

생물공학에서 이온성 액체의 응용

¹이 상 목 · ²장 우 진 · ^{1,2}구 윤 모

¹인하대학교 생물공학과, ²인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터

(접수 : 2005. 6. 17., 게재승인 : 2005. 6. 24.)

Application of Ionic Liquids in Biotechnology

Sang-Mok Lee¹, Woo-Jin Chang², and Yoon-Mo Koo^{1,2}

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²ERC for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2005. 6. 17., Accepted : 2005. 6. 24.)

Ionic liquids, composed of organic cations and either organic or inorganic anions remain liquid over a wide range of temperature. Ionic liquids are a new group of solvents or extractants of great interest as a potential 'green solvent'. Ionic liquids are gaining wide recognition as novel solvents in many research fields, such as chemistry, chemical engineering, electrochemistry, etc. However, not much researches have been done related to biotechnology using ionic liquids, while a lot of researches have been performed in chemistry. The merits of ionic liquids in bioseparation technology are originated from some unique properties of ionic liquids, such as negligible vapor pressure, good thermal stability, controllable viscosity and miscibility with water and organic solvents. An appropriate selection of ionic liquid for bioprocesses requires basic knowledge on physicochemical properties of ionic liquids. This review gives a brief overview on the application of ionic liquids in biotechnology, including bioconversion and bioseparation.

Key Words : Ionic liquids, biotechnology, bioseparation, bioconversion, green solvent

서 론

이온성 액체 (Ionic Liquids)는 두 개의 이온으로 결합된 간단한 용액이다. 소금과 같은 양이온과 음이온이 결합된 화합물은 일반적으로 180°C 이상에서 녹는 것과 달리 이온성 액체는 100°C 이하에서 액체로 존재하며, 상온에서 존재하는 이온성 액체를 특히 상온 이온성 액체 (Room Temperature Ionic Liquids)라 한다. 이온성 액체가 상온에서 안정한 상태로 유지하는 바는 용매, 화학적 전환에서의 유도 물질 등 다양한 화학적 적용을 유도할 수 있다. 이온성 액체는 다음과 같은 특성을 가지고 있다. 우리는 이온성 액체를 상압에서 아주 낮은 증기압으로 존재하여 휘발하지 않아 독성을 줄일 수 있기에 green solvent라 부른다. 그리고, 이온성 액체의 녹는점, 점도, 밀도, 친수/소수성 등 물리적 성질을, 수많은 양이온과 음이온의 결합을 쉽게 조절하여 합성할 수 있으므로 designer solvents

라 부른다. 이온성 액체는 용매력이 우수하여 organic, inorganic, polymer 등을 다양하게 녹일 수 있다. 또한, 이온성 액체는 수소, 이산화탄소, 산소 등을 이용한 반응 및 분리 등에 유용한 용매로서 사용될 수 있으며, 현재 초임계 유체에서 이산화탄소의 용매로서 사용되고 있다. 마지막으로, 이온성 액체가 아주 낮은 증기압을 가지는 특성을 이용하여 재사용 및 재활용을 쉽게 할 수 있다. 이러한 화학적 특성은 실험실에서 다양한 연구를 진행할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이러한 이온성 액체의 특성을 이용하여 최근 몇 년간 이온성 액체를 이용한 다양한 적용과 연구가 이뤄지고 있다. 특히, 이온성 액체의 합성, 분석화학, 전기화학, 화학 공정 등에서 다양하게 연구되고 있다.

전 세계적으로 화학 및 석유화학 공정에서 광범위하게 사용되고 있는 휘발성 유기화합물의 사용에 대한 규제가 점차 강화되고 있다. 친환경 시대를 맞아 휘발성 유기화합물을 대체할 수 있는 방안으로는 물, 불소화합물, 초임계 이산화탄소를 사용하는 방법 등으로, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 물을 용매로 사용하는 경우, 유기기질의 용해도가 매우 낮아 반응속도에 제한적이다. 불소화 용매는 이상계 반응에 응용되고 있으나, 높은 반응온도에서 여러 가지 불소 화합물이 부가적으로 생성되어 독성을 지니는 경우가 있

† Corresponding Author : ERC for advanced Bioseparation Technology, Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7513, Fax : +82-32-875-0827

E-mail : ymkoo@inha.ac.kr

다. 그리고, 초임계 유체인 경우에도 장치비용이 많이 드는 단점이 있다. 이러한 친환경적 요구와 Sustainable Technology 개념에 부합하는 에너지 절약형 용매 개발이 절실하다.

이에 따라 원유가 상승을 대비한 석유화학제품의 대체 생산 공정 개발과 전지 및 연료전지용 비수용성 차세대 전해질 소재의 개발에 이온성 액체가 각광을 받고 있다. 석유화학에서는 이온성 액체를 이용하여 유해물질인 황과 인을 원유로부터 제거하는데 응용이 가능할 것이다. 제약 산업에서는 이온성 액체를 이용하여 신약을 제조하고 분리하는 시도가 진행 중이다. 정밀화학 산업에서는 화합물 합성에서 이온성 액체를 용매로서 다양하게 사용할 수 있다. 화학촉매인 경우는 높은 가격과 독성으로 인하여 사용이 제한적이거나, 이온성 액체는 폐수 및 촉매의 제거 없이 분리할 수 있으며, 낮은 가격과 낮은 독성을 지니는 장점이 있다.

이상적인 청정용매는 화학적/물리적으로 안정하고, 독성과 휘발성이 없어야 한다. 또한, 여러 가지 물질에 대한 용해력이 우수하고, 회수 및 재활용이 용이해야 한다 (1). 이런 조건에 부합되는 청정용매는 이온성 액체라 할 수 있을 것이다.










이온성 액체는 생촉매 반응, 분리, 효소 고정화 등 생물공학 분야의 응용에서도 이상적인 용매이다. 일반적으로, 이온성 액체를 이용한 생물반응공정은 세 종류로 분류할 수 있다. 이는 이온성 액체 자체를 이용한 방법, 그리고 수용액상에서 보조 또는 공유 용매로서 이온성 액체, 마지막으로 수용액과 이상계 또는 다상계 시스템을 이용하는 방법이다. 이와 같은 이온성 액체의 성질을 이용하여 생물공학에서 응용과 분리공정에 대한 응용에 대해 알아보고자 한다.

이온성 액체의 구조 및 성질

이온성 액체는 소금과 같이 양이온과 음이온으로 구성되어 있다. 양이온으로는 imidazolium, pyridinium, pyrrolidinium, pyrrolidinium, phosphonium, ammonium, guanidinium, isouronium 등이 있으며 음이온으로는 halogenide, sulfate, sulfonate, amide, imide, methane, borate, phosphate, antimonate 등이 있다 (Table 1).

이온성 액체의 물리화학적 성질은 다양한 양이온과 음이온의 구조 변화를 통하여 조절이 가능하기 때문에 이온성 액체를 용이하게 합성할 수 있다. 또한, 키랄 이온성 액체의 합성도 용이하다 (2). 이러한 특성이 있어 이온성 액체를 흔히 designer solvent라 불린다. 이러한 특성은 목적에 맞는 이온성 액체를 합성할 수 있으며 특화된 이온성 액체를 이용하여 효율적으로 연구 및 산업에 적용시킬 수 있다.

Table 1. The building blocks of ionic liquids

Cations	Anions
monosubstituted imidazolium 	halogenides Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻
disubstituted imidazolium 	sulfates and sulfonates CH ₃ SO ₃ ⁻ , CF ₃ SO ₃ ⁻
trisubstituted imidazolium 	amides and imides (CN) ₂ N ⁻ , [N(CF ₃) ₂] ⁻ , [N(SO ₂ CF ₃) ₂] ⁻
pyridinium 	methanes [N(CF ₃) ₂] ⁻ , O ₂ SO ₂ CF ₃ ⁻
phosphonium 	borates BF ₄ ⁻ , B(CN) ₄ ⁻
ammonium 	phosphates and antimonates PF ₆ ⁻ , SbF ₆ ⁻
pyrrolidinium 	ethers C ₂ H ₅ OCF ₃ ⁻ , CF ₃ OCF ₃ ⁻
guanidinium 	
isouronium 	

Source: www.merck.de

이온성 액체는 높은 열 안정성, 아주 낮은 증기압, 전기전도도, 액체 결정 구조로 형성되었으며, 높은 전기적 탄성, 높은 열용량과 낮은 인화성을 지니고 있다 (Table 2). 또한, 극성이 크기 때문에 무기 및 유기금속 화합물을 잘 용해시키며 상온 및 넓은 온도범위에서 액체 상태로 존재하는 독특한 특성을 지니고 있

Table 2. Some physicochemical properties of the commonly used ionic liquids in analytical chemistry

Ionic Liquids	Melting point (°C)	Density (g/ml)	Viscosity (mPas)	Water solubility (g/100ml)	Conductivity (S/m)
[C4MIM][PF6]	10, -8	1.36-1.37 (25°C)	148-450 (25°C)	1.88	0.14 (25°C)
[C6MIM][PF6]	-61	1.29-1.31 (25°C)	560-586 (25°C)	0.75	
[C8MIM][PF6]		1.20-1.23 (25°C)	681-710 (25°C)	0.20	
[CMIM][Tf2N]	22	1.56	44 (20°C)		0.84 (20°C)
[C2MIM][Tf2N]	-3	1.50	34 (20°C)	1.77	0.88 (20°C)
[C4MIM][Tf2N]	-4	1.42	52 (20°C)	0.88	0.39 (20°C)
[C6MIM][Tf2N]		1.33		0.34	
[C8MIM][Tf2N]		1.31		0.21	
[C4MIM][Cl]	65, 41	1.10 (supercooled liquid at 25°C)	Solid	Miscible	Solid
[C2MIM][BF4]	15	1.15(30°C) 1.28(25°C)	37 (25°C)	Miscible	
[C4MIM][BF4]	-81	1.17(30°C) 1.21(25°C)	180 (25°C)	Miscible	0.17 (25°C)
[C6MIM][BF4]			314 (20°C)	Miscible	
[C4MIM][TfO]	16	1.29(20°C)	90 (20°C)	Miscible	0.37 (20°C)

1-alkyl-3-methylimidazolium (C_nMIM), tetrafluoroborate (BF₄), trifluoromethylsulfonate (TfO), bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide (Tf2N), hexafluorophosphate (PF₆).

다(3). 이온성 액체와 알콜을 조합하였을 때는 수소결합과 비극성 결합에 영향을 미쳐 독특한 특성을 나타냈다(4). 이와 같은 이온성 액체의 특성을 이용하여 광범위한 화학분야에 응용될 수 있다(Fig. 1). 산업적으로 이온성 액체는 연료전지(5), 대규모 화학공정 및 효소 반응, 생물분리, 단백질 분리 등 생물공정에도 응용될 수 있는 청정용매인 것이다.

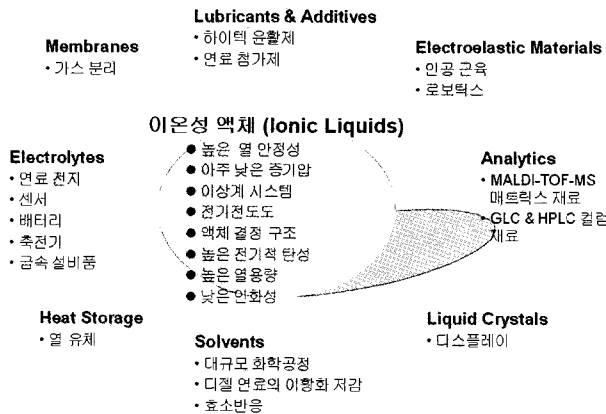


Figure 1. Application of ionic liquids.

화학공학에서 이온성 액체의 응용

초임계 유체에서 이온성 액체

이온성 액체의 특이한 성질을 이용하여 전기화학, 분석화학, 촉매공학, 석유화학 등에 많은 연구가 이뤄졌다. 촉매 반응은 화학 합성 공정에서 중요한 인자이다. 촉매는 균일하게 반응액내에 녹아야 하고, 또한 재활용되어야 한다. 그리고, 생산물은 쉽게 분리할 수 있어야 한다. 이런 조건에 부합하는 상태는 이산화탄소를 이용한 초임계유체라 할 수 있다. 이온성 액체를 반응 용매로 사용 후, 반응물에 상분리가 일어나는 경우에는 이온성 액체와 산물을 분리할 수 있다(6). 한 예로 초임계상태인 이산화탄소 유체에 styrene을 녹이고 이온성 액체를 이용하여 이상계를 형성한다. 여기서 반응성이 높은 이온성 액체는 촉매 작용을 하여 styrene을 ethylbenzene으로 전환시키는 연구를 실시한 바 있다(7). 즉 단일계에서 촉매반응과 이상계에서 촉매반응을 연결하여 계면에서 촉매반응 및 분리 공정을 실시함으로써 효율적인 공정을 실현하고자 하는 연구를 진행하고 있다(8) (Fig. 2). 이러한 공정을 이용하여, 초임계 유체 CO₂와 물을 CO와 H₂O로 효율적으로 전환하였다(9). 이와 반대로 CO와 H₂O를 초임계 유체 CO₂와 함께 반응하여 선택적으로 CO₂를 분리해낼 수도 있다(10). 이러한 현상은 CO₂는 이온성 액체에 잘 녹지만 이온성 액체는 CO₂에 잘 녹지 않는 사실을 이용한 것이다. 초임계 유체 공정을 Fig. 3과 같이 설계하여 환경친화적인 공정을 구현할 수 있다(10).

단일상에서 이온성 액체

또한, 이온성 액체만을 이용한 단일상에서 촉매반응을 실시하는 연구도 진행되고 있다(11-13). 이온성 액체의 단일상에서 초음파를 이용하여 codeine methyl ether에 MnO₂를 산화

반응하여 Thebaine으로 전환하는 연구에서는 [1-*n*-butyl-3-methylimidazolium][tetrafluoroborate] ([Bmim][BF₄])를 이용하여 회수율을 높였다(14).

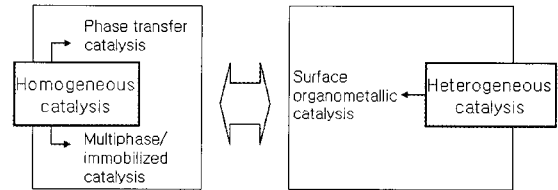


Figure 2. Links between homogeneous and heterogeneous catalysis (Source: Cornis, B. and W. A. Herrmann (2003), *J. Catalysis* 216, 23-31).

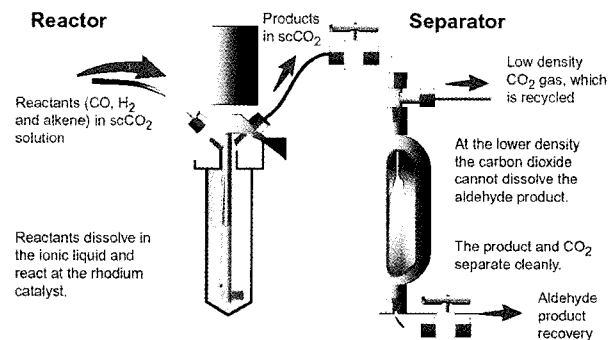


Figure 3. Schematic diagram of a continuous-flow hydroformylation reaction in a supercritical-ionic biphasic system (Source: Cole-Hamilton, D. J. (2003), *Science* 299, 1702-1706).

이상계에서 이온성 액체

이온성 액체를 이용하여 이상계에서 물질의 분리 및 합성을 수행하는 방법은 대부분의 이온성 액체가 소수성이기에 기본적으로 연구가 진행된 분야이다. 이온성 액체와 유기용매 또는 물을 이용하여 이상계를 형성하였으며, 형성된 이상계에서 이온성 액체를 촉매로 또는 용매로 이용하여 물질을 합성 그리고 추출 및 분리하는 연구가 진행되고 있다(15-26). 이상계 내에서 이온성 액체의 낮은 증기압을 이용하여 고온에서 산물 추출에도 이용될 수 있다. 한 예로 [1-*n*-butyl-3-methylimidazolium][hexafluorophosphate]([Bmim][PF₆])를 이용하여 90°C에서 chloroaniline 계열을 추출해 냈으며, 높은 친화성을 보이는 것으로 나타났다(27). 액-액 상태에서 이온성 액체를 이용하여 Koser's salt를 합성 분리하였으며, 금속이온을 추출하는 연구도 진행되고 있다(28-30). Toluene과 물, 그리고 이온성 액체의 이상계에서 Suzuki와 Heck coupling을 실시하였다(31). [Bmim][PF₆], [Bmim][BF₄] 등을 이용하여 고분자합성 (methyl methacrylate)에 이용하였다(32, 33). 극초단파를 이용한 고분자 합성에도 이온성 액체를 용매로서 이용하여, 크로마토그래피를 이용한 분리 없이도 높은 수율과 순도로 산물을 얻어냈다(34).

이온성 액체를 이용하여 삼상 또는 다상계에서도 촉매 반응 및 분리 공정을 수행할 수 있다. 가스 (초임계 유체)-유기용매-수용액 시스템에 이온성 액체를 첨가함으로써, 보다

효율적인 촉매반응 시스템을 이룰 수 있다(35).

이온성 액체의 대부분은 물과 잘 섞이지 않는다. 그러나, 일부 이온성 액체들은 물과 섞이는 친수성 특성을 지니고 있다. 이러한 친수성 이온성 액체들은 이상계를 구축하기가 쉽지 않아, 이상계를 이용한 응용 연구에서 제외된 종류들이다. 이러한 특성을 지니는 [1-ethyl-3-methylimidazolium] [chloride] ([Emim][Cl])은 물과 섞이는 친수성 이온성 액체이다. 그러나, 친수성 이온성 액체를 salts나 알코올을 첨가하여 이상계를 형성할 수 있으며, 이를 이용하여 효율적인 이상계 시스템을 구축할 수 있었다(36, 37).

키랄 물질의 분리에서 이온성 액체

이온성 액체의 특이성을 이용하여 ethyl acetoacetate의 가수반응에 선택적으로 반응하여 EE 값이 90% 이상의 BINAP를 얻어냈다(38). 카본나노튜브에 이온성 액체를 지지체로 이용하여 벤질알데하이드의 키랄 물질 (EE 89%)을 선택적으로 분리하였다(39).

크로마토그래피에서 이온성 액체

화학공정에서 사용되는 일반적인 분리 공정은 크로마토그래피를 이용한 것이다. 다양한 물질 중에서 선택적으로 원하는 물질을 분리하는 데 효율적이며, 특히 HPLC, 가스 크로마토그래피를 주로 이용한다. 이온성 액체는 양이온과 음이온이 존재하며 극성을 띄고 있다. 이러한 성질을 이용하여 이온성 액체를 실리카 표면에 부착하여 실리카의 성질을 변환시킬 수 있으며(40), 이온성 액체를 이동상에 첨가해서 이동상의 성질을 변화시킬 수도 있다(41-44). 이동상에 첨가된 이온성 액체로 인해 분리 효율을 높일 수 있었다. HPLC 컬럼에 이온성 액체를 부착하여 수용액에 녹는 ephedrine류와 녹지 않는 ephedrine류들 모두를 분리해낼 수 있었다(45). 이온성 액체의 높은 전도도, 소수성, 그리고 여러 물질을 잘 녹이는 용매력을 이용하여 고분자 계면활성제와 함께 이동상으로 사용하여 크로마토그래피 내에서 키랄 물질들을 분리해냈다(46).

Liu에 의하면 가스 크로마토그래피의 주사기에 이온성 액체를 코팅하여 미세추출 공정을 설계하였으며, 이를 이용하여 여러 유기용매를 분리하였다(47). 가스-액체 크로마토그래피에서도 이온성 액체를 이동상으로 첨가하여 pentane, hexane, octane 등을 분리해냈다(48).

이온성 액체 중 이미다졸륨 계열을 이용하여 capillary electrophoresis에 의한 분리를 진행하였다. Acetonitrile과 이미다졸륨 계열의 이온성 액체를 이용하여 페놀류들을 분리해냈다(49).

생물공학 분야에서 이온성 액체의 적용

이온성 액체를 이용한 단백질 folding/refolding

유전자 재조합 기술의 발달과 더불어 산업적으로 유용한 단백질을 대량으로 생산하기 위한 목적으로 미생물을 이용한 재조합 단백질 형태의 유용 유전자 산물을 대량 생산하는 시도가 많이 이루어지고 있다. 이러한 이유로 대장균을 이용하여 단백질의 대량 생산을 위한 고농도의 세

포 배양 기술이 개발되어 있고, 이러한 기술은 재조합 단백질 생산에 가장 많이 이용되고 있다. 그러나, 이와 같이 미생물을 이용하여 재조합 단백질을 대량 생산하는 경우 단백질의 3차 구조와 관련된 문제가 있다. 즉, 대장균에서 생산된 상당수의 재조합 단백질들이 활성이 없는 형태로 응집된 내포체 (inclusion body)로 존재하는 경우가 흔히 발생한다. 현재, 재조합 단백질의 생산에 있어서, 상기의 내포체 형태로 발현되는 재조합 단백질을 활성을 가진 단백질로 회수하는 재접힘 (refolding) 기술이 많이 개발되었다. 이러한 재접힘 공정은 변성제(denaturant)를 이용한 내포체의 풀림 (unfolding) 단계와 단백질의 올바른 접힘 유도를 위한 변성제 제거 공정으로 구성된다(50).

상기 변성제의 제거 방법에 따라 단순 희석, 단계적 희석, 유가식 희석, 투석, 겔 여과 크로마토그래피 등의 방법이 사용되고 있다. 종래 보고된 연구결과에 의하면 단백질 재접힘을 위한 재접힘 버퍼로서 상기 요소가 포함된 재접힘 버퍼 중에 이온성 액체로서 0.54 M의 질산 에틸암모늄 (ethylammonium nitrate)을 첨가제로 사용하여 라이소자임의 재접힘 효율을 90%까지 향상시킨 보고가 있다(51).

이온성 액체의 독성

환경적 측면에서 이온성 액체는 청정용매로서 흥미로운 물질이다. 청정 용매라 불리는 이유는 아주 낮은 증기압 때문인데, 실질적으로 미생물, 동물, 사람이 섭취 또는 접촉했을 때 독성을 갖는가에 대한 연구도 이뤄져야 한다(52). 특히 생물공학 분야에서 이온성 액체는 이상계 내 생 전환 기술에의 적용이 먼저 이뤄지고 있다. 이는 유기 용매를 대체하고, 이온성 액체를 이용함으로써, 환경친화적인 공정으로 대체해 나가는 방향에 맞춘 연구들이 활발히 진행되고 있기 때문이다. 이는 추후 미생물 배양에서 생산과 분리를 동시에 적용 가능할 것으로 판단하고 있다. 그러므로, 미생물 및 식물, 동물 세포에 이온성 액체가 미치는 독성에 대한 분석이 필요한 실정이다.

Lactic acid 생산에 있어, *Lactobacillus rhamnosus*를 이용하여 배양하고, 여기에 약간의 이미다졸륨 계열의 이온성 액체를 첨가하여 유기 용매와 독성 테스트를 비교 분석하였다(53, 54). 이러한 공정들의 목적은 연속적으로 수용액 내에서 비수용성 생산물질을 분리해 내는 데 있다. 이온성 액체 중 메틸과 에틸 이미다졸륨 계열을 이용하여 쥐의 백혈병 세포와 *Caenorhabditis elegans*에서 독성 분석을 실시하였다. 그리고, 이를 전통적인 유기 용매인 아세톤, acetonitrile, 메탄올, methyl t-butyl ether의 독성과 비교하였다. 이 중 이온성 액체 음이온 종류에 따른 독성의 영향은 없는 것으로 나타났으며, 양이온의 알킬체인 길이에 따라 독성 영향이 나타나고 있음을 밝혀냈다(55, 56). 현재, 이온성 액체의 독성에 대한 연구는 많지 않고, 모든 이온성 액체를 대상으로 분석한 결과도 없다. 가장 많이 사용되고 있는 이미다졸륨 계열 중 일부만이 독성 분석이 되어 있는 실정이다. 이온성 액체가 미생물 또는 세포를 포함한 배양액 내에 존재하면서 산물을 분리해 내고자 한다면, 보다 더 체계적인 연구가 진행되어야 할 것으로 판단한다.

생물반응에서 이온성 액체

이온성 액체를 이용하여 많은 연구가 이뤄져 왔으나, 대부

분 화학공학 분야에 국한되어 있다. 특히, 전기화학, 석유화학, 촉매반응 등에 많은 연구가 진행되고 있다. 생물화학공학 및 생물공정에 이온성 액체를 응용한 예는 많지 않다. 그 중 생물공학에 이온성 액체를 사용해서 가장 많이 연구된 분야는 효소반응에 용매로서 이용한 연구이다(57-63). 이는 이온성 액체의 높은 용매력에 기인하는 것이다. 이온성 액체를 이용한 효소반응에 대한 연구를 Table 3에 나타내었다(61, 64). 특히, 효소 중 lipase를 이용한 효소반응에 가장 많은 연구가 이뤄지고 있다(Table 3). Lipase의 기질은 일반적으로 지방이며 소수성인 물질들이다. 단백질인 lipase는 수용액 상에 존재하는 친수성이기 때문에 전통적인 효소반응 방법들도 유기용매를 사용하여 이상계 또는 단상계에서 유기용매를 첨가하는 방식으로 연구가 진행되어 왔다(65-67). 이러한 효소반응에서 사용되는 유기용매의 대체물질로서 이온성 액체를 이용한 연구가 진행되고 있다.

Table 3. Examples of biocatalytic reactions using ionic liquids

Enzyme and Microorganism	Reaction
Lipase	Transesterification
	Esterification
	Alcoholysis
	Acylation
	Perhydrolysis
	Aminolysis
Protease	Peptide synthesis
	Transesterification
	Protein renaturation
Esterase	Transesterification
Glycosidase	Synthesis of N-acetylglucosamine
Oxidoreductase	Regeneration of NADH
	Oxidation of guaiacol
	Oxidation of syringaldazine
Phosphatase	hydrolysis of p-nitrophenol
	renaturation
Baker's yeast	Reduction of ketones
Whole cell yeast	Recovery of n-butanol from fermentation broth
Whole cell of <i>Rhodococcus</i> R312	Biotransformation of 1,3-dicyanobenzene

한 예로 lipase를 이용하여 거울상 이성질체를 선택적으로 합성하였으며(68, 69), trans-에스테르화 반응, 에스테르화 반응 등이 주를 이루고 있다. 이온성 액체 내에서 효소 *Candida antarctica* lipase B를 이용하여 1-Phenylethanol을 비닐 아세테이트와 함께 trans-에스테르화 반응시켰다(70). 이미다졸륨 계열의 이온성 액체를 이용하였으며, 3회 재사용시 활성도가 10% 낮아지는 것을 관찰하였으며 거울상 이성질체 활성은 떨어지지 않았다(59, 71). 포항공대의 김만주 교수팀은 *Candida rugosa* lipase를 이용하여 methyl glucosides와 비닐 아세테이트의 선택적 acylation을 실시하여 반응의 효율성을 증대시켰다(72). Chiappe에 의하면 에폭사이드 가수분해효소를 이용하여 에폭사이드들의 이성질체를 선택적으로 가수분해하는 것을 발견했다(73). 이온성 액체 내에 β -galactosidase를 포함하는 이온성 액체를 이용하여 효소의 활성 및 안정성을 높였으며, 이를 이용하여 N-acetylglucosamine을 합성하

였다(74).

생물물질 분리에서 이온성 액체

생물분리는 생물체의 배양에서 얻어지는 발효액, 또는 천연 생물체부터 얻어지는 목적산물을 분리, 정제하는 기술을 통틀어 말한다. 대부분의 목적산물들은 생체에서 전형적으로 볼 수 있는 유사한 물질들과 오염물질을 포함하는 용액상태로 존재한다. 생물공학제품은 고순도 및 생물학적 활성을 갖기 위한 정확한 3차 및 4차 구조를 유지해야 하기 때문에 분리정제 과정에서 기존의 화학공업에서 사용하지 않았던 새로운 기술들이 필요하게 된다. 근래 들어 단백질 회수를 위한 folding/refolding, 효율적인 분리를 위한 분자생물학적인 one-step 분리 공정 및 키랄 분리 등의 연구가 진행되고 있다. 이에 새로운 대체 용매로서 이온성 액체를 이용하고자 하는 시도들도 미약하게나마 이뤄지고 있다.

생물물질 분리에서 크로마토그래피와 이온성 액체

화학공학에서 이뤄지는 분리에서부터 착안하여 생물물질 분리 연구들이 선행되고 있다. 일반적으로 생물 물질 분리에서 후반 공정에 사용되는 것이 크로마토그래피 기술이다. 크로마토그래피 내에서 이온성 액체를 이용한 생물공학적인 연구도 다양하게 진행되고 있다(75). 중국인들이 즐겨먹는 Shiitake 버섯에는 포름알데하이드가 아주 소량 포함되어 있다. 유독성인 포름알데하이드 제거를 위한 분석에서 이온성 액체를 크로마토그래피에 이동상에 첨가하였고, 포름알데하이드가 효율적으로 분리되는 것을 확인하였다(76).

Capillary zone electrophoresis에 이온성 액체와 β -cyclodextrin (β -CD)을 이용하여 중국산 허브에 있는 anthraquinone 류를 분리하는 연구를 진행하였다(77). Capillary 컬럼에 이미다졸륨을 코팅하면 컬럼 벽면은 양극성을 띄게 된다. 그 예로 capillary 벽면에 이미다졸륨을 코팅하여, β -CD 안으로 anthraquinone이 들어갈 수 있게 하고, β -CD와 함께 분리해 내었다. 이를 이용하여 라이소자임, 사이토크롬 등을 효율적으로 분리하였다(78). 또한 Qin에 의하면 디알킬이미다졸륨을 capillary 벽면에 코팅하여, 인간 혈청에서 UK-103, 320과 sildenafil을 분리하였다(79).

Thin-layer 크로마토그래피 (TLC) 시스템에서 이동상에 이온성 액체를 첨가제로 사용하여, 여러 단백질 분리에 응용하였으며, 이온성 액체를 첨가하지 않았을 때보다 많게는 2배, 적게는 0.5배의 분리 효율을 보였다(80).

생물분리에서 이상계와 이온성 액체

생물공학에서는 일반적으로 이상계를 이용하여 많은 물질들을 분리하고 있다. 이온성 액체의 경우에도 물과 이온성 액체의 이상계 시스템을 이용하여 생물물질을 분리하고 있다(81). [Bmim][PF6]를 이용하여 이상계 내에서 flavylum salt의 특성을 규명했다. 그리고, 두 항생제(amoxicillin, ampicillin)를 분리하는 연구도 상온에서 [Omim][BF4]와 물의 이상계를 이용하여 이뤄졌다(82). 이온성 액체를 이용하여 생물반응기 내에서 이상계를 구축하였으며, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas aromticivorans*

등의 미생물을 이용하여, 페놀 400 mg/l을 효과적으로 분리하는 데 성공하였다(83). 이온성 액체를 이용한 다상계 시스템에서 항생제인 erythromycin-A를 분리해내기도 하였다(84).

기타 생물분리방법과 이온성 액체

생물공정에서도 초임계 유체 CO₂를 이용한 생물물질 분리 연구가 이뤄지고 있다. 초임계 유체에 효소인 lipase를 넣어 이성질체를 선택적으로 생전환하는 연구를 진행하여, lauryl ester와 (S)-2-octanol을 효과적으로 분리하였다(85).

일반적으로 이온성 액체를 이용하여 액-액 추출이 가장 많이 연구되어 왔다. 이에 추가적으로 이온성 액체를 액체 막에서 매체로서 사용하는 연구를 진행했으며, 여러 유기 용매 및 아미노산들이 효율적으로 분리됨을 알게 되었다(86-90). 막여과 시스템에 효소인 lipase를 포함하여 생물반응기로 응용하였으며, 기질도 효율적으로 산물로 생전환시키면서 동시 반응, 분리를 구현하였다(91).

이온성 액체는 낮은 증기압으로 인해 다른 물질과 분리가 쉽다. 즉, 증류를 통하여 다른 물질들을 분리해 낼 수 있다. 그러나, 물질들 중에는 이온성 액체와 비슷한 낮은 증기압을 가지고 있는 물질들이 있다. 이런 물질들을 분리하기 위한 연구로서 나노막을 이용하여 이온성 액체와 락토오스, Bromophenol blue의 분리를 시도하였으며, 효율적으로 이온성 액체를 포함한 물질들을 분리해냈다(92).

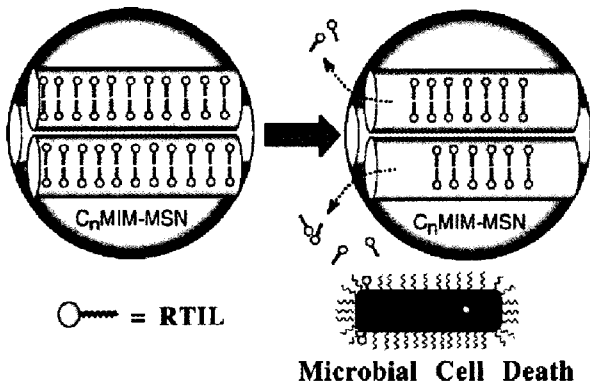


Figure 4. Schematic representation of the controlled release process of CnMIM-mesoporous silica nanoparticle (MSN) and its antibacterial activity against *E. coli* (Source: Trewyn, B. G., C. M. Whitman, and V. S. Y. Lin (2004), *Nano Letters* 4, 2139-2143).

나노 생물공학에서 이온성 액체의 응용

생물공학에서 이온성 액체의 응용을 위해서는 해당 조건에 대한 보다 많은 정보가 필요하다. 나노 환경에서 미생물 및 세포에 이온성 액체가 미치는 영향과 세포와의 작용 등을 파악해야 한다. [Bmim][Cl]를 *Bacillus subtilis*의 표면에 부착하는 연구가 진행되었다(93). 이온성 액체의 독성은 이온세기, pH 등의 변화에 따른 부착효과를 검토하여, 이온 세기에 따라 영향을 받으며, pH에는 영향을 받지 않는다고 발표했다(93).

또한, Trewyn은 이온성 액체와 실리카를 이용하여 나노 분자를 제작하였다(94) (Fig. 4). 나노 분자는 이미다졸류의 알킬 체인을 변형시킴으로써 구형, 원통형, 튜브형 등 다양하게 만들어 낼 수 있었다. 이 나노분자에서 이온성 액체를 분비해

Escherichia coli K12의 antibacterial agent로서 효율적으로 작용하는 것으로 판명됐다. 나노분자 속에 있는 이온성 액체의 분비를 효과적으로 조절함으로써, 항균 물질로서 작용하도록 유도한 시스템이다.

효소반응도 나노 규모의 효소와 기질들이 반응하는 것이다. 효소와 섬유소 막에 이온성 액체를 이용하여 안정성을 높이는 연구가 진행되었다. 섬유소 막에 효소인 laccase를 고정화하고, 이온성 액체를 첨가하여 효소 활성을 약 1.6배 높였다. 그리고, 이온성 액체를 첨가한 활성막은 높은 안정성을 보이는 것으로 확인되었다(95).

요 약

현재 석유화학 및 화학분야에서 이온성 액체를 이용한 많은 연구가 이뤄지고 있다. 휘발성 유기용매의 대체 물질로서 각광을 받고 있는 이온성 액체는 최대 250억불 이상의 시장을 형성할 것으로 기대된다. 위에서 말한 바와 같이 생물공학 분야에서도 이온성 액체를 이용한 연구가 시작되어 용매로 사용하는 방법, 분리매체로서 사용하는 방법 등 다양하게 이용되고 있다. 이러한 이온성 액체는 효소의 활성, 안정성을 증대시킬 뿐 아니라, 분리 과정도 손쉽게 실현할 수 있다. 또한 환경적 측면과, 경제적인 측면을 고려하여 청정용매로 널리 사용할 수 있을 것이다. 앞에서 말한 바와 같이 생물공학에서 이온성 액체의 응용 가능성은 무한하다 볼 수 있다. 또한, 나노공학과 생물공학을 접목하는 분야에서도 널리 이온성 액체가 쓰일 수 있을 것이다. 유럽과 미국에서는 주로 청정용매로서의 응용에 대한 연구를, 일본에서는 주로 이온 전도성 재료로서의 응용에 대한 연구를 활발히 하고 있다. 이러한 전 세계적인 연구의 활성화에 비하여 국내 상황은 대학 및 연구소에서 산발적으로 연구가 진행되고 있는 수준이다. 이에 국내에서도 이에 대한 관심과 더불어 정부 및 기업체, 대학 및 연구소에 의한 컨소시엄을 형성하여 보다 체계적인 연구지원이 이뤄져야 할 것이다.

감 사

본고는 한국 과학재단 지원 인하대학교 조정밀 생물분리기술 연구센터의 지원을 받아 작성되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Muthusamy, S. and B. Gnanaprakasam (2005), Ionic liquids as a convenient recyclable medium for the generation of transient carbonyl ylides: syntheses of oxa and dioxa-bridged polycyclic systems, *TETRAHEDRON* 61, 1309-1315.
2. Jie, D and D. W. Armstrong (2005), Chiral ionic liquids: Synthesis and applications, *Chirality* 17, 281-292.
3. Kato, R. and J. Gmehling (2004), Activity coefficients at infinite dilution of various solutes in the ionic liquids [MMIM]+[CH3SO4], [MMIM]+[CH3OC2H4SO4], [MMIM]+[(CH3)2PO4], [C5H5NC2H5]+[(CF3SO2)2N] and [C5H5NH]+[C2H5OC2H4OSO3], *Fluid Phase Equilibria* 226, 37-44.

4. Crosthwaite, J. M., S. N. V. K. Aki, E. J. Maginn, and J. F. Brennecke (2005), Liquid phase behavior of imidazolium-based ionic liquids with alcohols: effect of hydrogen bonding and non-polar interactions, *Fluid Phase Equilibria* **228-229**, 303-309.
5. Wang, P., B. Wenger, R. Humphry-Baker, J.-E. Moser, J. Teuscher, W. Kantelehner, J. Mezger, E. V. Stoyanov, S. M. Zakeeruddin, and M. Gratzel (2005) Charge separation and efficient light energy conversion in sensitized mesoscopic solar cells based on binary ionic liquids, *J. American Chemical Society* **127**, 6850-6856.
6. Webb, P. B., M. F. Sellin, T. E. Kunene, S. Williamson, A. M. Z. Slawin, and D. J. Cole-Hamilton (2003), Continuous flow hydroformylation of alkenes in supercritical fluid-ionic liquid biphasic systems, *J. American Chemical Society* **125**, 15577-15588.
7. Leitner, W. (2003), Catalysis-A greener solution, *Nature* **423**, 930-931.
8. Cornils, B. and W. A. Herrmann (2003), Concepts in homogeneous catalysis: the industrial view, *J. Catalysis* **216**, 23-31.
9. Zhao, G. Y., T. Jiang, B. X. Han, Z. H. Li, J. M. Zhang, Z. M. Liu, J. He, and W. Z. Wu (2004), Electrochemical reduction of supercritical carbon dioxide in ionic liquid 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate, *J. Supercritical Fluids* **32**, 287-291.
10. Cole-Hamilton, D. J. (2003), Homogeneous catalysis-new approaches to catalyst separation, recovery, and recycling, *Science* **299**, 1702-1706.
11. Kamal, A. and G. Chouhan (2005), A task-specific ionic liquid [bmim]SCN for the conversion of alkyl halides to alkyl thiocyanates at room temperature, *Tetrahedron Letters* **46**, 1489-1491.
12. Xie, H. B., S. B. Zhang, and H. F. Duan (2004), An ionic liquid based on a cyclic guanidinium cation is an efficient medium for the selective oxidation of benzyl alcohols, *Tetrahedron Letters* **45**, 2013-2015.
13. Brinchi, L., R. Germani, and G. Savelli (2003), Ionic liquids as reaction media for esterification of carboxylate sodium salts with alkyl halides, *Tetrahedron Letters* **44**, 2027-2029.
14. Singer, R. D. and P. J. Scammells (2001), Alternative methods for the MnO₂ oxidation of codeine methyl ether to thebaine utilizing ionic liquids, *Tetrahedron Letters* **42**, 6831-6833.
15. Olivier, H (1999), Recent developments in the use of non-aqueous ionic liquids for two-phase catalysis, *J. Molecular Catalysis A: Chemical* **146**, 285-289.
16. Kim, H. W., J. M. Jeong, Y. S. Lee, D. Y. Chi, K. H. Chung, D. S. Lee, J. K. Chung, and M. C. Lee (2004), Rapid synthesis of [18F]FDG without an evaporation step using an ionic liquid, *Applied Radiation and Isotopes* **61**, 1241-1246.
17. Mehnert, C. P., R. A. Cook, N. C. Dispenziere, and E. J. Mozeleski (2004), Biphasic hydroformylation catalysis in ionic liquid media, *Polyhedron* **23**, 2679-2688.
18. Chikara, B. S., R. Chandra, and V. Tandon (2004), IBX in an ionic liquid: eco-friendly oxidation of 17 alpha-methylandrostan-3 beta,17 beta-diol, an intermediate in the synthesis of anabolic oxandrolone, *Tetrahedron Letters* **45**, 7585-7588.
19. Nakashima, K., F. Kubota, T. Maruyama, and M. Goto (2005), Feasibility of ionic liquids as alternative separation media for industrial solvent extraction processes, *Industrial Engineering Chemical Research* Page EST 4.8.
20. Comyns, C., N. Karodia, S. Zeler, and J. A. Andersen (2000), Clean catalysis with clean solvents-phosphonium tosylates for transfer hydrogenation reactions, *Catalysis Letters* **67**, 113-115.
21. Hirayama, N., M. Deguchi, H. Kawasumi, and T. Honjo (2005) Use of 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate room temperature ionic liquids as chelate extraction solvent with 4,4,4-trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione, *TALANTA* **65**, 255-260.
22. Letcher, T. M. and P. Reddy (2004), Ternary liquid-liquid equilibria for mixtures of 1-hexyl-3-methylimidazolium (tetrafluoroborate or hexafluorophosphate) plus ethanol plus an alkene at T=298.2 K, *Fluid Phase Equilibria* **219**, 107-112.
23. Wei, L., J. Y. Jiang, Y. H. Wang, and Z. L. Jin (2004), Selective hydrogenation of SBS catalyzed by Ru/TPPTS complex in polyether modified ammonium salt ionic liquid, *J. Molecular Catalysis A-Chemical* **221**, 47-50.
24. Wasserscheid, P. and M. Eichmann (2001), Selective dimerisation of 1-butene in biphasic mode using buffered chloroaluminate ionic liquid solvents-design and application of a continuous loop reactor, *Catalysis Today* **66**, 309-316.
25. Liu, J. F., Y. G. Chi, and G. B. Jiang (2005), Screening the extract ability of some typical environmental pollutants by ionic liquids in liquid-phase microextraction, *J. Separation Science* **28**, 87-91.
26. Visser, A. E. and R. D. Rogers (2003), Room-temperature ionic liquids: new solvents for *f*-element separations and associated solution chemistry, *J. Solid State Chemistry* **171**, 109-113.
27. Peng, J. F., J. F. Liu, G. B. Jiang, C. Tai, and M. J. Huang (2005), Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples, *J. Chromatography A* **1072**, 3-6.
28. Handy, S. T. and M. Okello (2005), Homogeneous supported synthesis using ionic liquid supports: Tunable separation properties, *J. Organic Chemistry* **70**, 2874-2877.
29. Wei, G. T., Z. S. Yang, and C. J. Chen (2003), Room temperature ionic liquid as a novel medium for liquid/liquid extraction of metal ions, *Analytica Chimica Acta* **488**, 183-192.
30. Okada, I. (1999), The Chelma effect-from the separation of isotopes to the modeling of binary ionic liquids, *J. Molecular Liquids* **83**, 5-22.
31. Zou, G., Z. Y. Wang, J. R. Zhu, J. Tang, and M. Y. He (2003), Developing an ionic medium for ligandless-palladium-catalysed Suzuki and Heck couplings, *J. Molecular Catalysis A: Chemical* **206**, 193-198.
32. Ma, H. Y., X. H. Wan, X. F. Chen, and Q. F. Zhou (2003), Reverse atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate in imidazolium ionic liquids, *Polymer* **44**, 5311-5316.
33. Shen, Y. Q., H. D. Tang, and S. J. Ding (2004), Catalyst separation in atom transfer radical polymerization, *Progress in Polymer Science* **29**, 1053-1078.
34. Yi, F., Y. Peng, and G. Song (2005), Microwave-assisted liquid-phase synthesis of methyl 6-amino-5-cyano-4-aryl-2-methyl-4H-pyran-3-carboxylate using functional ionic liquid as soluble support, *Tetrahedron Letters* **46**, 3931-3933.
35. Scurto, A. M., S. N. V. K. Aki, and J. F. Brennecke (2002), CO₂ as a separation switch for ionic liquid/organic mixtures, *J. American Chemical Society* **124**, 10276-10277.
36. Arce, A., O. Rodriguez, and A. Soto (2004), Tert-amyl ethyl ether separation from its mixtures with ethanol using the 1-butyl-3-methylimidazolium trifluoromethanesulfonate ionic liquid: Liquid-liquid equilibrium, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **43**, 8323-8327.
37. Gutowski, K. E., G. A. Broker, H. D. Willauer, J. G. Huddleston, R. P. Swatloski, J. D. Holbrey, and R. D. Rogers (2003), Controlling the aqueous miscibility of ionic liquids: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations, *J. American Chemical Society* **125**, 6632-6633.
38. Berthod, M., J. M. Joerger, G. Mignani, M. Vaultier, and M. Lemaire (2004), Enantioselective catalytic asymmetric hydrogenation of ethyl acetoacetate in room temperature ionic liquids, *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2219-2221.
39. Baleizao, C., B. Gigante, H. Garcia, and A. Corma (2004), Chiral vanadyl salen complex anchored on supports as recoverable catalysts for the enantioselective cyanosilylation of aldehydes. Comparison among silica, single wall carbon nanotube, activated carbon and imidazolium ion as support, *Tetrahedron* **60**, 10461-10468.
40. Kaliszán, R., M. P. Marszall, M. J. Markuszewski, T. Baczek, and J. Pernak (2004), Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids, *J. Chromatography* **1030**, 263-271.
41. Liu, J. F., J. A. Jonsson, and G. B. Jiang (2005), Application of ionic

- liquids in analytical chemistry, *Trends in Analytical Chemistry* **24**, 20-27.
42. Liu, J.F., Y. G. Chi, G. B. Jiang, C. Tai, J. F. Peng, and J. T. Hu (2004), Ionic liquid-based liquid-phase microextraction, a new sample enrichment procedure for liquid chromatography, *J. Chromatography A* **1026**, 143-147.
 43. Waichigo, M. M., T. L. Riechel, and N. D. Danielson (2005), Ethylammonium acetate as a mobile phase modifier for reversed phase liquid chromatography, *Chromatographia* **61**, 17-23.
 44. Xiao, X. H., L. Zhao, X. Liu, and S. X. Jiang (2004), Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography: Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids, *Acta* **519**, 207-211.
 45. He, L. J., W. Z. Zhang, L. Zhao, X. Liu, and S. X. Jiang (2003), Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrine by liquid chromatography, *J. Chromatography A* **1007**, 39-45.
 46. Mwangela, S. M., A. Numan, N. L. Gill, R. A. Agbaria, and I. M. Warner (2003), Separation of achiral and chiral analytes using polymeric surfactants with ionic liquids as modifiers in micellar electrokinetic chromatography, *Analytical Chemistry* **75**, 6089-6096.
 47. Liu, J.F., N. Li, G. B. Jiang, J. M. Li, J. A. Jonsson, and M. J. Wen (2005), Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography/fluorescence ionization detection, *J. Chromatography A* **1066**, 27-32.
 48. David, W., T. M. Letcher, D. Ramjugernath, and J. D. Raal (2003), Activity coefficients of hydrocarbon solutes at infinite dilution in the ionic liquid, 1-methyl-3-octyl-imidazolium chloride from gas-liquid chromatography, *J. Chemical Thermodynamics* **35**, 1335-1341.
 49. Vaher, M., M. Koel, and M. Kaljurand (2002), Application of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids in non-aqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatography A* **979**, 27-32.
 50. Armstrong, N., A. D. Lencastre, and E. Gouaux (1999), A new protein folding screen: Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase, *Protein Science* **8**, 1475-1483.
 51. Catherine A. S. and A. F. II Robert (2000), Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate, *Protein Science* **9**, 2001-2008.
 52. Jastorff, B., R. Stormann, J. Ranke, K. Molter, F. Stock, B. Oberheitmann, W. Hoffmann, J. Hoffmann, M. Nuchter, B. Ondruschka, and J. Filser (2003), How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation, *Green Chemistry* **5**, 136-142.
 53. Matsumoto, M., K. Mochiduki, K. Fukunishi, and K. Kondo (2004), Extraction of organic acids using imidazolium-based ionic liquids and their toxicity to *Lactobacillus rhamnosus*, *Separation and Purification Technology* **40**, 97-101.
 54. Matsumoto, M., K. Mochiduki, and K. Kondo (2004), Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria, *J. Bioscience and Bioengineering* **98**, 344-347.
 55. Ranke, J., K. Molter, F. Stock, U. Bottin-Weber, J. Poczbott, J. Hoffmann, B. Ondruschka, J. Filser, and B. Jastorff (2004), Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays, *Ecotoxicology AND Environmental Safety* **58**, 396-404.
 56. Swatloski, R. P., J. D. Holbrey, S. B. Memon, G. A. Caldwell, K. A. Caldwell, and R. D. Rogers (2004), Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids, *Chemical Communications* **6**, 668-669.
 57. Jain, N., A. Kumar, S. Chauhan, and S. M. S. Chauhan (2005), Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *TETRAHEDRON* **61**, 1015-1060.
 58. Bornscheuer, U. T., C. Bessler, R. Srinivas, and S. H. Krishna (2002), Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, *Trends in Biotechnology* **20**, 433-437.
 59. Schofer, S. H., N. Kaftzik, P. Wasserscheid, and U. Kragl (2001), Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity, *Chemical Communications* **5**, 425-426.
 60. Panke, S. and M. G. Wubbolts (2002), Enzyme technology and bioprocess engineering, *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 111-116.
 61. Park, S. and R. J. Kazlauskas (2003), Biocatalysis in ionic liquids-advantages beyond green technology, *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 432-437.
 62. van Rantwijk, F., R. M. Lau, and R. A. Sheldon (2003), Biocatalytic transformations in ionic liquids, *Trends in Biotechnology* **21**, 131-138.
 63. Walker, A. J. and N. C. Bruce (2004), Combined biological and chemical catalysis in the preparation of oxycodone, *TETRAHEDRON* **60**, 561-568.
 64. Kragl, U., M. Eckstein, and N. Kaftzik (2002), Enzyme catalysis in ionic liquids, *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 565-571.
 65. Jaeger, K. E. and T. Eggert (2002), Lipases for biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 390-397.
 66. Yahya, A. R. M., W. A. Anderson, and M. Moo-Young (1998), Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions, *Enzyme and Microbial Technology* **23**, 438-450.
 67. Flores, M. V. and P. J. Halling (2002), Full model for reversible kinetics of lipase-catalyzed sugar-ester synthesis in 2-methyl 2-butanol, *Biotechnology and Bioengineering* **78**, 794-800.
 68. Ulbert, O., T. Frater, K. Belafi-Bako, and L. Gubicza (2004), Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic* **31**, 39-45.
 69. Kamal, A. and G. Chouhan (2004), Chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure 1,2-diols employing immobilized lipase in the ionic liquid [bmim]PF₆, *Tetrahedron Letters* **45**, 8801-8805.
 70. Lau, R. M., F. van Rantwijk, K. R. Seddon, and R. A. Sheldon (2000), Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Organic Letters* **2**, 4189-4191.
 71. Eckstein, M., P. Wasserscheid, and U. Kragl (2002), Enhanced enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas* sp at high temperatures and fixed water activity in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide, *Biotechnology Letters* **24**, 763-767.
 72. Kim, M. J., M. Y. Choi, J. K. Lee, and Y. Ahn (2003), Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity, *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic* **26**, 115-118.
 73. Chiappe, C., E. Leandri, S. Lucchesi, D. Pieraccini, B. D. Hammock, and C. Morisseau (2004), Biocatalysis in ionic liquids: the stereoconvergent hydrolysis of trans-beta-methylstyrene oxide catalyzed by soluble epoxide hydrolase, *J. Molecular Catalysis B-Enzymatic* **27**, 243-248.
 74. Kaftzik, N., P. Wasserscheid, and U. Kragl (2002), Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the beta-galactosidase catalysed synthesis of N-acetyllactosamine, *Organic Process Research & Development* **6**, 553-557.
 75. Poole, C. F. (2004), Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids, *J. Chromatography A* **1037**, 49-82.
 76. Liu, J. F., J. F. Peng, Y. G. Chi, and G. B. Jiang (2005), Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography, *TALANTA* **65**, 705-709.
 77. Qi, S. D., S. Y. Cui, X. G. Chen, and Z. Hu (2004), Rapid and sensitive determination of anthraquinones in Chinese herb using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid with beta-cyclodextrin as modifier in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatography A* **1059**, 191-198.
 78. Jiang, T. F., Y. L. Gu, B. Liang, J. B. Li, Y. P. Shi, and Q. Y. Ou (2003), Dynamically coating the capillary with 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids for separation of basic proteins by capillary electrophoresis, *Analytica Chimica Acta* **479**, 249-254.
 79. Qin, W. D. and S. F. Y. Li (2002), An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry, *Electrophoresis* **23**, 4110-4116.

80. Baczek, T., M. P. Marszall, R. Kaliszan, L. Walijewski, W. Makowiecka, B. Sparzak, Z. Grzonka, K. Wisniewska, and P. Juszczak (2005), Behavior of peptides and computer-assisted optimization of peptides separations in a normal-phase thin-layer chromatography system with and without the addition of ionic liquid in the eluent, *Biomedical Chromatography* **19**, 1-8.
81. Fernandez, D., A. J. Parola, L. C. Branco, C. A. M. Afonso, and F. Pina (2004), Thermal and photochemical properties of 4-hydroxyflavylium in water-ionic liquid biphasic systems, *J. Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* **168**, 185-189.
82. Soto, A., A. Alberto, and K. K. Mohammad (2005), Partitioning of antibiotics in a two-liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid, *Separation and Purification Technology In Press*.
83. Baumann, M. D., A. J. Daugulis, and P. G. Jessop (2005), Phosphonium ionic liquids for degradation of phenol in a two-phase partitioning bioreactor, *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**, 131-137.
84. Cull, S. G., J. D. Holbrey, V. Vargas-Mora, K. R. Seddon, and G. J. Lye (2000), Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations, *Biotechnology and Bioengineering* **69**, 227-233.
85. Reetz, M. T., W. Wiesenhofer, G. Francio, and W. Leitner (2003), Continuous flow enzymatic kinetic resolution and enantiomer separation using ionic liquid/supercritical carbon dioxide media, *Advanced Synthesis & Catalysis* **345**, 1221-1228.
86. Branco, L. C., J. G. Crespo, and C. A. M. Afonso (2002), Highly selective transport of organic compounds by using supported liquid membranes based on ionic liquids, *Angewandte Chemie-International Edition* **41**, 2771-2773.
87. Branco, L. C., J. G. Crespo, and C. A. M. Afonso (2002), Studies on the selective transport of organic compounds by using ionic liquids as novel supported liquid membranes, *Chemistry-A European J.* **8**, 3865-3871.
88. Matsumoto, M., T. Inomoto, and K. Kondo (2005), Selective separation of aromatic hydrocarbons through supported liquid membranes based on ionic liquids, *J. Membrane Science* **246**, 77-81.
89. Schlosser, S., R. Kertesz, and J. Martak (2005), Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction: An overview with a case study on recovery of MPCA, *Separation and Purification Technology* **41**, 237-266.
90. Fortunato, R., M. J. Gonzalez-Munoz, M. Kubasiewicz, S. Luque, J. R. Alvarez, C. A. M. Afonso, I. M. Coelho, and J. G. Crespo (2005), Liquid membranes using ionic liquids: the influence of water on solute transport, *J. Membrane Science* **249**, 153-162.
91. Miyako, E., T. Maruyama, N. Kamiya, and M. Goto (2003), Use of ionic liquids in a lipase-facilitated supported liquid membrane, *Biotechnology Letters* **25**, 805-808.
92. Krockel, J. and U. Kragl (2003), Nanofiltration for the separation of nonvolatile products from solutions containing ionic liquids, *Chemical Engineering & Technology* **26**, 1166-1168.
93. Gorman-Lewis, D. J. and J. B. Fein (2004), Experimental study of the adsorption of an ionic liquid onto bacterial and mineral surfaces, *Environmental Science & Technology* **38**, 2491-2495.
94. Trewyn, B. G., C. M. Whitman, and V. S. Y. Lin (2004), Morphological control of room-temperature ionic liquid templated mesoporous silica nanoparticles for controlled release of antibacterial agents, *Nano Letters* **4**, 2139-2143.
95. Turner, M. B., S. K. Spear, J. D. Holbrey, and R. D. Rogers (2004), Production of bioactive cellulose films reconstituted from ionic liquids, *Biomacromolecules* **5**, 1379-1384.