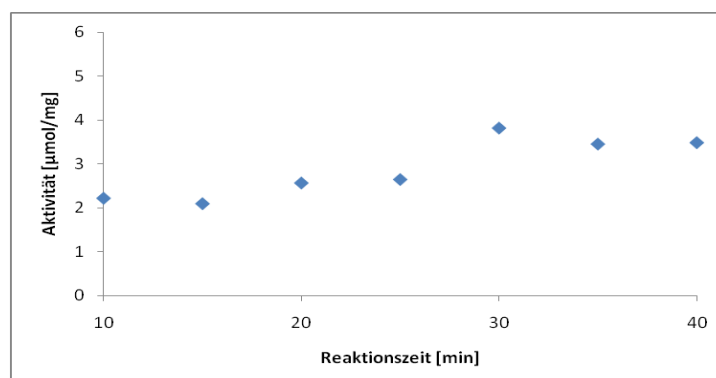


Fig.10: Aktivität der β -Glukosidase in Funktion der Zeit

Fig.11 und Fig.12 zeigen die Abnahme der Aktivität in Funktion der Anzahl Anwendungen nach Aktivität-Reaktionen bei 50°C respektiv 30°C. In Fig.11 dauerten die Reaktionen 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 Minuten. Die berechneten Am Werte wurden durch diese Zeiten multipliziert, deshalb ist die Einheit der Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{mg}$] wie in Fig.10.

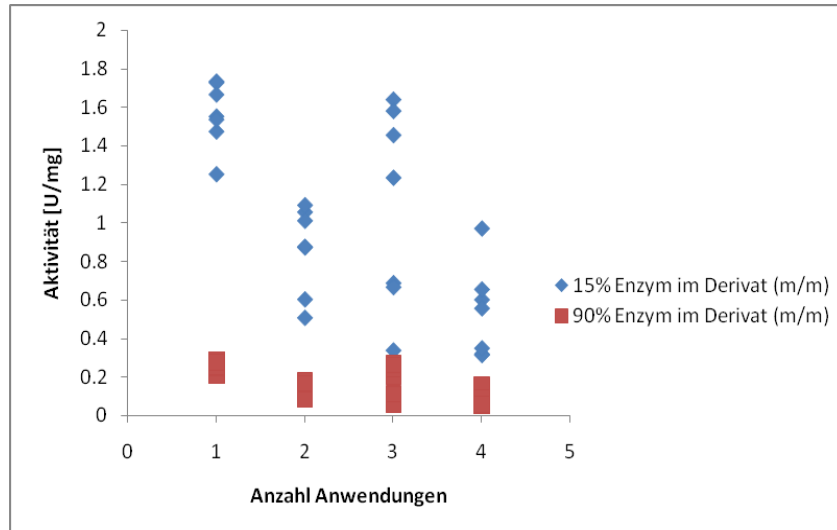


Fig.11: Abnahme der Aktivität bei 50°C in Funktion der Anzahl Anwendungen der derivatisierten β -Glukosidase

Bei der 5. Verwendung des Derivats ist keine Aktivität mehr präsent. Werden Fig.10 und Fig.11 verglichen, so ist bei der ersten Verwendung die Aktivität der derivatisierten β -Glukosidase zwischen 0.2 und 1.8 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$], also ungefähr zwei bis zwanzig Mal kleiner als bei der β -Glukosidase (wo die Aktivität zwischen 2 bis 4 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$] ist).

In Fig.12 dauerte die Reaktion 30 Minuten. Die berechneten Am Werte wurden durch diese Zeiten multipliziert.

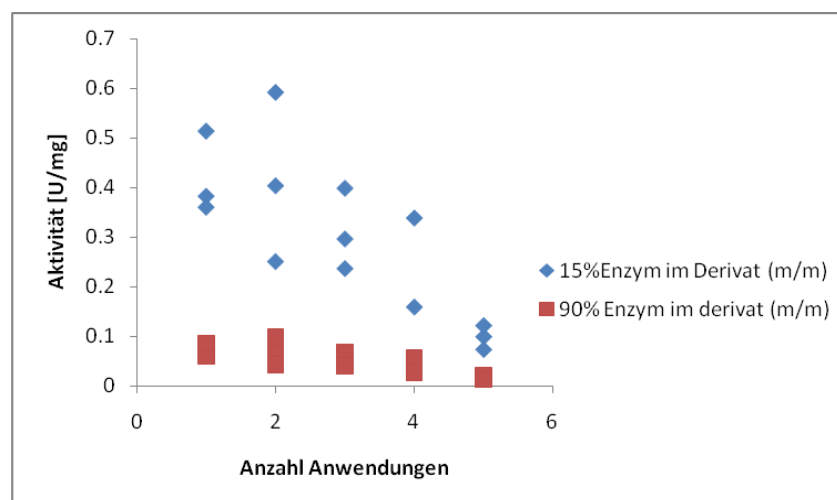


Fig.12: Abnahme der Aktivität bei 30°C in Funktion der Anzahl Anwendungen der derivatisierten β -Glukosidase

Bei der 5. Verwendung des Derivats ist keine Aktivität mehr präsent. Werden Fig.10 und Fig.12 verglichen, so ist bei der ersten Verwendung die Aktivität der derivatisierten β -Glukosidase zwischen 0.05 und 0.5 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$], also ungefähr vier bis achtzig Mal kleiner als bei der β -Glukosidase (wo die Aktivität zwischen 2 bis 4 [$\mu\text{mol}/\text{mg}$] ist).

4.2 Charakterisierung des derivatisierten Enzyms

4.2.1 LCST Messung

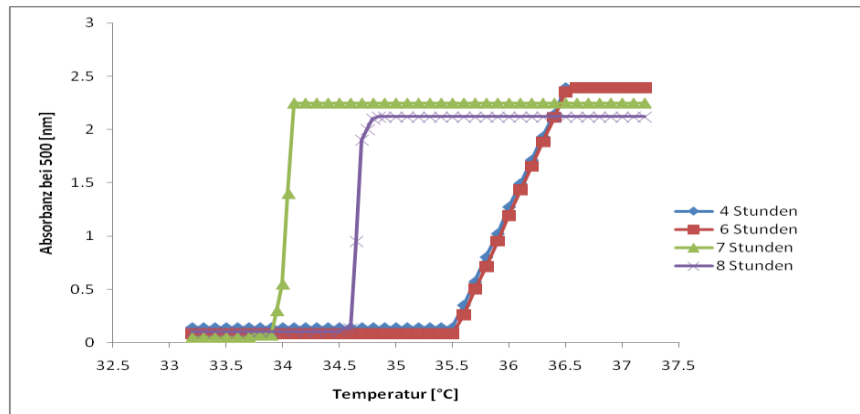


Fig.13: LCST Messungen von mit NIPAM telomerisierten β -Glukosidase, nach angegebener Reaktionszeit und 48 Stunden Dialyse, ohne Lyophilisation und ohne SEC

PNIPAM hat einen theoretischen LCST von 32.5°C. Derivatisierte β -Glukosidase scheint einen höheren LCST zu besitzen. Betrachtet man den LCST als Inflexionspunkt der gemessenen Kurve, dann ist auf der Fig. 13 zu sehen, dass dieser sich zwischen 34°C und 36°C befindet. Nach 4 Stunden Reaktion ist er höher als nach 8 Stunden Reaktion.

4.2.2 Thiol Gruppen Bestimmung

Die in Fig.14 dargestellte Eichgerade dient zur Bestimmung der Anzahl an Thiol Gruppen bei β -Glukosidase.

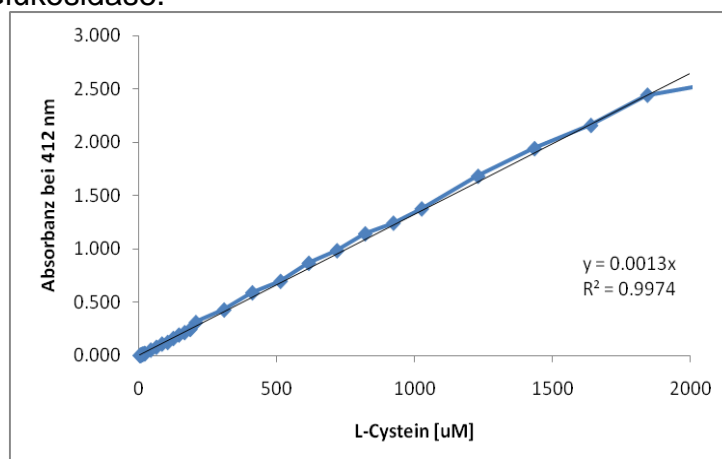


Fig.14: Eichgerade von L-Cystein

Die Konzentration an -SH Gruppen ist direkt proportional zur Cystein Konzentration da es pro Cystein eine Thiol Gruppe gibt. Die Anzahl μM β -Glukosidase wird mit Kenntnis dessen Molekularmasse (1 mol wiegt 135'000 g) berechnet. Laut Eichgerade ist die Konzentration an -SH Gruppen gleich der Absorbanz einer Probe dividiert durch 0.0013. Die Anzahl an freien Thiolgruppen ist gleich der Konzentration an -SH Gruppen dividiert durch die Konzentration an darin enthaltener β -Glukosidase.

Die Bestimmung an Thiol Gruppen für reine β -Glukosidase ergibt die in Fig.15 dargestellte Graphik. Die Anzahl an Thiol Gruppen variiert zwischen 2.5 und 4 pro Enzym in Funktion der Konzentration an Enzym

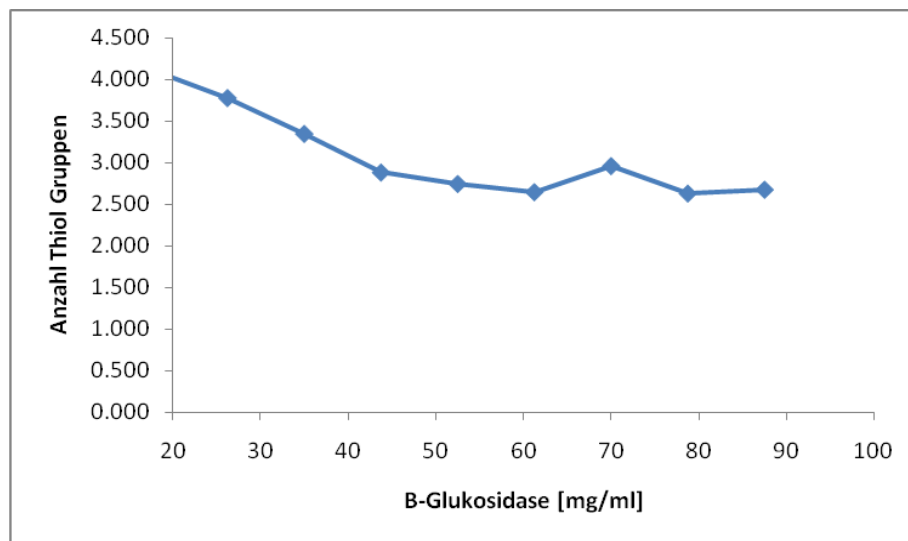


Fig.15: Anzahl Thiol Gruppen pro Enzym bei verschiedener Enzym Konzentrationen

Die Folgende Fig.16 zeigt die Abnahme der freien Thiol Gruppen an β -Glukosidase, welches die Telomerisierungsreaktion durchmacht, bei einer Konzentration von 20 mg/ml.

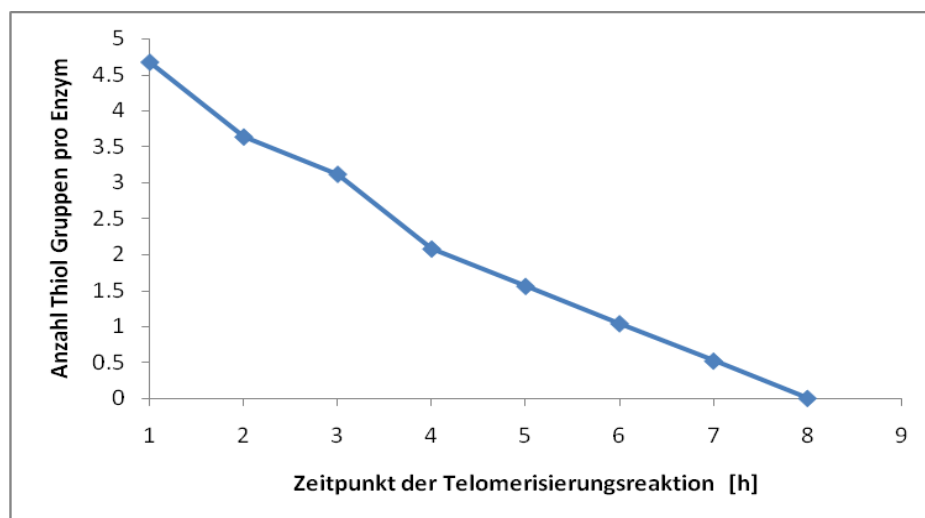


Fig.16: Abnahme der freien Thiol Gruppe in β -Glukosidase mit steigender Reaktionszeit

4.2.3 SDS-PAGE

In der Fig.17 wird nach der Telomerisationsreaktion die Probe dialysiert, danach entsteht beim lagern in einem Eppendorf Vial ein Bodensatz. Es werden Proben vom Bodensatz und vom Überstand analysiert.

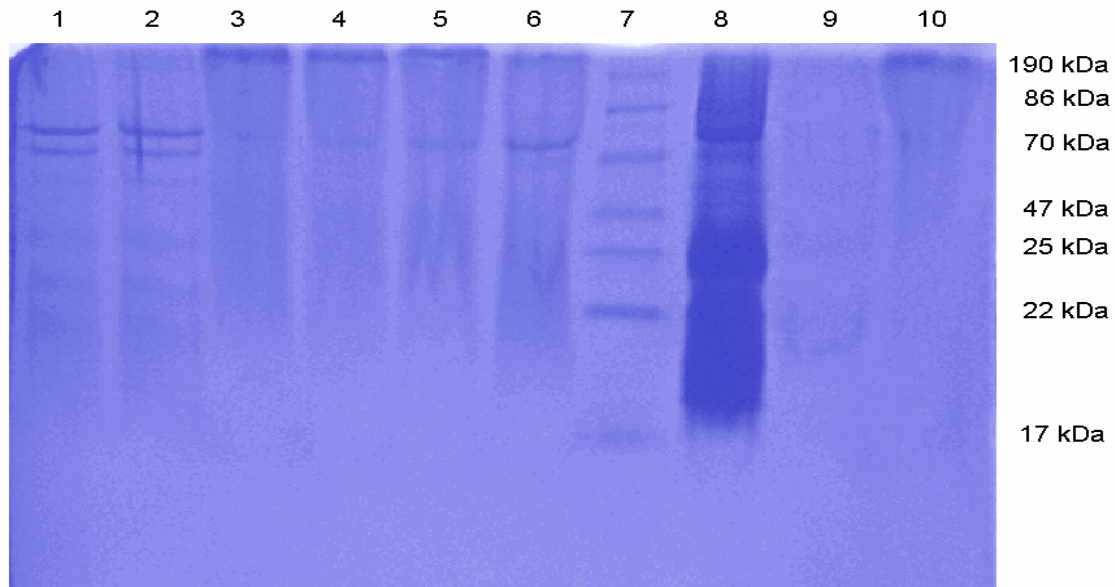


Fig.17: SDS-Page. 1) Filtrat des Bodensatzes nach 8h Telomerisation; 2) Filtrat des Bodensatzes nach 6h Telomerisation; 3) Ueberstand nach 8 h Telomerisation; 4) Ueberstand nach 7h Telomerisation; 5) Ueberstand nach 6h Telomerisation; 6) Ueberstand nach 4h Telomerisation; 7) Marker; 8) reine β -Glukosidase; 9) Telomerisation ohne Enzym, mit β -Mercaptopropionsäure; 10) Telomerisation ohne Enzym, ohne β -Mercaptopropionsäure

In Fig.17 bei 1) und 2) kommen deutlich 2 Banden zwischen 70 und 80 kDa vor, vielleicht zwei Untereinheiten des Enzyms. Werden diese 2 Werte addiert, so ergibt sich eine Grösse von 150 kDa für das derivatisierte Enzym. Es gibt jedoch Spuren die zwischen 20 und 50 kDa variieren, diese stammen vielleicht von PNIPAM welches nicht am Enzym gebunden ist, und grösser ist als den MWCO der Dialyse Membran und deshalb vom Enzym nicht getrennt wird. 3) bis 6) zeigen 2 Banden, eine bei minimum 190 kDa und eine zwischen 70 und 80 kDa. Es könnte sein dass das derivatisierte Enzym 190 kDa gross ist, die Bande bei 70 kDa könnte eine Untereinheit sein die kaum mit Polymer beladen ist. 9) zeigt kaum Spuren während 10) bei 190 kDa eine Spur nachweist. Dies kann eine Anhäufung von Polymer bedeuten.

In Fig.18 wurden die Telomerisationslösungen dialysiert, ohne Bodensatz und Überstand zu trennen. Es wurde kein size exclusion chromatographie durchgeführt.

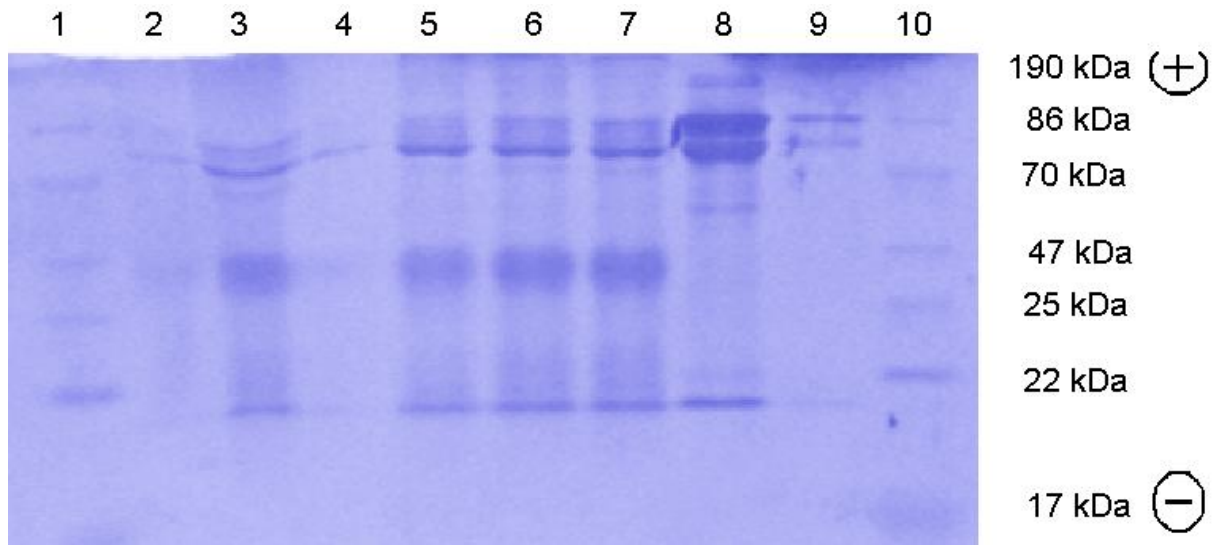


Fig.18: SDS-Page. 1) Marker; 2) β -Glukosidase; 3) β -Glukosidase, 10 mal verdünnt; 4) derivatisierte β -Glukosidase, 1 Stunde telomerisiert ; 5) derivatisierte β -Glukosidase, 2 Stunden telomerisiert; 6) derivatisierte β -Glukosidase, 3 Stunden telomerisiert; 7) derivatisierte β -Glukosidase, 3 Stunden telomerisiert; 10 mal verdünnte Probe; 8) derivatisierte β -Glukosidase, 5 Stunden telomerisiert; 9) derivatisierte β -Glukosidase, 5 Stunden telomerisiert; 10 mal verdünnte Probe; 10) Marker

In Fig.18 bei 2) und 3) sind deutlich zwei Banden zwischen 70 und 86 kDa zu sehen, was zwei Untereinheiten charakterisiert. Weniger erklärbar sind die Banden bei 22 und zwischen 25 und 47 kDa, vielleicht sind es Unreinheiten. Im Elektronen Mikroskopie Kapitel wird gezeigt, dass β -Glukosidase in einer Matrix eingeschlossen ist, vielleicht sind diese Banden Teile dieser Matrix. In 5) bis 9) gibt es Spuren zwischen 70 und 86 kDa und 190 kDa. Wahrscheinlich sind in der Telomerisationslösung neben der derivatisierten β -Glukosidase noch unberührte β -Glukosidase. Diese wurde deshalb von der derivatisierten β -Glukosidase durch SEC getrennt, damit sie keinen Einfluss auf die Aktivität der derivatisierten β -Glukosidase hat.

In Fig.19 wurden die Telomerisationslösungen dialysiert, ohne Bodensatz und Überstand zu trennen. Die Proben 8 und 9 wurden zudem mittels Size Exclusion Chromatographie isoliert.

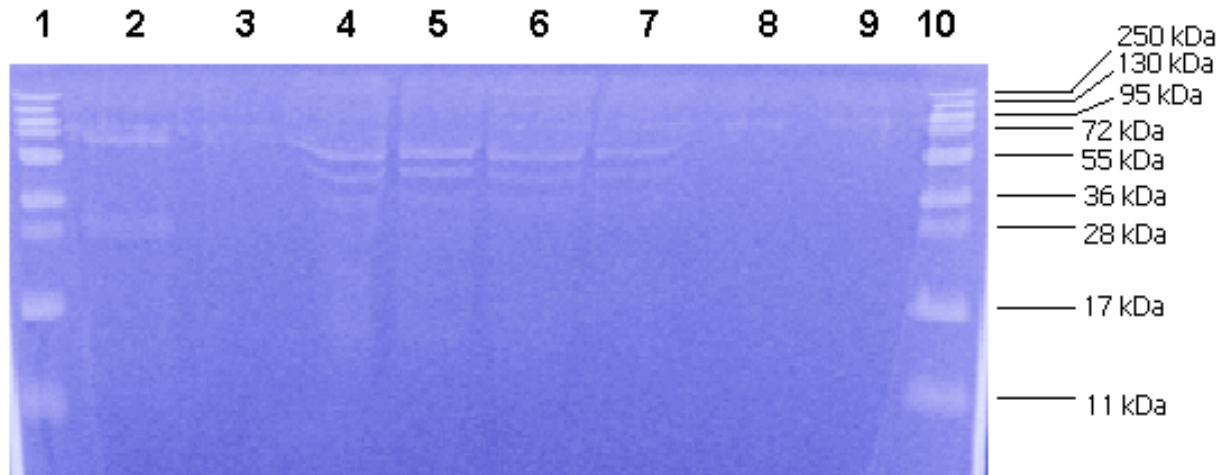


Fig.19: SDS-PAGE: 1) Marker, 2) β -Glukosidase, 3) PNIPAM, 4) derivatisierte β -Glukosidase, 8 Stunden telomerisiert, 5) derivatisierte β -Glukosidase, 7 Stunden telomerisiert, 6) und 7) derivatisierte β -Glukosidase, 6 Stunden telomerisiert, 8) und 9) derivatisierte β -Glukosidase, 6 Stunden telomerisiert, nach SEC und lyophilisieren

In Fig.19 scheint die 2) neuerdings zwei Untereinheiten von zwischen 28 und 36 kDa und ungefähr 72 kDa zu haben. 3) zeigt eine kaum sichtbare Bande bei 95 kDa an, 4), 5), 6) und 7) zeigen mehrere Banden zwischen 36 und 250 kDa an, wobei die zwei intensivsten sich bei 55 und 72 kDa befinden, was auf 2 Untereinheiten des Enzyms hinweist, sowie ein möglich derivatisiertes Enzym das bis zu 250 kDa gross ist. 8) und 9) zeigen keine Spuren von Untereinheiten zwischen 50 und 70 kDa sondern zwischen 95 und 250 kDa, mit ziemlich schwacher Intensität. Es könnte also sein, dass die nicht derivatisierte β -Glukosidase, die zwei Banden zwischen 50 und 70 kDa aufweist durch die SEC vollständig entfernt wurde.

Die Fig.20 entspricht der Fig.19 wobei die Licht-Intensität beim Fotografieren geändert wurde. Es wird besser sichtbar, dass die beiden Banden bei 250 kDa und bei 95 kDa bei jeder Probe auftreten, sogar wo sie nicht sollten, nämlich bei der reinen β -Glukosidase. Diese Banden könnten also bei der SDS_PAGE migrationsunabhängig von der Grösse der darin enthaltenen Proben entstanden sein (Manipulationsfehler). Dies stellt wiederum in Frage ob bei der Size exclusion nicht auch die derivatisierte β -Glukosidase entfernt worden ist. Die Aktivitätsmessung im Kapitel 4.1.3 beweist, dass ein wenig Aktivität vorhanden ist. Vielleicht ist so wenig derivatisiertes Enzym übrig das die Bande von sehr schwacher Intensität ist und deshalb kaum sichtbar.

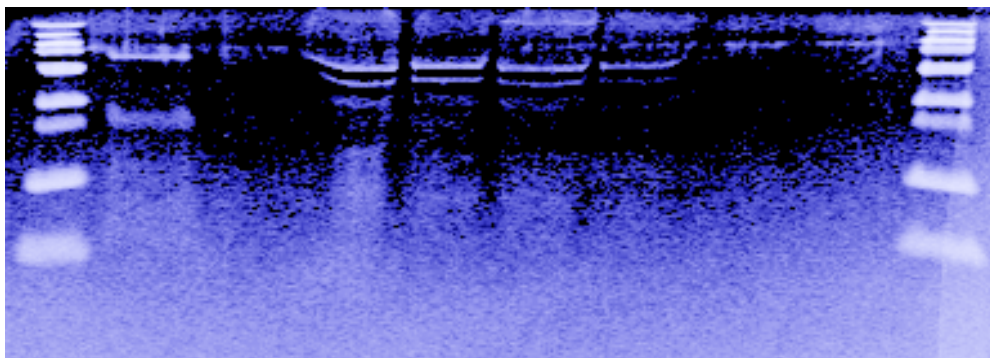


Fig.20: Details der Fig.3

Es wird klar, dass derivatisierte Enzyme und reines PNIPAM dieselben Banden aufweist, (welche überall anders auch vorkommen) diese weisen eher auf eine Fehlmanipulation. In diesem Fall sind derivatisierte Enzyme zu verdünnt um sichtbar zu sein, und PNIPAM migriert wahrscheinlich gar nicht.

4.2.4 ^1H -NMR

Die Fig.21 ist das qualitative ^1H -NMR Spektrum von einem Gemisch von PNIPAM und Pyrazin gelöst in D_2O .

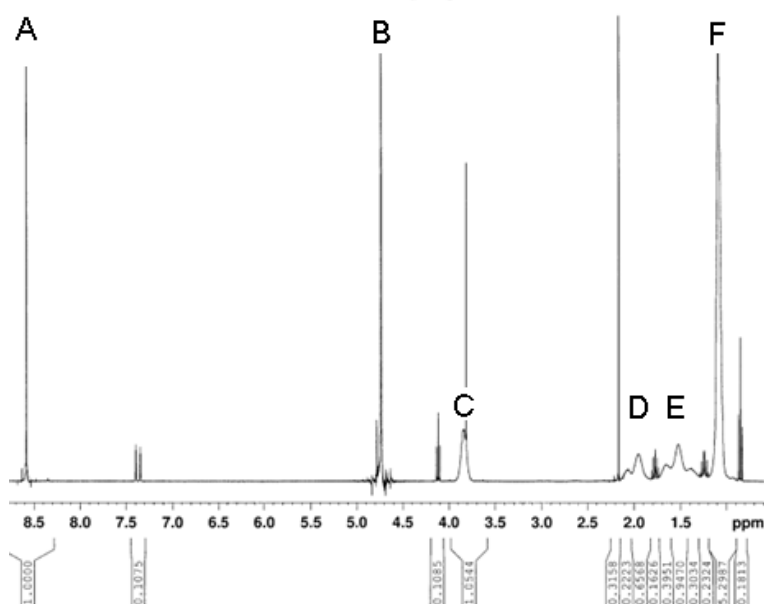


Fig. 21: PNIPAM und Pyrazin. A) Pyrazin, B) D_2O , C) CH Gruppe neben dem Sekundären Amin des Polymers, D) CH Gruppe des Rückgrats von PNIPAM, E) CH_2 Gruppe des Rückgrats von PNIPAM, F) CH_3 der Dimethylgruppe des Polymers

Die Fig.22 ist das qualitative ^1H -NMR Spektrum von einem Gemisch von β -Glukosidase und Pyrazin gelöst in D_2O .

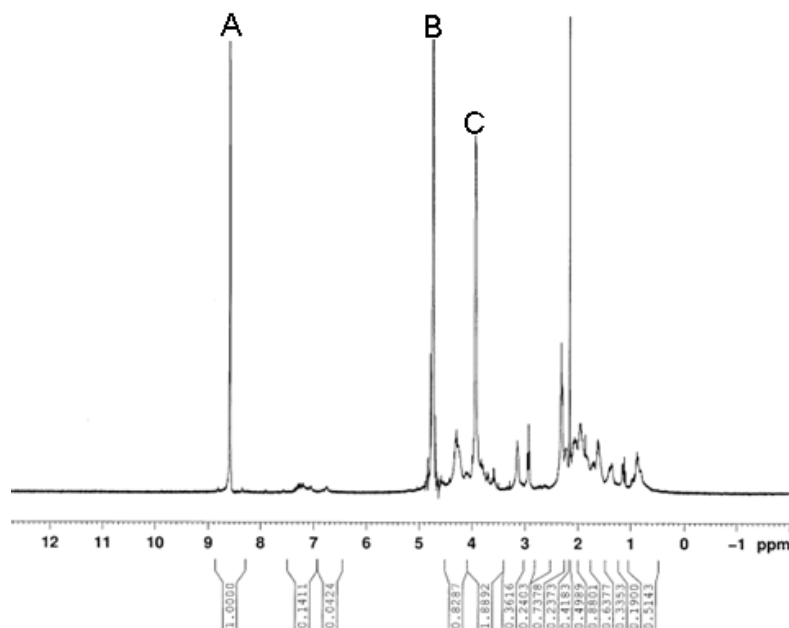


Fig.22: β -Glukosidase und Pyrazin. A) Pyrazin, B) D_2O , C) vermutliche CH Gruppe aus dem Enzym.

Das in Fig.23 am Enzym gebundenen Polymer mit entsprechenden Gruppen (C-F) die in den vorigen Figuren y und w vorkommen.

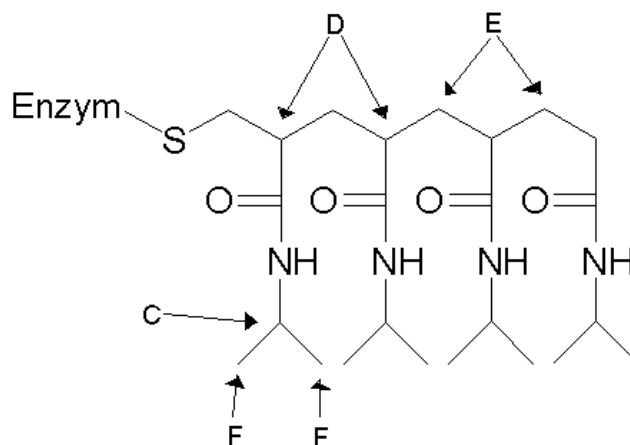


Fig 23: Derivatisierte β -Glukosidase

Die 4 symmetrisch verteilten Protone des Pyrazins (Fig.24) eignen sich gut als interner Standard

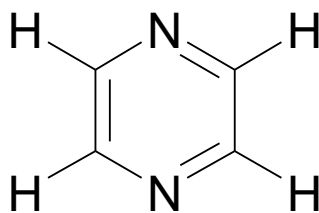


Fig.24: Pyrazin

Zur Quantifizierung des Polymers in einer Probe von telomerisiertem Enzym wird eine Rechnungsmethode die in der Industrie benutzt wird verwendet (siehe Anhang ^1H -NMR):

% Produkt in Gemisch = $(100 \times \text{Integral des Produkts} \times \text{Menge interner Standard} \times \text{Molarmasse des Produkts} \times \text{Anzahl Protone des internen Standards}) / (\text{Integral des internen Standards} \times \text{Menge des Produkts} \times \text{Molarmasse des internen Standards} \times \text{Anzahl Protonen des ausgesuchten Peaks des Produktes})$

Das folgende Spektra (Fig.25) ist von einem Gemisch aus 11.21 mg telomerisierte β -Glukosidase und 2.72 mg Pyrazin in D_2O .

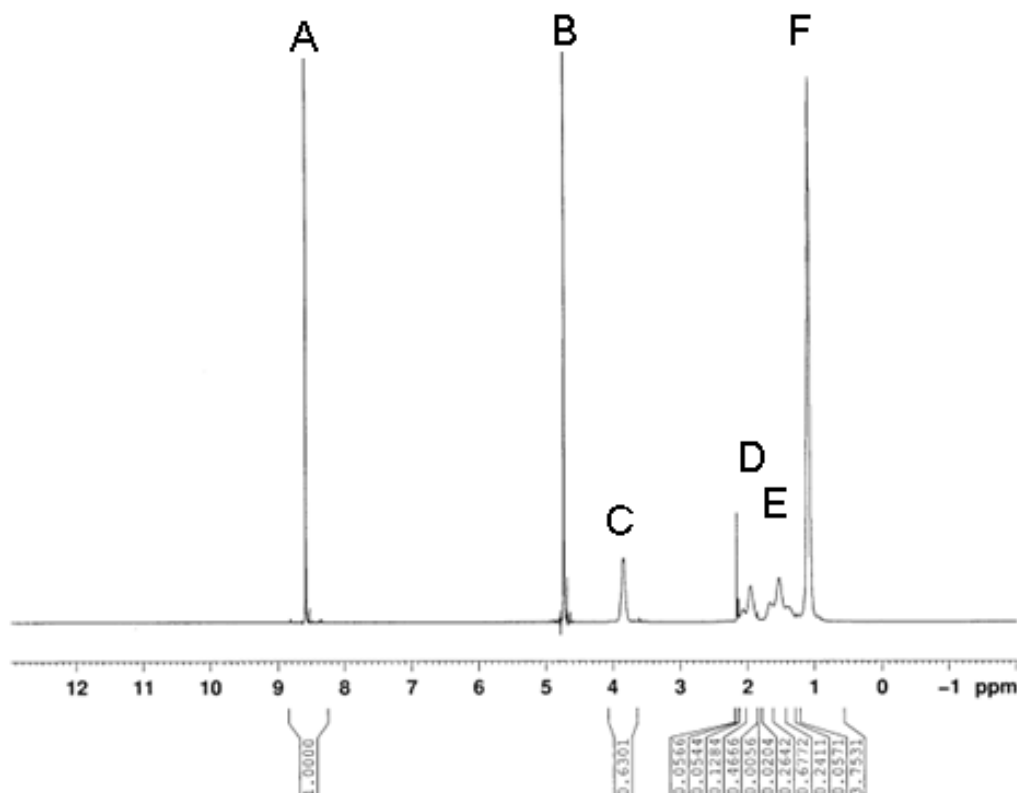


Fig.25: β -Glukosidase, PNIPAM und Pyrazin. A) Pyrazin, B) D_2O , C) CH Gruppe neben dem Sekundären Amin des Polymers, D) CH Gruppe des Rückgrats von PNIPAM, E) CH_2 Gruppe des Rückgrats von PNIPAM, F) CH_3 der Dimethylgruppe des Polymers

Der Peak F eignet sich gut zur Auswahl für die Berechnung da er ziemlich sauber vorliegt und bei β -Glukosidase nicht vorkommt. Wird die Formel zur Berechnung des Anteils an Polymer im derivatisiertem Enzym angewendet, $(100 \times 3.7531 \times 2.72 \times 113 \times 4) / (1 \times 11.21 \times 80 \times 6) = \mathbf{85.75\% \text{ PNIPAM (m/m)}}$.

4.2.5 Infrarot Spektroskopie-FTIR

Die Fig. 26 bis 27 sind Spektren zwischen 500 und 4000 cm^{-1} von β -Glukosidase, PNIPAM und derivatisierter β -Glukosidase.

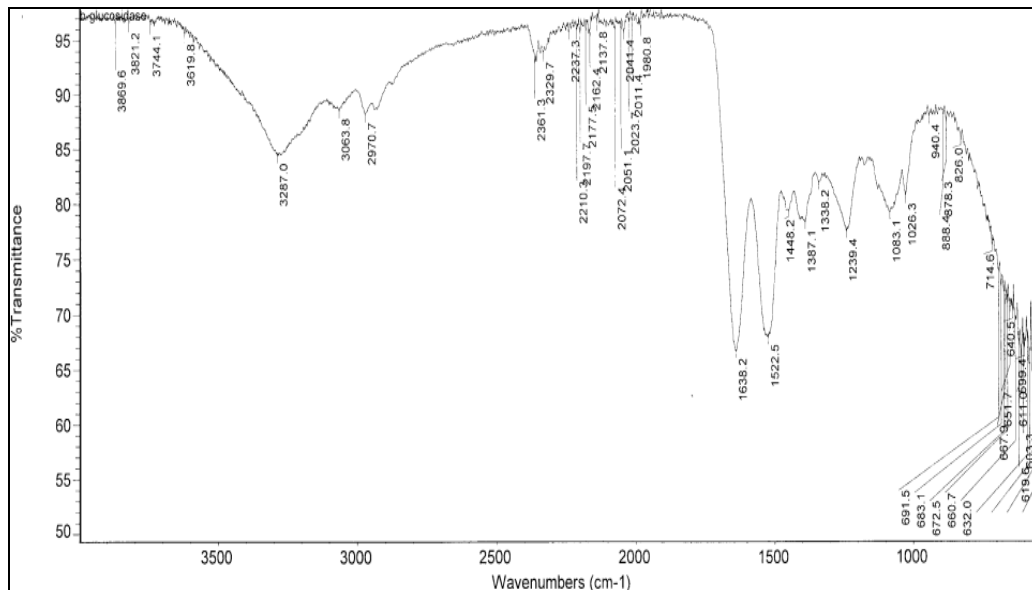


Fig.26: Spektrum der β -Glukosidase

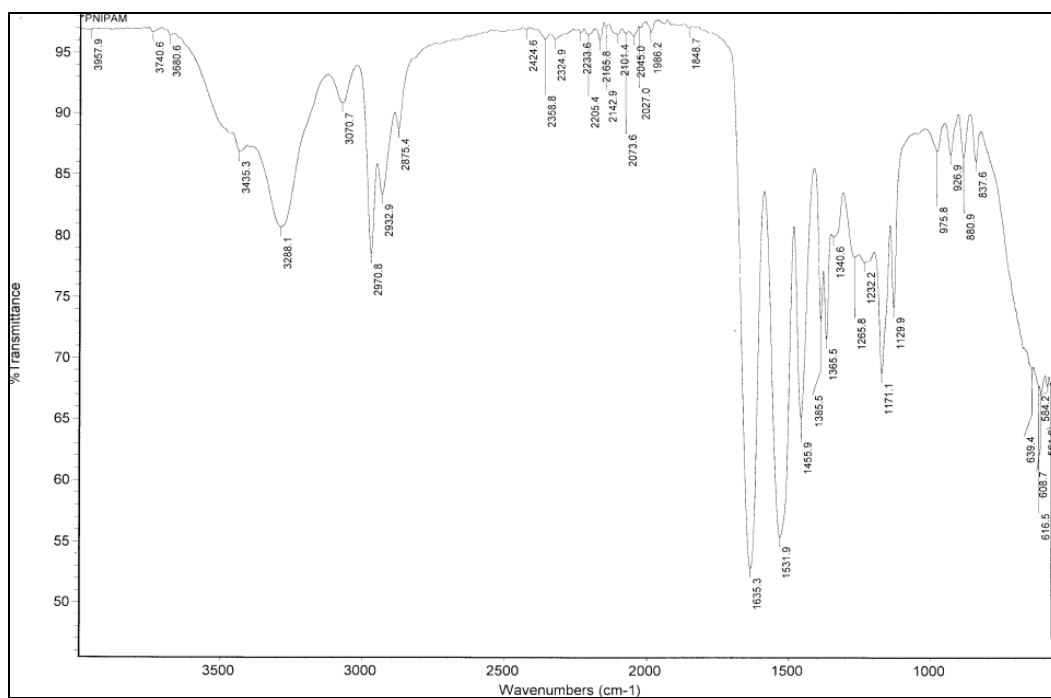


Fig.27: Spektrum von PNIPAM

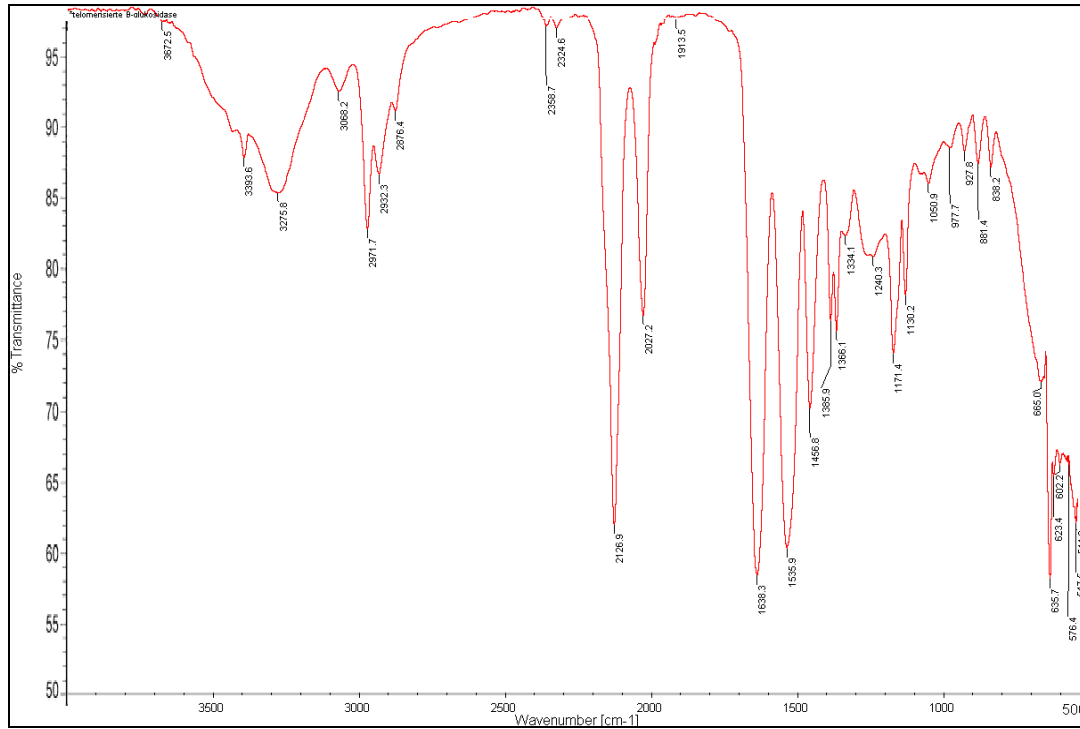


Fig.28: Spektrum von derivatisierter β -Glukosidase

In der Fig.29 sind Überlappungen der Spektren von β -Glukosidase und derivatisierter β -Glukosidase.

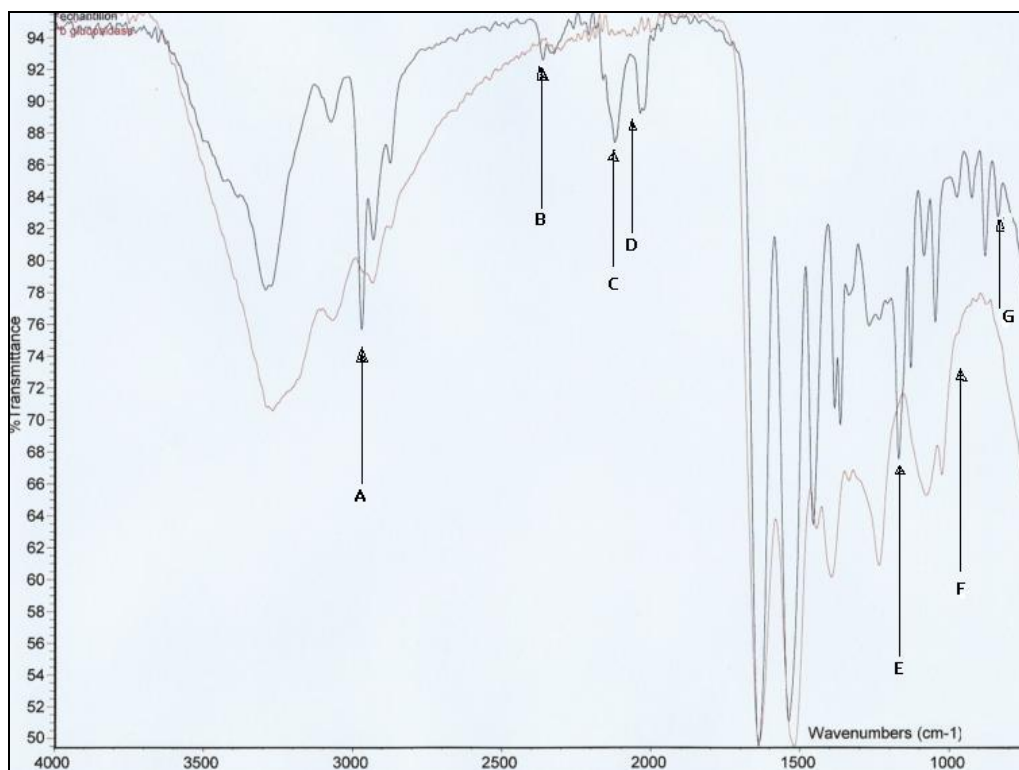


Fig.29: Überlappung der Spektren von β -Glukosidase und derivatisierte β -Glukosidase

Peaks welche bei nur einem der beiden Spektren anwesend sind werden durch einen Buchstaben markiert: A) Abwesender Peak im β -Glukosidase, Anwesend in

derivatisierter β -Glukosidase bei 2970 cm^{-1} , B) Abwesender Peak im β -Glukosidase, Anwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 2400 cm^{-1} , C) Abwesender Peak im β -Glukosidase, Anwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 2130 cm^{-1} , D) Anwesender Peak in β -Glukosidase, Abwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 2100 cm^{-1} , E) Abwesender Peak im β -Glukosidase, Anwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 1170 cm^{-1} , F) Abwesender Peak im β -Glukosidase, Anwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei cm^{-1} , G) Abwesender Peak im β -Glukosidase, Anwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 830 cm^{-1} .

In der Fig. 30 sind Überlappungen der Spektren von derivatisierter β -Glukosidase und PNIPAM.

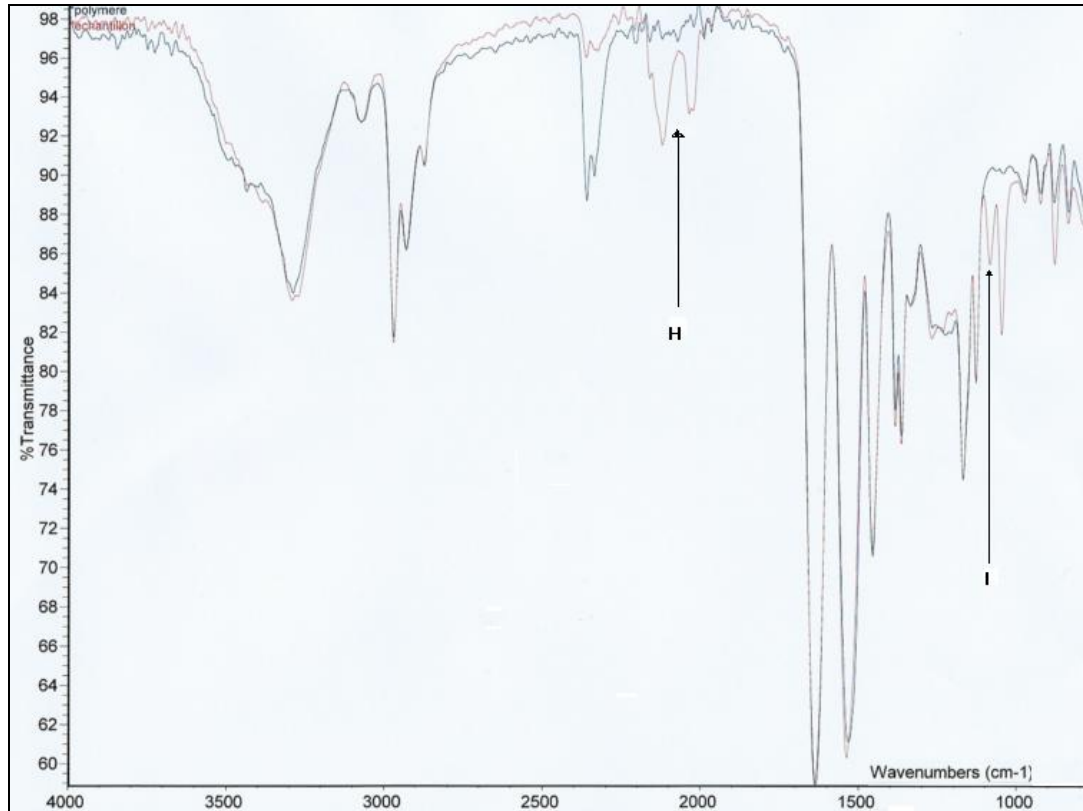


Fig.30: Überlappung der Spektren von PNIPAM und derivatisierte β -Glukosidase

Peaks welche bei nur einem der beiden Spektren anwesend sind werden durch einen Buchstaben markiert. H) Anwesender Peak im Polymer, Abwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 2050 cm^{-1} . I) Abwesender Peak im Polymer, Anwesend in derivatisierter β -Glukosidase bei 1050 cm^{-1}

Beim Vergleich von Fig.29 und Fig.30 muss herausgefunden werden, welchen Peak nur bei einem der drei Spektren vorkommt. Der Peak A kommt in Fig.E zweimal vor. Er ist also ein Merkmal des Polymers, da er bei der reinen β -Glukosidase fehlt. Genauso wie Peaks B, C, E und G.

Die Peaks D und H (bei 2050 cm^{-1}) befinden sich bei β -Glukosidase und PNIPAM, jedoch nicht bei derivatisierter β -Glukosidase. Die Peaks I und F (bei 1050 cm^{-1}) existieren nicht bei β -Glukosidase und PNIPAM, befinden sich jedoch bei derivatisierter β -Glukosidase.

Laut Handbook of Chemistry and Physics [25] gibt es bei 2050 cm^{-1} folgende Funktional Gruppen: Isocyanate ($-\text{N}=\text{C}=\text{O}$) oder Halogenide ($-\text{C}=\text{X}$). Keine dieser Gruppe kommt nur bei β -Glukosidase und PNIPAM. Der Peak bei 2050 cm^{-1} hat also kaum Bedeutung. Bei 1050 cm^{-1} gibt es folgende Funktional Gruppen: N-propyl, Isopropyl, aromatische Ether, primäre Alkohole, aliphatische Aldehyde, primäre und sekundäre Amine. Keine von denen könnte eine Gruppe sein die nur bei derivatisierter β -Glukosidase vorkommt. Die einzige Gruppe die nur bei derivatisierter β -Glukosidase vorkommt ist Thioether.

Die Tabellen im Handbook of Chemistry and Physics bezeichnen die Anwesenheit einer Thioether Gruppe zwischen $670\text{--}770\text{ cm}^{-1}$. Eine solche verbindet die β -Glukosidase mit dem Polymer und sollte deshalb im Spektrum der telomerisierten β -Glukosidase vorkommen, und weder beim Enzym allein (vermutlich) noch beim Polymer allein (Fig 31).

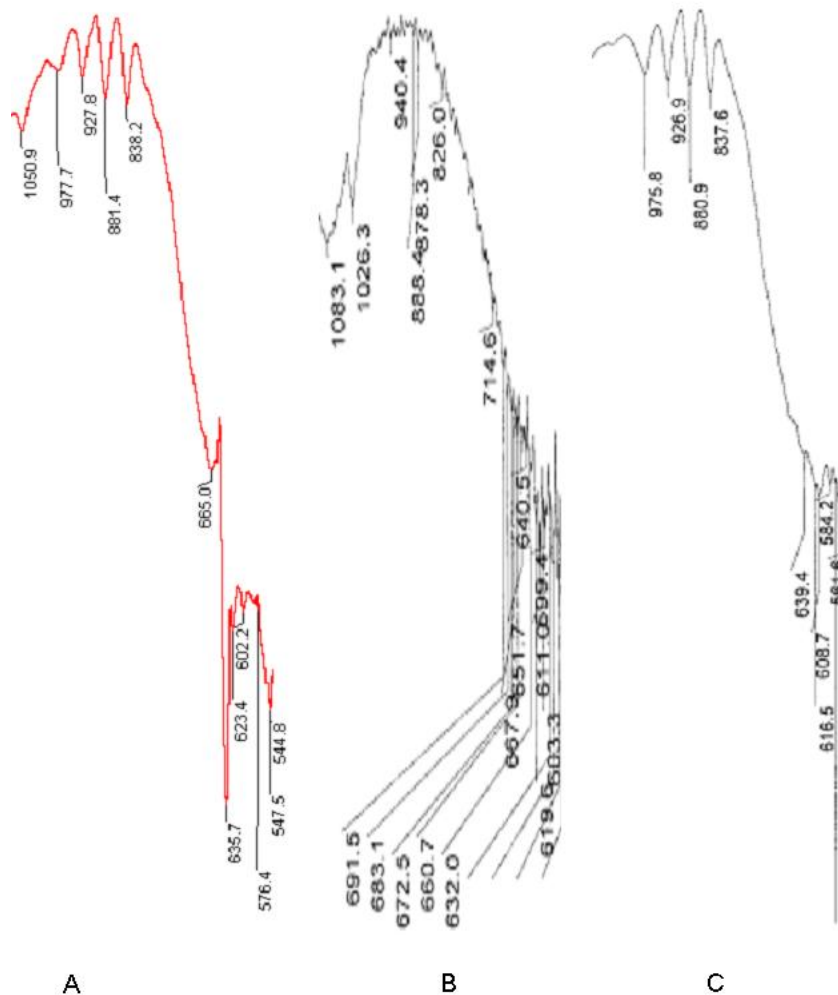


Fig.31: Ausschnitt der FTIR Spektren im Bereich $500\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. **A)** derivatisierte β -Glukosidase, **B)** β -Glukosidase, **C)** PNIPAM

Der Peak bei 665 cm^{-1} der nur in A vorkommt könnte die Thioether Gruppe charakterisieren, welche β -Glukosidase mit dem Polymer verbindet.

4.2.6 Maldi-Tof-MS

Das einzig brauchbare Spektra ist das von PNIPAM, das in HES-SO synthetisiert wurde [21], die Spektren von Enzym und telomerisiertem Enzym sind unklar. Sie sind im Anhang vorhanden.

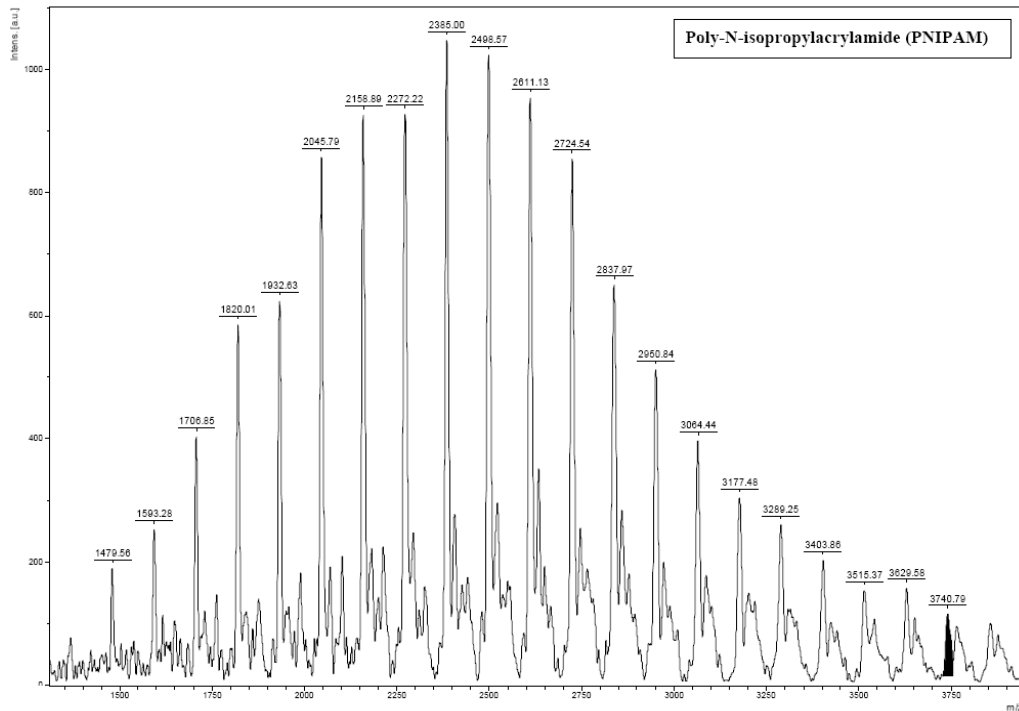


Fig.32: Massenspektra des PNIPAM

Das in Fig.32 erscheinende Massenspektra des PNIPAM ergibt, das die am häufigsten auftretenden Masse des Polymers 2385 g/mol ist. Die Peaks die sich daneben finden sind jeweils von 113 g/mol entfernt und entsprechen genau der Molekularmasse des NIPAM Monomers.

4.2.7 Elektronen Mikroskopie

Die erste Methode, bei welcher die Proben stark verdünnt wurden, auf ein Goldplättchen gelegt, bei Raumtemperatur verdampft und mit Kohlenstoff besprüht worden sind ergibt die Fotos die in den Fig.33 bis Fig.35 dargestellt sind.

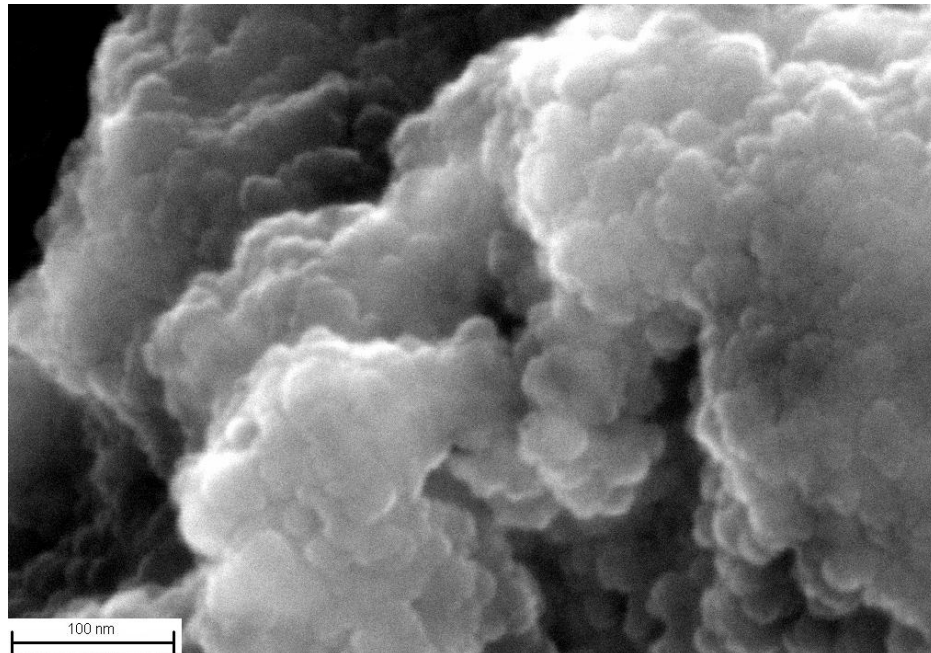


Fig.33: β -Glukosidase

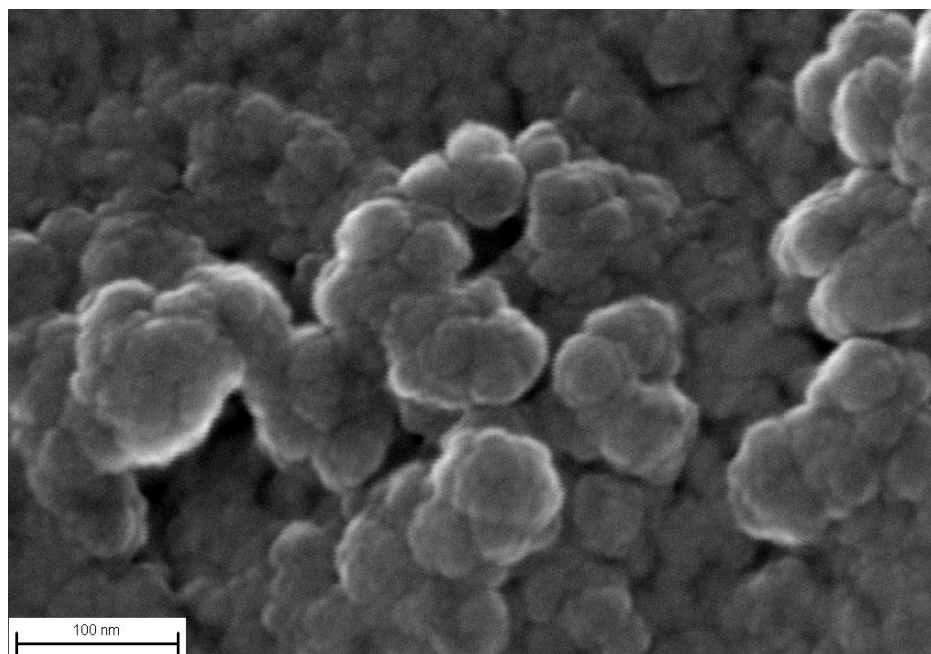


Fig.34: PNIPAM

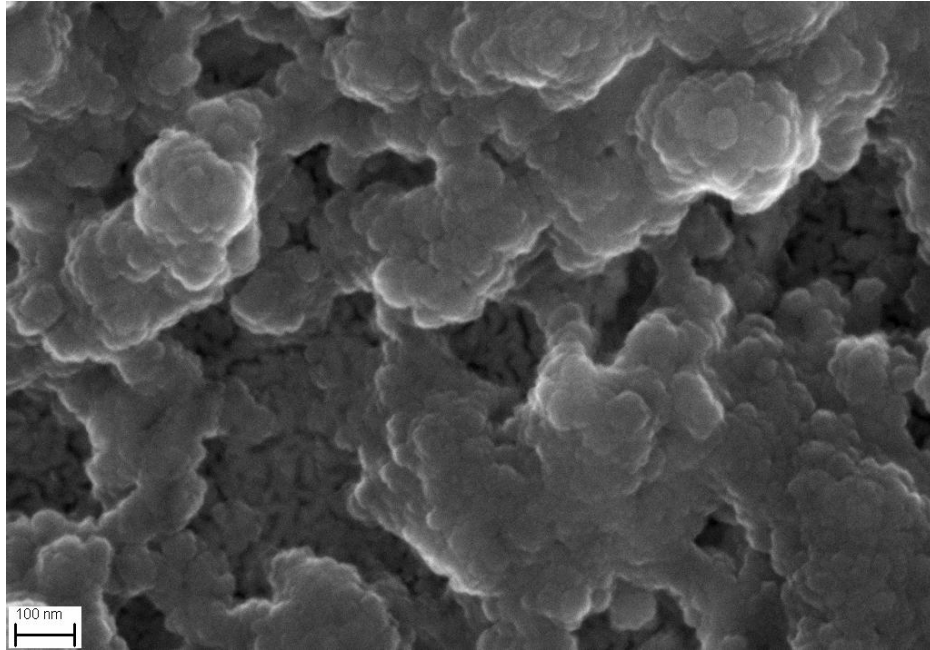


Fig.35: Derivatisierte β -Glukosidase

Die Fig.33 bis Fig.35 zeigen identische Strukturen. Dazu gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder nehmen die drei Proben bei der Vorbereitung durch die erste Methode dieselbe Struktur an, oder es wurde drei Mal dieselbe Probe prepariert.

Die zweite Methode, bei welcher die Proben im festen Zustand auf ein Kohlenstoffplättchen gelegt wurden um mit Kohlenstoff besprüht worden sind, ergibt die Fotos die in den Fig.36 bis Fig.39 dargestellt sind.

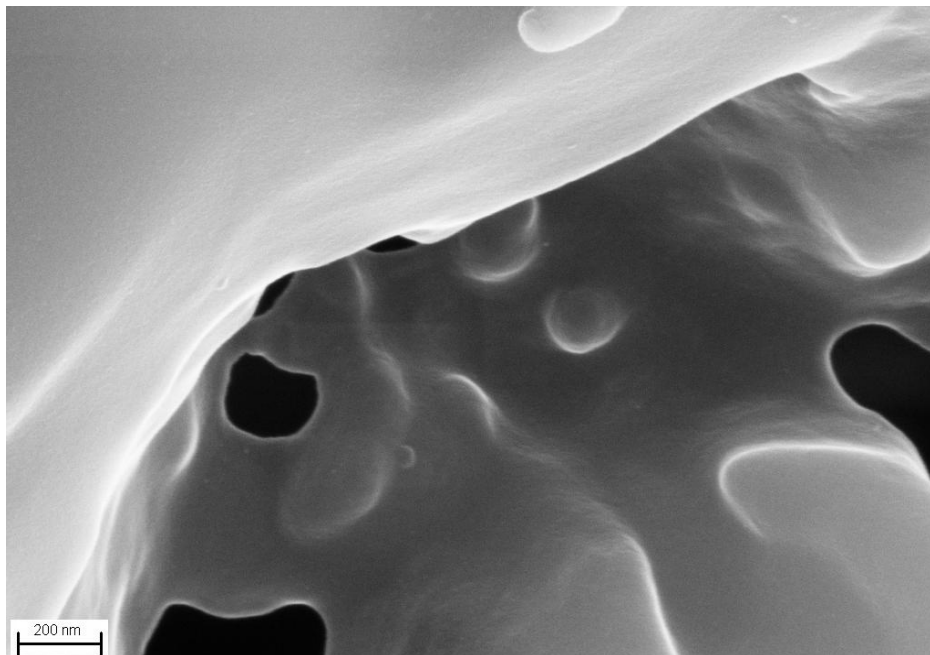


Fig.36: β -Glukosidase

Im festen Zustand gibt es keine oder nur wenige freie Proteine. Diese scheinen eher in einer Matrix eingeschlossen zu sein, welche zur Konditionierung des Enzyms dienen kann.

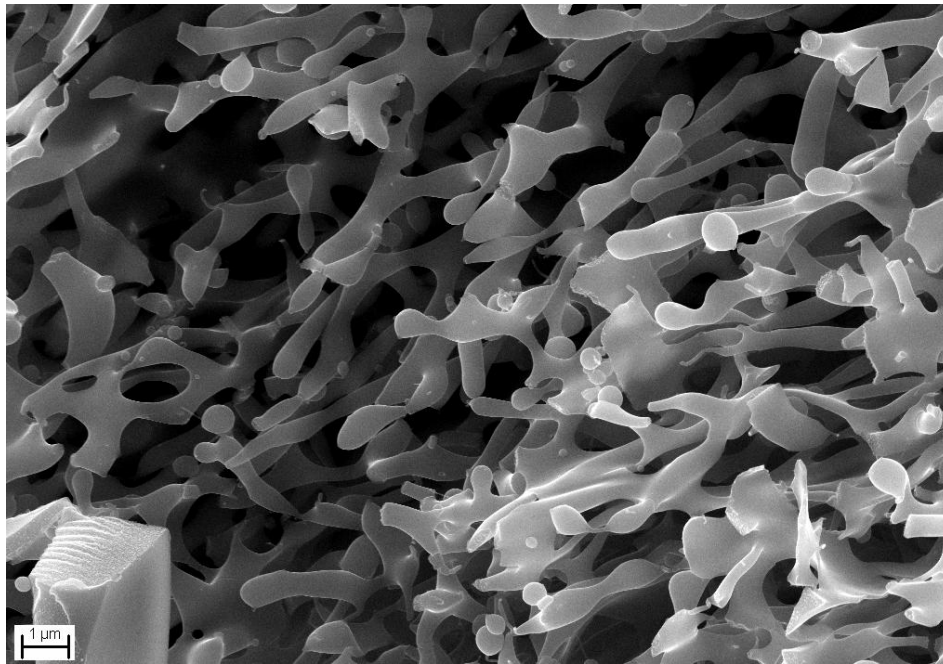


Fig.37: PNIPAM

Von blosssem Auge ist PNIPAM im festen Zustand Schichtenweise aufgebaut, am Mikroskop erscheinen lange schmale vernetzte Strukturen.

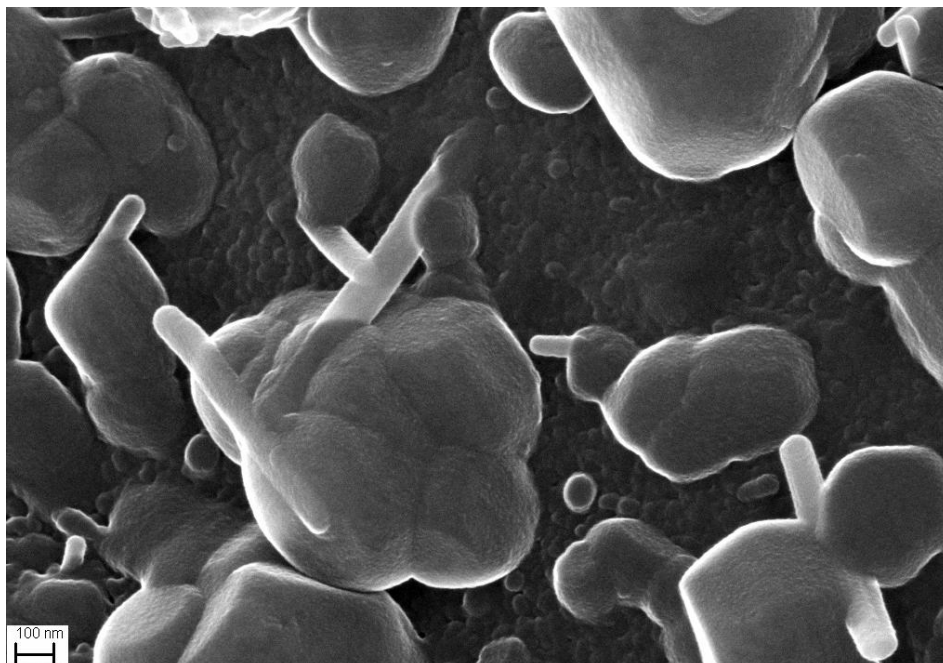


Fig.38: Derivatisierte β -Glukosidase

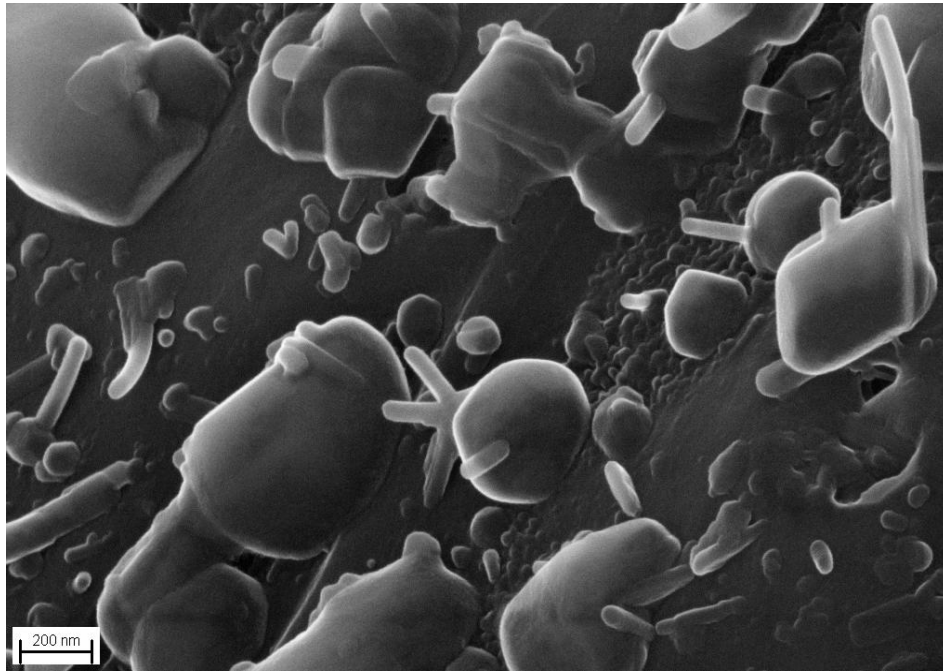


Fig.39: Derivatisierte β -Glukosidase

Die in Fig.38 und Fig.39 dargestellten Strukturen zeigen vermutlich derivatisierte β -Glukosidase. Polymere in Form von Stäbchen sind mit den rundförmigen Enzymen β -Glukosidase kovalent gekoppelt. In der Literatur sind interessante Bilder von PNIPAM erwähnt, die jedoch kugelförmig sind und ungefähr 2 μm gross. [24]

4.3 Handlungen in ionischen Flüssigkeiten

4.3.1 Messung der Verteilungskoeffizienten Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase im Zweiphasigen System [BMIM][PF₆]/Natrium-Azetat Puffer

Zuerst wurden die Eichgerade zur Bestimmung der Konzentrationen an Cellobiose in Funktion der bei HPLC erhaltenen Flächen erstellt (Fig.40), sowie die zur Bestimmung der Konzentration an β -Glukosidase in Funktion der Absorbanzmessung mittels Bradford Test (Fig.41). Die Eichgerade zur Bestimmung der Konzentration an Glukose wurde im Kapitel 4.1.3 zur Aktivität Messung erstellt (Fig.9).

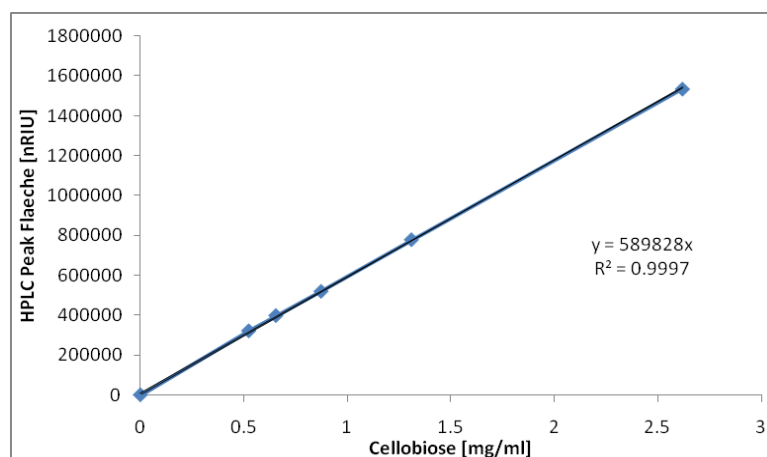


Fig.40: HPLC Peak Fläche in Funktion der Konzentration an Cellobiose

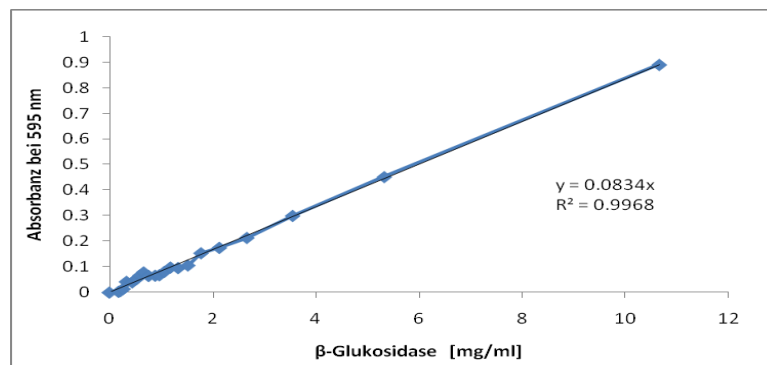


Fig.41: Absorbanz in Funktion der Konzentration an β -Glukosidase

Diese Eichgeraden dienen dazu die Werte zur Verteilungen in den Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 zu berechnen.

Die folgende Fig.42 enthält Gruppen von 3 Werte pro Anteil ionischer Flüssigkeit in Na-Azetat Puffer die ziemlich nahe liegen, sie liegen nie mehr als 10% auseinander. Tendenziell liegt die Verteilung zwischen 40% und 60 % und bleibt unabhängig vom Anteil an ionischer Flüssigkeit konstant. Allein bei höheren Konzentration an ionischer Flüssigkeit bei β -Glukosidase steigt der Anteil an β -Glukosidase in der ionischen Flüssigkeit.

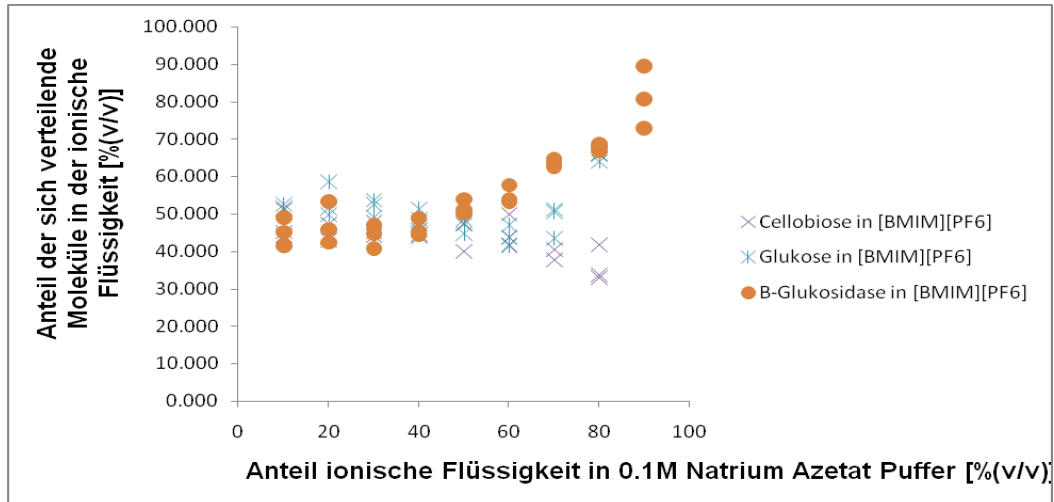


Fig.42: Anteil an Ziel Molekülen in [BMIM][PF₆] in Funktion dessen Anteils in [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat

4.3.2 Messung der Verteilungskoeffizienten Cellobiose, Glukose und β -Glukosidase im Zweiphasigen System [BDMIM][PF₆]/NatriumAzetat Puffer

Die Fig.43 enthält Gruppen von 3 Werte pro Anteil ionischer Flüssigkeit in Na-Azetat Puffer die sich gegenüber weniger nahe liegen als in Tabelle A. Es gibt tatsächlich bis zu 40% Unterschied zwischen manchen Werten, dies obwohl Messungen wiederholt worden sind, nachdem Ausreisser durch den Q-Test ausgeschieden wurden.

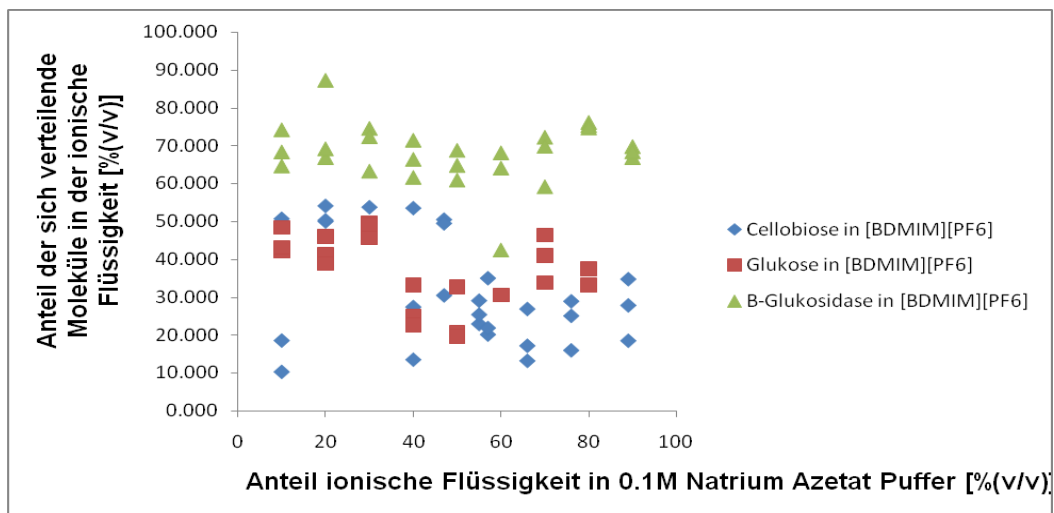


Fig.43: Anteil an Ziel Molekülen in [BDMIM][PF₆] in Funktion dessen Anteils in [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat

Die Tendenz zur Verteilung scheint aber wie in Fig.43 konstant zu sein bei verschiedenen Anteilen an ionischer Flüssigkeit. Allerdings verteilt sich β -Glukosidase zwischen 60 und 80% in die ionische Flüssigkeit.

Grob gesehen verteilen sich Cellobiose und Glukose zwischen 10 und 50 % respektiv zwischen 20 und 50% in [BDMIM][PF₆].

Vergleich zwischen [BMIM][PF₆] und [BDMIM][PF₆]:

Die Fig.44 bis Fig.46 zeigen die Werte die in Fig.42 und Fig.43 gezeigt wurden. Die Fig.44 zeigt insgesamt grössere und weniger auseinander geratene Werte der Verteilung von Cellobiose in [BMIM][PF₆] als in [BDMIM][PF₆].

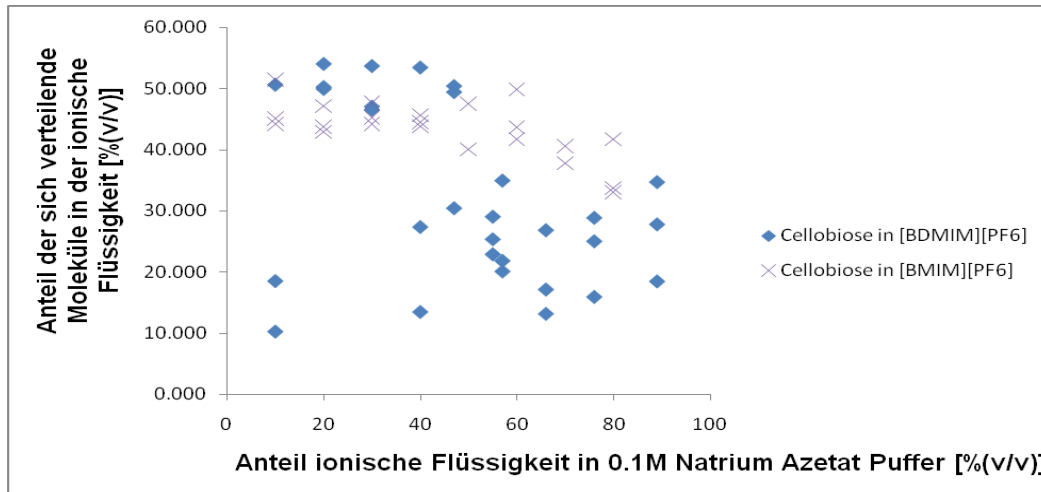


Fig.44: Anteil an Ziel Molekülen in [BMIM][PF₆] in Funktion dessen Anteils in [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat

Die Fig.45 zeigt insgesamt weniger auseinander liegende Werte der Verteilung von Glukose in [BMIM][PF₆] als in [BDMIM][PF₆].

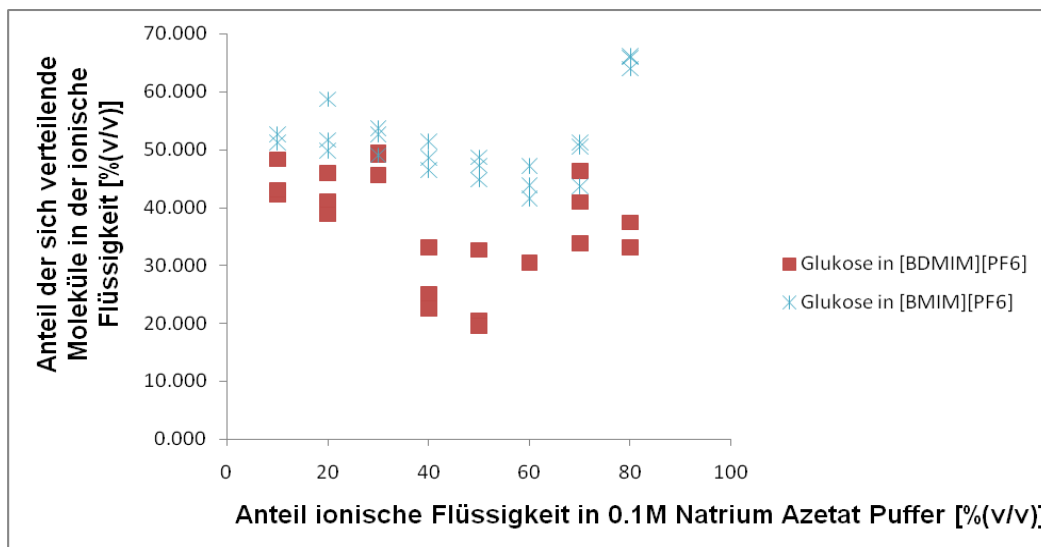


Fig.45: Anteil an Ziel Molekülen in [BMIM][PF₆] in Funktion dessen Anteils in [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat

Die Fig.46 zeigt insgesamt eine kleinere und weniger konstante Verteilung von β -Glukosidase in [BMIM][PF₆] als in [BDMIM][PF₆].

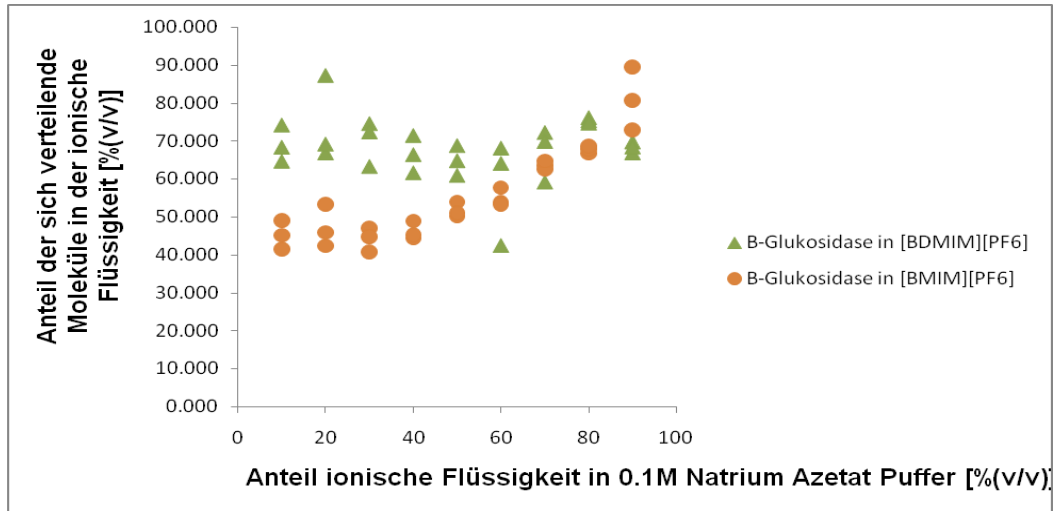


Fig.46: Anteil an Ziel Molekülen in [BMIM][PF₆] in Funktion dessen Anteils in [BMIM][PF₆]/Natrium Azetat

Der Q-Test wurde angewendet um einen eventuellen Ausreisser von einer Gruppe von 3 Punkten (mit demselben Anteil an ionischer Flüssigkeit) auszuschliessen. Manche Werte bleiben trotz wiederholter Messung Ausreisser.

Ein Beispiel zur Anwendung des Q-Tests für die 3 folgenden Werte 20, 25, 35. Diese sind so arrangiert das sie in grösser werdender Ordnung angeordnet sind. Der Ausreisser ist vermutlich 35.

$Q = Q_{\text{gap}} / Q_{\text{range}} = (25 - 35) / (20 - 35) = 0.6666$, wobei Q_{gap} die Differenz zwischen dem vermutlichen Ausreisser und dessen am nächsten Wert, und Q_{range} die Differenz zwischen dem vermutlichen Ausreisser und dessen am weitesten liegenden Wert.

Wenn der berechnete Q-Wert grösser ist als den Q-Wert der folgenden Tabelle 5 ist, wird der vermutliche Ausreisser als Ausreisser betrachtet und ausgeschlossen.

Tabelle 5: Q-Werte in Funktion von Konfidenz und Anzahl experimentellen Werte

| Anzahl Werte | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Q _{90%} : | 0.941 | 0.765 | 0.642 | 0.560 | 0.507 | 0.468 | 0.437 | 0.412 |
| Q _{95%} : | 0.970 | 0.829 | 0.710 | 0.625 | 0.568 | 0.526 | 0.493 | 0.466 |
| Q _{99%} : | 0.994 | 0.926 | 0.821 | 0.740 | 0.680 | 0.634 | 0.598 | 0.568 |

Ein Wert kann bei einer Konfidenz von 90% ausgeschlossen werden, und bei 99% angenommen. Umgekehrt ist nicht möglich.

4.3.3 Verteilung von telomerisierter β -Glukosidase und von PNIPAM in [BDMIM][PF₆] und [BMIM][PF₆]

Bei 50°C, 1100rpm und 30 Minuten werden ein Paar mg der Proben in ein Eppendorf Vial der ein Zweiphasen System aus ionischer Flüssigkeit/Wasser im Verhältnis 1:1 (v:v) beinhaltet gemischt. Die Fig.47 stellt Fotos dar die direkt nach dem Mischen entstanden sind.

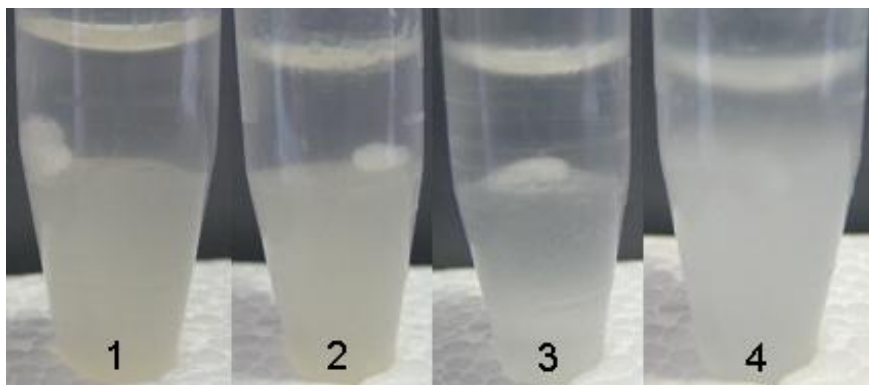


Fig.47: 1) derivatisierte β -Glukosidase in $\text{H}_2\text{O}/[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$, 2) PNIPAM in $\text{H}_2\text{O}/[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$, 3) derivatisierte β -Glukosidase in $\text{H}_2\text{O}/[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$, 4) PNIPAM in $\text{H}_2\text{O}/[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$

Es fällt auf, dass derivatisierte β -Glukosidase sowie PNIPAM in $[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]/\text{H}_2\text{O}$ koaguliert, zur Ueberschreitung des LCST was zurückzuführen ist. Beide Koagulate liegen auf $[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$ und sind scheinbar kaum in festem Kontakt damit. Was bei derivatisierte β -Glukosidase in $\text{H}_2\text{O}/[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$ nicht der Fall ist, da scheint sich das Koagulat leicht in die ionische Flüssigkeit einzuschliessen. PNIPAM hingegen koaguliert nicht, die Lösung ist trüb.

4.3.4 Karl Fischer Titration zur Bestimmung der Mischbarkeit von H_2O mit $[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$ und $[\text{BMIM}][\text{PF}_6]$

Die Tabelle 6 enthält die erhaltenen Werte zur Titration von H_2O mittels Titrationslösung Hydranal®-Composite 5. Die angewendete Methode stammt aus der Gebrauchsanweisung. [23]

Tabelle 6: Kalibrierung: Volumen an Titrationslösung pro Masse H_2O

| Menge Wasser [mg] | Volumen Titrationslösung [ml] | Menge H_2O pro Volumen Titrationslösung [mg/ml] |
|-------------------|-------------------------------|---|
| 50.78 | 15.597 | 3.256 |
| 39.3 | 11.949 | 3.289 |

Der Durchschnitt der beiden obigen Werte (3.27 mg H_2O titriert durch 1 ml Titrationslösung) wird zur Berechnung nach folgenden Messungen eingesetzt. Es wird bei jeder Messung eine bestimmte Menge ionischer Flüssigkeit titriert. Daraus kann der Gehalt an H_2O berechnet werden.

Tabelle 7: Volumen an Titrationslösung pro Masse $[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$

| Menge $[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$ [g] | Volumen Titrationslösung [ml] | Menge H_2O pro Menge $[\text{BDMIM}][\text{PF}_6]$ [mg/g] |
|---|-------------------------------|---|
| 0.680 | 6.106 | 29.4 |
| 0.77 | 7.582 | 32.2 |
| 0.62 | 2.425 | 12.8 |

Ein Beispiel zur Berechnung der dritten Kolonne ausgehend von der ersten und zweiten Kolonne in der Tabelle 7: 6.106 ml Titrationslösung werden für (6.106 ml • 3.27 mg H_2O pro ml Titrationslösung =) 20 mg H_2O eingesetzt.

Diese 20 mg H₂O befinden sich in 0.68 g [BDMIM][PF₆] was (20/0.68=) 29.4 mg H₂O in 1 g [BDMIM][PF₆] entspricht.

Im Durchschnitt für die drei Werte sind **24.8 mg H₂O in 1 g [BDMIM][PF₆]** beim mischen eingeschleust worden.

Tabelle 8: Volumen an Titrationslösung pro Masse [BMIM][PF₆]

| Menge [BMIM][PF ₆] [g] | Volumen Titrationslösung [ml] | Menge H ₂ O pro Menge [BMIM][PF ₆] [mg/g] |
|------------------------------------|-------------------------------|--|
| 1.077 | 5.641 | 17.1 |
| 2.4705 | 12.482 | 16.5 |
| 1.848 | 13.76 | 24.4 |

Im Durchschnitt für die drei Werte in der Tabelle C sind **19.3 mg H₂O in 1 g [BMIM][PF₆]** beim mischen eingeschleust worden.

Die Titrationskurven inklusiv Titrationsvolumen und entsprechenden Berechnungen befinden sich im korrespondierenden Anhang Karl Fischer.

5 Diskussion

Telomerisation. Die Telomerisationsreaktion zeigt nach 4 Stunden schon Zeichen vom Entstehen von Polymeren, da bei Erhöhung der Temperatur über 34°C die Reaktionslösung trüb wird, was nicht passiert wenn nur Monomere vorhanden sind.

Isolierung. Nach 5 bis 6 Stunden wird die Reaktionslösung schleimig, es ist mühsam, diesen Schleim in die Dialyse Membran zu transferieren. Nach 48 Stunden Dialyse bleiben laut SDS-PAGE noch reine Enzyme im Dialysat. Um diese von den derivatisierten Enzymen wegzutrennen, damit sie keinen Einfluss auf die spätere Aktivitätsmessung haben, werden sie lyophilisiert und dann durch SEC isoliert, was den Vorteil hat, diesen derivatisierten Enzymen durch Berechnung eine Grösse zuzuteilen. **LCST.** Die lowest critical solution temperature ist für derivatisiertes Enzym nach Dialyse (34-36°C) um 1.5 bis 3.5 °C höher als für PNIPAM allein (32.5°C). Die Isolierung zur Wiederverwendung vom derivatisierten Enzym konnte durch Temperatur Erhöhung über den LCST nur teilweise angewendet werden. Wird die Aktivitätsreaktion bei 50 °C durchgeführt, so koaguliert das derivatisierte Enzym von Anfang an und kann am Ende leicht isoliert werden. Wird aber die Reaktion bei 30°C durchgeführt, so ist das derivatisierte Enzym in Lösung. Wird nach der Reaktion die Temperatur auf 40°erhöht, dann wird die Lösung trüb. Wird dieses Muster bei 40°C zentrifugiert, dann bleibt die Lösung homogen und trüb, anstatt wie erwartet zweiphasig, wobei so das derivatisierte Enzym isoliert werden könnte indem die klare wässrige Phase entnommen würde.

SEC. Die durch Size Exclusion Chromatographie berechneten Werte zur Grösse des derivatisierten Enzyms ergeben ein Massenanteil an β-Glukosidase zwischen 25% und 90%. Der durch ¹H-NMR berechneten Massenanteil an Polymer in telomerisierter β-Glukosidase ergab 85.75%. Der Anteil an Enzym wäre 14.25%.

Das Enzym wiegt laut Hersteller 135 kDa, also sollte die telomerisierte β -Glukosidase $(135/14.25\%) = 949$ kDa wiegen und das Polymer folglich $(949-135 =) 814$ kDa. Dies aber nur, wenn das Polymer ausschliesslich am Enzym gebunden ist und nicht frei ist.

Es wurde aber gezeigt, dass sich während der Telomerisierungs-Reaktion auch Polymer bildet, dass nicht mit dem Enzym gebunden ist, genauer gesagt Polymer das sich bildet ohne dass Enzym vorhanden ist. Dieses unabhängige Polymer, angenommen es sei dasselbe wie dies von der HES-SO synthetisierte [20], mit einer durch Maldi-Tof zu 2385 g/mol bestimmte Molarmasse, sollte bei der Dialyse von den grossen Molekülen wie Enzyme und telomerisierten Enzyme getrennt werden. Es sei denn es seien viel grössere Polymere, sogar Polymer Aggregate. Diese sollten jedoch mittels Size exclusion von Enzymen und telomerisierten Enzymen getrennt werden. Oder eben nicht: die Polymer Aggregate, die dieselbe Grösse haben wie die telomerisierten Enzyme eluieren gleichzeitig und befinden sich deshalb nach lyophilisieren noch mit dem derivatisiertem Enzym zusammen. Die Reinheit des Zielmoleküls wäre also gering, was durch Elektronen Mikroskopie bestätigt wird. Da werden derivatisierte Enzyme ersichtet, aber nur in kleinem Mass gegenüber der grossen Menge an Polymer.

Aktivität. Dass der Anteil an β -Glukosidase in der derivatisierten β -Glukosidase zwischen 15% und 90 % liegt vereinfacht die Berechnung der Aktivität des derivatisierten Enzyms nicht, da bei der Aktivitätsmessung die genaue Masse an Enzym bekannt sein muss. Es wurde versucht, die Bradford Methode anzuwenden um die genaue Masse an Enzym in einer Probe aus derivatisiertem Enzym zu bestimmen. Dies ergab aber kein brauchbares Resultat, da die gemessene Absorbanz der Proben eher vom Anteil an Polymer abhing als vom Enzym, ohne jedoch bei Verdünnten Lösungen von reinem PNIPAM Polymer eine Linearität aufzuweisen. Die Bestimmung der Aktivität des derivatisierten Enzyms ist also eher qualitativ als quantitativ. Es wurde bestimmt, dass Glukose gebildet wurde, was heisst dass eine Aktivität vorliegt, diese wird mit steigender Anzahl an Rezyklierungen schwächer. Zahlen zur Aktivität sind begrenzt einzuschätzen, da der Anteil an Enzym im Derivat stark variiert. Zudem ist die vom Hersteller angegebenen Aktivität (2.6 U/mg) nicht für den Abbau von Cellobiose zu Glukose sondern für eine andere hydrolytische Reaktion bestimmt. Diese 2.6 U/mg können also nicht in Betracht genommen werden für den Vergleich mit den berechneten Werten. Es kann nur die berechnete Aktivität von reinem Enzym als Vergleich benutzt werden. Bei einer für das reine Enzym idealen Temperatur von 50°C ist die Aktivität zwischen 2 und 4 [μ mol/mg] für Reaktionszeiten zwischen 10 und 40 Minuten, bei dieser Temperatur ist die Aktivität von derivatisiertem Enzym nach einer Anwendung ungefähr zwischen zwei bis zwanzig Mal kleiner als die Aktivität des reinem Enzyms. Bei 30°C wiederum ist die Aktivität ungefähr zwischen vier bis achtzig Mal kleiner als die Aktivität des reinem Enzyms.

Thiol Gruppe Bestimmung. Der Ellman Test ermöglichte es die Thiol Gruppen an der Oberfläche des reinen Enzym auf 2 bis 4 zu bestimmen, während theoretisch (siehe Anhang 1) 2 bis 8 Gruppen vorliegen. F.Druey weist auf 5 Gruppen hin [5].

Diese Variation deutet darauf hin, dass manche dieser Thiol Gruppen im innern des Enzyms sind, womöglich in Form von Cystin, wo zwei Cysteine eine Thiol Brücke zueinander bilden. Kontinuierliche Messungen zeigen die Abnahme der freien Thiol Gruppen, was bedeuten kann, dass diese mit PNIPAM gebunden sind.

SDS-PAGE zeigt dass nach der Telomerisation und nach der Dialyse sich noch β -Glukosidase in der Lösung mit derivatisierter β -Glukosidase befindet. Nach versuchter Isolierung mittels Size exclusion Chromatographie ergibt die SDS-PAGE die Information, dass derivatisierte β -Glukosidase 95 kDa bis 250 kDa gross ist. 250 kDa ist eine Zahl die vorsichtig betrachtet werden muss, da bei der Bewertung des Gels durch Photographie die Bande bei 250 kDa beim reinen Enzym sowie beim reinen Polymer auch vorkam. Es weist eher auf eine Fehlmanipulation bei der Anwendung der Methode. Es wird also kein klarer Beweis gegeben dass derivatisiertes Enzym isoliert worden ist, was aber letzteres nicht ausschliesst, weil vielleicht dieses derivatisierte Enzym zu verdünnt vorliegt um sichtbar zu werden (geringe Intensität). Es ist fraglich, ob diese Methode etwas zu Grössen-Charakterisierung von derivatisiertem Enzym bringt, da Polymer allein nicht zu migrieren scheint, d.h. dass dieses Polymer, gebunden mit Enzym, gar nicht anders migrieren würde wie reines Enzym. Derivatisiertes Enzym wäre eher noch aufgehalten von dieser Masse an ungeladenem Polymer, was mit der Bande bei 250 kDa im letzten gezeigten Gel der SDS-PAGE zutreffen könnte. Bei SDS-PAGE kann im Bereich der grösseren Molekularmassen die Migrierung verbessert werden, indem die Konzentration an Resolving Gel verkleinert wird. So verkleinern sich die Acrylamid Maschen und lassen die grossen Proteine besser durch, somit migrieren sie weiter. Folgedessen wird auf dem Bild die Resolution klarer.

Infrarot Spektroskopie. Die Methode ist meistens die erste die angewendet wird, um die funktionellen Gruppen einer Unbekannten Substanz zu bestimmen. Um mehrere Substanzen voneinander zu unterscheiden reichen meistens die Anwesenheit oder Abwesenheit mancher Charakteristischen Funktional Gruppen, welche sehr klare und Intensive Signale aufweisen. Die Anwesenheit einer Thioether Gruppe wäre der einzige beweis, dass die Derivatisierung funktioniert hat, d.h. dass Enzym mit Polymer gebunden wären. Das Signal bei 670 cm^{-1} welches nur bei derivatisierter Enzym, und weder bei PNIPAM und Enzym allein vorkommt, deutet darauf hin dass die Derivatisierung gelungen ist.

Maldi-Tof. Diese Analyse sollte die Grösse des derivatisierten Enzyms beschreiben. Signale für derivatisierten Enzyms und reines Enzym sind sehr unklar (siehe Anhang 3), was für Moleküle die grösser sind als 100kDa zu erwarten war. Zur Weiterführung könnten andere Matriz und Lösungsmittel verwendet werden, jedoch ohne Erfolgsgarantie. Das Spektrum für reines PNIPAM ergab 2385g/mol für den am häufigsten auftretenden Peak, nebenbei befinden sich viele Peaks mit jeweils einen Unterschied in der Molarmass von 113 g/mol, was genau die Masse von einem NIPAM Monomer ist.

Elektronen Mikroskopie. Da werden derivatisierte Enzyme besichtigt, nur aber in kleinem Mass gegenüber der grossen Menge an Polymer. Die Mikroskopie ermöglicht es zu sehen dass die Hersteller die Enzyme in eine Matrix einschliessen.

Diese Matrix erlaubt physikalisch vielleicht der Angriff vom Monomer auf die freie Thiol Gruppe des Enzyms nicht, und deshalb wird die Polymerisation nicht auf 2-8 Stellen gemacht wie erwartet (wegen den 2-8 theoretischen freien Thiol Gruppen des Enzyms), sondern nur bei Enzymen die nicht oder nicht komplett in dieser Matrix eingebunden sind. Die Methode bei welcher die Proben verdünnt und das Wasser verdampft wird ergibt keine überzeugenden Resultate, die Methode bei der lyophilisierte Präparate analysiert werden, weisen hingegen auf eine gelungene Derivatisierung hin.

Verteilungen. Cellobiose und Glukose verteilen sich besser in [BMIM][PF₆] als in [BDMIM][PF₆], für β -Glukosidase ist es umgekehrt. Allerdings befinden sich die Verteilungskoeffizienten von diesen Substanzen in die ionische Flüssigkeit zwischen 30% und 50%, was keine klare Tendenz markiert. Ideal wäre eine Verteilung von Enzym und Substrat von maximal 10% oder minimal 90%, und umgekehrt für das Produkt. So würde in eine Phase die Enzym Reaktion stattfinden, und das gebildete Produkt würde in die andere Phase übergehen. Theoretisch wäre die Aktivität von Enzym nicht gross beeinflusst wenn die Reaktion in ionischen Flüssigkeiten stattfinden würde. β -Glukosidase löst sich in den benutzten ionischen Flüssigkeiten. Derivatisierte β -Glukosidase hingegen nicht (bewiesen durch die gebildeten Koagulate in der wässrigen Phase).

Würde zur Weiterführung dieses Projekts die Aktivitätsreaktion in einem Gemisch aus wässriger Phase und ionischer Flüssigkeit stattfinden, wäre Substrat in beiden Phasen fast gleichmässig verteilt und derivatisiertes Enzym nur in der wässrigen Phase. Es wäre also nur ungefähr halb soviel Substrat dem Enzym zugänglich wie eingesetzt. Das resultierende Produkt würde sich ebenfalls fast gleichmässig in wässriger Phase und in ionischer Flüssigkeit befinden. Den einzigen Sinn dabei wäre, dass das Enzym als Koagulat leicht rezyklierbar ist. Das aber zwei Phasen vorliegen ist gegenüber Substrat Einsatz und Produkt Gewinnung nicht von Nutzen.

Karl Fischer Titration. Es lösen sich zwischen 12 und 30 mg H₂O in 1g [BDMIM][PF₆] und zwischen 17 und 24 mg H₂O in 1g [BMIM][PF₆]. Also zwischen 1 und 3 % (m/m), was für eine theoretische Abstossende Wirkung zwischen Wasser und ionische Flüssigkeit nicht ohne Bedeutung ist. Diese Werte sind jedoch sehr gering in Bezug auf die Art Experimenten bei der Verteilung in ionischen Flüssigkeiten. Diese Mischbarkeit hat nur wenig Einfluss auf die Resultate der Verteilungen.

6 Schluss und Folgerung

Die Isolierung der bei der Telomerisationsreaktion gebildeten derivatisierten Enzymen erfolgte durch Dialyse, Size exclusion Chromatographie und Lyophilisieren. Die Grösse des Derivats wurde durch SDS-PAGE, ¹H-NMR, SEC bestimmt, jedoch ziemlich approximativ. Der Anteil an Polymer im Derivat ist ein wichtiger Hinweis auf die Menge darin enthaltenen Enzym. Wird derivatisiertes Enzym, welches lyophilisiert ist, für die Aktivitäts Messung verwendet, muss die Menge Enzym genau bekannt sein, um einen sogenannten quantitativen brauchbaren Wert zu bestimmen.

In dieser Arbeit sind die für derivatisiertes Enzym bestimmte Aktivitäten eher semi-quantitativ zu betrachten.

Sie sollen zeigen, dass eine Aktivität vorliegt, was heisst dass das lyophilisierte Derivat tatsächlich Enzym enthält. Zur Weiterführung der Arbeit sollte die Struktur vom Enzym welches mit Polymer gekoppelt wird genauer analysiert werden.

Zur Rezyklierung des derivatisierten Enzyms ist die Methode der Temperatur Erhöhung über den LCST nur bei Aktivitätsmessung von 50°C machbar, das Derivat ist von Anfang an der Messung ein Koagulat. Höher wäre die Aktivität wenn das Derivat gelöst wäre, was bei 30°C der Fall ist. Leider ist dann nach Temperatur Erhöhung kein Koagulat mehr vorhanden, nur eine Trübung, welche sogar bei zentrifugieren nicht zwei Phasen bildet, die Rezyklierung erfolgt dann indem dialysiert und lyophilisiert wird.

Die Bestimmung der Verteilungskoeffizienten von Cellobiose, β -Glukosidase und Glukose in den beiden benutzten ionischer Flüssigkeiten [BDMIM][PF₆] und [BMIM][PF₆] ergeben keine Werte die auf eine sinnvolle Anwendung von Zweiphasen Systeme ionischer Flüssigkeit/wässriger Phase hindeuten. Das Ziel wäre, dass Substrat und Enzym in der gleichen Phase wären und das Produkt in der anderen, somit wäre die Reaktion favorisiert und das Produkt einfacher isolierbar.

7 Bibliographie

- [1] F.Fischer; R.Freitag, Microwave induced chain transfer polymerization of a stimuli responsive polymer and determination of its critical solution temperature, *Journal of chemical education*, volume 83, 2006, pp 447-450
- [2] M.Nakayama; T.Okano; T.Miyasaki; F.Kohori; K.Sakai; M.Yokoyama, Molecular design of biodegradable polymeric micelles for temperature-responsive drug release, *Journal of controlled release* n° 115, 2006, pp. 46-56
- [3] M.Nakayama; J.E.Chung; T.Miyasaki; M.Yokoyama; K.Sakai, T.Okano, Thermal modulation of intracellular drug distribution using thermoresponsive polymeric micelles, *Reactive & Functional Polymers* n° 67, 2007, pp.1398-1407
- [4] F.Druey, Glycosylation enzymatique de phénols en milieux ioniques, HES-SO Valais, Sion, CH, 2008
- [5] A.Kull, Recherche des conditions optimales à la bio-conjugaison du glutathion et de l'acrylamide, HES-So Valais, Sion, CH, 2008
- [6] Quantification of sulfhydryls DTNB, Ellman's reagent, FT-UP01566, Uptima, Interchim, Montluçon, F, 2002
- [7] G.L.Ellman, Tissue Sulfhydryl Groups, *Archives of Biochemistry and Biophysics* n° 82, 1959, pp.70-77
- [8] J.B.Hill, Determination of the Extent of Alkylation in Half-Mustard Treated Albumin, *Journal of Undergraduate Research* n°9-1, University of Florida, 2007
- [9] <http://www.uniprot.org/uniprot>
- [10] F.Kohori; K.Sakai; T.Aoyagi; M.Yokoyama; Y.Sakurai; T.Okano, Preparation and characterization of thermally responsive block copolymer micelles comprising poly(N-isopropylacrylamide-b-DL-lactide), *Journal of controlled release* n°55, 1998, pp.87-98
- [11] TP de bioanalytique, Etude de la structure quaternaire des protéines par électrophorèse sur gel, HES-SO Valais, Sion, 2006
- [12] B.L.Turner; D.W.Hopkins; P.M.Haygarth; N.Ostle, β -glucosidase activity in pasture soils, *Applied Soil Ecology* n° 20, 2002, pp.157-162
- [13] Détermination de la teneur en protéines totales selon la méthode de Bradford, TP EIAF, HES-So Valais, Sion, CH, 2008
- [14] T.K.Ghose, Measurement of cellulase activities, *Pure & Appl. Chem.*, vol. 59 n° 2, UK, 1987, pp 257-268
- [15] O.Clerc, Enzymatic glycosylation of phenols in ionic liquids, HES-SO Valais, Sion, CH, 2006
- [16] <http://msds.chem.ox.ac.uk>
- [17] Nucleogel® GFC columns for gel filtration of biological macromolecules, Macherey-Nagel GmbH & CO.KG
- [18] Mini-Protean® 3 Cell Instruction Manual, Catalog Numbers 165-3301, 165-3302, Bio Rad, Hercules, Ca, USA
- [19] D. H.Williams, I.Fleming, *Strukturaufklärung in der organischen Chemie*, 6.überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1991
- [20] www.nmrdb.org/predictor
- [21] T.Saito, K.Hayamizu, M.Yanagisawa, O.Yamamoto, Spectral Database for Organic Compounds (SDBS), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan
- [22] F.Fischer; R.Tabib, R.Freitag, Chain transfer polymerisation of poly-N-alkylacrylamides in superheated methanol and by microwave induction, *European Polymer journal* n° 41, 2005, pp.403-408
- [23] Karl Fischer Titration Basics, Aquastar®, EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, USA
- [24] R.Thaoes Soto; D.Zufferey; N.Schmidt; F.Fischer, The imaging of nano and micro globules of short linear thermo responsive polyacrylamides formed above the lower critical solution temperature, *European Polymer Journal* n° 43, 2007, pp. 2768-2774
- [25] D.R Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 85th Edition, CRC Press, 2004-2005

8 Anhang

Anhang 1: Thiol Gruppen

Verschiedene β -Glukosidasen, **deren Herkunft**, Charakteristiken (**AA** Anzahl Aminosäuren, **G** Gewicht [kDa]), **C** Anzahl Cysteine, **L** Anzahl Lysine und Aminosäure Sequenz. Daten gesammelt aus <http://www.uniprot.org/uniprot/>

Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406/NCIMB 9469)

(**L**=745, **G**=81.798, **C**=6, **L**=65)

MKHLYFFTGIFFLSVTVAQTD SIENKIHALVKKMSLDEKIGQTCLKGTSSRSKGLSEELKE
 QVRKGLVGAILNLDTALVLQIQRIAVEESPNIHPLLFGRDVIHGYKTIFFPIPLGLAASWDS
 VLVEKTAMIAAQESYSRCINWTFAPMVDICRDARWGRIAESPGEDPYLASVLARAYINGFQG
 NNPAQPGRILACSKHFAAYGAAEGGRDYN TVSMSRSTLWNMYLKPFHASVQAGAATFMTSFN
 DLNGVPASGNAYLLKDVLRNQWKFPGFVVDWNSVTEMITHGCTDEKDAALKAFSAGLDME
 MTSQAYAHHLKTLIAEKKITEQQDELVKNILRIKLYAGIFENPYFKEKEKFTLLDSAALT
 AKKSAVKSFVLLKNHNNTLPLAATKKIAVIGPLAEAPKEQLGTWIFDGDKTSQTPLAALKK
 MYGAENIKYVQGLTHSRDESHDDFNAAAYKAAKSDVVLFFAGEEAILSGEAHSRADIRLPGA
 QERLIRKLHKAGKPIVLVIMAGRPITIEHILPNVSAVVMAWHPGTMAGPALADVLSGKENFS
 GRLPVTWPKTVGQIPIYYNHTNTGRPADSVSFVGIKDIPIEAWQSSLGNNSHYLDAGYTPQY
 PFGYGLSYTKFVCTNSSIEKNTLTVKDSLIVTLSVSNAGSRSGIETIQLYVQDVTASLVRPV
 RELKAFAQVELKAGETKTVRF AVAVSELGFYNNEGIYVIEPGAFNLWVAQDAAGGMKQSFEI
 K

Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406/NCIMB 9469)

(**AA**=758, **G**=83.66, **C**=7, **L**=59)

MKKITVLISIWLSAAAFSSSEKKTEAGSKPQAFDKEVQDLLKNMSLEEKAGQMTQIDIRNLLNNGYGNTEKLD
 ARLKEAIQTYHVGSIILNCIQAYTPEKWVELISQIQNEALQSPNKIPVLYGTDAMHGVGFIKDAVLFP
 HNIGMAAS RNDQLVSQAAQVSTEARSVGLTWNFAPVLDVGREPYWSRFEETFGEDVYITTQMGSA
 AVQMMEGSDLTSTKNIA SCLKHFIGYSAPKNGIDRTQSHIPEIVLREYYLPFFREAINKGASSIMIN
 SAEINGIPCHGNKWLITDILLRTELG FTGMVSDWEDVIRLHTWHKVAATPKEAVMMAVNAGV
 DMSMPNDYSFPKYLVELVKEGKVSMA IDEAVGRILT LKIKLGLMKNPLPSIADVG
 VVGSDAHQQIALNAARESITLLKNDKNILPLAKDKILLVGPAA NSLSALHSSWSY
 TWQGSNESLYPETTKTIREALEASGNKANIRTNATTGFDDAANYDV SFIQKNTAGVDV
 IIVVGEAAYAEQPGVI KDLNLPEAQQLIVA AKKTGKPVIVLVEGRPRLFPEEEALADAVIM
 YRPGSKGADAF AEILYGDINPSGKL PF TYPRYDGDITTYDYKFKE TEQQLKPGVSEFVAFNP
 QWPFGHGLSYTTTFAYSNLNVNKS NFTKND SVLVTVDISNT GARTGKIAVELYSRDH
 FASITPSE RRLRKYTKIELKAGEKQTVSFTIKAADLQFVNKDLKTVTEAGAFDLMIGNL
 QTEIYFNE

Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406/NCIMB 9469)

(**AA**=820, **G**=89.743, **C**=6, **L**=60)

MKKTIYLFGLVLSLWAF TACNKSEKPAAPETS AVSDKDKEIEAKVDALIAKMSPEEKAGQMTQV
 NLNLIKILYTGN SGYDNNYGIIDPALD TAIVKYKVSILNAINRAYSQDQWISIITQIQDKATKT
 GQNI PVLYGIDAIHGVTF TNL STLFP HNIGTAASWNP AVEAAGAEVTALEARAGL RWNFD
 PVL DLGRNPLWPRFPETTFGEDPYLVEQM GVAAISK YEEAGLGP KAVASCMKHFIGYSAS
 RTGRDRTPSFIPEIELREYYLPQFQA AVKAGASTIMINSGEINGVPVHAN KYLLTDVLRGEL
 GFGKLIVTDWEDINRLHERHNISPTMRDAVKTAILAGIDMSMTPNDYEFTKHLISLIKDGEIP
 MAHIDASVKRILTLKMKLGLFENPVVEKEA IANFGKPEYAEKALFAARQTITLLKNDKNTL
 PLKKEIKIVVAGPN ANNVP SLHGWSYTWQ GADASAKLSSKGDKNFINGVTFGDSILPLFPK
 STLTIKQALEAKIGAGKVVSQSVENYE DPKNYS LPSLAGADAIVLGLGENSYAESPGSIR
 DLTLDARQIALAQA AIKTGKPVILVLVEGRPRVISA FVDGVP AVVDAFWPGSQGANAIAD
 VLF GDYNPGGKL PFSYPKHTGDFIMYDHKWTEANVETTPGGFVDEGYMPQWPF GHGL
 SYTTTFEYSDAKISTDTLIGDAKLKVS VTKNTGTVDGEEVVQLYTRDMFASVPNSKR
 LRAFERVAIKAGESKTV SFEISRADLSFVKEEQ TATTHKFTRVTEEGAFKVMIGGSSNFELEA
 APFPWMTFPYRTYKGALNFYYKEK

Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406/NCIMB 9469)

(AA=750, G=83.203, C=7, L=59)

MNKKQLLWILSIGTIVGISITKTEKPAADAIEKIISEMSLEEKVGMQTNLTATIANEVDSTVVVD TAKLNDVI
 LKHHVSGSIQNVLTTHAYTLNEWHSIIEPIQKLTLEKTRHKIPFLYIDAVHGANYVYGATIFPHNIGLAATRNRTL
 VKEAGAITAVQTRAAGIRYNFAPVLDVGRNQLWSRFGETFGEDTYIATEMGLASIRGFEGGDVSSPLHVAAIMKH
 FIGYSVPQNGKDRAPAYIPEIILREHFLPSFKA AVNEGHTLMVNSGEINGTPVHASKYLLTDVLRTELGFKG VV
 ITDWLDILKLKERHQVAETHKDAVYLAVTAGIDMIVPFD FSFTDDLI ALVKEGRISEERINESVRRI LQLKKDL
 GLFEHPYLEEQAVKAFSDQAYSNTALQLARES VTLLKNENGILPLTDKQKILVTGPFANTLSELHGAWSYSWQGN
 IERLYPDTLNTIAEVFKKETPATSIFDLSAWTKSNGWNGALIKAAARAADVLVVCAGEAAYAETPGNIPDLAFDS
 VQVEVIKELSKTGKPIVLVLLEGRPRIIREIEPYNAVVLAYWPGAQGAQAIYDVLYGRYNPSGKLPFTYPRYSG
 TLLTYDHKLLDEAVEIVEPYQYFYEFNPQYAFGYGLSYTTFSYSALKISSDTLVANDSLTVSITVTNTGKLDGQE
 VVELYSRDLVASITPSVKRLRRFEKIALHAGESKTVDFVLTKADLAFVVGQDLKTVTEQGA FEISIQKQKTTIYYK

Arabidopsis thaliana (AA=528, G=60.459, C=8, L=35)

MVRFEKVHLVLGLALVLT LVGAPTKAQGPVCGAGLPDKFSRLNFP EGFIWGTATAAFQVEGAVNEGIRGPSMWDT
 FTKKFPHRCENHNADVAVDFYHRYKEDIQLMKDLNTDAFRLSIAWPRI FPHGRMSKGISKVGVQFYHDLIDELLK
 NNIIPLVTVFHWDT PQDLEDEYGGFLSGRIVQDFTEYANFTFHEYGHKVKHWITFNEPWWFVS RAGYDNGKKAPGR
 CSPYIPGYGQHCDQGRSGYEAYQVSHNLLLSHAYAVDAFRNCKQAGGKIGIAHSPAWFEPQDLEHVGGSIERVL
 DFILGWHLAPTTYGDYPQSMKDRVGHRLPKFTEAEKKLLKGSTDYVGMNYYTSVFAKEISPDPKSPSWTTDSLVD
 WDSKSVDG YKIGSKPFNGKLDVYSKGLRYLLKYIKDNYGDPEVIAENGYGEDLGEKHNDVNF GTQDHNKRYYIQ
 RHLLSMHDAIC KDKVNV TGYFVWSLMDNFEWQDGYKARFGLYYIDFQNNLTRHQKVSGKWYSEFLKPQFPTSKLR
 EEL

Flavobacteriales bacterium (AA=763, G=84.595, C=2, L=64)

MKLLKRIKYYTKTLILIVFIFLHTNCKNNESDLKTPNKND AIELKINELL SKMTLEEKIGQTNLRGSSSRVNGE
 LPEELKTAVRNGEIGAFLNMNLEYVKELQRIAVEESPNGVPLIFARDVIHGFKTIFPIPLGLAASWDAETARKS
 SEIAAFEASSAGIRWTFAPMLDIARDSRWGRIAESPGEDPYLASILGKAYVEGFQSNDSLNP TSMAAAKHFFIGY
 GAAIGGRDYNTVMNSEPLL RNVYLP PFTA AINNNAATVMTSFNEVNGIPVTGNEFLLKEVLRNELNFGFTVSDW
 DSTVEMISHGYARDEKHVAELAANAGLDMEMTSKAYEHLKILIEENKVSMD ELDTMVKNILRIKLKLNLFEDPY
 IPEDHTGNLYADSHLEEAKKAVIKSAVLLKNENILPLSNNTKVAVIGPLANKPHEQLGTWTFDGERDHTITPVDA
 FKKANAKYEFVEGLTYSRDKTTRGFND AIRAAKSSD VILFFGGEEA ILSGEAHSRSNIDLPGAQVQLLNELAKTG
 KPIVMVIMAGR PITITNIINKVDAVIMAWHPGTMGGEALYDIIFGISNPEGRLPISWPKNAGQLPYFYNHKNTGR
 PAETGQFVQMDSIPIGAWQSS LGNDSHYLDIGYAPHFPFGYGLSYTNFKYENISISKDTITFSED LIVKASITNT
 GKR DGKELVQLYLQDIVGSITRPIRELKGFQHV DIKSGETKEVSFKISSGDLKFVNSKMINAAEEGKFNLWVGPN
 ASSGLKRSFYLKE

Pedobacter sp. (AA=766, G=84.712, C=3, L=70)

MKFRSLSLLLLLSGCFSTAF AQSGNQAKIESLIKKMSIEEKVGMQAVTLDVIGKGKGRFESDEPFSLDDAALKK
 TLLQYHVGSVLNTSNNRARTPQVWYGIISKIQNVAMKQSKHGIPVIYGVDEM HGATYTAGATMFPQQIGQAATFN
 RALVKNGASITAYETRASSIPWNFAPLLDLGADPRFP RQWESFGEDPYVISELGLAAVKGYEGEDGRVAHPEKVA
 TSLKHFLGYQVPVSGKDRTPAYISDQALREYHLPFFKAAIDAGAKTIMINS GIINGVPVHANHHILTELLKEELG
 FKGLVVTDWGDIENLYKRDHIAKDDKEA IMLAINAGIDMSMIAYNYETFCDNLIALVKEGKVKESRIDDAVRRI L
 WVKYELNLFDKPTTNPKDYPKFGSKAFENAA YQTAAESITLLKNTDAALPLSKSAKILVTGPNANSMTLNGAWT
 YSWQGEKVEEFAGKYNTILEALQLKAGKDKVTYLPGVSYKMDGKYEEYADKLEETIAAAQTADVIVLGLGENTY
 TETPGNLNDLYLSDLQTELAQRLAATGKKIILVLNEGRPRIISKFEKKMSAVIQSYLPGNFGGDALADVLYGDVN
 PSGKLPYTYPPQFPNALFTYYHKPSESRETTEGV NYDADYNPQYVFGHGLSYTSFKYDQLKLSSNTLKAGESMTI
 SVNISNTGKVTGKETVLLFTSDLVASMISPDIKRLRGFDKLELKAGETKTVTFRISPQDLAFVGTDNKKVTEPGE
 FTVQIGDQKANFNYSL

Fervidobacterium sp. (AA=438, G=50.54, C=2, L=37)

MIRRSDFPKDFIFGTATAAYQIEGAANEDGRGPSIWDVFSHTPGKTLNGDTGDVACDHYHRYKEDIQLMKEIGLD
 AYRFSISWPRIMPDGKNINQKGVDFYNRLVDELLKNDIIPFVTLYHWDLPYALYKGGWLNPDIALYFRAYATFM
 FNELGDRVKHWITLNEPWCS SFLGYTTGEHAPGHQNLQEAIIAAHNLLRAHGHA VQAFREEVKDGKVL TNVVMK
 IEPGDAKPESFLVASLVDKFVNAWFHDPVVF GKYPEEAVALYTEKGLQVPDS DMNIISTPIDFFGVNYYTRTLVV
 FDMNNPLGFSYVQGDLPKTEMGWEIYPQGLFDMLVYLKERYKLP LYITENG MAGPDKLENGRVHDNYRIEYLEKH
 FEKALEAINAGVDLKG YFIWLSLMDNFEWAYGYSKRFGIYVDYNTQKRILKDSALWLKEFLKS

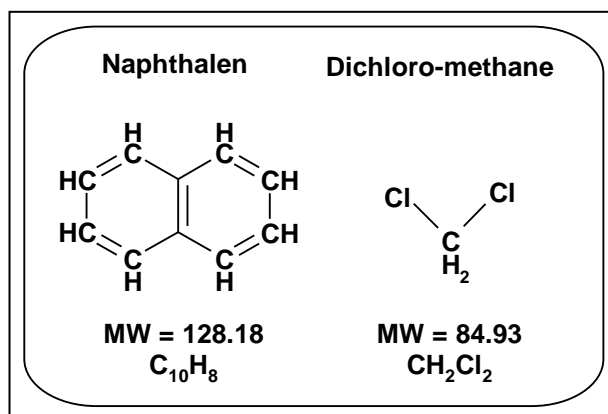
Anhang 2: ^1H -NMR

Solvant aromatique 180

AGI Code 421 - CA 239 A

Lot N° - Op. N° du

Détermination du Naphthalène par RMN ^1H (CDCl_3) par standard interne

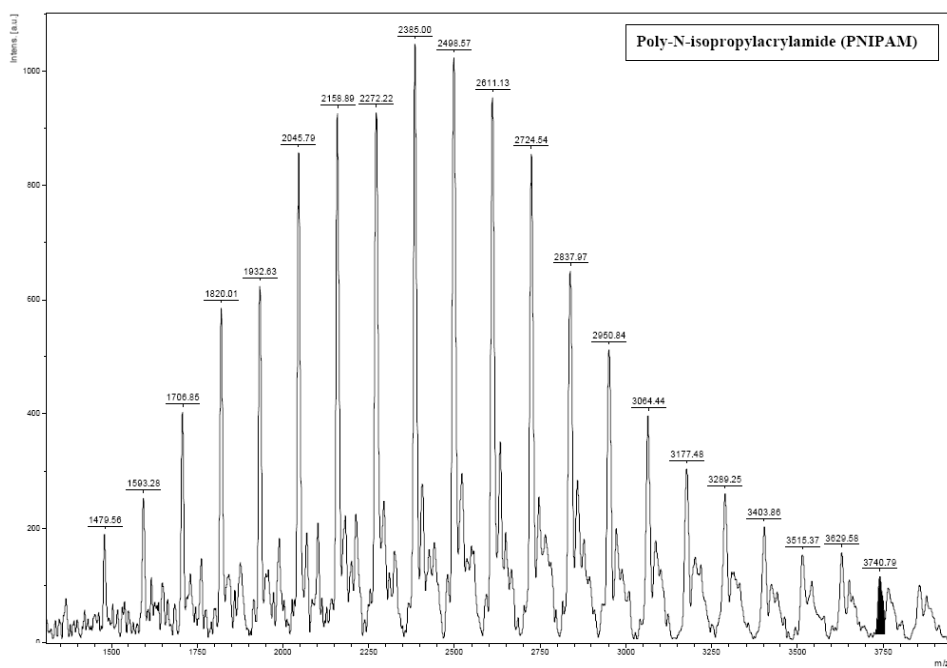
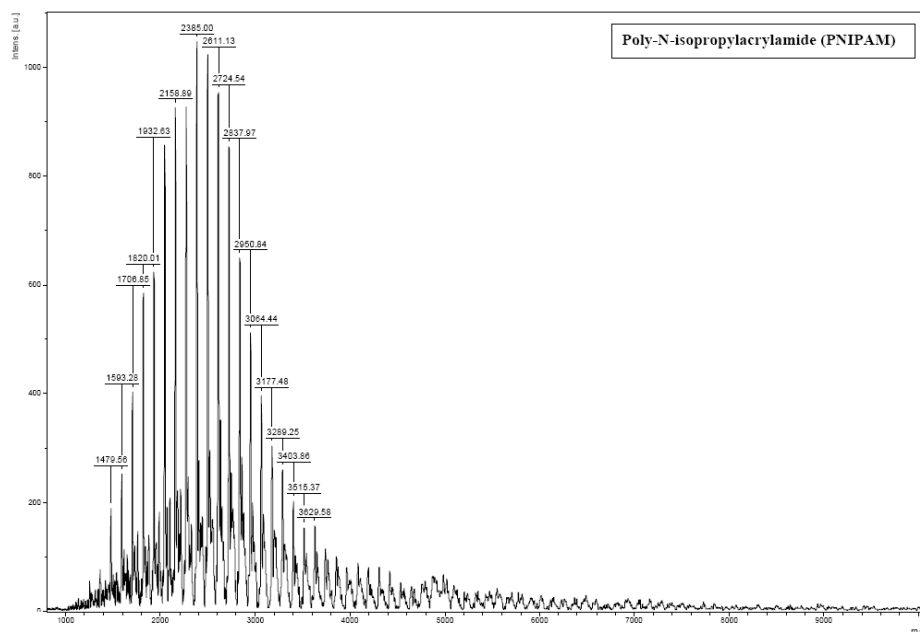


$$\% \text{ (PRODUIT) } = \frac{I_s * W_s * MW_x * (100 * (n_{His} / n_{Hx}))}{I_{is} * W_s * MW_{is}}$$

| | Masse Mol. | C | ppm |
|--------------------------|------------|---|-----------|
| Naphthalène | 128.18 | 8 | 7.5 - 8.0 |
| CH_2Cl_2 | 84.93 | 2 | 5.32 |

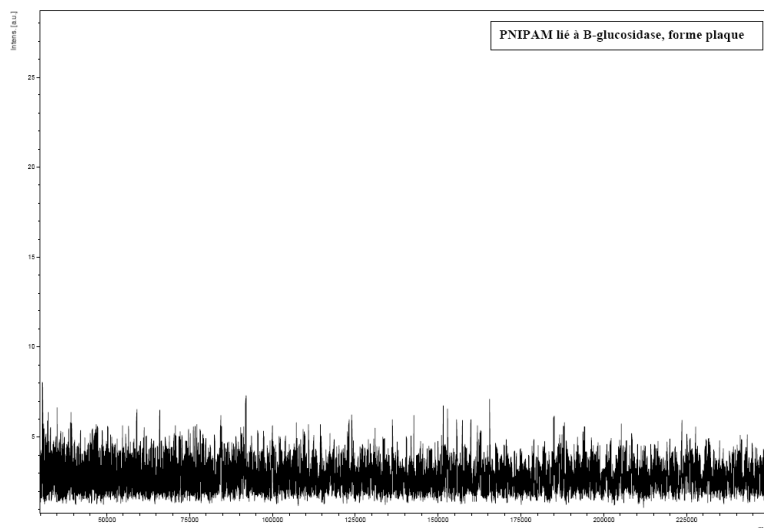
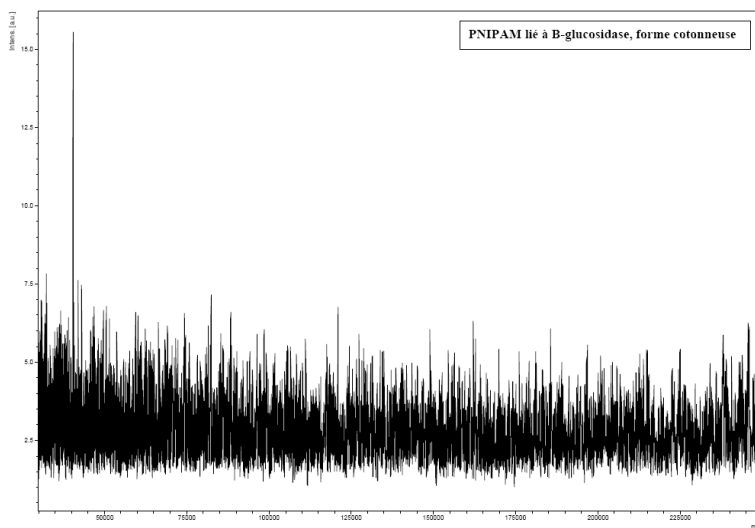
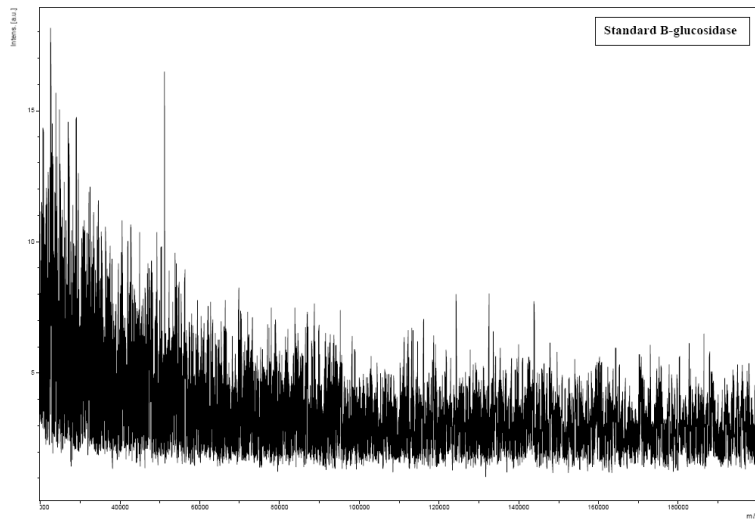
I_s Intégrale du produit, dans un échantillon, à analyser
 I_{is} Intégrale du Standard Interne (Dichloromethane)
 W_s Pesée du Standard Interne (Dichloromethane)
 W_{is} Pesée de l'échantillon à analyser
 MW_x Masse Molaire du produit à analyser
 MW_{is} Masse Molaire du Standard Interne (Dichloromethane)
 n_{Hx} Nombre de protons du produit à analyser
 n_{His} Nombre de protons du Standard Interne (Dichloromethane)

Anhang 3 : MALDI-TOF



Poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAM)


| m/z | Intensity | Resolution | Signal/Noise |
|---------|-----------|------------|--------------|
| 1479.56 | 189.46 | 177 | 500.6 |
| 1593.28 | 252.14 | 179 | 666.3 |
| 1706.85 | 402.62 | 188 | 1063.9 |
| 1820.01 | 585.30 | 202 | 1546.6 |
| 1932.63 | 623.82 | 206 | 1648.4 |
| 2045.79 | 856.49 | 215 | 2263.2 |
| 2158.89 | 925.32 | 215 | 2445.1 |
| 2272.22 | 927.26 | 204 | 2450.2 |
| 2385.00 | 1047.53 | 231 | 2768.0 |
| 2498.57 | 1023.50 | 214 | 2704.5 |
| 2611.13 | 953.71 | 229 | 2520.1 |
| 2724.54 | 854.10 | 232 | 2256.9 |
| 2837.97 | 650.14 | 212 | 1717.9 |
| 2950.84 | 512.75 | 218 | 1354.9 |
| 3064.44 | 396.68 | 237 | 1048.2 |
| 3177.48 | 304.07 | 232 | 803.5 |
| 3289.25 | 260.61 | 226 | 688.6 |
| 3403.86 | 202.45 | 239 | 535.0 |
| 3515.37 | 153.74 | 207 | 406.2 |
| 3629.58 | 157.15 | 245 | 415.2 |
| 3740.79 | 115.47 | 207 | 305.1 |



Maldi-Tof-MS ergibt für Moleküle die grösser sind als 100kDa bei den eingesetzten Bedingungen keine nennenswerte Resultate. Zur Weiterführung könnten andere Matriz und Lösungsmittel verwendet werden, jedoch ohne Erfolgsgarantie.

Anhang 4: Karl Fischer

Titration zur Bestimmung der Mischbarkeit von Wasser in ionischen Flüssigkeiten


 License ID 14275244 Program version tiamo 1.2 - 41 -
 Client name WE1496
 User F103 2008-12-01 15:29:20 UTC+1

Results report

Determination

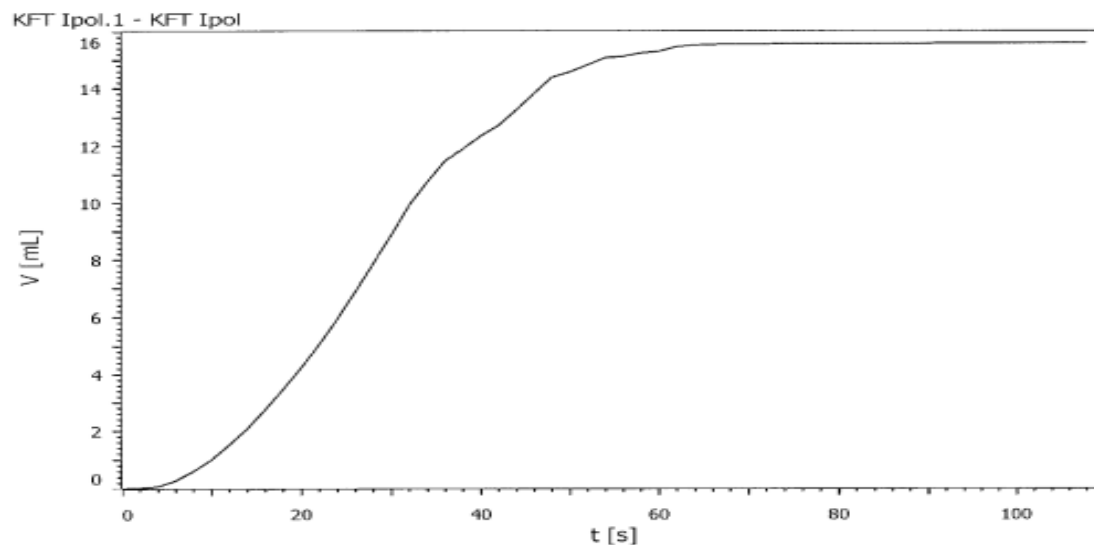
Method KF facteur
 Method saving date 2008-12-01 14:43:16 UTC+1
 Method version 14
 Method state original
 Determination start 2008-12-01 15:26:04 UTC+1
 Determination state original
 Determination version 1
 Run number 3
 User (full name) Etudiant
 User (short name) F103

Sample data

Sample size * 0.05078

End points

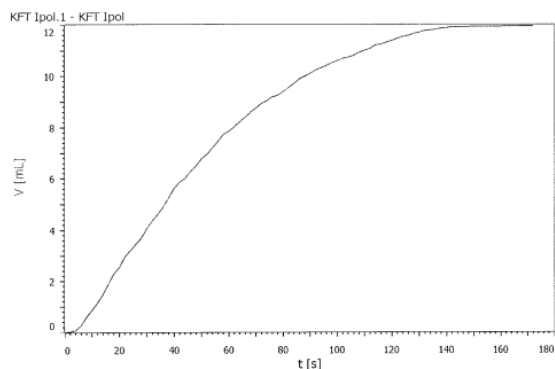
KFT Ipol KFT Ipol.1
 EP1 15.5970 mL 108.21 s



Wasser Menge: 50.78 mg.
 Volumen an Titrationslösung : 15.597 ml
 Ratio: **3.256 mg/ml**

End points

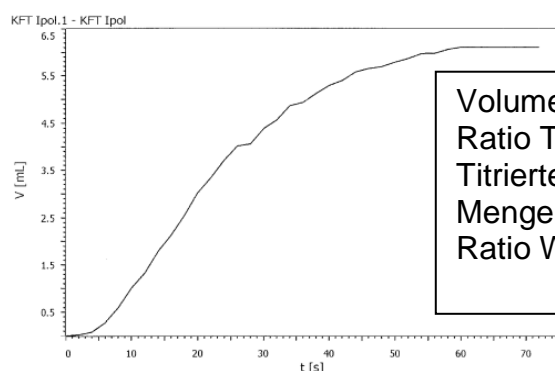
KFT Ipol KFT Ipol.1
EP1 11.9490 mL 172.91 s



Wasser Menge: 39.3 mg.
Volumen an Titrationslösung :
11.949 ml
Ratio: **3.289 mg/ml**

End points

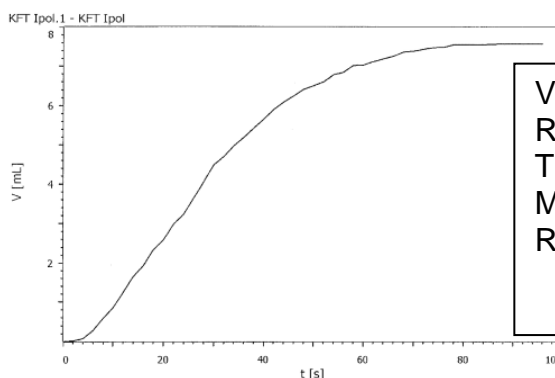
KFT Ipol KFT Ipol.1
EP1 6.1060 mL 72.31 s



Volumen an Titrationslösung: 6.106 ml
Ratio Titrationslösung / Wasser: 3.27 mg/ml
Titrierte Wassermenge: $6.106 \cdot 3.27 =$ 19.97g H₂O
Menge [BDMIM][PF₆]: 0.680 g
Ratio Wasser/[BDMIM][PF₆]: **29.4 mg H₂O in 1 g /[BDMIM][PF₆]**

End points

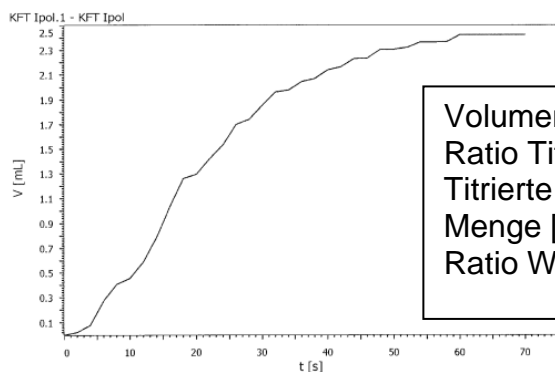
KFT Ipol KFT Ipol.1
EP1 7.5820 mL 96.21 s



Volumen an Titrationslösung: 7.582 ml
Ratio Titrationslösung / Wasser: 3.27 mg/ml
Titrierte Wassermenge: $7.582 \cdot 3.27 =$ 24.79 mg H₂O
Menge [BDMIM][PF₆]: 0.770 g
Ratio Wasser/[BDMIM][PF₆]: **32.2 mg H₂O in 1 g /[BDMIM][PF₆]**

End points

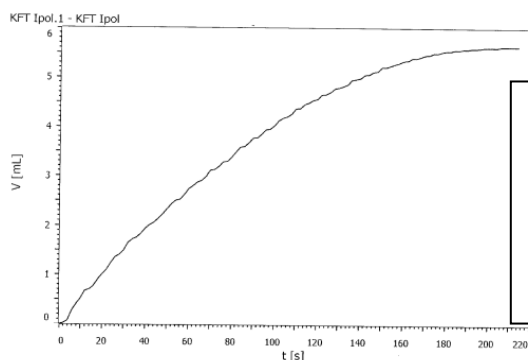
KFT Ipol KFT Ipol.1
EP1 2.4250 mL 70.52 s



Volumen an Titrationslösung: 2.425 ml
Ratio Titrationslösung / Wasser: 3.27 mg/ml
Titrierte Wassermenge: $2.425 \cdot 3.27 =$ 7.93 mg H₂O
Menge [BDMIM][PF₆]: 0.620 g
Ratio Wasser/[BDMIM][PF₆]: **12.8 mg H₂O in 1 g /[BDMIM][PF₆]**

End points

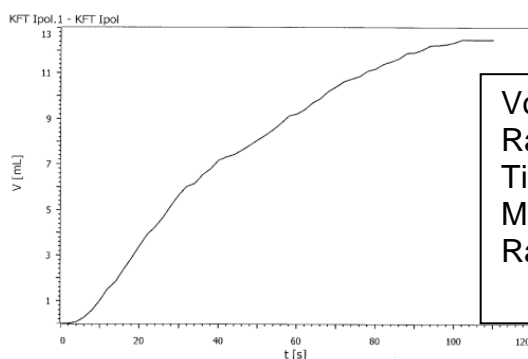
KFT Ipol KFT Ipol.1
 EP1 5.6410 mL 214.81 s



| | |
|---|--------------------------------------|
| Volumen an Titrationslösung: | 5.641 ml |
| Ratio Titrationslösung / Wasser: | 3.27 mg/ml |
| Titrierte Wassermenge: $5.641 \cdot 3.27 =$ | 18.45 mg H ₂ O |
| Menge [BDMIM][PF ₆]: | 1.077 g |
| Ratio Wasser/[BMIM][PF ₆]: | 17.1 mg H₂O |
| | in 1 g/[BMIM][PF₆] |

End points

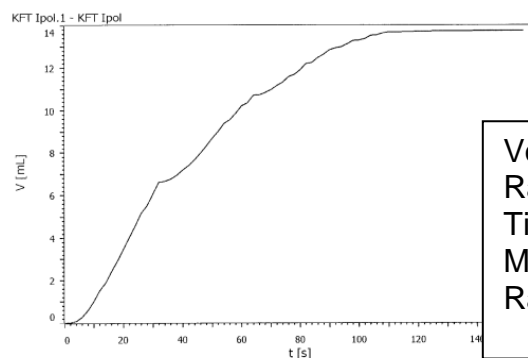
KFT Ipol KFT Ipol.1
 EP1 12.4820 mL 110.81 s



| | |
|--|-------------------------------------|
| Volumen an Titrationslösung: | 12.482 ml |
| Ratio Titrationslösung / Wasser: | 3.27 mg/ml |
| Titrierte Wassermenge: $12.482 \cdot 3.27 =$ | 40.82 mg H ₂ O |
| Menge [BDMIM][PF ₆]: | 2.471 g |
| Ratio Wasser/[BMIM][PF ₆]: | 16.5 mg H₂O in |
| | 1 g / [BMIM][PF₆] |

End points

KFT Ipol KFT Ipol.1
 EP1 13.7600 mL 157.51 s



| | |
|---|-------------------------------------|
| Volumen an Titrationslösung: | 13.76 ml |
| Ratio Titrationslösung / Wasser: | 3.27 mg/ml |
| Titrierte Wassermenge: $13.76 \cdot 3.27 =$ | 45.0 mg H ₂ O |
| Menge [BDMIM][PF ₆]: | 1.848 g |
| Ratio Wasser/[BMIM][PF ₆]: | 24.4 mg H₂O in |
| | 1 g / [BMIM][PF₆] |