

**Lignine aus Low-Input-Pflanzen:
Einfluss von Biomasse, Vorbehandlung
und Aufschlussparametern auf Struktur
und Antioxidanz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

der Landwirtschaftlichen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

von

Jessica Rumpf

aus

Gifhorn

Bonn, 2023

Referentin: Prof. Dr. Margit Schulze

Koreferent: Prof. Dr. Ralf Pude

Tag der mündlichen Prüfung: 22.08.2023

Angefertigt mit Genehmigung der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	5
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	7
I Einführung	9
1. Einleitung und Zielsetzung	9
2. Stand der Forschung	10
2.1 Low-Input-Pflanzen	10
2.1.1 Miscanthus.....	10
2.1.2 Durchwachsene Silphie.....	11
2.1.3 Paulownia	12
2.2 Lignin	13
2.2.1 Struktur und Arten von Ligninen	13
2.2.2 Analytische Methoden zur Strukturaufklärung von Ligninen	17
2.2.3 Lignin als Antioxidans	18
2.2.4 Assays zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften	19
II Materialien und Methoden	24
3. Verwendete Geräte und Chemikalien	24
4. Experimentelle Arbeiten	26
4.1 Aufbereitung und Charakterisierung der Biomasse	26
4.1.1 Autohydrolyse.....	26
4.1.2 Chemische Zusammensetzung der Biomasse	26
4.2 Isolierung und strukturelle Charakterisierung der Lignine	27
4.2.1 Organosolv-Aufschluss	27
4.2.2 Fällung von Kraft-Lignin	28
4.2.3 Chemische Zusammensetzung ausgewählter Lignine	28
4.2.4 Spektroskopische Methoden.....	28
4.2.5 Methoxy- und Ethoxygehalt	29
4.2.6 Gelpermeationschromatographie	30
4.3 Assays zur Bestimmung der Antioxidanz und des Phenolgehaltes	31
4.3.1 DPPH-Assay.....	31
4.3.2 ABTS-Assay.....	31
4.3.3 FRAP-Assay	31
4.3.4 FC-Assay.....	32
4.3.5 Statistische Auswertung	32
III Ergebnisse & Diskussion	34
5. Lignine aus verschiedenen Biomassen	34
5.1 Charakterisierung der Biomassen	34
5.2 Ausbeute der Lignine	35

5.3	Qualitative Strukturuntersuchung	38
5.4	Monolignolverhältnisse, Bindungstypen und Substrukturen	41
5.5	Methoxy- und Ethoxygehalt.....	48
5.6	Molmassenverteilung	49
5.7	Antioxidanz und Phenolgehalt	52
5.8	Zusammenfassung	55
6.	Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße	56
6.1	Ausbeute der Lignine	56
6.2	Qualitative Strukturuntersuchung	57
6.3	Monolignolverhältnisse, Bindungstypen und Substrukturen	60
6.4	Methoxy- und Ethoxygehalt.....	63
6.5	Molmassenverteilung	63
6.6	Antioxidanz und Phenolgehalt	65
6.7	Zusammenfassung	66
7.	Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen.....	68
7.1	Charakterisierung von Miscanthus nach verschiedenen Aufschlussprozessen	68
7.2	Ausbeute und Reinheit der Lignine.....	70
7.3	Qualitative Strukturuntersuchung	72
7.4	Monolignolverhältnisse, Bindungstypen und Substrukturen	74
7.5	Methoxy- und Ethoxygehalt.....	77
7.6	Molmassenverteilung	78
7.7	Antioxidanz und Phenolgehalt	80
7.8	Zusammenfassung	83
IV	Zusammenfassung und Ausblick.....	85
	Literaturverzeichnis.....	87
	Tabellenverzeichnis.....	106
	Abbildungsverzeichnis.....	108
	Anhang.....	112
	Publikationsliste.....	124
	Danksagung	126

Kurzfassung

Lignin ist ein aromatisches Biopolymer, das in den Zellwänden von Pflanzen vorkommt. Es ist hauptsächlich aus drei sogenannten Monolignolen (*p*-Hydroxyphenyl (H), Guajakol (G) und Syringol (S)) aufgebaut, die über verschiedene Bindungen miteinander verknüpft sein können, und enthält eine Vielzahl an funktionellen Gruppen. Interessant für die Verwendung von Lignin sind dabei insbesondere die vielen phenolischen Hydroxygruppen, die als Ausgangsstoff bei der Synthese neuer Produkte dienen können, daneben aber auch für seine antioxidativen Eigenschaften verantwortlich sind. Da Struktur und Eigenschaften von vielen Faktoren wie Biomasse und Aufschlussprozess abhängen, ist eine detaillierte Charakterisierung der Lignine nötig, um Struktur-Eigenschafts-Beziehungen aufzuklären und so einen Schritt näher an eine mögliche stoffliche Nutzung zu kommen. Mit dieser Arbeit soll der Einfluss der Biomasse inklusive der verwendeten Partikelgröße sowie des Organosolv-Aufschlussprozesses auf die Monomerzusammensetzung, das Molekulargewicht und die Antioxidanz der isolierten Lignine untersucht werden.

Als Rohstoffe zur Ligningewinnung dienen die drei mehrjährigen lignocellulosereichen Low-Input-Pflanzen *Miscanthus x giganteus*, *Silphium perfoliatum* und *Paulownia tomentosa*, die momentan hauptsächlich zur Energiegewinnung genutzt werden. Im Rahmen der Bioökonomiestrategie der Europäischen Union soll der Schwerpunkt zukünftiger Bioraffinerien jedoch auf eine ganzheitliche Nutzung von Biomassen gelegt und so auch die stoffliche Nutzung fokussiert werden. Zusätzlich zu diesen drei Pflanzen werden auch Organosolv-Lignine aus den in der Literatur bereits gut beschriebenen Biomassen Weizenstroh und Buchenholz isoliert, und zwei Nadelholz-Kraft-Lignine als Vergleich herangezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Art der Biomasse hauptsächlich die Monomerzusammensetzung beeinflusst: Gräser bestehen aus allen drei Monolignolen, Laubhölzer mehrheitlich aus S- und G-Einheiten, während Nadelhölzer nur aus G-Einheiten aufgebaut sind. Die Holzlignine besitzen zudem höhere Molekulargewichte sowie bessere antioxidative Eigenschaften als die Gras- und Krautlignine. Mit der feineren Vermahlung der Biomasse kann die Monomerzusammensetzung beeinflusst werden: der Einsatz kleinerer Partikelgrößen führt zu Ligninen mit einem höheren Gehalt an H-Einheiten, sowohl für *Miscanthus* als auch für *Paulownia*. Außerdem kann bei *Paulownia* die Ausbeute gesteigert und eine Zunahme des Molekulargewichtes beobachtet werden, wenn die kleinste Siebfraktion für den Organosolv-Aufschluss verwendet wird. Einen größeren Einfluss als der Mahlgrad der Biomasse haben die Autohydrolyse sowie der Organosolv-Aufschlussprozess selbst. Die Monomerzusammensetzung ändert sich aufgrund derselben Biomasse zwar kaum, die Bindungstypen zwischen den Monolignolen dagegen schon. Mit höherer Prozessstärke (Zeit, Temperatur, Ethanol-Konzentration) werden Etherbindungen gespalten, was den Anteil an phenolischen Hydroxygruppen und somit die Antioxidanz erhöht. Neben dieser Depolymerisation werden partiell auch Rekondensationsreaktionen beobachtet.

Die erzielten Ergebnisse liefern einen Beitrag zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen Ligninquelle und -gewinnung mit der daraus resultierenden Ligninstruktur und Antioxidanz und bieten damit eine Grundlage für den Wandel von der energetischen hin zu einer nachhaltigen stofflichen Nutzung dieses nachwachsenden Biopolymers. Gerade über die Wahl der Aufschlussparameter können Struktur und Antioxidanz gezielt beeinflusst werden, was in zukünftigen Studien weiter fokussiert werden sollte.

Abstract

Lignin is an aromatic biopolymer found in the cell walls of plants. It is mainly composed of three so-called monolignols (*p*-hydroxyphenyl (H), guaiacol (G) and syringol (S)), which can be linked via various bonds, and contains a large number of functional groups. Of particular interest for the use of lignin are its many phenolic hydroxyl groups, which can serve as starting materials for the synthesis of new products but are also responsible for its antioxidant properties. Since structure and properties depend on many factors such as biomass and pulping process, a detailed characterization of the lignins is necessary to elucidate structure-property relationships and thus come one step closer to a possible material use. The aim of this work is to investigate the influence of the biomass including its particle size as well as the pulping parameters of the organosolv process on the monomer composition, molecular weight, and antioxidant capacity of the isolated lignins.

The three perennial lignocellulose-rich low-input crops *Miscanthus x giganteus*, *Silphium perfoliatum* and *Paulownia tomentosa*, which are currently mainly used for energy production, serve as raw materials for lignin production. Within the framework of the bioeconomy strategy of the European Union, however, the focus of future biorefineries is to be placed on an integrated use of biomasses and thus, also on their material use. In addition to these three plants, organosolv lignins are isolated from wheat straw and beech wood, which are already well described in the literature, and two softwood kraft lignins for comparison. The results show that the type of biomass mainly influences the monolignol composition: grasses are made up of all three monolignols, hardwoods are mainly composed of S and G units, while softwoods only consist of G units. The wood lignins also have higher molecular weights and better antioxidant properties than the grass and herb lignins. With finer grinding of the biomass, the monomer composition can be influenced: the use of smaller particle sizes leads to lignins with a higher content of H units, both for *Miscanthus* and *Paulownia*. Furthermore, for *Paulownia*, the yield and molecular weight can be increased when the smaller particle size is used for organosolv pulping. A greater influence than the degree of grinding of the biomass is its autohydrolysis as well as the organosolv process itself. Although the monomer composition barely changes due to the same biomass, the linkages between the monolignols do. With higher process severity (time, temperature, ethanol concentration), ether bonds are cleaved, which increases the proportion of phenolic hydroxyl groups and thus the antioxidant capacity. Next to this depolymerization, recondensation reactions are also observed, but to a smaller extent.

The results obtained contribute to the understanding of the relationship between lignin source and extraction with the resulting lignin structure and antioxidant capacity, and thus provide a groundwork for the change from the energetic to a sustainable material use of this renewable biopolymer. The structure and antioxidant properties can be specifically influenced by the choice of the pulping parameters, which could be a focus in future studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	β -Aryl-Ether-Strukturen
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AH	Autohydrolyse
B	Resinol
C	Phenylcoumaran
C-C	Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung
CKA	Campus Klein-Altendorf
C-O	Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung
CSF	kombinierte Prozessstärke (<i>combined severity factor</i>)
CUPRAC	antioxidative Kapazität, bestimmt als Reduktionsvermögen von Kupferionen (<i>cupric ion reducing antioxidant capacity</i>)
CV	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>)
D	Spirodienon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl
EFA	ökologische Vorrangfläche (<i>ecological focus area</i>)
EtOH	Ethanol
FC	Folin-Ciocalteu
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
FRAP	antioxidatives Potential, bestimmt als Reduktionsvermögen von Eisenionen (<i>ferric ion reducing antioxidant potential</i>)
G	G-Einheiten (Guajakol)
GAE	Gallussäure-Äquivalente (<i>gallic acid equivalents</i>)
GPC	Gelpermeationschromatographie
H	H-Einheiten (<i>p</i> -Hydroxyphenyl)
HAT	Wasserstoff- bzw. Protonentransfer (<i>hydrogen atom transfer</i>)
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPAEC	Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie (<i>high pressure anion exchange chromatography</i>)
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>high pressure liquid chromatography</i>)
HS-GC-MS	Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum coherence</i> (NMR-Technik)
IAT	Indulin AT
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)

Abkürzungsverzeichnis

KL	Kraft-Lignin
KU	Anteil an kondensierten Untereinheiten
MSD	Verfahrensstandardabweichung (<i>method standard deviation</i>)
M_n	Zahlenmittel der Molmasse
M_w	Massenmittel der Molmasse
MWL	<i>milled wood lignin</i>
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NREL	<i>National Renewable Energy Laboratory</i>
ORAC	Fähigkeit zum Abfangen von Sauerstoffradikalen (<i>oxygen radical absorbance capacity</i>)
OSL	Organosolv-Lignin
PAD	gepulst-amperometrischer Detektor (<i>pulsed amperometric detector</i>)
pCA	<i>p</i> -Coumarat
PMMA	Polymethylmethacrylat
PDI	Polydispersitätsindex
Py-GC/MS	Pyrolyse-Gaschromatographie/Massenspektrometrie
R^2	Bestimmtheitsmaß
RACI	relativer Index der antioxidativen Kapazität (<i>relative antioxidant capacity index</i>)
RI	Refraktionsindex
RMSE	Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers (<i>root mean square error</i>)
RSA	Aktivität als Radikalfänger (<i>radical scavenging activity</i>)
RSS	Residuenquadratsumme (<i>residual sum of squares</i>)
S	S-Einheiten (Syringol)
SET	Ein-Elektronentransfer (<i>single electron transfer</i>)
T	Tricin
TE	Trolox-Äquivalente (<i>Trolox equivalents</i>)
TEAC	antioxidative Kapazität angegeben als Trolox-Äquivalente (<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i>)
THF	Tetrahydrofuran
TPC	Gesamtphenolgehalt (<i>total phenol content</i>)
TPTZ	2,4,6-Tri(2-Pyridyl)-1,3,5-Triazin
TRAP	reaktives antioxidatives Gesamtpotential (<i>total reactive antioxidant potential</i>)
UV-Vis	Ultravioletter – sichtbarer Wellenlängenbereich (<i>ultraviolet – visible</i>)
ZA	Zimtalkohol-Endgruppe

I Einführung

1. Einleitung und Zielsetzung

Mit der immer weiter zunehmenden Verknappung fossiler Rohstoffe gewinnt der Wandel hin zur Nutzung erneuerbaren Ressourcen mehr und mehr an Bedeutung, sowohl in der Forschung als auch in der Industrie. Ein Fokus liegt dabei auf neuen Bioraffineriekonzepten zur Nutzung lignocellulosereicher Biomasse, die mit einer jährlichen Produktion von 200 Milliarden Tonnen reichlich verfügbar ist.¹ Ein wichtiger Punkt ist dabei der Ausbau der Wertschöpfungskette, die den Fokus nicht nur auf die Energiegewinnung legt, sondern auch die stoffliche Verwertung möglichst aller Biomassebestandteile adressiert.²

Eine Komponente, deren Potential bisher nicht hinreichend ausgeschöpft wird, ist Lignin, ein aromatisches Biopolymer. In der Zellstoffindustrie fallen jährlich ca. 70 Mio. t Lignin an, wovon jedoch nur 2 % isoliert und kommerziell genutzt werden.³ Aufgrund der vielen phenolischen und aliphatischen Hydroxygruppen in seiner Struktur könnte es sich z.B. als Ersatz für bisher fossil-basierte Polyole bei der Synthese von Polyurethanen oder Polyestern⁴ eignen, aber auch ein Einsatz in der Biomedizin⁵ wäre aufgrund der antioxidativen und antimikrobiellen Eigenschaften möglich. Um Lignine effizienter für hochwertige Produkte nutzen zu können, ist in einem ersten Schritt jedoch die detaillierte Analyse der Struktur und Eigenschaften von großer Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Gewinnung und Charakterisierung von Ligninen aus den sogenannten Low-Input-Pflanzen Miscanthus, Silphie und Paulownia, die potentielle Rohstoffe für zukünftige Bioraffinerien sind.⁶ Daneben werden die in der Literatur bereits gut beschriebenen Biomassen Weizenstroh und Buchenholz als Vergleich herangezogen, sowie verschiedene Vorbehandlungen der Biomasse und Organosolv-Aufschlussbedingungen untersucht. Zusammenfassend soll die Auswirkung der Variation der folgenden Parameter auf Struktur und Eigenschaften der isolierten Lignine untersucht werden:

- i. Variation der Biomasse bei gleichem Aufschlussprozess (Kapitel 5):
Gräser (Miscanthus, Weizenstroh) vs. krautige Pflanzen (Silphie) vs. Hölzer (Paulownia, Buche)
- ii. Variation der Partikelgröße der Biomasse bei gleichem Aufschlussprozess (Kapitel 6):
1,6 – 2 mm vs. 0,5 – 1,0 mm vs. < 0,25 mm; am Beispiel von Miscanthus (Gras) und Paulownia (Holz)
- iii. Variation des Aufschlussprozesses bei gleicher Biomasse (Kapitel 7):
Aufschlussdauer, Lösemittelkonzentration und Autohydrolyse als Vorbehandlung am Beispiel von Miscanthus; Vergleich mit Kraft-Lignin und kommerziell erhältlichem Indulin AT

Die Charakterisierung der Lignine erfolgt in Hinblick auf die strukturelle Zusammensetzung (Monolignole, funktionelle Gruppen, Bindungstypen), das Molekulargewicht (Molmassenmittelwerte, Polydispersitäten) und die antioxidativen Eigenschaften (ermittelt über vier verschiedene Assays). Außerdem werden die Biomassen auf ihre chemische Zusammensetzung hin untersucht, genauso wie ausgewählte Lignine, um ihre Reinheit zu überprüfen.

2. Stand der Forschung

2.1 Low-Input-Pflanzen

Die Bioökonomie-Strategie der Europäischen Union beinhaltet Konzepte der Kreislaufwirtschaft sowie Strategien zur Substitution fossiler Energieträger mit erneuerbaren Ressourcen für eine nachhaltige Energie-, Biokraftstoff- und Chemikalienproduktion.⁷ Im Mittelpunkt dieser Strategie steht das Konzept nachhaltiger Bioraffinerien, das im Wesentlichen auf einer kosteneffektiven Umwandlung von lignocellulosereicher Biomasse zu Bioenergie und Bioprodukten basiert. Im Gegensatz zu Bioraffinerien der ersten Generation, in denen hauptsächlich essbare Nutzpflanzen verwendet wurden, sollen nun verschiedene Optionen von nachwachsenden Rohstoffen über agroforstwirtschaftliche Reststoffe bis hin zu Abfallstoffen verfolgt werden.²

Jüngste Untersuchungen zur Biomassenutzung umfassen sogenannte Low-Input-Pflanzen, vor allem mehrjährige und lignocellulosereiche Gräser und Hölzer.^{8,9} Insbesondere die Mehrjährigkeit der Pflanzen bringt viele Vorteile mit sich: dass sie nach der einmaligen Pflanzung für die nächsten 10 – 25 Jahre jährlich geerntet werden können, resultiert in einer positiven Energie- und Treibhausgasbilanz; außerdem sind sie sehr effizient in ihrer Ressourcennutzung und benötigen nur wenig Sonnenstrahlung, Wasser und Dünger, da sie in der Lage sind, Nährstoffe über den Winter in die Wurzeln zurückzuverlagern.¹⁰ Denn auch wenn nachwachsende Rohstoffe erneuerbar sind, ist Biomasse eine limitierte Ressource. Wird sie nicht sinnvoll angebaut, kann ihre Produktion Herausforderungen wie Flächenkonkurrenz, Ressourcenknappheit, Bodenabtrag und -schädigung, Biodiversitätsverluste und den Klimawandel verschärfen.^{11,12} Mit dem zweckmäßigen Anbau von Low-Input-Pflanzen könnte dem entgegengewirkt werden, da sie einige ökologische Vorteile, vor allem im Vergleich mit einjährigen Kulturen, mit sich bringen. Diese werden im Folgenden für *Miscanthus*, Silphie und Paulownia, den drei in dieser Arbeit genutzten Low-Input-Pflanzen, kurz skizziert.

2.1.1 Miscanthus

Miscanthus umfasst ca. 17 Arten an mehrjährigen, rhizombildenden Gräsern, die ihren Ursprung in subtropischen und tropischen Regionen in Asien haben.¹³ *Miscanthus* gehört zu den C₄-Pflanzen, die aufgrund der Oxalacetat-Bildung während der Fotosynthese eine höhere CO₂-Fixierungsrate aufweisen als C₃-Pflanzen, die D-3-Phosphoglycerat produzieren. Auf diese Weise ist *Miscanthus* in der Lage, mehr CO₂ einzulagern. Insgesamt nutzen zwar nur 3 % der blühenden Pflanzen den C₄-Stoffwechsel, tragen damit aber zu 23 % des fixierten CO₂ weltweit bei.¹⁴ Dadurch, dass C₄-Pflanzen das vorhandene Sonnenlicht besser nutzen, wachsen sie sehr schnell. Der hier verwendete Genotyp *Miscanthus x giganteus* (Abbildung 2-1) kann im Jahr bis zu 4 m hoch werden. Zusammen mit der hohen Anbaudichte sind Erträge von ca. 25 t pro Hektar und Jahr möglich. Einmal gepflanzt, kann *Miscanthus* jährlich für ca. 15 – 20 Jahre geerntet werden.¹⁵ Die Ernte erfolgt typischerweise im Winter oder Frühjahr, wenn die Nährstoffe von den überirdischen Pflanzenteilen zu den Rhizomen im Boden rückverlagert wurden. Dies bringt weitere Vorteile gegenüber einjährigen Pflanzen mit sich, wie ein geringerer Nährstoff- und Wasserbedarf, was den Anbau auf marginalen Landflächen erlaubt, verminderte Bodenerosion und ein erhöhtes Potential der Kohlenstoffbindung im Boden. Zudem ist *Miscanthus* sehr tolerant gegenüber verschiedenen klimatischen Bedingungen.^{16,17}



Abbildung 2-1: Links: blühender *Miscanthus x giganteus* im Sommer (Copyright 2017, Katharina Walbrück).
Rechts: getrockneter *Miscanthus x giganteus* kurz vor der Ernte (Copyright 2018, CKA).

Im Rahmen der Greening-Maßnahmen der *Gemeinsamen Agrarpolitik der Europäischen Union* ist Miscanthus seit 2018 zum Anbau auf ökologischen Vorrangflächen (EFA, *ecological focus area*) zugelassen⁶, was die Attraktivität des Miscanthusanbaus weiter gesteigert hat. Neben der rein energetischen Nutzung rücken weitere Anwendungsbereiche in den Fokus, wie z.B. die Produktion von Biokraftstoffen und Chemikalien^{13, 18–20}, stoffliche Nutzungsmöglichkeiten in Spanplatten und Zementsystemen²¹ oder als Substrat zum Gemüseanbau mit anschließender Verbrennung im Zuge einer Kaskadennutzung²².

2.1.2 Durchwachsene Silphie

Die durchwachsene Silphie (*Silphium perfoliatum*) ist ein Staudengewächs mit großen, gegenständig angeordneten und am Stängel zusammengewachsenen Blättern, weswegen sie auch als Becherpflanze bezeichnet wird. Sie wird bis zu 3 m hoch, blüht gelb und besitzt einen vierkantigen Stängel (Abbildung 2-2).²³ Ursprünglich wurden Becherpflanzen, die zu den C₃-Pflanzen zählen, in Nordamerika kultiviert, wohingegen sie heute weltweit angebaut werden.⁶ Wie bei Miscanthus handelt es sich um eine mehrjährige Pflanze, die jährlich über einen Zeitraum von 15 – 20 Jahren geerntet werden kann.²⁴ Sie benötigt nur geringe Mengen an Dünger und Pflege, zeigt ein gutes Wachstum auch bei trockenen Böden und hohe Erträge zwischen 11 – 22 t pro Hektar ab dem zweiten Jahr.²⁵ Außerdem ist sie ebenfalls Teil des EU Greening-Programms und kann auf EFAs angebaut werden.²⁶



Abbildung 2-2: Links: blühende Silphie (Copyright 2016, CKA). Rechts: Querschnitt des Stängels der durchwachsenen Silphie (Copyright 2019, Niklas Frase).

2. Stand der Forschung

Momentan wird die Silphie hauptsächlich als Rohstoff für Biogas und Biokraftstoffe untersucht.^{25,27} Dabei besitzt sie gegenüber herkömmlichen Biomassepflanzen wie Mais einige ökologische Vorteile, z.B. eine verbesserte Biodiversität, Bodengesundheit und Wasserqualität.²⁸ Daneben rückt aber auch die stoffliche Nutzung der Becherpflanze immer weiter in den Fokus, z.B. als erneuerbarer Rohstoff bei der Herstellung von Spanplatten²⁹, zur Papierherstellung³⁰ oder als Polystyrolersatz in Baustoffen²⁴.

2.1.3 Paulownia

Neben mehrjährigen Pflanzen wie Miscanthus und Silphie ziehen auch schnellwachsende Hölzer ein immer größeres Interesse als Industriepflanze auf sich. Ein Beispiel ist der Laubbaum Paulownia, dessen Gattung neun Arten umfasst und in China und Südostasien heimisch ist.³¹ Die Bäume zeichnen sich durch einen geringen Wasserbedarf aus und besitzen einen Wachstumszyklus von ca. 15 Jahren. Bereits nach weniger als 10 Jahren sind sie bis zu 20 m hoch bei einem Stammdurchmesser von bis zu 40 cm (Abbildung 2-3).⁶ Die jährliche Holzproduktion beträgt bereits 5 – 7 Jahre nach Pflanzung zwischen 150 – 330 t pro Hektar bei intensiver Bepflanzung mit ca. 2000 Bäumen pro Hektar.³²



Abbildung 2-3: Links: blühender Paulowniabaum. Rechts: Baumstamm einer siebenjährigen Paulownia (Copyright 2019, Georg Völkerling).

Studien zur Nutzung von Paulownia befassen sich vor allem mit der Herstellung von Biokraftstoffen und Bioethanol^{33–36}, aber auch mit Kompositen aus Paulowniaholz und Polypropylen³⁷ oder Papieren³⁸. Neben dem Holz finden Rinde, Blätter, Blüten und Samen aufgrund ihrer antioxidativen, entzündungshemmenden und antimikrobiellen Eigenschaften Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin.³⁹ Weitere Anwendungen der verschiedenen Pflanzenteile wurden von Rodríguez-Seoane *et al.* in einem übersichtlichen Review-Artikel zusammengefasst.³¹ Die Nutzung von Paulownia in einer integrierten Bioraffinerie, die die Fraktionierung in mehrere Produkte im Rahmen einer Kaskadennutzung erlaubt, wurde von Del Río *et al.* untersucht.³⁵

2.2 Lignin

Lignocellulose ist ein von Pflanzen synthetisiertes Kompositmaterial, das hauptsächlich aus polymeren Kohlenhydraten (Cellulose und Hemicellulose) und dem aromatischen Polymer Lignin besteht. Daneben sind auch geringe Anteile an Pektinen, anorganischen Substanzen, Proteinen und Extraktstoffen enthalten, wobei die genaue Zusammensetzung von der Spezies und dem Pflanzengewebe sowie den Wachstumsbedingungen abhängt.⁴⁰ Lignin und Hemicellulosen sind über kovalente Bindungen miteinander verknüpft und formen so eine Matrix, die durch die Cellulosefasern verstärkt wird (Abbildung 2-4).

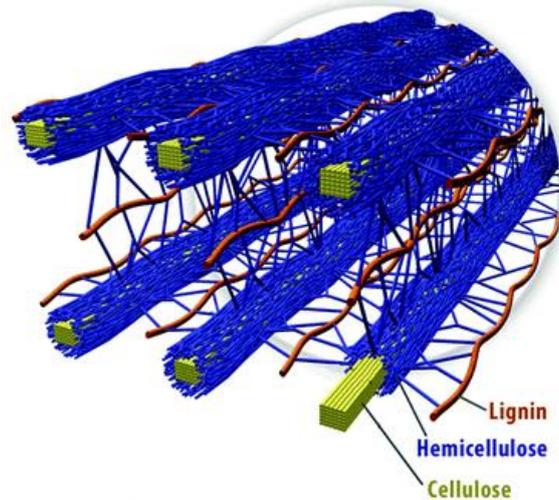


Abbildung 2-4: Cellulose, Hemicellulose und Lignin in den Zellwänden von Pflanzen.⁴⁰

Cellulose ist der Hauptbestandteil der Lignocellulose. Es ist ein lineares, unverzweigtes Polysaccharid, das aus über $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpfte D-Glucose-Einheiten besteht. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Hemicellulose um Heteropolysaccharide aus verschiedenen Derivaten der Furanosen oder Pyranosen.⁴¹

Lignin ist ein phenolisches Makromolekül mit einer komplexen dreidimensional vernetzten Struktur aus Phenylpropaneinheiten (C_6-C_3). Es ist das am häufigsten vorkommende aromatische Biopolymer der Erde, von der Biosphäre werden ca. 150 Mrd. t Lignin pro Jahr synthetisiert.⁴² Lignin trägt zur Festigkeit der Zellwände bei und macht diese resistent gegen Stauchung, Einschlag und Biegung.⁴³ Daneben spielt es auch eine Rolle bei der Flüssigkeitsregulierung der Pflanzen, erlaubt den Wassertransport über vertikale Distanzen sogar in hohen Bäumen⁴⁴ und schützt vor biochemischem Stress durch die Hemmung von enzymatischen Abbauprozessen anderer Komponenten⁴⁵. Weitere Aufgaben des Lignins umfassen den Schutz vor UV-Licht dank seines aromatischen Charakters sowie gegen mechanisches Eindringen von Schädlingen.⁴⁶

2.2.1 Struktur und Arten von Ligninen

Lignin ist ein heterogenes Polymer, das sich hauptsächlich aus drei aromatischen alkoholischen Vorstufen, den sogenannten Monolignolen, zusammensetzt, die sich nur durch unterschiedliche Substitutionsmuster der Methoxygruppen am aromatischen Ring voneinander unterscheiden. Aus *p*-Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol werden während des Lignifizierungsprozesses über radikalische Kupplungsreaktionen die phenolischen Substrukturen *p*-Hydroxyphenyl, Guajakol und Syringol gebildet (Abbildung 2-5).⁴⁷ Daneben gibt es noch eine weitere Reihe phenolischer Verbindungen, die bei der Ligninsynthese je nach Pflanzenart eine

2. Stand der Forschung

Rolle spielen können und selbst heute, nach mehreren Jahrzehnten der Ligninforschung, werden immer noch neue Strukturmerkmale gefunden und aufgeklärt.⁴⁸

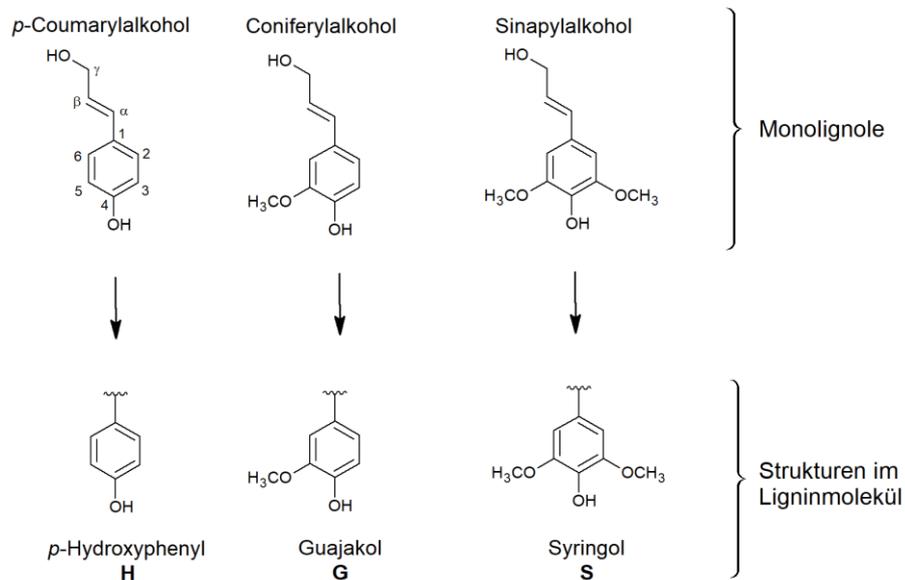


Abbildung 2-5: Die Monolignole *p*-Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol formen die spezifischen Substrukturen *p*-Hydroxyphenyl (H), Guajakol (G) und Syringol (S) im Lignin.⁴⁷

In welchem Verhältnis die Monolignole im Lignin vorliegen, hängt unter anderem von der Pflanzengattung ab: Weichholz-Lignine (Nadelhölzer) bestehen hauptsächlich aus G-Einheiten, Hartholz-Lignine (Laubbäume) aus G- und S-Einheiten, während Gräser und krautige Pflanzen aus allen drei Monolignolen aufgebaut sind.⁴⁹ Vom Monolignolverhältnis hängt auch die Verknüpfung der Untereinheiten ab. Im Allgemeinen lassen sich die Bindungstypen in drei Klassen einteilen: Etherbindungen (C-O-C) (Abbildung 2-6), Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (C-C) (Abbildung 2-7) und komplexere Strukturen mit mehreren Untereinheiten und Bindungstypen (Abbildung 2-8). Besitzt das Lignin beispielsweise Methoxy-substituierte *ortho*-Positionen, kann es nicht an der Bildung von 5-5', β -5' oder 4-O-5-Bindungen teilnehmen, weswegen Lignine mit einem hohen Anteil an S-Einheiten einen geringeren Anteil dieser Bindungen besitzen als Lignine, die mehrheitlich aus G-Einheiten aufgebaut sind.³

Außerdem besitzen Lignine eine Vielzahl an funktionellen Gruppen, darunter aliphatische und aromatische Hydroxygruppen (-OH), verschiedene Ether (C-O-C) (insbesondere Methoxygruppen (-OCH₃)), Carbonyle (Ketone (-C=O) bzw. Aldehyde (-CHO)), Carboxyle (Säuren (-COOH) bzw. Ester (-C(=O)-O)) und C=C-Doppelbindungen, aber auch schwefelhaltige Thiole (-SH) je nach Extraktionsprozess.⁵⁰

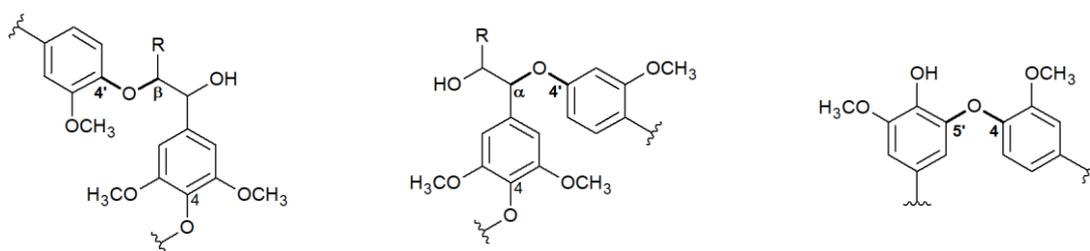


Abbildung 2-6: Etherbindungen (v. l. n. r.): β -Aryl-Ether (β -O-4'), α -Aryl-Ether (α -O-4'), Biphenyl-Ether (4-O-5').⁴⁷

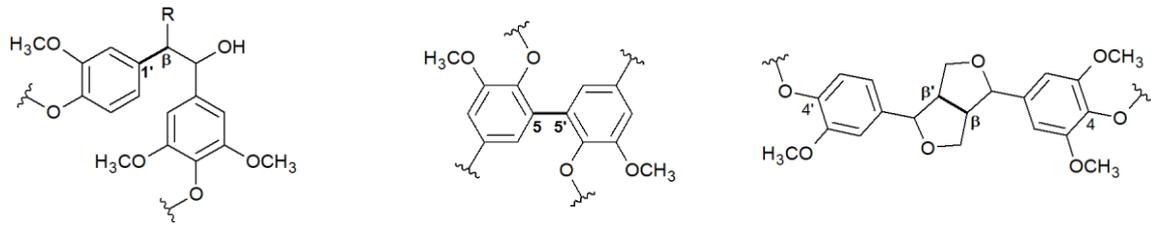


Abbildung 2-7: Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (v. l. n. r.): 1,2-Diarylpropan (β -1'), Biphenyl (5-5'), Resinol (β - β').⁴⁷

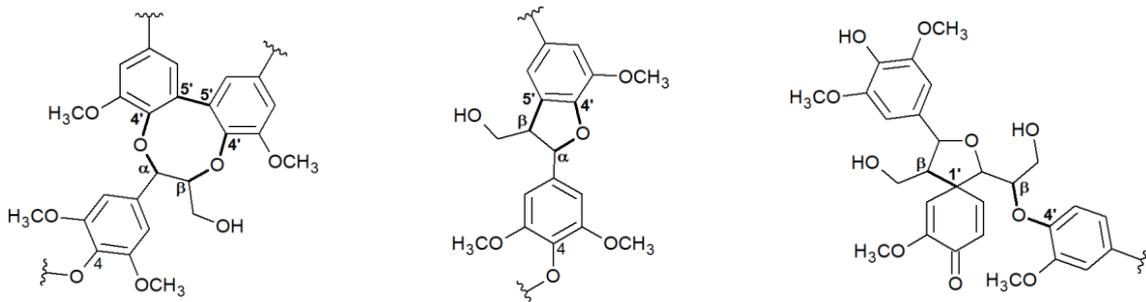


Abbildung 2-8: Komplexere Strukturen (v. l. n. r.): Dibenzodioxocin (α -O-4'/ β -O-4'/5-5'), Phenylcoumaran (α -O-4'/ β -5'), Spirodienon (β -1'/ β -O-4').⁴⁷

Das meiste Lignin fällt als Nebenprodukt der Papierindustrie in Form von Kraft-Lignin (KL) oder Lignosulfonaten an. Im Kraft- oder Sulfatprozess werden Holzschnitzel in einer stark alkalischen Lösung aus Natriumhydroxid (NaOH) und Natriumsulfid (Na₂S) bei erhöhter Temperatur (ca. 170 °C) unter Druck gekocht, um Lignin und die Hemicellulosen in der Schwarzlauge zu lösen und eine möglichst reine Cellulosefraktion zu erhalten.⁵¹ Das KL kann anschließend durch die Zugabe von z.B. Salz- oder Schwefelsäure aus der Schwarzlauge gefällt werden. Beim Sulfitprozess wird das Holz in wässrigem Schwefeldioxid (HSO₃⁻, SO₃²⁻) und einer Base (Na⁺, K⁺, NH₄⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) bei 130 – 160 °C aufgeschlossen. Aufgrund des sauren Milieus werden hauptsächlich Alkyl-Aryl-Etherbindungen gespalten und es kommt zur Sulfonierung des α -Kohlenstoffs.⁵² Die Lignosulfonate können anschließend ebenfalls aus der Schwarzlauge extrahiert werden: sie sind wasserlöslich, besitzen einen hohen Anteil an Verunreinigungen wie Schwefel und Zucker (bis zu 30 %) und ein hohes Molekulargewicht.⁵³ Insgesamt beträgt die Menge an Lignin, die bei der Zellstoffherstellung extrahiert wird ca. 70 Mio. t pro Jahr, wovon jedoch weniger als 2 % aufbereitet und stofflich genutzt werden.⁵⁴ Der Großteil wird verbrannt, um anorganische Chemikalien rückzugewinnen und die Fabrik mit Energie zu versorgen.

Eine weitere Methode zur Ligningewinnung ist der Organosolv-Prozess, bei dem das Lignin nur geringen Modifikationen unterzogen wird.⁵⁵ Meist werden wässrige organische Lösemittel (Ethanol (EtOH), Methanol, Aceton, Polyole, organische Säuren oder cyclische Ether) verwendet, um das Organosolv-Lignin (OSL) aus der Biomasse zu extrahieren.⁵⁶ Als Katalysatoren können sowohl Säuren als auch Basen zum Einsatz kommen. OSL besitzt ein geringeres Molekulargewicht im Vergleich zum KL oder den Lignosulfonaten und ist schwefelfrei, weswegen diese hohe Reinheit es ideal für den direkten Gebrauch macht.³ Es zeigt eine hohe Löslichkeit in organischen Lösemitteln und ist praktisch unlöslich in Wasser, da es sehr hydrophob ist. Dennoch führen die Hydrophobie und das geringe Molekulargewicht in Kombination mit den höheren Kosten der Lösemittel für den Aufschluss dazu, dass der Prozess insgesamt unattraktiver für die Industrie ist und auch der produzierte Zellstoff ist von schlechterer Qualität als beim Kraft-Prozess.^{45, 57} Die bisher existierenden Organosolv-basierten Bioraffinerien befin-

2. Stand der Forschung

den sich zum größten Teil noch in der Pilotphase und nur wenige arbeiteten bereits im industriellen Maßstab.⁵⁶

Neben dem Sulfat, Sulfit- und Organosolvprozess existiert noch eine Vielzahl weiterer Aufschlussverfahren zur Ligningewinnung, darunter der Soda-Aufschluss, die Behandlung der Biomasse mit ionischen Flüssigkeiten, das Dampfexplosionsverfahren, die Isolierung von *milled wood lignin* (MWL) sowie verschiedene biologische und enzymatische Verfahren. Diese sind in der Literatur gut beschrieben^{53, 58} und werden hier nicht im Detail erläutert, da sie technisch weniger relevant sind und keinen direkten Bezug zu den hier untersuchten Proben haben.

In dieser Arbeit wird der Organosolv-Aufschluss zur Ligningewinnung aus verschiedenen Low-Input-Pflanzen genutzt. Im Gegensatz zu anderen Extraktionsprozessen aus Dioxan⁵⁹ oder ionische Flüssigkeiten⁶⁰, wird dabei umweltfreundliches wässriges EtOH als Lösemittel genutzt. In der Literatur sind OSL aus *Miscanthus* bereits gut beschrieben: untersucht wurden z.B. der Einfluss von Lösemittel und Reaktionszeit auf die Ligninausbeute und -struktur^{61, 62}, der Einfluss der Prozessstärke und Vorbehandlungen auf die Struktur von EtOH-OSL^{63, 64} bzw. auf die antioxidativen Eigenschaften des Lignins^{65, 66}, aber auch der Einfluss verschiedener *Miscanthus*-Genotypen, des Erntezeitpunktes der Pflanzen und der verwendeten Pflanzenteile (Stamm vs. Blätter)^{67, 68}. Im Gegensatz dazu sind Studien zur Ligninextraktion aus *Paulownia* rar, untersucht wurde z.B. MWL aus *Paulownia fortunei*⁶⁹, die Autohydrolyse (AH) mit anschließender Soda-Anthrachinon-Delignifizierung⁷⁰, der Einfluss einer Heißwasser-Extraktion von *Paulownia* auf die Delignifizierung mittels Aceton-Wasser³² und die Formosolv-Vorbehandlung zur Fraktionierung von *Paulownia* in der Bioraffinerie⁷¹. Studien zum EtOH-Organosolv-Aufschluss von *Paulownia* beschränken sich bisher auf die Untersuchung des Zellstoffs, die Charakterisierung des Lignins fehlt.³⁵ Daten zur Silphie beschränken sich auf die Pflanzenzusammensetzung²⁹ und Monolignolanteile (G, H, S) der Biomasse⁷², aber nicht der isolierten Lignine.

Neben dem Aufschlussprozess selbst kann auch die Vorbehandlung der Biomasse einen Einfluss auf die spätere Ligninstruktur haben. Eine der meistgenutzten Vorbehandlungen ist die AH der Biomasse vor dem Organosolv-Aufschluss.⁷³ Dabei wird die Biomasse mit Wasser und optional einem Katalysator gemischt und unter Druck in heißem Wasser gekocht, wodurch es zu einer Hydrolyse der Acetylgruppen der Hemicellulosen kommt. Durch die Spaltung der Zucker in einem ersten Schritt werden die anschließende Delignifizierung vereinfacht und eine höhere Ligninausbeute erzielt, aber auch der Zugang zur Cellulosefraktion verbessert. Allerdings kommt es dadurch auch zur Freisetzung von kleinen Mengen an Essigsäure, was den pH-Wert senkt, und weitere autokatalytische Reaktionen begünstigen kann.⁷⁴

Die Extraktion von Lignin ist daher auch immer direkt mit Modifikationen der ursprünglichen Struktur verbunden, die während des Aufschlussprozesses oder während der möglichen Vorbehandlung der Biomasse auftreten können, sodass sich das isolierte Lignin vom nativen Lignin *in planta* unterscheidet. Bei der Isolierung werden Bindungen innerhalb des Ligninmoleküls, insbesondere die Etherbindungen, gespalten, was z.B. zu einer Änderung des Molekulargewichtes oder dem Anteil an phenolischen Gruppen führt.^{46, 75} Daneben ist das Ligninpolymer in Pflanzen kovalent mit Polysacchariden, meist Hemicellulosen, vernetzt. Beim Aufschlussprozess werden diese Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe gespalten.^{76, 77} Jedes Lignin hat daher seine einmaligen chemischen Eigenschaften, die hauptsächlich durch die Quelle der Biomasse und den genauen Biosyntheseweg⁷⁸ sowie die Isolations- bzw. Fraktionierungsme-

thode, die stark an die Ausbeute bzw. Reinheit des isolierten Lignins geknüpft ist⁷⁹, bestimmt werden. Obwohl die Struktur seit Jahrzehnten untersucht wird, bleiben einige strukturelle Details weiterhin unaufgeklärt.^{48, 80, 81}

2.2.2 Analytische Methoden zur Strukturaufklärung von Ligninen

Aufgrund der Heterogenität der Ligninstruktur, die abhängig von vielen verschiedenen Faktoren ist, kommt der Charakterisierung der isolierten Lignine eine zentrale Bedeutung zu. Wichtige Parameter sind der Ligningehalt bzw. die Reinheit, die Monomierzusammensetzung, Bindungstypen und funktionelle Gruppen wie Hydroxy- oder Methoxygruppen, sowie die Molekulargewichtsverteilung inklusive Massenmittel der Molmassen (M_w), Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und Polydispersitätsindex (PDI). Diese Eigenschaften können mit verschiedenen Analysemethoden untersucht werden, wie von Lupoi *et al.* in einem übersichtlichen Review zusammengefasst wurde.⁸² Hier soll deshalb nur auf die gängigsten Techniken zur Strukturaufklärung der Lignin eingegangen werden, mit einem Fokus auf den in dieser Arbeit verwendeten Methoden.

Um das Monolignolverhältnis von Lignin zu bestimmen, kann z.B. die Säurehydrolyse mit anschließender Flüssigchromatographie verwendet werden, die allerdings eine zeitaufwändige nasschemische Probenvorbereitung beinhaltet. Eine weitere Möglichkeit ist die Pyrolyse-Gaschromatographie/Massenspektrometrie (Py-GC/MS), bei der die entstehenden Fragmente jedoch nicht immer eindeutig einer bestimmten Substruktur des Lignins zugeordnet werden können. Aufgrund dieser Nachteile wird meist auf spektroskopische Methoden wie die Fourier-Transform-Infrarot- (FTIR) Spektroskopie oder die Kernspinresonanz- (NMR, *nuclear magnetic resonance*) Spektroskopie zurückgegriffen. Die FTIR-Spektroskopie wird hauptsächlich genutzt, um verschiedene funktionelle Gruppen im Lignin zu identifizieren. Da bestimmte Schwingungen aber auch einem spezifischen Monolignol zugeordnet werden können, lässt sich das S/G-Verhältnis semiquantitativ über die relativen Intensitäten dieser Banden bestimmen.⁸³ Deutlich häufiger wird das S/G Verhältnis mithilfe der $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ HSQC (*heteronuclear single-quantum coherence*) NMR bestimmt: die Zuordnung der Crosspeaks ist in der Regel eindeutig, außerdem können neben den Monolignolen auch die verschiedenen Bindungstypen analysiert werden.⁷⁷ Dennoch sollten auch die Ergebnisse der quantitativen 2D NMR mit einer gewissen Vorsicht betrachtet werden: auch wenn die HSQC NMR eine gute Auflösung der verschiedenen Strukturelemente im Lignin in einzelne Signale erlaubt, besteht nur ein semiquantitativer Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der Anzahl an funktionellen Gruppen in der Probe.^{84, 85}

Die Art und Anzahl der funktionellen Gruppen kann mithilfe nasschemischer Methoden bestimmt werden, beispielsweise über den Folin-Ciocalteu- (FC) Assay zur Ermittlung des Gesamtphenolgehaltes (TPC, *total phenol content*)⁸⁶ oder eine potentiometrische Titration mit Tetrabutylammoniumhydroxid für die phenolischen Hydroxy- sowie Carboxygruppen⁷⁴. Auch hier wird jedoch in den meisten Fällen auf spektroskopische Methoden, insbesondere die ^1H - oder ^{31}P -NMR zurückgegriffen.⁸⁷

Die Molekulargewichtsverteilung von Ligninen wird üblicherweise mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) bestimmt. Trotzdem sind die Ergebnisse in den meisten Fällen nicht direkt vergleichbar, da viele Faktoren einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Dazu gehören u. a. die verwendete Säule, das Lösemittel (NaOH, Dimethylsulfoxid (DMSO), Tetrahydrofuran

2. Stand der Forschung

(THF)) und der Detektor (ultraviolett (UV), Refraktionsindex (RI)), Lichtstreuung), aber auch ob eine vorherige Acetylierung der Lignine zur Steigerung der Löslichkeit in unpolaren Lösemitteln stattgefunden hat.^{88, 89} Außerdem sind keine Lignin-Standards zur Kalibrierung verfügbar, sodass in der Regel gegen Polystyrol oder Polymethylmethacrylat (PMMA) gemessen wird, was lediglich zu relativen Ergebnissen statt absoluten Molekulargewichten führt.⁹⁰ Neben der zeitaufwändigen Chromatographie gibt es zudem einen ersten Ansatz von Burger *et al.* zur Korrelation des Molekulargewichtes von Ligninen mit simpler ¹H-NMR in Kombination mit multivariater Datenanalyse.⁹¹

Insgesamt ist das Potential konventioneller univariater Methoden (z.B. FTIR, NMR) zur Strukturaufklärung von komplexen 3D-Molekülen wie dem Lignin aufgrund der starken Überlappung der spektralen Banden stark limitiert. Abhilfe schaffen können chemometrische Methoden, die ein vielseitiges und effizientes Tool zur Datenverarbeitung, -analyse und -interpretation darstellen, insbesondere um natürliche Stoffe wie LCF oder Lignine zu klassifizieren.^{92, 93} Meistens werden dabei FTIR und (HSQC) NMR mit multivariater Datenanalyse kombiniert, um Lignine anhand ihres botanischen Ursprungs zu klassifizieren und/oder Struktur-Eigenschafts-Beziehungen zu entwickeln, z.B. zwischen dem aliphatischen und aromatischen Hydroxygehalt, der Monomerzusammensetzung oder den antioxidativen Eigenschaften⁹⁴, die essenziell für die zukünftige Anwendung der Lignine sind.

2.2.3 Lignin als Antioxidans

Antioxidantien sind klassischerweise als Substanzen definiert, die in der Lage sind, unerwünschte Oxidationsreaktionen zu verhindern oder zu verzögern, indem sie freie Radikale abfangen, Wasserstoffatome abgeben, Metallionen per Chelatkomplex binden und/oder radikalische Kettenreaktionen abbrechen.⁹⁵ Aus diesem Grund spielen sie eine wichtige Rolle bei der menschlichen Gesundheit und können Krankheiten, die auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, wie Bluthochdruck, neurodegenerative Erkrankungen oder Krebs, positiv beeinflussen oder gar verhindern.⁹⁶ Die Untersuchung der antioxidativen Eigenschaften einer Substanz ist sehr komplex, da es keine einzelne Methode gibt, die in der Lage ist, alle natürlichen Reaktionen, die *in vivo* ablaufen, vollständig abzubilden.⁹⁷ Es gibt zahlreiche Faktoren, die die Wirksamkeit eines Antioxidans beeinflussen, die wichtigsten sind seine 3D-Struktur, die Konzentration und intrinsische Reaktivität des Antioxidans gegenüber freien Radikalen oder anderen reaktiven Sauerstoffspezies, sowie die Anzahl an Radikalen, die pro Antioxidans-Molekül neutralisiert werden kann. Daneben üben auch die Temperatur und Kinetik der beteiligten Redoxreaktionen einen Einfluss auf die Potenz des Antioxidans aus. All diese Faktoren müssen berücksichtigt werden, wenn ein geeignetes Antioxidans für eine spezielle Anwendung gesucht wird.^{98, 99} Abhängig von der Auswertemethode des jeweiligen Assays kann zwischen der antioxidativen Aktivität als Reaktionsgeschwindigkeit der chemischen Oxidation (Reaktionskinetik) und der antioxidativen Kapazität als Umwandlungseffizienz (Stöchiometrie der Reaktion) unterschieden werden.^{96, 100}

Einsatz finden Antioxidantien z.B. als Konservierungsstoffe in verschiedenen Produkten wie Fetten, Ölen oder Seifen, um deren Haltbarkeit zu verlängern, sowie in Gummi oder anderen Polymeren, um die Alterung der Materialien zu verzögern.¹⁰¹ In Lebensmitteln können sie zudem den Verlust der Farbe, des Geschmacks bzw. des Vitamingehaltes verhindern.¹⁰² Antioxidative Polymere wie das Lignin bieten dabei ein neues Feld von großem Interesse für Forscher

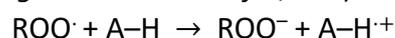
in vielen Industriebereichen und der Landwirtschaft. Aufgrund seiner vernetzten 3D-Struktur und der Widerstandsfähigkeit gegen enzymatische Abbaureaktionen besitzt Lignin eine höhere thermische und biologische Beständigkeit als niedermolekulare Antioxidantien und kann so in Bereichen angewandt werden, in denen der Einsatz kleinerer Moleküle ineffizient wäre aufgrund ihrer höheren Diffusionsraten.¹⁰³ Zudem sind manche kommerzielle Antioxidantien wie Butylhydroxytoluen oder Butylhydroxyanisol selbst in kleinen Konzentrationen cytotoxisch und/oder karzinogen, wie bereits in *in vivo*-Studien untersucht wurde.^{5, 104} Azadfar *et al.* konnten zeigen, dass Lignin das Potential hat, als Ausgangsstoff für Antioxidantien wie Guajakol oder 4-Vinylguajakol zu dienen, deren antioxidative Aktivität vergleichbar mit der kommerzieller Antioxidantien ist.¹⁰⁵

Mit wenigen Ausnahmen, wie den Carotinoiden, handelt es sich bei den meisten Antioxidantien um Phenole bzw. Phenol-Derivate.¹⁰⁶ Natürliche Polyphenole wie Lignin, das häufigste in der Natur vorkommende Polyphenol, finden sich hauptsächlich in Pflanzen und besitzen mehrere Hydroxygruppen in ihrer aromatischen Struktur.¹⁰⁷ Aufgrund der Notwendigkeit fossilbasierte Ressourcen zu substituieren, gewinnen solch natürliche Antioxidantien heutzutage eine immer größer werdende Aufmerksamkeit.⁸⁶ Die antioxidative Eigenschaft des Lignins lässt sich vor allem mit den vielen phenolischen Hydroxygruppen erklären, deren Anzahl während des Delignifizierungsprozesses durch die Spaltung der Etherbindungen noch einmal gesteigert wird.¹⁰⁸ Wegen der strukturellen Komplexität des Lignins ist es allerdings schwierig, die antioxidativen Eigenschaften spezifischen Strukturen zuzuordnen, im Gegensatz zu chemisch definierten Polyphenolen wie Tanninen oder Flavonoiden.¹⁰⁹ Studien an Lignin-Modellverbindungen geben jedoch Hinweise darauf, dass Methoxygruppen in *ortho*-Position der phenolischen Hydroxygruppe sowie nicht substituierte Alkylgruppen die antioxidative Kapazität positiv beeinflussen können.¹⁰⁸ Einen negativen Einfluss haben dagegen konjugierte Carbonylgruppen¹⁰⁹, ein hoher Sauerstoffgehalt in der Seitenkette des Lignins¹¹⁰ und ein hohes Molekulargewicht sowie eine hohe Polydispersität¹¹¹. Außerdem kann die antioxidative Aktivität durch das Vorhandensein von polaren Molekülen wie z.B. Polysacchariden herabgesetzt werden, indem diese mit den freien phenolischen Hydroxygruppen des Lignins über Wasserstoffbrücken wechselwirken.¹¹² Insgesamt ist die Wirkung des Lignins und somit seine Anwendung als Antioxidans also von verschiedenen Faktoren abhängig. Zur Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften existiert eine Vielzahl unterschiedlicher Assays, auf die im folgenden Kapitel 2.2.4 genauer eingegangen wird.

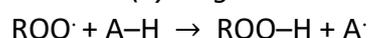
2.2.4 Assays zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften

Um antioxidative Assays zu klassifizieren, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Eine davon basiert auf dem Mechanismus der zugrundeliegenden Reaktion, der grob in zwei Kategorien aufgeteilt werden kann¹⁰¹:

- (i) Ein-Elektronentransfer (*single electron transfer*, SET):



- (ii) Wasserstoff- bzw. Protonentransfer (*hydrogen atom transfer*, HAT):



Meist läuft ein Assay jedoch nicht nur nach einem der beiden Mechanismen ab, sondern es finden, abhängig von den Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Konzentra-

2. Stand der Forschung

tion der Reaktanden, komplexere Reaktionen statt. Beispiele hierfür sind der gemischte HAT/SET, der schrittweise SET/HAT, der gemeinsame SET/HAT oder der sequenzielle Protonenverlust–Elektronentransfer.¹¹³

Eine andere Möglichkeit der Klassifizierung erfolgt anhand der Reaktionsmethodik⁹⁸:

- (i) Assays auf zellulärer Ebene (*in vivo*)
- (ii) Assays auf chemischer Basis (*in vitro*), z.B. durch:
 - das Abfangen freier Radikale (2,2-Diphenyl-1-pikryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS))
 - die Reduktion von Metallionen (*ferric ion reducing antioxidant potential* (FRAP), *cupric ion reducing antioxidant capacity* (CUPRAC), Folin-Ciocalteu (FC))
 - kompetitive Methoden (*oxygen radical absorbance capacity* (ORAC), *total reactive antioxidant potential* (TRAP))

In der Literatur findet sich eine Vielzahl an Artikeln, die sich mit den Vor- und Nachteilen der Assays auseinandersetzt^{99, 114}, die jeweilige Reaktionskinetik diskutiert^{101, 115–118}, *in vitro*- und *in vivo*-Methoden gegenüberstellt^{98, 119} oder die Anwendungen von Antioxidantien, z.B. in Lebensmitteln¹²⁰ oder Verpackungen¹²¹ betrachtet. Auch zum Einsatz von Lignin als Antioxidans^{86, 104} finden sich verschiedene Übersichtsarbeiten, sowie zur Nutzung von Ligninen in der Biomedizin⁵, darunter im Tissue-Engineering¹²².

Aus diesem Grund werden im Folgenden nur die vier in dieser Arbeit genutzten Assays im Detail vorgestellt: der DPPH-, ABTS-, FRAP- und FC-Assay sind in Tabelle 2-1 genauer spezifiziert. Die Auswahl der Assays erfolgte aufgrund ihrer Anwendungshäufigkeit bei der Lignincharakterisierung. Alle vier sind einfache Methoden, die einen hohen Durchsatz erlauben und kein spezielles Equipment benötigen. Die Messung erfolgt nach einer festgelegten Reaktionszeit zwischen 12 – 30 Minuten, wobei die Reaktivität stark vom Probenotyp abhängt.

Tabelle 2-1: Vergleich der in dieser Studie genutzten Antioxidanz-Assays.¹²³

	DPPH	ABTS	FRAP	FC
Prinzip der Methode	Reaktion mit einem organischen Radikal	Reaktion mit einem organischen Radikalkation	Reaktion mit einem Fe ³⁺ -Komplex	Reaktion mit einem Mo ⁶⁺ -Komplex
Reaktionsmechanismus	HAT & SET	HAT & SET	SET	SET
Endproduktbestimmung	Kolorimetrie (Entfärbung) bei 518 nm	Kolorimetrie (Entfärbung) bei 734 nm	Kolorimetrie (Farbentwicklung) bei 593 nm	Kolorimetrie (Farbentwicklung) bei 750 nm
pH-Bereich	5 – 9	3 – 9	3,6	≈ 10
Polarität der Antioxidantien	hydrophob (nur in organischen Lösemitteln)	hydrophil & lipophil	hydrophil (nur in wässriger Lösung)	hydrophil

Die mit Abstand am häufigsten genutzten Assays zur Untersuchung von Ligninen sind der DPPH- und der ABTS-Assay.¹²³ Beide sind nach dem jeweiligen Radikal benannt, welches genutzt wird, um die antioxidative Kapazität zu bestimmen (Abbildung 2-9). Da es sich bei beiden um artifizielle und nicht-physiologisch relevante Radikale handelt, können nur direkte Reaktionen des Radikals mit dem zu untersuchenden Antioxidans gemessen werden.¹¹⁴ Eine weitere Gemeinsamkeit beider Assays ist, dass sie sich nicht eindeutig dem SET- oder HAT-

Mechanismus zuordnen lassen, sondern auf einem komplexeren Reaktionsmechanismus beruhen, bei dem beide Mechanismen in unterschiedlichen Anteilen ablaufen, abhängig von der Konzentration und Struktur der Probe, des Lösemittels und des pH-Wertes. Im Allgemeinen erfolgt der Elektronentransfer sehr schnell, während der Protonentransfer vergleichbar langsam abläuft. Dieser initiale Elektronentransfer ist aufgrund der sterischen Hinderung des DPPH-Radikals, das nur schwer zugänglich für Phenole ist, beim ABTS-Assay viel schneller.¹²⁴

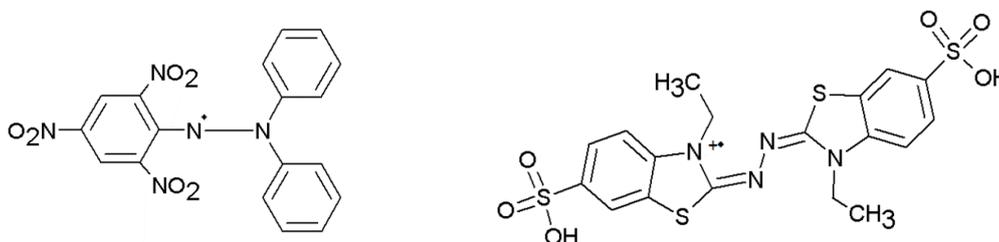


Abbildung 2-9: Strukturformeln des DPPH-Radikals (links) sowie des ABTS-Radikalkations (rechts).

Ein Vorteil des DPPH-Assays ist, dass es sich beim DPPH um ein freies stabiles Radikal handelt, das nicht erst erzeugt werden muss. Es besitzt eine intensive violette Färbung mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 513 – 528 nm. Reagiert es mit einem Antioxidans, nimmt es eine blassgelbe Farbe an, sodass die Reaktion photometrisch beobachtet werden kann.¹²⁵ Allerdings ist das DPPH-Radikal gegenüber der Reaktionsumgebung sehr empfindlich, was dazu führt, dass sich die Absorption auch aufgrund von z.B. der Temperatur oder den Lichtverhältnissen ändern kann.¹²⁴ Daher sollte stets auf einheitliche Messbedingungen geachtet werden, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Zur Auswertung des Assays lässt sich aus der Abnahme der Absorption zum einen die Inhibition des DPPH-Radikals in % bestimmen, sowie als Gegenstück dazu die Aktivität als Radikalfänger (*radical scavenging activity, RSA*) in % berechnen. Eine andere Möglichkeit ist die Berechnung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50} , *half maximal inhibitory concentration*), die definiert ist als die Konzentration eines Antioxidans, die benötigt wird, um die ursprüngliche Radikal-Konzentration um 50 % zu reduzieren.⁹⁹ Da hierbei für jede untersuchte Probe eine eigene Konzentrationsreihe vermessen werden muss, ist dieses Vorgehen sehr zeitaufwendig. Einfacher ist die Messung einer Konzentrationsreihe mit Trolox, einem Vitamin E-Derivat, als Standard, anhand derer die *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) bestimmt werden kann.

Im Gegensatz zum DPPH-Radikal muss das ABTS-Radikalkation vor Beginn des Assays jeweils frisch erzeugt werden. Die meistgenutzte Methode zur Herstellung des $ABTS^{+}$ ist die Reaktion von ABTS mit Ammonium- oder Kaliumperoxodisulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$ oder $K_2S_2O_8$). Die Oxidation dauert ca. 12 – 16 h, anschließend wird die Lösung auf eine Absorption von ca. 0,70 bei 734 nm verdünnt.¹¹⁴ Die $ABTS^{+}$ -Lösung besitzt eine dunkelgrüne Färbung, die nach der Reaktion mit einem Antioxidans abnimmt, sodass auch hier eine photometrische Bestimmung möglich ist und aus der Absorptionsdifferenz die antioxidative Kapazität berechnet werden kann, analog zum DPPH-Assay. Da die Ergebnisse häufig als TEAC angegeben werden, ist in der Literatur die Bezeichnung als TEAC-Assay etabliert¹²⁶, wird hier jedoch nicht verwendet, da auch der DPPH- oder FRAP-Assay nach dieser Methode ausgewertet werden können. Vorteile des ABTS-Assays sind seine geringe Anfälligkeit für Interferenzen von gefärbten Proben aufgrund der hohen Messwellenlänge, eine höhere Reaktivität und Sensitivität verglichen mit dem DPPH-Radikal, sowie die Anwendung in organischen und wässrigen Lösemitteln in einem weiten pH-Bereich.^{127, 128}

2. Stand der Forschung

Die anderen beiden verwendeten Assays sind der FRAP- und der FC-Assay, basierend auf dem SET-Mechanismus. Beide sind simple, schnelle und günstige Methoden mit einer guten Reproduzierbarkeit.⁹⁹ Beim FRAP-Assay werden Eisen-III-Ionen (Fe^{3+}) in Gegenwart eines Antioxidans zu Eisen-II-Ionen (Fe^{2+}) reduziert. Das FRAP-Reagenz muss dabei arbeitstäglich frisch angesetzt werden und besteht aus 2,4,6-Tri(2-Pyridyl)-1,3,5-Triazin (TPTZ), Eisen-(III)-chlorid und einem Acetatpuffer. Der entstehende Fe^{3+} -TPTZ-Komplex (Abbildung 2-10) hat eine blassgelbe Farbe, die bei der Reduktion zu Fe^{2+} -TPTZ in blau umschlägt, was anhand der zunehmenden Absorption bei 593 nm photometrisch gemessen werden kann.¹¹⁶ Die Ergebnisse des FRAP-Assays werden typischerweise als Fe^{2+} -Äquivalente angegeben, indem eine Eisensulfat-Lösung (FeSO_4) als Standard vermessen wird. Zur besseren Vergleichbarkeit mit dem DPPH- und ABTS-Assay kann die Auswertung auch hier als TEAC-Wert erfolgen. Vorteile des FRAP-Assays sind eine hohe Sensitivität und Präzision sowie eine gute Robustheit. Zudem ist das Reagenz relativ stabil und besitzt eine geringe Toxizität. Nachteilig ist, dass nur in wässriger Lösung bei geringem pH-Wert, also bei nicht physiologischen Messbedingungen, gearbeitet werden kann.¹²⁹

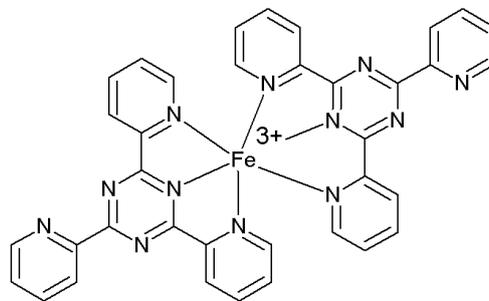


Abbildung 2-10: Fe^{3+} -TPTZ-Komplex.

Der FC-Assay wurde ursprünglich für die Bestimmung von Tyrosin in Proteinen entwickelt¹³⁰, wird allerdings seit Jahren genutzt, um den TPC einer Probe zu bestimmen. Da der grundlegende Mechanismus eine Redoxreaktion ist und nicht nur Phenole, sondern alle oxidierbaren Gruppen mit dem Reagenz reagieren, kann er jedoch auch als Methode zur Messung der Antioxidanz angesehen werden.¹¹⁵ Das verwendete Reagenz ist kommerziell erhältlich und besteht aus einer Mischung aus Wolframat- und Molybdatanionen, die in einer Mischung aus Phosphor- und Salzsäure gelöst sind.¹¹⁶ Bei der Reaktion mit einem Antioxidans im basischen Medium wird Mo^{6+} zu Mo^{5+} reduziert, wodurch es zu einem Farbumschlag von gelb zu blau kommt, der photometrisch in einem Wellenlängenbereich von 745 – 765 nm bestimmt werden kann.⁸⁶ Die Auswertung erfolgt meist über eine Kalibriergerade mit Gallussäure, sodass die Ergebnisse als Gallussäure-Äquivalente (GAE, *gallic acid equivalents*) angegeben oder in den TPC umgerechnet werden können. Da neben den Phenolen aber alle oxidierbaren Gruppen mit dem Reagenz reagieren, ist es eher eine Messung der Reduktionskapazität, die direkt mit dem Phenolgehalt und der antioxidativen Kapazität korreliert.¹¹⁴ Vorteile des FC-Assays sind das kommerziell erhältliche Reagenz und die hohe Messwellenlänge, wodurch Interferenzen mit farbigen Probenmatrices minimiert werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssen pH-Wert sowie Reaktionszeit und -temperatur für die Farbentwicklung korrekt eingehalten werden.^{99, 131}

Aufgrund spezifischer Vor- und Nachteile sowie unterschiedlicher Reaktionsmechanismen bzw. Messbedingungen kann jeder Assay für sich nur einen Teilaspekt der gesamten antioxidativen Kapazität einer Probe abbilden, was speziell für komplexe Proben wie 3D-Polymere

gilt, deren Antioxidanz von vielen verschiedenen Strukturmerkmalen abhängt, wie in Kapitel 2.2.3 erläutert wurde. Zwar gibt es Studien, die bis zu drei verschiedene Assays zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität genutzt haben^{132, 133}, sowie Reviews zur Untersuchung des Einflusses der Isolationsmethode und verschiedener Vor- oder Nachbehandlungen auf die antioxidativen Eigenschaften von Ligninen^{86, 104}, aber auch die Betrachtung der Ergebnisse mit geeigneten statistischen Methoden ist wichtig, um die Ergebnisse, die aus verschiedenen Assays gewonnen werden, synergetisch in einen angemessenen Kontext zu bringen. Um belastbare Aussagen darüber treffen zu können, inwieweit die vier Assays für die Charakterisierung von Ligninen geeignet sind, wurden Reproduzierbarkeit und Sensitivität mithilfe von Standardsubstanzen untersucht sowie die Korrelationen der antioxidativen Kapazitäten der Lignine zwischen den Assays betrachtet.¹²³ Auf Grundlage dieser Ergebnisse eignen sich alle vier Assays für die Ligninanalytik und werden zur Charakterisierung der in dieser Arbeit isolierten Lignine herangezogen.

II Materialien und Methoden

3. Verwendete Geräte und Chemikalien

Im Folgenden sind alle Geräte (Tabelle 3-1) und Chemikalien (Tabelle 3-2) aufgeführt, die für die selbst durchgeführten Analysen zur Anfertigung dieser Arbeit benötigt wurden. Details zu den extern durchgeführten Messungen finden sich in den jeweiligen Unterkapiteln in Kapitel 4.

Tabelle 3-1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller	Modell	Software
Analysenwaage	Sartorius	PRACTUM224-1S	-
FT-IR-Spektrometer	Jasco	FT/IR 410	Spectra Manager for Windows 95/NT (Version 1.53.05)
Gelpermeationschromatograph	PSS	SECcurity GPC System, Agilent 1260 Infinity	PSS WinGPC UniChrom® Messung: V 8.2.1 Auswertung: V 8.33
Gefriertrocknung	Christ	ALPHA 2-4 LDplus	-
Kugelmühle	Fritsch	Pulverisette 6	-
NMR-Spektrometer	Bruker	Avance III 600 MHz	TopSpin 4.2.0
Presse, hydraulisch	Graseby Specac	Atlas, 15T	-
Siebturm	Retsch	AS200 basic	-
Tischreaktor	Parr Instruments	4523HP Reaktor, 4848 Reaktor Regler	SpecView 2.5
Trockenschrank	Memmert	UF 110	-
UV-Vis-Spektrometer	Hach Lange	DR6000	-
Ultraschallbad	Bandelin	SONOREX	-
Zentrifuge	Hettich	Rotina 420	-

Tabelle 3-2: Verwendete Chemikalien.

Reagenz	Summenformel	CAS	Hersteller	Qualität	Gehalt
ABTS-Diammoniumsalz	$C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$	30931-67-0	Alfa Aesar	-	98 %
1,4-Dioxan	$C_4H_8O_2$	123-91-1	Roth	zur Analyse, ACS, ISO	≥ 99,5 %
DMSO	C_2H_6OS	67-68-5	VWR	zur Analyse	≥ 99,5 %
DMSO-d6, mit 0,03% (v/v) Tetramethylsilan	C_2D_6OS	2206-27-1	Eurisotop	für die NMR-Spektroskopie	99,80 %
DPPH, freies Radikal	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	1898-66-4	Alfa Aesar	-	95 %

3. Verwendete Geräte und Chemikalien

Eisen-(III)-chlorid Hexahydrat	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10025-77-1	Merck	zur Analyse, ACS, Reag. Ph. Eur.	$\leq 100 \%$
Eisessig	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	64-19-7	VWR	ACS, Reag. Ph. Eur.	99,8 – 100,5%
Ethanol absolut	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	64-17-5	VWR	technisch	$\geq 99,5 \%$
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	-	-	Merck	Gemisch	-
Gallussäure (wasserfrei)	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	149-91-7	Merck	zur Synthese	$\geq 98 \%$
Indulin AT (Lignin, alkalisch)	$\text{C}_{30}\text{H}_{25}\text{ClN}_6$	8068-05-1	S3-chemicals	-	-
Kaliumbromid	KBr	7758-02-3	Merck	zur Analyse	-
Kaliumperoxodisulfat	$\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$	7727-21-1	Merck	zur Analyse, ACS, Reag. Ph. Eur.	$\geq 99,0 \%$
Natriumacetat Trihydrat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	6131-90-4	VWR	AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur.	99,0 – 101,0 %
Natriumbenzol-sulfonat	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NaO}_3\text{S}$	515-42-4	Sigma Aldrich	-	97 %
Natriumcarbonat (wasserfrei)	Na_2CO_3	497-19-8	Roth	zur Analyse, ACS, wasserfrei	$\geq 99,5 \%$
Natriumhydroxid	NaOH	1310-73-2	Merck	zur Analyse, EMSURE® ISO	$\geq 99 \%$
Natriumpolystyrol-sulfonat	$[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3\text{NaS}]_n$	28210-41-5	PSS	Standards für GPC (891 Da - 976 kDa)	-
Salzsäure	HCl	7647-01-0	Roth	technisch	37 %
Schwarzlauge	-	-	Zellstoff- & Papierfabrik Rosenthal	-	-
TPTZ (2,4,6-Tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin)	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$	3682-35-7	Thermo Scientific	-	99 %
Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_4$	53188-07-1	Acros Organics	-	97 %

4. Experimentelle Arbeiten

4.1 Aufbereitung und Charakterisierung der Biomasse

Bei den in dieser Arbeit zur Ligningewinnung genutzten Rohstoffe handelt es sich um die drei Low-Input-Pflanzen *Miscanthus x giganteus*, *Paulownia tomentosa* und *Silphium perfoliatum*, die am Campus Klein-Altendorf (CKA; Außenlabore der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Bonn) angebaut, geerntet und vorab zerkleinert wurden, sowie um die von der LXP Group (Teltow) zur Verfügung gestellten und als Referenz genutzten Biomassen Buchenholz und Weizenstroh. Um den Einfluss verschiedener Partikelgrößen der Biomassen auf das isolierte Lignin zu untersuchen, wurden diese mithilfe eines Siebturms und Analysensieben in kleinere Fraktionen unterteilt. Wenn nötig, wurden die größeren Fraktionen in der Kugelmühle bei 330 rpm für je 10 min weiter zerkleinert. Die Biomassen inkl. der jeweiligen Aufbereitung durch CKA bzw. LXP und der Siebfraktionen, die für die Aufschlüsse genutzt wurden, sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Zur Ligninisolation verwendete Biomassen.

Biomasse	Art	Bereitgestellt durch	Aufbereitung durch CKA/LXP Group	Siebfraktionen für Aufschluss
<i>Miscanthus x giganteus</i>	Gras	CKA	Kollermühle* > 1,5 mm; < 0,25 mm	1,6 – 2 mm 0,5 – 1 mm < 0,25 mm
<i>Paulownia tomentosa</i>	Holz	CKA	Hammermühle* > 0,75 mm; < 0,25 mm	1,6 – 2 mm 0,5 – 1 mm < 0,25 mm
<i>Silphium perfoliatum</i>	Kraut	CKA	Schneidmühle* < 1 mm	0,5 – 1 mm
Buchenholz	Holz	LXP Group	< 4 mm	0,5 – 2 mm
Weizenstroh	Gras	LXP Group	< 2 mm	0,5 – 2 mm

* Die zur Zerkleinerung genutzten Mühlen variieren aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Biomassen.

4.1.1 Autohydrolyse

Für die Autohydrolyse (AH) wurde *Miscanthus* der Siebfraktion 0,5 – 1 mm verwendet. Dieser wurde im Tischreaktor mit dest. Wasser mit einem Feststoff-zu-Flüssigkeits-Verhältnis von 1:10 gemischt, auf die jeweilige Temperatur (120 °C; 150 °C; 180 °C) erhitzt, diese für 1 h gehalten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurde der *Miscanthus* vakuumfiltriert, getrocknet und als Ausgangsmaterial für die Organosolv-Aufschlüsse genutzt.

4.1.2 Chemische Zusammensetzung der Biomasse

Die Zusammensetzung der Biomassen wurde angelehnt an sogenannte *laboratory analytical procedures*, veröffentlicht vom *National Renewable Energy Laboratory* (NREL), analysiert. Im Detail wurde dabei nach den Vorschriften NREL/TP-510-42621 (*Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples*)¹³⁴, NREL/TP-510-42622 (*Determination of Ash in Biomass*)¹³⁵, und NREL/TP-510-42618 (*Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass*)¹³⁶ gearbeitet.

Die Analysen wurden extern von der LXP Group (Vergleich der unbehandelten Biomassen, siehe Kapitel 5.1) mithilfe eines HPLC–RI Systems (ABOA SugarSep-H(III) (8 x 300 mm) von AppliChrom) und dem Wood K Plus – Kompetenzzentrum Holz (Vergleich der autohydrolysierten und aufgeschlossenen Biomassen, siehe Kapitel 7.1) mit einer HPAEC–PAD (Dionex CarboPac PA1 (2 x 250 mm) von Thermo Scientific) durchgeführt.

4.2 Isolierung und strukturelle Charakterisierung der Lignine

4.2.1 Organosolv-Aufschluss

Der Organosolv-Aufschluss wurde in einem 970 mL Edelstahl-Rührreaktor der Firma Parr Instruments durchgeführt und über die Software *SpecView* gesteuert. Um statistisch belastbare Aussagen treffen zu können, wurden alle Aufschlüsse in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Eine Übersicht aller isolierten Lignine ist in Tabelle 4-2 gegeben.

Tabelle 4-2: Übersicht der isolierten Lignine inkl. Probenkürzel und Aufschlussbedingungen.

	Probenkürzel	Biomasse	Partikelgröße der Biomasse	Aufschluss
Einfluss der Biomasse (Kapitel 5)	ML2*	Miscanthus	0,5 – 1,0 mm	Standard
	SL	Silphie	0,5 – 1,0 mm	
	WL	Weizenstroh	0,5 – 2,0 mm	
	PL2*	Paulownia	0,5 – 1,0 mm	
	BL	Buchenholz	0,5 – 2,0 mm	
Einfluss der Partikelgröße der Biomasse (Kapitel 6)	ML1	Miscanthus	1,6 – 2,0 mm	Standard
	ML2*		0,5 – 1,0 mm	
	ML3		< 0,25 mm	
	PL1	Paulownia	1,6 – 2,0 mm	
	PL2*		0,5 – 1,0 mm	
	PL3		< 0,25 mm	
Einfluss des Aufschlussprozesses (Kapitel 7)	ML2*	Miscanthus	0,5 – 1,0 mm	Standard
	ML4			Aufschlussdauer: 180 min
	ML5			Aufschlussdauer: 180 min EtOH-Konzentration: 60 %
	MA120			Standard, nach AH 120 °C
	MA150			Standard, nach AH 150 °C
	MA180			Standard, nach AH 180 °C

* ML2 und PL2 sind mehrfach gelistet, da sie für mehrere Vergleiche herangezogen werden. Es handelt sich jeweils um dieselben Proben.

Um den Einfluss der Biomasse und den Einfluss der Partikelgröße auf das isolierte Lignin zu untersuchen, wurde der nachfolgende „Standardaufschluss“ durchgeführt und nicht variiert. Biomasse und wässriges Ethanol (EtOH, 80 % v+v) wurden mit einem Feststoff-zu-Flüssigkeits-Verhältnis von 1:8 gemischt, unter kontinuierlichem Rühren bei 700 rpm auf 170 °C erhitzt und bei dieser Temperatur für 90 min gehalten. Nach Abkühlung des Reaktors wurde das Gemisch vakuumfiltriert und fünf Mal mit je 50 mL EtOH (80% v+v) gewaschen. Um das Organosolv-Lignin (OSL) auszufällen, wurden Filtrat und Waschlösung mit der dreifachen Menge dest.

4. Experimentelle Arbeiten

Wasser versetzt und auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert (5 mL HCl (4 M) pro 1 L Suspension). Der sich absetzende Feststoff wurde durch Zentrifugation (3200 rpm) abgetrennt, drei weitere Male mit einer Lösung von 5 mL HCl (4 M) auf 1 L dest. Wasser gewaschen, bei -18°C eingefroren und für mind. 72 h gefriergetrocknet.

Um den Einfluss des Aufschlussprozesses zu untersuchen, wurde *Miscanthus* mit einer Partikelgröße von 0,5 – 1 mm verwendet. Das Vorgehen gleicht dem Standardaufschluss, allerdings wurden die Aufschlussdauer (M4) sowie zusätzlich die Lösemittelkonzentration (M5) variiert. Der Einfluss der vorherigen AH wurde untersucht, indem die bei den jeweiligen Temperaturen autohydrolysierten Biomassen nach dem Standardaufschluss aufgearbeitet werden (MA120, MA150, MA180).

Die erzielten Ausbeuten der Aufschlüsse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). Zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wird der Tukey-Test ($p < 0,05$) verwendet.

4.2.2 Fällung von Kraft-Lignin

Für die Fällung des KL wurden 500 g Schwarzlaug (Nadelholz, hauptsächlich Kiefer & Fichte) mit 1 L dest. Wasser verdünnt. Anschließend wurde unter Rühren so lange 20 % (w/w) HCl zugetropft, bis ein pH-Wert von 2 erreicht war. Danach wurde das Lignin abzentrifugiert, dreimal mit angesäuertem dest. Wasser (pH 2) gewaschen und für mind. 72 h gefriergetrocknet.

4.2.3 Chemische Zusammensetzung ausgewählter Lignine

Die Zusammensetzung ausgewählter Lignine wurde vom Wood K Plus – Kompetenzzentrum Holz durchgeführt, angelehnt an Veröffentlichungen des NREL wie in Kapitel 4.1.2 beschrieben.

4.2.4 Spektroskopische Methoden

Für die UV-Vis- (ultravioletter – sichtbarer Wellenlängenbereich, *ultraviolet visible*) Spektroskopie wurde Lignin in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ gelöst und in Quarzglasküvetten mit einem Lichtweg von 10 mm (HellmaAnalytics, High Precision Cell) im Bereich von 200 – 500 nm mit einer Auflösung von 1 nm vermessen.

Für die FTIR-Messungen wurden Presslinge aus KBr mit 1 % Lignin hergestellt. Dazu wurden die Probe und KBr für 2 min vermahlen und anschließend je 200 mg zu einem Pressling weiterverarbeitet (10 t für 2 min). Die Absorption wurde im Bereich von $4000 - 700 \text{ cm}^{-1}$ mit 64 scans und einer Auflösung von 4 cm^{-1} gemessen. Sowohl Messung als auch Auswertung erfolgten mit dem *Spectra Manager* von Jasco (Version 1.53.05).

Für die NMR-Messungen wurden 50 mg Lignin in 900 μL DMSO- d_6 + 0,03 % (v/v) Tetramethylsilan gelöst und bei 297 K auf einem NMR-Spektrometer Avance III 600 (Bruker) mit BBO cryo probe vermessen. Die ^1H -NMR-Spektren wurden mit dem Standard-Pulsprogramm von Bruker (zg30) mit 16 Scans und 2 Dummy-Scans mit einer spektralen Breite von 24,0155 ppm, einer Messzeit von 4,5438 s und einem repetition delay von 1 s gemessen. Die Spektren wurden mit *Topspin* (V 4.0.7) manuell phasen- und basislinienkorrigiert. Zur Erstellung der Hauptkomponentenanalyse wurde Matlab 2018b (The Math Works, Natick, USA) mit dem SAISIR package für MATLAB verwendet.¹³⁷ Für die multivariate Modellierung wurden Datenpunkte aus vier

Regionen der ^1H -NMR-Spektren mit einer Bucketwidth von 0,01 ppm genutzt: 10,00 – 3,50 ppm; 3,24 – 2,65 ppm; 2,35 – 1,09 ppm und 1,03 – 0,20 ppm. Zur Normalisierung der Intensitäten der verschiedenen Proben wurden die Spektren auf ein einheitliches Gesamtintegral skaliert.

Die Aufnahme der HSQC NMR Spektren erfolgte mit 16 Scans und 16 Dummy-Scans, mit 4096 (F2) bzw. 256 (F1) Inkrementen bei einer Messzeit von 0,2840 s (F2) bzw. 0,0045 s (F1) und einer spektralen Breite von 12,0 ppm (F2) bzw. 190,3 ppm (F1). Das Transmitter Offset betrug 5,0 ppm für ^1H und 80,0 ppm für ^{13}C . Die Daten wurden automatisch mit ICON-NMR (Bruker) aufgenommen und mithilfe der Software *Topspin* (V 4.2.0) ausgewertet: dazu wurden zunächst die Achsen anhand des DMSO-Signals kalibriert (F1: 39,5 ppm; F2: 2,49 ppm)^{62, 138}, die Spektren manuell phasenkorrigiert und die Signale integriert. Für die Berechnung der Monolignolanteile wurden jeweils die $\text{C}_{2,6} - \text{H}_{2,6}$ Korrelationen der S- und H-Einheiten sowie die Summe der $\text{C}_2 - \text{H}_2$ und $\text{C}_6 - \text{H}_6$ Korrelationen der G-Einheiten verwendet. Die Bindungstypen (β -Aryl-Ether (A), Resinol (B), Phenylcoumaran (C), Spirodienon (D)) wurden anhand ihrer $\text{C}_\alpha - \text{H}_\alpha$ Korrelationen berechnet, um mögliche Interferenzen durch homonukleare $^1\text{H} - ^1\text{H}$ Kopplungen zu vermeiden.¹³⁹ Für die Tricin (T)-Strukturen wurde die $\text{C}_6 - \text{H}_6$ Korrelation verwendet, für *p*-Coumarat (pCA) die $\text{C}_{2,6} - \text{H}_{2,6}$ Korrelation, und für die Zimtalkohol-Endgruppen (ZA) die $\text{C}_{\alpha/\beta} - \text{H}_{\alpha/\beta}$ Korrelation, da keine genaue Differenzierung zwischen dem α - und β -Signal möglich ist. Alle Integrale wurden auf die jeweilige Protonenzahl normiert. Die Ergebnisse werden angegeben als Anzahl X (Bindungstyp bzw. Substruktur) pro 100 Aromaten und berechnen sich nach:

$$\text{Anzahl X pro 100 Aromaten} = \frac{f_X}{f_S + f_G + f_H} \cdot 100 \quad (5.1)$$

Außerdem wird der Anteil an kondensierten Untereinheiten (KU) wie folgt berechnet:

$$\text{KU [\%]} = \frac{B+C+D}{A+B+C+D} \cdot 100 \% \quad (5.2)$$

4.2.5 Methoxy- und Ethoxygehalt

Die Bestimmung der Methoxy- und Ethoxygruppen ausgewählter Lignine wurde am Wood K Plus – Kompetenzzentrum Holz angelehnt an Sumerskii *et al.*¹⁴⁰ durchgeführt. Dafür wurden 10 mg Lignin und 1 mL Iodwasserstoff in einem Headspace-Vial gemischt und für 3 h bei 110 °C im Ofen gelagert. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 9 mL NaOH (2 M) zugegeben und CH_3I und $\text{C}_2\text{H}_5\text{I}$ via Headspace-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HS-GC-MS) (siehe Tabelle 4-3) bestimmt. Zur Kalibration dienten Vanillin und Ethylvanillin. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung eines Lignins aus jedem Dreifachaufschluss.

4. Experimentelle Arbeiten

Tabelle 4-3: Messbedingungen der HS-GC-MS Methode.

Komponente	Bezeichnung	Parameter
Autosampler	AOC 6000 Autosampler mit 2,5 mL Spritze Headspace-Injektion	Heating Temperatur: 60 °C Heating Zeit: 5 min Spritzentemperatur: 80 °C Injektionsvolumen: 100 µL
Gaschromatograph	Shimadzu GC 2010 Plus Trägergas: Helium	Säulenfluss: 1,0 mL min ⁻¹ Purge: 3,0 mL min ⁻¹ Gesamtfluss: 14,0 ml min ⁻¹ Splitverhältnis: 1:10 Injektortemperatur: 250 °C
Säule	HP5-MS (J&W Scientific, Folsom, CA, USA): Länge: 60 m Innendurchmesser: 0,25 mm Filmdicke: 0,25 µm	Temperaturprogramm: 40 °C (2 min) 10 °C min ⁻¹ auf 150 °C 150 °C (5 min)
Detektor	Shimadzu Dual Stage TMP (QP2020) Massenspektrometer Ionisation: Elektronenstoß	Ionisationsenergie: 70 eV bei 1,13 · 10 ⁻⁷ Pa Temperatur Interface: 250 °C Temperatur Ionenquelle: 200 °C Temperatur Quadrupol: 180 °C Scan mode: 25 – 300 m/z

4.2.6 Gelpermeationschromatographie

Für die GPC-Messungen wurden die Ligninproben in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von 2,5 g L⁻¹ gelöst und vor der Messung filtriert (0,2 µm Polyamid). Als interner Standard zur Korrektur der Elutionszeit wurde Ethylenglykol (0,1 Gew.-%) zugegeben. Das Massenmittel der Molmasse (M_w), das Zahlenmittel der Molmasse (M_n) und der Polydispersitätsindex (PDI) wurden mit einem PSS GPC System (siehe Tabelle 4-4) ermittelt. Zur Kalibration wurden 14 Polystyrolsulfonat-Natriumsalze (891 – 976 000 Da) und Natriumbenzolsulfonat (180 Da) mit einer Konzentration von 1 g L⁻¹ vermessen und mit einer Polynomfunktion fünften Grades ($R^2 = 0,9997$) ausgewertet.

Tabelle 4-4: Messbedingungen der GPC-Analysen.

Komponente	Bezeichnung	Parameter
Chromatographie	Agilent 1260 Infinity Eluent: NaOH (0,1 M)	Fluss: 0,8 mL min ⁻¹ Injektionsvolumen: 10 µL (Proben), 50 µL (Kalibration)
Säulen	Vorsäule: PSS MCX 8 × 50 mm 5 µm	
	Trennsäulen: PSS MCX 8 × 300 mm 5 µm 1 000 Å PSS MCX 8 × 300 mm 5 µm 100 000 Å	Molmassenbereich: 100 – 70 000 Da 1 000 – 1 000 000 Da
Detektor	UV-Detektor	280 nm

Die aus der Molmassenverteilung ermittelten Parameter werden als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) angegeben. Zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wird der Tukey-Test (p < 0,05) angewandt.

4.3 Assays zur Bestimmung der Antioxidanz und des Phenolgehaltes

4.3.1 DPPH-Assay

Die Messung erfolgte angelehnt an Alzagameem *et al.*¹⁴¹ Die Lignine wurden dabei mit einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ in Dioxan+Wasser (90+10, v+v) gelöst. 0,1 mL dieser Probenlösung wurde mit 3,9 mL einer 6 · 10⁻⁵ M DPPH-Lösung gemischt und die Absorption nach 30 min bei 518 nm gemessen. Als Blank wurde Dioxan+Wasser (90+10, v+v) statt der Lignin-Lösung verwendet. Zur Kalibration wurden sechs Trolox-Standards im Bereich von 30 – 230 µg mL⁻¹ vermessen, die zugehörige Kalibrationsgerade ist im Anhang in Abbildung A 1a dargestellt.

Für die Auswertung wird aus der gemessenen Absorption zunächst die Inhibition des Radikals in Prozent als Aktivität als Radikalfänger (*radical scavenging activity*, RSA) bestimmt nach:

$$\text{RSA} [\%] = \left(1 - \left(\frac{A_{\text{Probe}}}{A_{\text{Blank}}} \right) \right) \cdot 100\% \quad (5.3)$$

wobei A_{Probe} die Absorption der gemessenen Probe ist, und A_{Blank} die Absorption des Blanks. Aus der Kalibrationsgeraden mit Trolox wird anschließend die Konzentration an Trolox-Äquivalenten (*Trolox equivalents*, TE) c_{TE} wie folgt berechnet:

$$c_{\text{TE}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{RSA}_{\text{Lignin}} - b_{\text{cal}}}{m_{\text{cal}}} \quad (5.4)$$

Dabei ist b_{cal} der Achsenabschnitt und m_{cal} die Steigung der Kalibrationsgeraden. Anschließend kann mithilfe der molaren Masse von Trolox M_{Trolox} (250,29 g mol⁻¹) und der Konzentration der vermessenen Lignin-Lösung (in mg mL⁻¹) die *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) bestimmt werden:

$$\text{TEAC} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mgLignin}} \right] = \frac{c_{\text{TE}} \cdot M_{\text{Trolox}}}{c_{\text{Lignin}}} \quad (5.5)$$

4.3.2 ABTS-Assay

Der ABTS-Assay wurde angelehnt an García *et al.*¹⁰⁷ durchgeführt. Dafür wurde für jeden Messtag eine ABTS-Radikalkation-Lösung mit 7 mM ABTS und 2,45 mM Kaliumperoxodisulfat in EtOH+Wasser (50+50, v+v) frisch angesetzt und über Nacht im Dunkeln bei 25 °C temperiert. Am nächsten Tag wurde die ABTS^{•+}-Lösung mit EtOH+Wasser (50+50, v+v) auf eine Absorption von (0,700 ± 0,005) bei 734 nm verdünnt. Zur Bestimmung der RSA wurden 2,5 mL der verdünnten ABTS^{•+}-Lösung vorgelegt und 0,25 mL Lignin-Lösung (0,15 mg mL⁻¹ in DMSO) hinzu pipettiert. Anschließend wurde die Messlösung direkt in eine Küvette umgefüllt und die Absorption nach 12 min bei 734 nm gemessen. Als Blank wurde reines DMSO anstelle der Lignin-Lösung verwendet. Zudem wurde eine Kalibrationsgerade mit sechs Troloxstandards im Bereich von 15 – 40 µg mL⁻¹ aufgenommen (siehe Abbildung A 1b im Anhang). RSA, c_{TE} und TEAC werden analog zum DPPH-Assay in Kapitel 4.3.1 berechnet.

4.3.3 FRAP-Assay

Die Messung erfolgte angelehnt an Yang *et al.*¹⁴² Das FRAP-Reagenz wurde vor jedem Messdurchgang frisch aus Acetatpuffer (300 mM, Natriumacetat & Essigsäure, pH 3,6), TPTZ (10 mM) in HCl (40 mM) und Eisen-(III)-chlorid (20 mM) in dest. Wasser im Verhältnis 10:1:1 angesetzt. Vor Nutzung wurde das Reagenz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die TPTZ-Lösung wurde dabei arbeitstäglich frisch angesetzt.

4. Experimentelle Arbeiten

Für die Messung wurden 3 mL FRAP-Reagenz vorgelegt, dann 0,1 mL Lignin-Lösung ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ in Dioxan+Wasser (90+10, v+v)) zugegeben, bei 37 °C für 10 min im Trockenschrank inkubiert und anschließend die Absorption bei 593 nm gemessen. Für den Blank wurde Dioxan+Wasser (90+10, v+v) statt der Lignin-Lösung verwendet. Außerdem wurde eine Kalibrationsgerade mit sechs Trolox-Standards im Bereich von $40 - 190 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ aufgenommen (siehe Abbildung A 1c im Anhang). Zur Auswertung des FRAP-Assays kann c_{TE} direkt aus der Absorption der Messlösung des jeweiligen Lignins A_{Lignin} und der Kalibrationsgeraden berechnet werden:

$$c_{\text{TE (FRAP)}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{A_{\text{Lignin}} - b_{\text{cal}}}{m_{\text{cal}}} \quad (5.6)$$

Anschließend kann daraus der TEAC berechnet werden, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

4.3.4 FC-Assay

Die Messung erfolgte angelehnt an Alzagameem et al.¹⁴¹ Dafür wurden 0,1 mL Lignin-Lösung (2 mg mL^{-1} in DMSO) in einen 10 mL Messkolben vorgelegt und 0,5 mL FC-Reagenz und ca. 7 mL dest. Wasser hinzu pipettiert. Eine Minute nach Zugabe des FC-Reagenz wurde 1 mL einer gesättigten wässrigen Natriumcarbonatlösung hinzugegeben und mit dest. Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Die Messlösung wurde für 30 min bei 40 °C temperiert und anschließend die Absorption bei 750 nm gemessen. Für den Blank wurde reines DMSO statt der Lignin-Lösung verwendet.

Für die Auswertung wurde arbeitstäglich eine Kalibrationsgerade mit sechs Gallussäure-Standards im Konzentrationsbereich von $100 - 1000 \text{ mg L}^{-1}$ vermessen (siehe Abbildung A 1d im Anhang). Die Gallussäure-Äquivalente (GAE) werden wie folgt berechnet:

$$\text{GAE} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{A_{\text{Lignin}} - b_{\text{cal}}}{m_{\text{cal}}} \quad (5.7)$$

Dabei ist A_{Lignin} die Absorption der Messlösung mit Lignin, b_{cal} der Achsenabschnitt der Kalibrationsgerade und m_{cal} die Steigung der Kalibrationsgeraden. Der Gesamtphenolgehalt (*total phenol content*, TPC) berechnet sich aus dem GAE und der Konzentration der Lignin-Probeflösung c_{Lignin} :

$$\text{TPC} [\%] = \frac{\text{GAE}}{c_{\text{Lignin}}} \cdot 100\% \quad (5.8)$$

4.3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software OriginPro 2016 (OriginLab, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Für jeden Assay wurden Standards in sechs verschiedenen Konzentrationen vermessen und als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Der Grubb's-Test wurde zur Identifizierung von Ausreißern verwendet ($p < 0,05$), sowie eine lineare Kurvenanpassung (keine Gewichtung, Konfidenzintervalle mit 95 % statistischer Sicherheit) zur Ermittlung der Steigung (m), des Achsenabschnittes (b), des Bestimmtheitsmaßes (R^2), der Residuenquadratsumme (*residual sum of squares*, RSS) und der Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers (*root mean square error*, RMSE). Für eine bessere Vergleichbarkeit werden die Verfahrensstandardabweichung (*method standard deviation*, MSD) und der Variationskoeffizient (*coefficient of variation*, CV) für jeden Assay wie folgt berechnet:

$$\text{MSD} = \frac{\text{RMSE}}{m} \quad (5.9)$$

$$CV = \frac{MSD}{\text{Gesamtmittelwert}} \cdot 100 \% \quad (5.10)$$

Die Ergebnisse der Kalibration der vier Assays sind im Anhang in Tabelle A 1 zu finden.

Zum Vergleich der verschiedenen Lignine wurden diese in dreifacher Wiederholung isoliert und mit jedem Assay eine Doppelbestimmung pro Probe durchgeführt. Die Daten wurden mithilfe einer einfaktoriellen ANOVA analysiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Aufschlusses angegeben ($n = 3$). Zum Vergleich der Mittelwerte der verschiedenen Gruppen wurde der Tukey-Test genutzt. Alle Tests wurden mit einer Signifikanz von 95 % durchgeführt ($p < 0,05$).

Daneben wurden Standard-Scores berechnet, um einen einheitenlosen Wert zu erhalten, was zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse führt. Für diese Standardisierung wird der Mittelwert aller betrachteten Messwerte vom Messwert der jeweiligen Probe abgezogen und durch die Standardabweichung geteilt. Die so ermittelten Standard-Scores haben laut Definition einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1. Aus den Standard-Scores wurde im Anschluss analog zu Sun *et al.*¹⁴³ der relative Index der antioxidativen Kapazität (*relative antioxidant capacity index*, RACI) berechnet, indem die Standard-Scores der vier Assays gemittelt wurden. Auf diese Weise wurde für jedes Lignin eines Dreifachaufschlusses ein RACI berechnet, sodass für jeden Probenotyp wiederum Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben werden kann.

III Ergebnisse & Diskussion

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

In diesem Kapitel wird untersucht, wie sich die Lignine, die aus den verschiedenen Biomassen gewonnen wurden, unterscheiden. Dafür werden die Low-Input-Pflanzen Miscanthus, Silphie und Paulownia betrachtet und mit den in der Literatur bereits gut beschriebenen Biomassen Weizenstroh und Buchenholz verglichen. Die Ergebnisse dieses Kapitels sind teilweise veröffentlicht in:

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y. B.; Schulze, M. Extraction of High-Purity Lignins via Catalyst-free Organosolv Pulping from Low-Input Crops. **2020**, *Biomacromolecules* 21 (5), 1929. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00123

Rumpf, J.; Burger, R.; Schulze, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **2023**, *Int. J. Biol. Macromol.* 233, 123470. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123470

5.1 Charakterisierung der Biomassen

Vor der Isolation der Lignine ist die Analyse der chemischen Zusammensetzung der genutzten Biomassen ein erster wichtiger Schritt, um die verschiedenen Biomassetypen untereinander vergleichen zu können. Außerdem ist es dadurch möglich, die Ausbeute bezogen auf den tatsächlichen Ligningehalt anzugeben, statt auf die Gesamtmasse der Pflanze, was die Vergleichbarkeit untereinander und auch mit Literaturdaten verbessert. Die Ergebnisse der mittels NREL-Analyse bestimmten chemischen Zusammensetzung der Biomassen sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

Tabelle 5-1: Chemische Zusammensetzung der Biomassen, bestimmt nach den NREL-Protokollen.^{134–136}

	Miscanthus ^a	Silphie ^a	Weizenstroh ^b	Paulownia ^a	Buchenholz ^b
Lignin [%]	26,0 ± 0,5	24,8 ± 0,2	25,9	32,8 ± 0,2	28,4
Cellulose [%]	40,6 ± 1,1	41,8 ± 0,3	39,6	36,9 ± 1,0	40,8
Hemicellulose [%]	24,2 ± 0,8	22,4 ± 0,4	23,4	20,5 ± 0,5	22,4
Asche [%]	3,2 ± 0,4	5,0 ± 0,1	5,3	1,3 ± 0,4	0,6

^a Mittelwert ± Standardabweichung einer Vierfachbestimmung jeder Probe.

^b Mittelwert einer Doppelbestimmung jeder Probe.

Für Miscanthus wird ein Ligninanteil von (26,0 ± 0,5) % sowie ein Aschegehalt von (3,2 ± 0,4) % bestimmt, was gut mit NREL-Literaturdaten für den Lignin- (19 – 26 %) und Aschegehalt (2 – 7 %) übereinstimmt.^{18, 20, 67, 144} Die chemische Zusammensetzung der Silphie ähnelt der des Miscanthus, hier beträgt der Ligningehalt (24,8 ± 0,2) %. Klímek *et al.* untersuchten Silphie-Stiele und fanden einen etwas geringeren Ligningehalt von 21,4 %²⁹, während Höller *et al.* Ligninanteile zwischen 21,4 – 28,8 % ermittelt haben³⁰, was wiederum gut mit dem hier dargestellten Ergebnis übereinstimmt. Beides wurde ebenfalls nach den Vorschriften der NREL ermittelt. Damm *et al.* untersuchten die die Zusammensetzung der Zellwände sowohl von Miscanthus als auch von Silphie und bestimmten Ligningehalte als *acetyl bromide soluble lignin* von 18 – 22 %, wobei Miscanthus etwas mehr Lignin enthält als Silphie.⁷² Auch wenn diese Werte leicht niedriger sind als die hier ermittelten, stimmt die Größenordnung überein, genauso wie der leicht höhere Ligningehalt in Miscanthus verglichen mit Silphie. Die Abwei-

chungen lassen sich mit den unterschiedlichen Analysemethoden erklären. Als weitere grasartige Pflanze wird Weizenstroh untersucht, dessen Zusammensetzung mit einem Ligningehalt von 25,9 % ebenfalls *Miscanthus* und *Silphie* ähnelt. Literaturwerte für den Ligningehalt von Weizenstroh sind allerdings meist etwas niedriger und liegen zwischen 20 – 24 % ermittelt nach der NREL- oder TAPPI-Methode.^{145–148} Buranov *et al.* geben sogar einen noch größeren Bereich des Ligningehaltes in Weizenstroh von 5,3 – 17,0 % und Aschegehalte von 1,8 – 6,7 % an, je nach dem in welcher Region die Biomasse angebaut wurde.¹⁴⁹ Im Rahmen dieser Schwankungen erscheint der hier ermittelte Wert realistisch und passt gut zu denen der anderen beiden gras- bzw. krautartigen Pflanzen.

Für *Paulownia* wird mit $(32,8 \pm 0,2)$ % ein signifikant höherer Ligningehalt gemessen, verglichen mit den meisten Literaturdaten: Gong *et al.* geben den Ligningehalt in *Paulownia tomentosa* mit 23,8 % an³², während Ye *et al.* $(20,5 \pm 0,8)$ % Lignin¹⁵⁰ ermittelt. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen wurden diese Werte allerdings nicht über das NREL-Protokoll bestimmt, was ein Grund für die Abweichung sein könnte. Lediglich Pegoretti de Souza *et al.* ermittelten einen ähnlich hohen Ligningehalt von 34,2 %, allerdings in *Paulownia elongata x fortunei* nach einer TAPPI Standardmethode.³⁶ Nichtsdestotrotz sind die gemessenen Werte generell höher als Ligningehalte in anderen Laubhölzern (18 – 24 %).¹⁵¹ Auch für Buchenholz wird mit 28,4 % Lignin ein etwas höherer Wert ermittelt, in der Literatur finden sich Ligningehalte zwischen 24,3 – 26,3 % ermittelt nach der NREL-Methode^{74, 152, 153}, während Brosse *et al.* für Buchenholz einen Klason-Lignin-Gehalt (säureunlösliches Lignin) von 31,2 % angeben¹⁵⁴.

Generell besitzen hölzerne Biomassen im Vergleich zu gras- und krautartigen Pflanzen einen höheren Ligningehalt⁷⁶, während letztere einen deutlich höheren Aschegehalt¹⁵⁵ aufweisen. Beides kann durch die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigt werden.

5.2 Ausbeute der Lignine

Die Ausbeute an Lignin wird bezogen auf den Ligningehalt der jeweiligen Biomasse (siehe Tabelle 5-1) angegeben. Auch wenn eine Optimierung der Ausbeute nicht das Hauptziel dieser Arbeit ist, können daraus erste Schlussfolgerungen gezogen werden, ob und wenn ja, welche Pflanzen Ähnlichkeiten zeigen und für die Ligningewinnung besonders geeignet scheinen. Um die Reproduzierbarkeit des genutzten Organosolvprozesses zu überprüfen, wurden alle Aufschlüsse zudem in dreifacher Wiederholung durchgeführt. Die Mittelwerte jedes Dreifachaufschlusses sind in Abbildung 5-1 dargestellt, mit absoluten Fehlern zwischen 0,5 % (PL2) und 1,2 % (ML2), was ein erster Indikator für die Reproduzierbarkeit des Aufschlusses ist.

Für ML2 liegt die Ausbeute bei $(15,3 \pm 1,2)$ %. Bauer *et al.* erreichten für *Miscanthus x giganteus* Ligninausbeuten zwischen 14 – 32 % (bezogen auf den Klason-Ligninanteil) mit 65 – 95 % wässrigem EtOH als Lösemittel.⁶² Allerdings wurde im Gegensatz zum hier genutzten Isolationsprozess die Biomasse drei Mal mit EtOH extrahiert, bevor der Aufschluss für 4 h unter Atmosphärendruck und mit HCl als Katalysator durchgeführt wurde. Weitere Studien zur OSL-Gewinnung aus *Miscanthus x giganteus* nutzen ebenfalls sauer katalysierte Aufschlüsse: Brosse *et al.* (170 °C, 60 – 80 min, 50 – 75 % wässriges EtOH, 0,5 – 1,2 % H₂SO₄) isolierten 14,7 – 43,8 % des Klason-Ligninanteils¹⁵⁶ als OSL, während Obama *et al.* (150 – 170 °C, 30 – 60 min, 80 % wässriges EtOH, 0,5 – 1 % H₂SO₄) eine Ausbeute von 22,4 – 57,6 %¹⁵⁷ erzielten. Auch wenn in der Literatur keine Vergleichsdaten für unkatalysierte EtOH-Organosolv-

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

Aufschlüsse gefunden werden, liegen die hier erzielten Ausbeute im Literaturbereich und nicht signifikant niedriger als die der katalysierten Aufschlüsse. Für eine höhere Ausbeute ist jedoch ein erheblicher Mehraufwand wie eine längere Aufschlussdauer, der Einsatz eines Katalysators oder mehrere Vorbehandlungsschritte nötig.

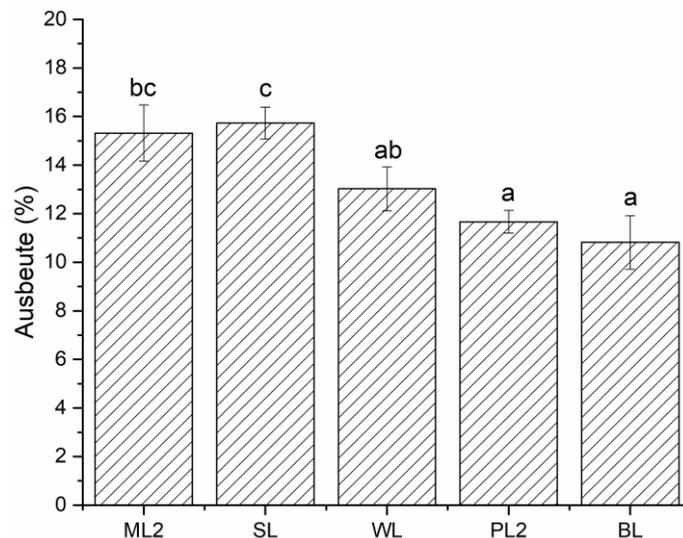


Abbildung 5-1: Vergleich der Ligninausbeute beim Organosolv-Aufschluss verschiedener Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

Für SL ist die Ligninausbeute mit $(15,7 \pm 0,7)$ % ähnlich zu der von ML2. Literaturdaten zu Silphie sind bisher limitiert auf Ligningehalte und die chemische Zusammensetzung von ganzen Pflanzenzellen⁷², Daten zu Organosolv-Aufschlüssen fehlen. Damm *et al.* nutzten einen OrganoCat-Aufschluss, um unter anderem Lignin in 2-Methyl-THF zu extrahieren, wobei 15 % des Lignins aus Silphie gewonnen werden konnten.⁷² Auch Weidener *et al.* konnten über diesen OrganoCat-Prozess eine maximale Ligninausbeute von $(15,0 \pm 2,3)$ % aus Silphie sowie $(15,3 \pm 0,9)$ % aus Miscanthus erzielen.¹⁵⁸ Beides liegt im selben Bereich wie die Ausbeuten des hier genutzten Organosolvprozesses, die sich für ML2 und SL nicht signifikant unterscheiden. Für WL wird mit $(13,0 \pm 0,9)$ % eine niedrigere Ligninausbeute als für ML2 und SL erreicht. In der Literatur finden sich ähnliche Werte: Rossberg *et al.* erzielten eine Ausbeute von 12 % mittels Organosolv-Aufschluss, allerdings in $\text{CH}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ ¹⁴⁶, während es Monteil-Rivera *et al.* gelang, 12,4 % Lignin durch Mikrowellen-Extraktion in 81 % wässrigem EtOH¹⁴⁷ zu isolieren. Wildschut *et al.* schlossen Weizenstroh ohne Katalysator (170 °C, 60 min, 60 % EtOH) auf und erreichten lediglich eine Ligninausbeute von 4,6 %.¹⁵⁹ Ramezani *et al.* untersuchten zudem den Einfluss verschiedener Prozessparameter des Organosolv-Aufschlusses in 60 % wässrigem EtOH auf die Ausbeute von Weizenstroh-Lignin¹⁶⁰: durch Variation von Aufschlussdauer (60 – 150 min), Temperatur (100 – 250 °C) und Druck (20 – 31 bar) konnten Ausbeuten zwischen 12 – 90 % des Klason-Ligningehaltes der Biomasse erzielt werden. Ähnliches fanden auch Huijgen *et al.* heraus, die Temperatur (190 – 210 °C), Zeit (60 – 120 min), EtOH-Konzentration (50 – 60 Gew.-%) und Katalysator-Konzentration (0 – 30 mmol/L H_2SO_4) variierten, was zu Ausbeuten zwischen 28,9 – 97,6 % führte.¹⁶¹ Neben dem isolierten Lignin wurde auch der restliche Ligninanteil im Zellstoff bestimmt, wodurch sich Massenbilanzen zwischen 107,4 – 128,7 % ergaben. Dies deutet darauf hin, dass auch der Anteil an isoliertem Lignin leicht höher angegeben sein könnte, als er tatsächlich ist. Insgesamt zeigen gerade die beiden letzteren Untersuchungen, dass höhere Ligninausbeuten möglich sind, allerdings werden

dafür auch deutlich höhere Temperaturen, Aufschlusszeiten oder der Einsatz eines Katalysators benötigt, worauf hier verzichtet wurde.

Für die beiden Hölzer liegt die Ligninausbeute mit $(11,7 \pm 0,5)$ % für PL2 und $(10,8 \pm 1,1)$ % für BL jeweils deutlich niedriger als für die Gräser, obwohl beide einen signifikant höheren Ligninanteil besitzen (vgl. Tabelle 5-1) als Miscanthus, Silphie und Weizenstroh. Rashid *et al.* haben beim Vergleich von Ligningehalt und Effizienz des Aufschlusses ähnliches festgestellt: mit zunehmendem Ligningehalt sinkt die relative Ausbeute.¹⁶² Rencoret *et al.* isolierten *milled wood lignin* (MWL) aus *Paulownia fortunei* ($< 0,15$ mm) mit einer Ausbeute von ca. 20 % des ursprünglichen Klason-Lignin Gehaltes⁶⁹, und auch Domínguez *et al.* isolierten MWL, allerdings aus *Paulownia elongata x fortunei*, mit einer Ausbeute von ebenfalls 20 %⁷¹. Beide Werte sind höher als das Ergebnis hier, allerdings wurde jeweils ein abweichender Genotyp und Aufschlussprozess genutzt und die Biomasse vor dem Aufschluss feiner vermahlen, was für *Paulownia* einen Einfluss auf die Ausbeute hat, wie in Kapitel 6.1 noch ausführlich dargestellt und diskutiert wird. Beim Organosolv-Aufschluss von Buchenholz erzielten Rossberg *et al.* mit einer Ausbeute von $(12,9 \pm 0,5)$ % einen Wert in ähnlicher Größenordnung trotz abweichender Aufschlussbedingungen (50 % wässriges EtOH, 1 % H₂SO₄).¹⁵² In Studien von Ibrahim *et al.* konnte sogar eine Ausbeute von ca. 50 % erreicht werden, allerdings mit einem sauren Aufschluss unter abweichenden Bedingungen (155 °C, 160 min, 50 % wässriges EtOH, 100 mM H₂SO₄).¹⁶³ Andere Aufschlussarten, wie die Gewinnung von pyrolytischem Lignin mit einer Ausbeute von 10 %¹⁶⁴ oder eine OrganoCat-Behandlung mit $(16,7 \pm 2,1)$ % Ligninausbeute¹⁵⁸ liefern wiederum ähnliche bzw. nur leicht höhere Ausbeuten, wie auch schon bei Miscanthus und Silphie beobachtet. Insgesamt wird auch hier deutlich, dass für höhere Ausbeuten auch eine gesteigerte Prozessstärke notwendig ist.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich mit dem genutzten Aufschlussprozess unterschiedliche Ligninausbeuten aus den verschiedenen Biomassen erzielen lassen: am höchsten ist diese für SL, am niedrigsten für BL. Insgesamt ist es schwierig, vergleichbare Literaturdaten zu finden, da der Organosolvprozess stark variiert und es keine Studien gibt, die mit exakt gleichen Aufschlussparameter gearbeitet haben. Gerade über eine Variation der Prozessparameter kann allerdings auch eine breite Spanne an Ausbeuten erzielt werden, was dazu führt, dass Literaturdaten zu verschiedenen Prozessen stark streuen. Nichtsdestotrotz liegen die hier ermittelten Werte in einer realistischen Größenordnung und im Rahmen von Literaturstudien. Des Weiteren liegt der Fokus nicht in allen Untersuchungen auf der Gewinnung von Lignin, sondern auf der Analyse des Zellstoffs bzw. der Wiedergewinnung der Zucker.^{71, 165} Wird aber lediglich die Delignifizierung der Biomasse untersucht, also die Zusammensetzung vor und nach dem Aufschluss, lässt dies noch keine Aussage über die tatsächliche Ligninausbeute zu. Darüber hinaus können unterschiedliche Aufschlussbedingungen oder Vorbehandlungen auch zu Änderungen der strukturellen Eigenschaften (z.B. Monolignolverhältnis, Bindungstypen, Molmasse oder funktionelle Gruppen) führen, wie in Kapitel 7 diskutiert wird.

5.3 Qualitative Strukturuntersuchung

Bei Lignin handelt es sich um ein stark verzweigtes und irreguläres phenolisches Makromolekül, das, abhängig von Biomasse und Aufschlussprozess, variierende Anteile der drei Monolignole Guajakol (G), Syringol (S) und *p*-Hydroxyphenyl (H) und verschiedener funktioneller Gruppe wie Hydroxy-, Methoxy-, Carboxy- und Carbonylgruppen enthält. Aus diesem Grund ist die Strukturanalyse von großer Bedeutung und schnelle und einfache Methoden wie die UV-Vis- und FTIR-Spektroskopie können helfen, einen ersten Überblick über das vorliegende Lignin zu erhalten. Für die zukünftige Verwertung von Ligninen als industrieller Rohstoff sind solche einfache und verlässliche Verfahren essentiell für die Qualitätskontrolle und Produktsicherheit.^{2, 6}

Die UV-Vis Spektren der Lignine zeigen aufgrund der Überlappung verschiedener Elektronenübergänge der unterschiedlichen lichtabsorbierenden Einheiten in der Ligninstruktur typischerweise breite und undeutliche Absorptionsbanden.⁸² Dennoch können mit dieser simplen Technik bereits erste Unterschiede zwischen den Ligninen aus verschiedenen Biomassen festgestellt werden, wie Abbildung 5-2 zeigt.

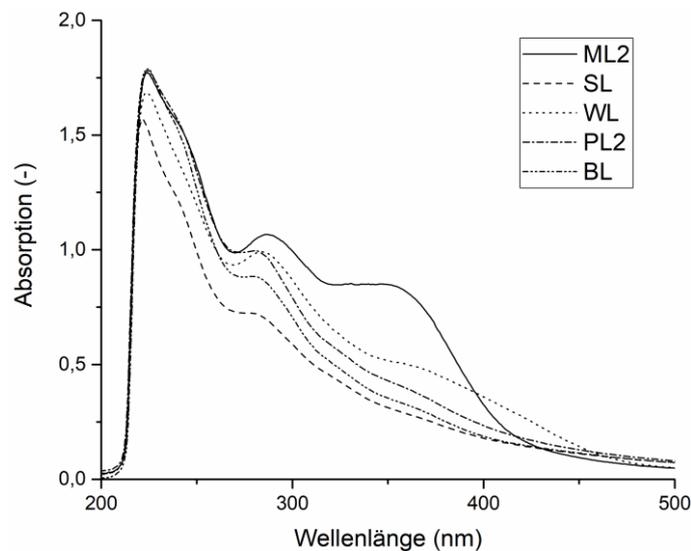


Abbildung 5-2: UV-Vis Spektren der Lignine aus verschiedenen Biomassen, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von 50 µg mL⁻¹ in 1 cm Quarzglasküvetten.

Alle Lignine besitzen ihr Absorptionsmaximum zwischen 222 – 224 nm mit einer Schulter bei ca. 231 – 245 nm. Bei 278 – 287 nm gibt es ein zweites schwächeres Maximum, das bei den Ligninen jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist: während ML2 und WL eine deutliche Absorptionsbande zeigen, ist bei SL, PL2 und BL eher eine Schulter vorhanden. Des Weiteren zeigt ML2 ein weiteres deutliches Signal bei ca. 350 – 370 nm, bei WL ist eine leichte Schulter bei derselben Wellenlänge zu beobachten. SL, PL2, und BL dagegen zeigen keine nennenswerte Absorption bei diesen größeren Wellenlängen. Insgesamt zeigen die Spektren die zu erwartenden Absorptionsbanden für Lignine in NaOH und sind gut vergleichbar mit Literaturdaten.^{141, 166} Die hohe Absorption bei 200 – 220 nm kann dem $\pi - \pi^*$ – Übergang des aromatischen Rings zugeordnet werden^{167, 168}, während unkonjugierte phenolische Gruppen wie Coniferyl-, Sinapyl- oder *p*-Coumarylalkohol zwischen 270 – 290 nm^{169, 170} liegen. Bei Wellenlängen über 300 nm lassen sich die Elektronenübergänge der mit den Aromaten konjugierten Strukturen beobachten, wie der $\pi - \pi^*$ – Übergang von konjugierten C=C-Bindungen oder der $n - \pi^*$ – Übergang von konjugierten C=O-Bindungen.^{171, 172} Außerdem gibt es Untersuchun-

gen, die eine Absorption bei ca. 315 nm den Estern der Hydroxyzimtsäuren wie *p*-Coumar-säure, einem Derivat der H-Einheiten (siehe Abbildung 5-3) im Lignin zuordnen.^{170, 173, 174} Diese Wellenlänge ist zwar etwas niedriger als die hier Gemessene, allerdings wurde in der Literatur Dioxan/Wasser oder 2-Methoxyethanol anstelle von NaOH als Lösemittel verwendet, was einen Einfluss auf die Lage der Absorptionsbanden haben kann. Je nach Polarität des Lösemittels kommt es zu unterschiedlich starken Wechselwirkungen mit den Orbitalen: polare Lösemittel können mit n-Orbitalen beispielsweise durch die Bildung von Wasserstoffbrücken stärker wechselwirken als mit π - oder π^* -Orbitalen, was zu einer unterschiedlichen starken Energieabsenkung führt. Außerdem spielt neben der Polarität auch der pH-Wert eine Rolle: bei der Verwendung von NaOH kommt es im basischen zu einer Deprotonierung und somit zu einer bathochromen Verschiebung, da die Konjugation des Sauerstoffatoms mit dem Benzenring erhöht wird.¹⁶⁹ Die Existenz von H-Einheiten in ML2 und WL im Gegensatz zu PL2 und BL deckt sich mit Literaturangaben (siehe Kapitel 5.4), zu SL fehlen Vergleichsdaten.

Diese kleinen strukturellen Unterschiede zwischen den Ligninen, die mit der UV-Vis-Spektroskopie beobachtet werden, lassen sich mit den Ergebnissen der FTIR-Spektroskopie bestätigen: auch hier können Unterschiede in der Absorption auf variierende Monolignolverhältnisse zurückgeführt werden. Um zu verdeutlichen, welche Signale welchen Strukturen zugeordnet werden können, entspricht die Farbe der jeweiligen Monolignoleinheit in Abbildung 5-3 der der farblich markierten Linien in den FTIR-Spektren der Lignine in Abbildung 5-4. Die Zuordnung der charakteristischen Signale ist in Tabelle A 2 im Anhang zu finden.

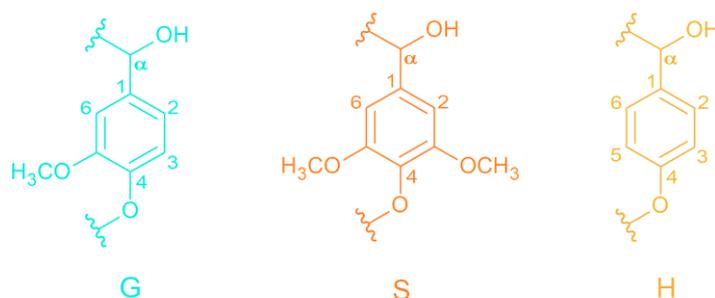


Abbildung 5-3: Monolignoleinheiten im Lignin. G: Guajakol; S: Syringol; H: *p*-Hydroxyphenyl.⁴⁷

Alle Lignine zeigen bei 3411 – 3439 cm^{-1} das typische breite Signal der O-H-Streckschwingung, da sowohl aliphatische als auch phenolische Hydroxygruppen vorhanden sind. Eine weitere typische Absorptionsbande ist die C-H-Streckschwingung in Alkylgruppen (2923 – 2937 cm^{-1}). Darüber hinaus werden auch Carbonylgruppen erwartet, die Signale bei 1704 – 1710 cm^{-1} für unkonjugierte C=O-Gruppen und bei 1656 – 1661 cm^{-1} für konjugierte C=O-Gruppen hervorrufen. Beide Banden werden in unterschiedlichen Ausprägungen in allen Spektren beobachtet, abhängig von der chemischen Umgebung der jeweiligen Carbonyle. Zwischen 843 – 2850 cm^{-1} besitzen alle OSL eine Bande, die den Methoxygruppen zugeordnet werden kann, die in den G- und S-Einheiten des Lignins vorkommen.

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

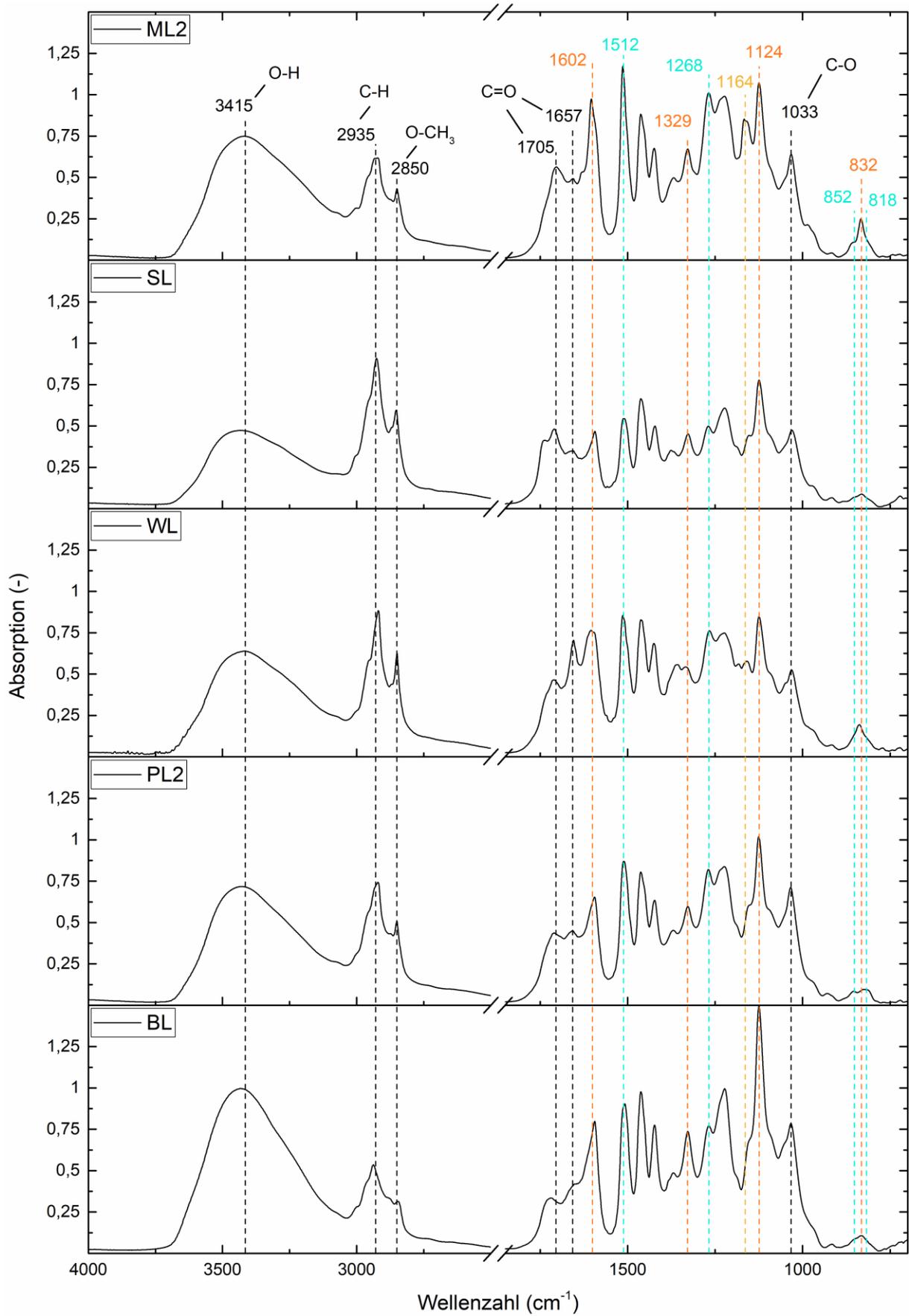


Abbildung 5-4: FTIR-Spektren der Lignine aus verschiedenen Biomassen. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).

Neben diesen bei allen Ligninen auftretenden Signalen, gibt es weitere, die einer bestimmten Monolignoleinheit zugeordnet werden können. G-Einheiten lassen sich in allen Ligninen beobachten, dazu gehören die asymmetrische C-C-Streckschwingung des aromatischen Skeletts bei $1509 - 1515 \text{ cm}^{-1}$ sowie die C-O-Streckschwingung des aromatischen Gerüsts bei $1266 - 1268 \text{ cm}^{-1}$. Außerdem besitzen Lignine, die hauptsächlich aus G-Einheiten bestehen, zwei charakteristische Peaks der C-H-*out-of-plane*-Deformationsschwingung in der Fingerprint-Region bei $852 - 854 \text{ cm}^{-1}$ und $815 - 823 \text{ cm}^{-1}$. Letztere sind am deutlichsten bei PL2 zu erkennen: zwar weist es ebenfalls Signale von S-Einheiten auf, aber scheint von allen Ligninen den höchsten Anteil an G-Einheiten zu besitzen. Dies lässt sich im Folgenden durch die HSQC NMR bestätigen (siehe Kapitel 5.4). Signale, die auf S-Einheiten hinweisen, sind die symmetrische C-C-Streckschwingung des aromatischen Skeletts bei $1594 - 1604 \text{ cm}^{-1}$, die C-O-Streckschwingung des aromatischen Gerüsts bei $1327 - 1330 \text{ cm}^{-1}$, die C-H-*in plane*-Deformationsschwingung bei $1123 - 1128 \text{ cm}^{-1}$ und die C-H-*out of plane*-Deformationsschwingung bei $830 - 833 \text{ cm}^{-1}$. Bei $1164 - 1166 \text{ cm}^{-1}$ befindet sich die C=O Streckschwingung in konjugierten Estergruppen, die z.B. in *p*-Coumarat, einem Derivat der H-Einheiten, vorkommt und somit typisch für HGS-Lignine ist, die aus allen drei Monolignoleinheiten bestehen. Diese Schwingung ist am ausgeprägtesten bei ML2, aber auch WL besitzt ein schwaches Signal bei dieser Wellenzahl. Genau wie die Ergebnisse der UV-Vis-Spektroskopie deuten die Banden im FTIR-Spektrum darauf hin, dass sowohl ML2 als auch WL aus allen drei Monolignolen aufgebaut sind. Insgesamt können also Unterschiede zwischen den Ligninen aus verschiedenen Biomassen identifiziert werden, sogar mit einfachen Methoden wie der UV-Vis- und FTIR-Spektroskopie. Um diese jedoch auch bestätigen und quantifizieren zu können, wird die spezifischere und sensitivere HSQC NMR genutzt, wie im folgenden Kapitel 5.4 beschrieben.

5.4 Monolignolverhältnisse, Bindungstypen und Substrukturen

Eine der meistgenutzten Methoden zur semiquantitativen Bestimmung des Monolignolverhältnisses und der Anteile verschiedener Bindungstypen und Substrukturen im Lignin ist die 2D HSQC NMR. Dabei wird jedes Kohlenstoffatom auf der y-Achse mit den direkt verbundenen Protonen auf der x-Achse korreliert, was die Aufklärung von sich überlappenden Peaks in 1D Spektren erlaubt.¹⁷⁵ Der Vorteil bei der Korrelation von $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ liegt in der Kombination der Sensitivität der ^1H -NMR und der höheren Auflösung der ^{13}C -NMR.¹⁷⁶ Die Spektren können anhand der Literatur in zwei Regionen aufgeteilt werden: die aliphatische Seitenkettenregion ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 50 – 90/2,8 – 5,8 ppm) und die aromatische Region ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 90 – 150/6,0 – 8,0 ppm). Die Signale können den Monolignolen (Abbildung 5-3) und verschiedenen Bindungstypen und Substrukturen (Abbildung 5-5) zugeordnet werden. Beide Regionen sind für die fünf Lignine in Abbildung 5-6 dargestellt, wobei die Farbe der Peaks der Farbe der jeweiligen Struktur entspricht. Im Anhang findet sich zudem eine detaillierte Zuordnung der Signale (Tabelle A 3).

Das größte Signal in allen HSQC NMR Spektren bei $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}} = 55,3/3,7 \text{ ppm}$ gehört zu den Methoxygruppen, die sowohl in den G- und den S-Einheiten vorkommen und somit in den dominierenden Monolignolen. Die S-Einheiten lassen sich über das $\text{S}_{2,6}$ – Signal bei $104,1/6,7 \text{ ppm}$ detektieren, außerdem erscheint ein zweites Signal bei $106,2/7,3 \text{ ppm}$, welches einer α -oxidierten S-Einheit zugeordnet werden kann.¹⁷⁷ Signale der H-Einheiten werden nur für die $\text{H}_{2,6}$ – Atome bei $127,1/7,2 \text{ ppm}$ gefunden. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich die Überlap-

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

pung der $H_{3,5}$ – Signale mit Peaks der G_5 – (114,9/6,8 ppm) und G_6 – (118,8/6,7 ppm) Atome, die wesentlich höhere Intensitäten zeigen.¹⁷⁸

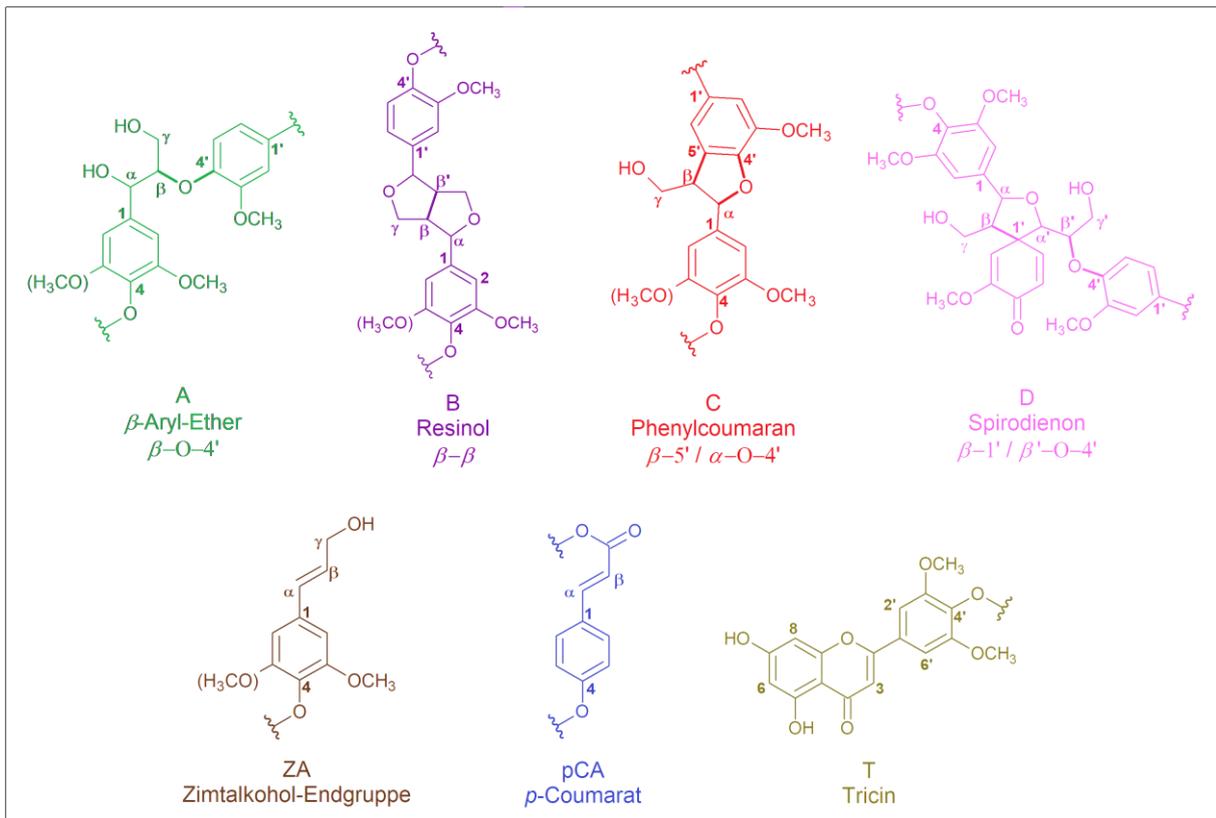
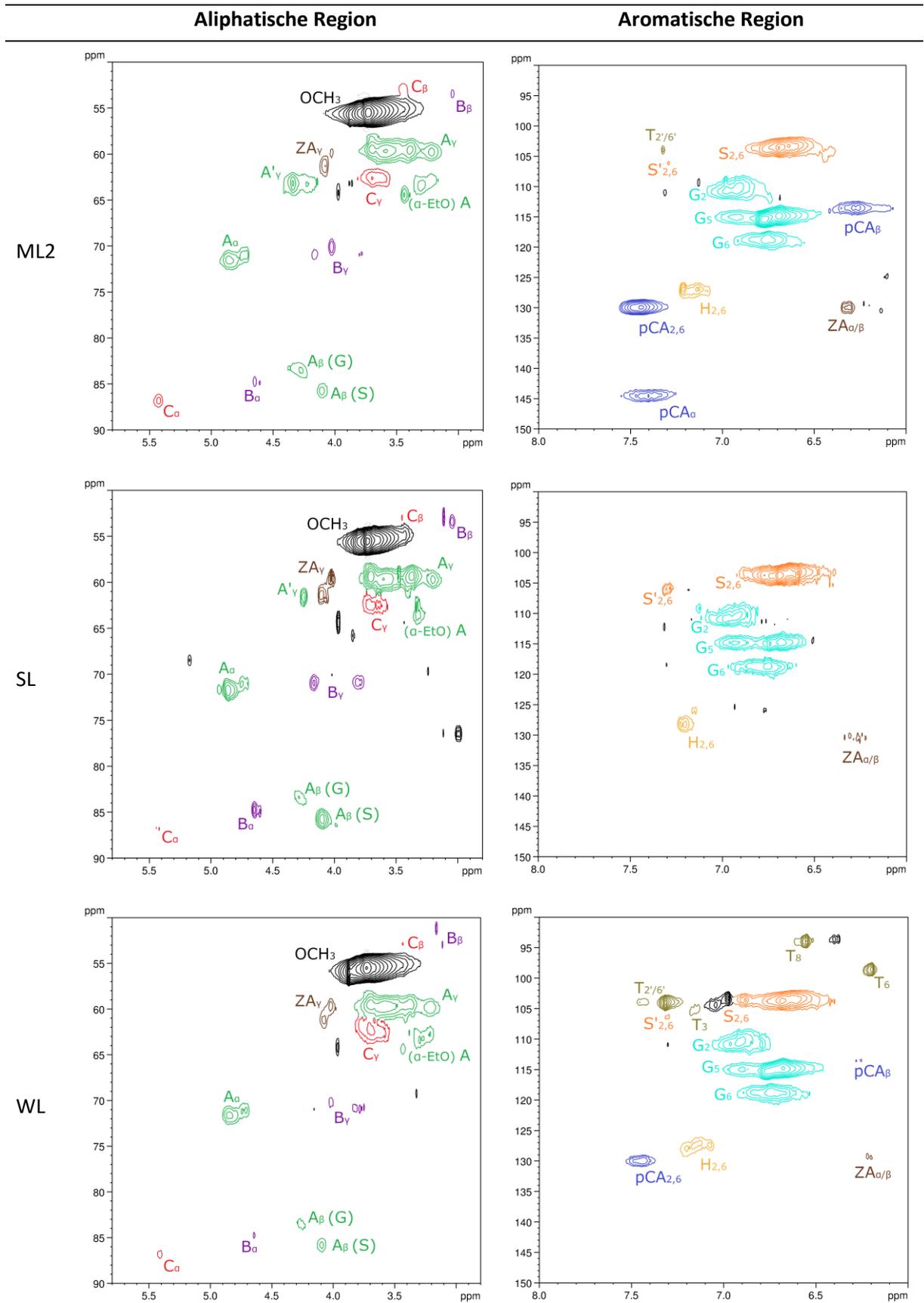


Abbildung 5-5: Bindungstypen und Substrukturen im Lignin.^{47, 139}

Die vorherrschenden Bindungstypen in allen Ligninen sind β -Aryl-Etherbindungen (A), Resinol (B) and Phenylcoumaran (C) für die jeweils die α -, β - und γ -Korrelationen detektiert werden. Für A_β können sogar zwei Signale beobachtet werden, abhängig davon ob es mit einer G - (83,5/4,3 ppm) oder S - (85,7/4,1 ppm) Einheit verknüpft ist.^{62, 177} Neben A_γ (59,5/3,5 ppm) zeigen ML2 und SL ein weiteres Signal der γ -modifizierten A-Untereinheiten (A'_γ) bei 63,2/4,3 ppm, z.B. durch eine γ -Acetylierung, eine γ - p -Coumarylierung oder eine γ -Veresterung.^{61, 178} Bauer *et al.* haben außerdem ein zusätzliches Signal für EtOH-OSL registriert, welches von einer α -ethoxylierten A-Untereinheit herrührt⁶² und in allen hier untersuchten OSL bei 63,7/3,3 ppm gefunden wird. Spirodienon-Strukturen (D) werden nur in PL2 bei 84,8/4,8 ppm (D_α) und 60,8/2,8 ppm (D_β) detektiert. Zimtalkohol-Endgruppen (ZA) sind in allen Ligninen vorhanden mit ZA_γ bei 60,9/4,1 ppm, während ZA_α und ZA_β nicht klar unterschieden werden können und das Signal bei 129,7/6,2 ppm beiden zugeordnet wird ($ZA_{\alpha/\beta}$). Des Weiteren finden sich in ML2 und WL Signale von Tricin (T) und p -Coumarat (pCA).

Aufgrund dieser Zuordnung der NMR-Signale zu den verschiedenen Ligninstrukturen ist es möglich, die Monolignolverhältnisse (Abbildung 5-7) und die Bindungstypen bzw. Substrukturen (Abbildung 5-8) semiquantitativ zu bestimmen. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 5-2 zu finden.

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen



5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

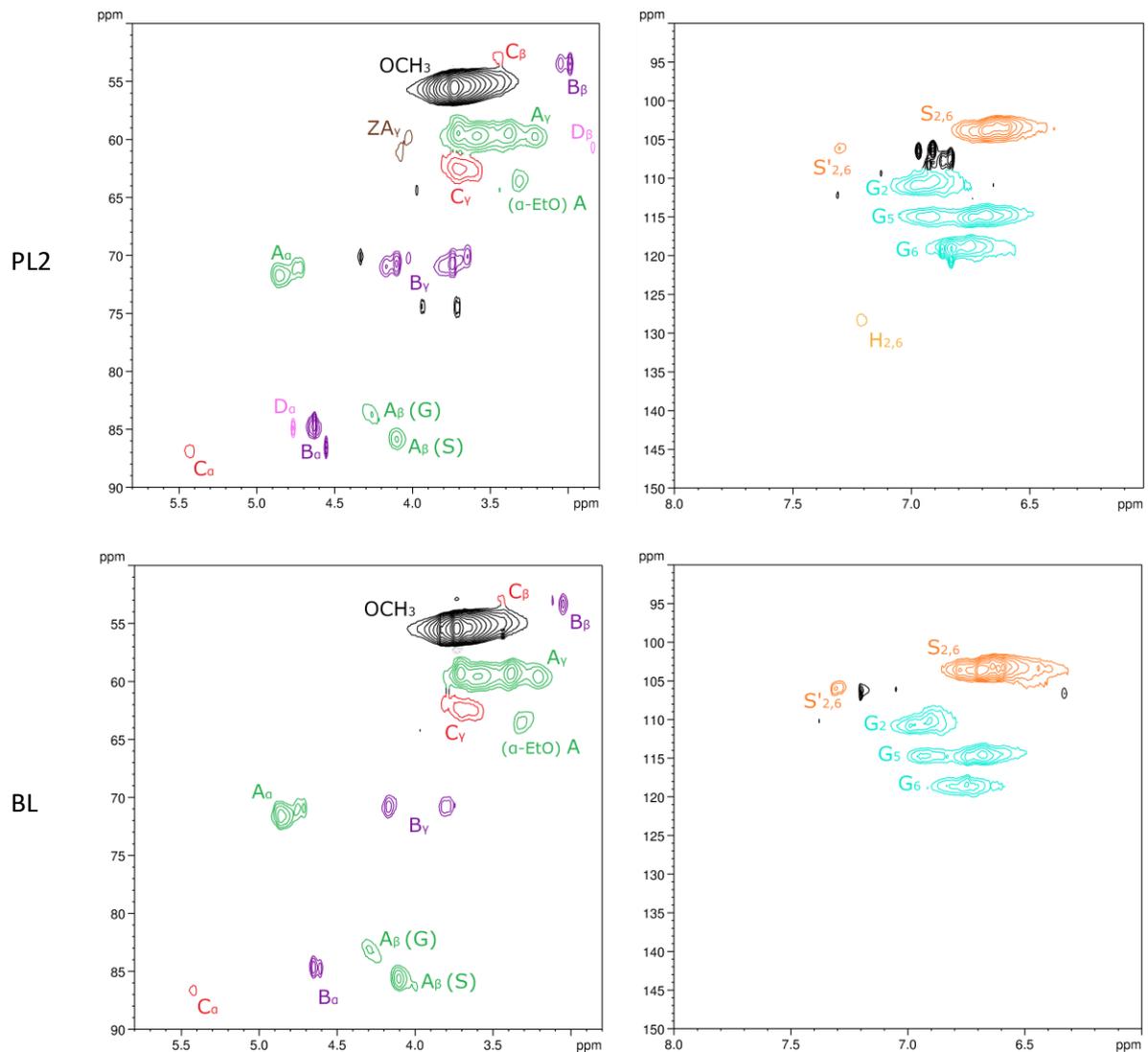


Abbildung 5-6: HSQC NMR-Spektren der Lignine aus verschiedenen Biomassen. Links: aliphatische Seitenkettenregion (δ_C/δ_H 50 – 90/2,8 – 5,8 ppm). Rechts: aromatische Region (δ_C/δ_H 90 – 150/6,0 – 8,0 ppm). Farbige Peaks lassen sich den Strukturen in Abbildung 5-3 und in Abbildung 5-5 derselben Farbe zuordnen.

Mit Ausnahme von BL bestehen die Lignine aus allen drei Monolignolen, wobei ML2 und WL den größten Anteil an H-Einheiten besitzen, während in SL und PL2 nur Spuren enthalten sind. Dies bestätigt die Ergebnisse der UV-Vis- und FTIR-Spektroskopie (siehe Kapitel 5.3), die bereits gezeigt haben, dass H-Einheiten in ML2 und WL vorhanden sind. Das S/G-Verhältnis liegt für ML2 bei $(0,94 \pm 0,01)$. In der Literatur lassen sich verschiedene Angaben für Miscanthus-Lignine finden, abhängig vom Aufschlussprozess: Bauer *et al.* geben S/G-Verhältnisse von 0,52 – 0,68 (saurer EtOH-Organosolv-Aufschluss bei Atmosphärendruck)⁶² an, während Wang *et al.* höhere Verhältnisse von 1,1 (basischer EtOH-Organosolv-Aufschluss)⁶¹ ermittelten. In dieser Arbeit wurde ein katalysatorfreier Aufschluss durchgeführt, und trotzdem ist das S/G-Verhältnis vergleichbar mit Literaturdaten. Auch Miscanthus-Lignine aus anderen Aufschlussprozessen, z.B. mit stark eutektischen Lösemitteln ($S/G = 0,88 – 1,22$)¹⁷⁹ liegen in der hier ermittelten Größenordnung. WL hat im Vergleich zu ML2 einen leicht höheren Anteil an H-Einheiten von $(8,0 \pm 0,2)$ % bei ähnlichem S/G-Verhältnis $(0,96 \pm 0,03)$. Auch dies stimmt gut mit Literaturangaben überein, wo sich für OSL aus Weizenstroh H-Anteile von 3 – 8,4 % und S/G-Verhältnis von 0,5 – 0,7^{139, 180} finden, während für Weizenstroh-KL auch höhere Werte mit

einem H-Anteil von 24,1 % und $S/G > 1^{181}$ angegeben werden. Je nach Aufschluss können die Angaben also stark variieren, und da selbst Organosolv-Aufschlüsse aufgrund unterschiedlicher Parameter wie Lösemittel, Druck/Temperatur oder Katalysator nicht immer vergleichbar sind, liegen die ermittelten Werte in einer realistischen Größenordnung.

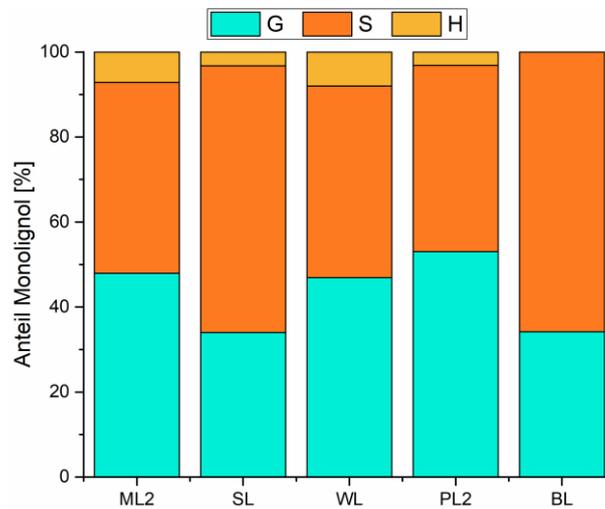


Abbildung 5-7: Anteil der Monolignole (G-, S- und H-Einheiten, siehe Abbildung 5-3) in Ligninen aus verschiedenen Biomassen.

SL hat im Gegensatz zu den beiden Grasligninen ein deutlich höheres S/G-Verhältnis von $(1,84 \pm 0,04)$. Bisher gibt es keine Literaturdaten zu isoliertem Lignin aus Silphie, lediglich Monolignol-Profile von ganzen Pflanzenzellen der Silphie und unter anderem Miscanthus nach OrganoCat-Vorbehandlung wurden mittels Py-GC/MS untersucht.⁷² Die Autoren stellten fest, dass Silphie im Vergleich zu Miscanthus mehr S- als G-Einheiten und nur geringe Anteile an H-Einheiten enthält. Allerdings zeigt eine Studie von Groenewold *et al.*, dass die quantitative Py/GCxGC/MS von Miscanthus-Biomasse zwar hilfreich ist, um die thermische Verarbeitung zu beschreiben, allerdings ist sie nicht geeignet, um die quantitative Biomassezusammensetzung und Monolignolverhältnisse zu bestimmen¹⁸², was ein Grund für die Unterschiede zu den hier dargestellten Ergebnissen sein könnte, auch wenn die Tendenzen zueinander passen.

Literaturangaben zur Zusammensetzung von PL2 sind rar, aber stimmen gut mit der hier ermittelten Zusammensetzung und dem S/G-Verhältnis von $(0,83 \pm 0,04)$ überein. Rencoret *et al.* untersuchten MWL aus *Paulownia fortunei* und fanden hauptsächlich G- und S-Einheiten und nur einen kleinen Anteil an H-Einheiten, während das S/G-Verhältnis 0,66 betrug.⁶⁹ Gong *et al.* untersuchten *Paulownia elongata* ($S/G = 0,88$) und *Paulownia tomentosa* ($S/G = 0,98$) mittels modifizierter Nitrobenzen-Oxidation statt der hier verwendeten HSQC NMR³², nichtsdestotrotz liegen die Werte in einer ähnlichen Größenordnung. Verglichen mit PL2 besitzt BL ein umgekehrtes Verhältnis von G- und S-Einheiten, obwohl es sich bei beiden um Harthölzer handelt. Allerdings werden auch diese Werte von Literaturangaben gestützt: Margellou *et al.* isolierten BL über einen unkatalysierten EtOH-Organosolv-Prozess (190 °C, 60 min) und ermittelten ähnliche Werte mit Anteilen von 34,5 % G- und 64,3 % S-Einheiten¹⁸³, während Zilstra *et al.* (120 °C, 5 h, 80 % wässriges EtOH, 0,24 M HCl) 17 % G- und 83 % S-Einheiten¹⁸⁴ detektierten.

Neben dem Monolignolverhältnis können aus den HSQC-Spektren auch verschiedene Bindungstypen und Substrukturen identifiziert werden, angegeben als Anzahl pro 100 Aromaten. In allen Ligninen ist die β -Aryl-Etherbindung (A) mit Werten zwischen $(23,5 \pm 0,4)$ für WL und

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

($37,2 \pm 1,0$) für SL dominierend. Dies stimmt gut mit Literaturdaten zu Ligninen aus Miscanthus^{61, 67}, Weizenstroh^{145, 180}, Paulownia^{69, 71} und Buche¹⁸⁵ überein, während es für Silphie-Lignine keine Vergleichswerte gibt.

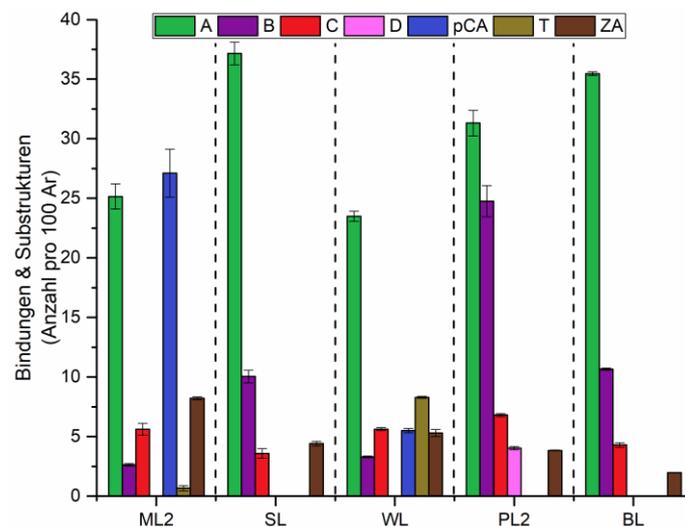


Abbildung 5-8: Anteil der Bindungstypen und Substrukturen (siehe Abbildung 5-5) in Ligninen aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Den mit Abstand höchsten Anteil an kondensierten Untereinheiten (KU) mit ($53,2 \pm 0,7$) besitzt PL2. Der größte Teil davon ist Resinol (B), welches hauptsächlich über eine Dimerisierung während der Ligninsynthese geformt wird und nicht bei der Ligninmodifizierung während des Aufschlussprozesses, wohingegen Phenylcoumaran (C) ein Produkt von Kondensationsreaktionen sein kann.⁶² Da allerdings eine α -Ethoxylierung in allen OSL beobachtet werden kann, scheinen weder intra- noch intermolekulare Kondensationsreaktionen sehr wahrscheinlich. Dies kann an der Substitution des α -Kohlenstoffs liegen, was zu dem geringen Anteil an C in allen Biomassen passt. Den kleinsten Anteil an via C verknüpften Einheiten besitzt SL, was an dem hohen Anteil an S-Einheiten liegen könnte, die in beiden *ortho*-Positionen eine Methoxygruppe besitzen, sodass diese keine 5-5- oder β -5-Kohlenstoffbindungen eingehen können.⁷⁹ Daneben besitzt auch BL einen ähnlich hohen Anteil an S-Einheiten wie SL, was sich wiederum im Anteil von C widerspiegelt, der für beide Lignine in derselben Größenordnung liegt.

Spirodienon-Strukturen (D) werden nur in PL2 detektiert mit ($4,0 \pm 0,1$) Einheiten pro 100 Aromaten, was ebenfalls gut mit Literaturdaten übereinstimmt.⁷¹ Zwar wurde D bereits in Spuren in Ligninen aus den weiteren untersuchten Biomassen beobachtet, allerdings gibt es ebenfalls Studien die keine Hinweise auf diese Unterstruktur finden.^{138, 139, 185} Zimtalkohol-Endgruppen (ZA) finden sich in allen untersuchten Ligninen, während *p*-Coumarat (pCA) und Tricin (T) nur in ML2 und WL vorkommen. Der sehr hohe Anteil an pCA in ML2 führt zu einem sehr ausgedehnten System an konjugierten Doppelbindungen, was die hohe Absorption bei 350 – 370 nm im UV-Vis-Spektrum erklärt (Kapitel 5.3). Auch WL hat in diesem Wellenlängenbereich eine leichte Schulter gezeigt, was diese Vermutung stützt.

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

Tabelle 5-2: Anteile der Monolignole (S, G, H) sowie der am häufigsten vorkommenden Bindungstypen (A, B, C, D) und Substrukturen (ZA, pCA, T) in Ligninen aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

	ML2	SL	WL	PL2	BL
Monolignole [%]					
S	44,9 \pm 0,4	62,7 \pm 0,3	45,1 \pm 0,7	43,8 \pm 1,1	65,8 \pm 0,1
G	48,0 \pm 0,2	34,0 \pm 0,5	46,9 \pm 0,6	53,1 \pm 1,2	34,2 \pm 0,1
H	7,1 \pm 0,4	3,2 \pm 0,3	8,0 \pm 0,2	3,1 \pm 0,3	-
Monolignolverhältnisse [-]					
S/G	0,94 \pm 0,01	1,84 \pm 0,04	0,96 \pm 0,03	0,83 \pm 0,04	1,92 \pm 0,01
H/G	0,15 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	-
Bindungstypen & Substrukturen [Anzahl pro 100 Aromaten (S + G + H)]					
A	25,1 \pm 1,0	37,2 \pm 1,0	23,5 \pm 0,4	31,3 \pm 1,1	35,5 \pm 0,2
B	2,6 \pm 0,1	10,0 \pm 0,5	3,3 \pm 0,1	24,8 \pm 1,3	10,7 \pm 0,1
C	5,6 \pm 0,5	3,6 \pm 0,4	5,6 \pm 0,1	6,8 \pm 0,1	4,3 \pm 0,2
D	-	-	-	4,0 \pm 0,1	-
pCA	27,1 \pm 2,0	-	5,5 \pm 0,2	-	-
T	0,7 \pm 0,2	-	8,3 \pm 0,1	-	-
ZA	8,2 \pm 0,1	4,4 \pm 0,2	5,3 \pm 0,3	3,8 \pm 0,0	2,1 \pm 0,1
Anteil an kondensierten Untereinheiten (KU) [%]					
	24,7 \pm 1,6	26,8 \pm 0,9	27,5 \pm 0,6	53,2 \pm 0,7	29,7 \pm 0,3

S: Syringol; G: Guajakol; H: *p*-Hydroxyphenyl; A: β -Aryl-Ether; B: Resinol; C: Phenylcoumaran; D: Spirodienon; ZA: Zimtalkohol; pCA: *p*-Coumarat; T: Tricin

Die Ergebnisse der HSQC NMR stimmen gut mit denen der UV-Vis- und FTIR-Spektroskopie aus Kapitel 5.3 überein: ML2 und WL konnten bereits mit FTIR- und UV-Vis-Spektroskopie als HGS-Lignine identifiziert werden, während SL und PL2 nur Spuren an H-Einheiten besitzen, die erst mit der HSQC NMR detektiert werden konnten. BL besteht als einziges Lignin nur aus G- und S-Einheiten. Außerdem ließ sich aus den FTIR-Spektren ableiten, dass PL2 den höchsten Gehalt an G-Einheiten der hier untersuchten Lignine besitzt, was ebenfalls durch die HSQC NMR bestätigt wurde. Auch die variierenden Anteile der Bindungen passen zu Literaturangaben und lassen sich zum Teil mit den unterschiedlichen Monolignolanteilen erklären: je mehr S-Einheiten im Lignin vorhanden sind, desto mehr A und desto weniger C liegt vor. SL ist im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal isoliert und charakterisiert worden: seine Monolignolzusammensetzung ähnelt am ehesten der von BL, und auch die Art der detektierten Bindungstypen und Substrukturen passt zu den beiden Laubholzligninen PL2 und BL. Betrachtet man nur die Zusammensetzung der Biomassen (Kapitel 5.1), so schien die Silphie mit ihrem Ligningehalt eher Miscanthus und Weizenstroh zu ähneln.

Überdies geben die HSQC-Spektren nicht nur Aufschluss über die Monolignole, Bindungstypen und Substrukturen, sondern können auch Hinweise auf Verunreinigungen wie Cellulose oder Hemicellulosen liefern. Da im Gegensatz zu den meisten Literaturdaten keine Signale dieser Komponenten gefunden wurden, bestätigt dies die hohe Reinheit der Lignine aus dem genutzten unkatalysierten Organosolv-Prozess. El Hage *et al.* detektierten beispielsweise geringe Mengen an Kohlenhydraten in EtOH-OSL aus Miscanthus via ^{13}C -NMR^{63, 174}, während Vanderghem *et al.* sogar bis zu 14 % Rest-Kohlenhydrate in Miscanthus-Lignin aus einer Ammoniak-Vorbehandlung¹⁸⁶ fanden. Des Weiteren lieferten die Aufschlüsse in dreifacher Wiederholung vergleichbare Ergebnisse, wie die Standardabweichungen der Monolignole, Bindungen und

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

Substrukturen in Tabelle 5-2 zeigen, was erneut die gute Reproduzierbarkeit des Prozesses bestätigt.

5.5 Methoxy- und Ethoxygehalt

Zur Bestimmung des Gehalts an Methoxy- und Ethoxygruppen im Lignin wurde eine Head-space-Gaschromatographie-Massenspektrometrie- (HS-GC-MS) Methode verwendet.^{140, 187} Dabei wird Iodwasserstoff zur Spaltung eben dieser Gruppen genutzt, gefolgt von der Quantifizierung von Methyl- und Ethyliodid mithilfe eines Standards. Auf diese Weise können einige Nachteile der klassischen Iodometrie, wie die komplexe und aufwändige Probenvorbereitung, sowie der Standard-GC-Analyse mit ihrer großen Varianz bei der Probenahme aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Methyljodids umgangen werden.⁸² Sumerskii *et al.* haben die neue Methode mit verschiedenen Lignintypen validiert und mit der klassischen Zeisel-Vieböck-Schwappach-Methode verglichen: die HS-GC-Methode zeigt eine höhere Präzision und Genauigkeit, sowie eine verbesserte Selektivität.¹⁴⁰ Außerdem ist ein höherer Probendurchsatz möglich, was die Analyse von bis zu 40 Proben am Tag ermöglicht. Die mit dieser Methode ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 5-3 dargestellt und liegen in einem ähnlichen Bereich wie die von Sumerskii *et al.* ermittelten Werte für verschiedene Lignine, die für OSL einen Methoxygehalt von 3,78 mmol g⁻¹ und einen Ethoxygehalt von 1,45 mmol g⁻¹ bestimmten.¹⁴⁰ Während Methoxygruppen in der nativen Ligninstruktur vorkommen, entstehen Ethoxygruppen meist erst durch den Aufschluss und weitere Aufarbeitungsschritte bzw. Modifizierungen. Da in dieser Arbeit ein EtOH-Organosolv-Aufschluss zur Ligningewinnung genutzt wird, ist eine Ethoxylierung der OSL wahrscheinlich, und konnte neben den mittels HS-GC-MS gemessenen Ethoxygehalten ebenfalls mithilfe der HSQC NMR nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5.4).

Tabelle 5-3: Ergebnisse der Bestimmung des Methoxy- und Ethoxygehaltes mittels HS-GC-MS der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung der Dreifachbestimmung eines OSL.

	Methoxy (-OCH ₃) [mmol g ⁻¹]	Ethoxy (-OCH ₂ CH ₃) [mmol g ⁻¹]
ML2	2,93 ± 0,11	0,32 ± 0,04
SL	5,49 ± 0,35	0,71 ± 0,14
WL	3,54 ± 0,16	0,35 ± 0,04
PL2	5,10 ± 0,33	0,65 ± 0,12
BL	5,20 ± 0,21	0,55 ± 0,06

In anderen Studien wurde ebenfalls die Methode von Sumerskii *et al.* zur Bestimmung der Methoxygruppen verwendet, allerdings bisher nicht für OSL. Dort finden sich für MWL Werte zwischen 1,25 – 6,3 mmol g⁻¹, für Lignosulfonate liegen sie zwischen 1,63 – 5,59 mmol g⁻¹ und für KL ist der Methoxygehalt am höchsten mit 4,22 – 6,3 mmol g⁻¹.^{188–191}

Von den hier untersuchten OSL besitzt SL den höchsten Gehalt an Methoxygruppen mit (5,49 ± 0,35) mmol g⁻¹, gefolgt von BL mit (5,20 ± 0,21) mmol g⁻¹. Beide besitzen mit über 60 % einen hohen Gehalt an S-Einheiten mit jeweils zwei Methoxygruppen am Aromaten und wenn überhaupt nur Spuren an H-Einheiten. Der geringste Gehalt an Methoxygruppen mit (2,93 ± 0,11) mmol g⁻¹ findet sich in ML2, welches einen niedrigeren Gehalt an S- und einen höheren Gehalt an H-Einheiten besitzt, die keine Methoxygruppen am aromatischen Ring aufweisen. Der deutlich höhere Methoxygehalt in PL2 als in WL lässt sich hingegen nicht eindeutig mit dem Gehalt an S-Einheiten erklären, da WL deutlich mehr davon besitzt als PL2, allerdings

auch 8,0 % an H-Einheiten. Neben einem hohen Gehalt an S-Einheiten könnten auch Methoxygruppen an den α - oder β -Kohlenstoffatomen anstelle aliphatischer Hydroxygruppen für den höheren Methoxygehalt verantwortlich sein. Eine Unterscheidung zwischen aromatischen und aliphatischen Methoxygruppen ist mit der verwendeten Methode allerdings nicht möglich und auch mit anderen Verfahren wie der NMR-Spektroskopie schwierig, da Lignine dort aufgrund der verschiedenen chemischen Umgebungen der einzelnen Gruppen breite Signale aufweisen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass es sich bei der HSQC NMR um eine Relativmethode handelt, während die Methoxygruppen als Absolutwerte bestimmt werden.

Insgesamt lassen sich dennoch wieder zwei Gruppen unterscheiden, sowohl beim Methoxy- als auch beim Ethoxygehalt: die beiden Graslignine ML2 und WL mit einem signifikanten Anteil an H-Einheiten besitzen einen geringeren Gehalt beider Gruppen als die Holzlignine PL2 und BL. SL lässt sich anhand seiner Struktur wieder eher den Holz- als den Grasligninen zuordnen, wie schon in Kapitel 5.4 diskutiert wurde.

5.6 Molmassenverteilung

Die gebräuchlichste Methode zur Untersuchung der Molmassenverteilung von Polymeren ist die GPC. Dabei handelt es sich um eine Relativmethode, bei der das Molekulargewicht der Lignine gegen einen Standard mit definierter Molmassenverteilung ermittelt wird. Ein Nachteil dabei ist das Fehlen von geeigneten Ligninstandards. Des Weiteren hängt die ermittelte Molmasse stark von den Messbedingungen ab (u. a. verwendete Säulen, Eluent, Detektor, Kalibrierstandards, Auswertung).^{89, 161} Um den Einfluss dieser Parameter auf die Ergebnisse der Molmassenbestimmung verschiedener Lignine zu untersuchen, haben Constant *et al.* sechs technische Lignine mit je neun verschiedenen GPC-Methoden untersucht und die Säule (selbst-gepackt, kommerziell), den Eluenten (NaOH, THF, Hexafluoroisopropanol (HFIP)) und, abhängig vom genutzten System, die Kalibrationsstandards (Polystyrol, Natrium-Polystyrolsulfonat, PMMA) variiert.¹³⁹ Aufgrund der Ergebnisse werden kommerzielle Säulen empfohlen, da diese reproduzierbare Ergebnisse liefern, sowie die Kombination mehrerer Säulen, was die Trennleistung verbessert. Daneben bietet NaOH als Eluent im Gegensatz zu THF den Vorteil, dass zum Lösen der Lignine keine Derivatisierung nötig ist. Mit HFIP können sowohl acetylierte als auch unmodifizierte Lignine mit ansonsten gleicher Methode verglichen werden: dabei wäre anzunehmen, dass die Molmasse aufgrund der Acetylierung steigt, dieser Trend ließ sich in den Ergebnissen jedoch nicht eindeutig beobachten. Dies könnte daran liegen, dass verschiedene Hydroxygruppen unterschiedlich acetyliert werden, oder dass HFIP nicht komplett inert gegenüber den (acetylierten) Ligninen ist. All diese Aspekte spielen also bei der Bestimmung der Molmassenverteilung eine Rolle, weshalb es nicht ohne weiteres möglich ist, die hier ermittelten Daten mit Absolutwerten aus der Literatur zu vergleichen, vielmehr können Trends erkannt und diskutiert werden.

Die aus der Molmassenverteilung ermittelten Werte für M_n , M_w und den PDI der Lignine aus verschiedenen Biomassen sind in Abbildung 5-9 und Tabelle 5-4 gegenübergestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass ML2 jeweils die niedrigsten Werte für alle drei Parameter aufweist, gefolgt von SL und WL, die sich nur in ihrem M_n unterscheiden. Die beiden Holzlignine PL2 und BL unterscheiden sich ebenfalls nur in ihrem M_n und besitzen jeweils die höchsten Molmassen. Beim PDI unterscheidet sich nur ML2 signifikant von den anderen vier Ligninen.

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

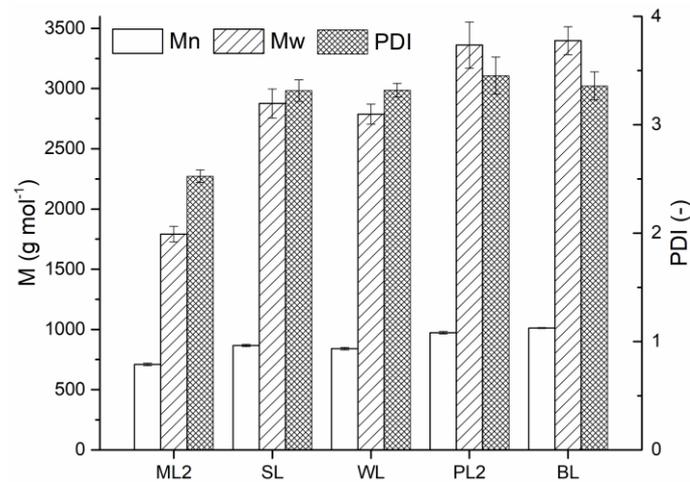


Abbildung 5-9: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

In der oben bereits erwähnten Studie von Constant *et al.* wurde unter anderem auch EtOH-OSL aus Weizenstroh mit verschiedenen GPC-Methoden untersucht und eignet sich daher gut für einen Vergleich mit dem in dieser Arbeit isolierten WL. Die Messungen in NaOH ergaben Werte für M_w im Bereich von 1720 – 2700 g mol^{-1} sowie für M_n im Bereich von 400 – 1160 g mol^{-1} , während in THF deutlich kleinere Werte ermittelt wurden ($M_w = 590 – 1820 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 230 – 890 \text{ g mol}^{-1}$). Der PDI schwankte allerdings bei den Messungen in NaOH (1,7 – 6,2) deutlich stärker als bei jenen in THF (2,0 – 2,6).¹³⁹ Das für WL ermittelte M_w von $(2788 \pm 83) \text{ g mol}^{-1}$ ist etwas höher, M_n ($840 \pm 10 \text{ g mol}^{-1}$) und PDI ($3,32 \pm 0,06$) liegen jedoch im Bereich der Literaturangaben. Die Unterschiede können neben den unterschiedlichen Methoden zudem auch an den leicht variierenden Aufschlussbedingungen der OSL liegen. Ein in der Literatur oft untersuchtes OSL aus Weizenstroh ist BioligninTM, welches von CIMV über einen Aufschluss in organischen Säuren isoliert wird. Je nach Messbedingungen findet sich auch hier ein großer Bereich an Vergleichsdaten, je nachdem ob in NaOH ($M_w = 11143 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 1051 \text{ g mol}^{-1}$; PDI = 10,6)¹⁰⁹, in THF nach Acetylierung ($M_w = 31890 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 1660 \text{ g mol}^{-1}$; PDI = 19,2)¹⁷⁸, oder in THF nach Behandlung mit Acetylbromid ($M_w = 4600 \text{ g mol}^{-1}$, $M_n = 920 \text{ g mol}^{-1}$, PDI = 5,0)¹⁸⁰ gemessen wird.

Für EtOH-OSL aus Miscanthus liegen Literaturwerte für M_w im Bereich von 1300 – 2720 g mol^{-1} und für den PDI zwischen 1,64 – 2,03.^{62, 68, 192} Diese wurden jedoch alle in THF als Eluent gegen Polystyrol ermittelt (teilweise nach Acetylierung), was die geringeren Absolutwerte erklären könnte. SL liefert von den gras- bzw. krautartigen Ligninen das höchste Molekulargewicht sowie den höchsten PDI. Literaturdaten zur Molekulargewichtsverteilung von Lignin aus Silphie liegen bisher nicht vor, sodass eine Einordnung schwierig ist. Bei den Strukturuntersuchungen in den Kapiteln 5.3, 5.4 und 5.5 zeigt sich, dass SL in seinen Eigenschaften eher den Holzligninen ähnelt, die allerdings noch höhere Molekulargewichte zeigen. Für OSL aus Paulownia konnte lediglich ein Referenzwert gefunden werden, allerdings handelt es sich dabei um ein Formosolv-Lignin mit einem deutlich höheren Molekulargewicht ($M_w = 44459 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 3589 \text{ g mol}^{-1}$; PDI = 12,4)⁷¹ im Vergleich mit PL2. Die Gründe hierfür könnten zum einen die abweichende GPC-Methode (Dimethylformamid mit 0,1% Lithiumbromid als Eluent), zum anderen der Aufschlussprozess sein. Wie bereits die Literaturdaten für WL gezeigt haben, scheint ein Aufschluss in organischen Säuren zu höheren Molekulargewichten zu führen (siehe Vergleich von WL mit BioligninTM). BL besitzt ein ähnlich hohes Molekulargewicht wie PL2. Hier

gibt es wieder einen großen Bereich an Literaturwerten für EtOH-OSL aus Buche: für M_w finden sich Werte im Bereich von 1502 – 4303 g mol^{-1} , das M_n liegt zwischen 558 – 1368 g mol^{-1} und der PDI bei 2,69 – 3,14 gemessen in THF ohne Acetylierung der Lignine^{184, 193}, während in DMSO mit 0,075 M NaNO_3 höhere Molmassen ($M_w = 4256 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 2198 \text{ g mol}^{-1}$), aber ein geringerer PDI (1,80)⁷⁴ beschrieben wird. Obwohl die Absolutwerte der Molmassen also stark von der verwendeten GPC-Methode abhängen, liegen die hier ermittelten Werte in einer realistischen Größenordnung. Des Weiteren zeigen alle drei Wiederholungen des Aufschlussprozesses vergleichbare Molekulargewichte, was erneut hervorhebt, dass der Isolationsprozess zu reproduzierbaren und zuverlässigen Ergebnissen führt.

Tabelle 5-4: Molmassenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

	M_n (g mol^{-1})		M_w (g mol^{-1})		PDI [-]	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
ML2	710 \pm 10	(a)	1792 \pm 65	(a)	2,53 \pm 0,06	(a)
SL	868 \pm 10	(c)	2876 \pm 121	(b)	3,31 \pm 0,06	(b)
WL	840 \pm 10	(b)	2788 \pm 83	(b)	3,32 \pm 0,06	(b)
PL2	973 \pm 11	(d)	3361 \pm 193	(c)	3,45 \pm 0,17	(b)
BL	1012 \pm 4	(e)	3398 \pm 117	(c)	3,36 \pm 0,13	(b)

Neben den aus der Molekulargewichtsverteilung berechneten Mittelwerten ist auch die Verteilung selbst interessant: in Abbildung 5-10 sind die Molmassenverteilungen der verschiedenen Lignine zu sehen. Alle besitzen im Bereich von 325 – 365 g mol^{-1} ein erstes Maximum, was für einen hohen Gehalt an kleinen Molekülen wie Dimeren spricht. ML2 hat jedoch als einziges Lignin eine deutlich bimodale Verteilung mit dem höchsten Massenanteil an Molekülen mit einem Molekulargewicht $< 1000 \text{ g mol}^{-1}$. Ein zweiter, deutlich breiterer Peak liegt für ML2, SL und WL bei 1230 – 1240 g mol^{-1} , zudem besitzt ML2 noch eine leichte Schulter bei 600 – 650 g mol^{-1} . BL und PL2 besitzen ihr Maximum bei höheren Molmassen zwischen 1490 – 1645 g mol^{-1} . Daneben besitzt WL als einziges der Lignine noch einen kleinen, sehr breiten Peak bei ca. 28 100 g mol^{-1} .

Insgesamt unterscheidet sich das M_n aller Lignine signifikant voneinander, während beim M_w zumindest drei Gruppen (ML2; SL & WL; BL & PL2) identifiziert werden können. Der PDI ist für ML2 am niedrigsten, für die anderen vier Lignine liegt er dagegen in derselben Größenordnung. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sich die Holzlignine anhand ihrer Molekulargewichte wieder gut von den Gras- und Krautligninen abgrenzen lassen, während es innerhalb der letzteren deutlichere Unterschiede gibt. SL ähnelt in seiner Molmassenverteilung am ehesten WL, und nicht wie bei der strukturellen Charakterisierung in Kapitel 5.4 und Kapitel 5.5 beobachtet den Holzligninen.

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

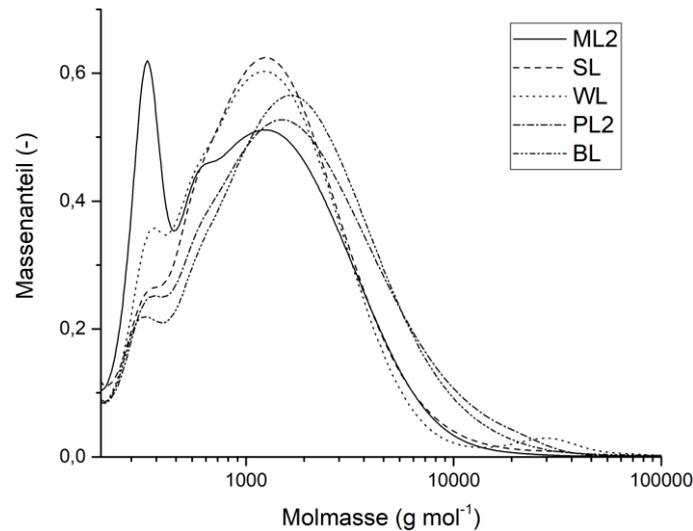


Abbildung 5-10: Molmassenverteilungen der Lignine aus verschiedenen Biomassen.

5.7 Antioxidanz und Phenolgehalt

Zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften existiert eine Vielzahl verschiedener Methoden (siehe Kapitel 2.2.4). Hier werden die vier meistgenutzten Assays zur Untersuchung von Lignin verwendet: dabei wird mit dem DPPH-, ABTS- und FRAP-Assay die *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) bestimmt, sowie mit dem FC-Assay der Gesamtphenolgehalt (*total phenol content*, TPC). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-11 dargestellt, die zugehörigen Rohdaten finden sich in Tabelle A 4 im Anhang.

Für den DPPH- und ABTS-Assay wird jeweils vor der Berechnung des TEAC-Wertes die Aktivität als Radikalfänger (*radical scavenging activity*, RSA) bestimmt (siehe Tabelle A 5). Dieser Wert kann hilfreich sein, um Lignine miteinander zu vergleichen, aber nur so lange wie die Konzentration der Proben und die Messbedingungen identisch sind.¹²³ Aus diesem Grund findet sich in der Literatur eine große Spannweite an RSA-Werten, abhängig von der Art der Biomasse und/oder dem Isolationsprozess: für ML2 liegen Vergleichswerte zwischen 20 – 78 %^{66, 179}, für WL bei 10 – 87 %^{105, 145}, sowie 5 – 64 % für BL^{141, 194} für den DPPH-Assay. Eine andere Auswertemethode ist die Berechnung des IC₅₀-Wertes, die allerdings deutlich zeitaufwendiger ist, da von jeder Ligninprobe eine Konzentrationsreihe vermessen werden muss, um die benötigte Konzentration zu bestimmen, bei der 50 % des jeweiligen Radikals abgefangen wird.¹⁰⁴ In dieser Arbeit wird daher Trolox als Standard zur Aufnahme einer Kalibrationsgeraden verwendet, die für alle Lignine genutzt werden kann. Dies ist zeitsparend, wenn viele Proben wiederholt vermessen werden sollen, da nicht mit jedem Lignin eine eigene Kalibrationsreihe angesetzt werden muss. Die Kalibration mit Trolox ist das Standardverfahren für den ABTS-Assay¹⁹⁴, funktioniert aber genauso gut für den DPPH- und FRAP-Assay.¹²³ Es gibt nur eine weitere Studie, die diese drei Assays mit Trolox als Standard zur Charakterisierung von Ligninen verwendet hat: Sun *et al.* nutzten einen *steam explosion* Prozess, gefolgt von einem alkalisch-ethanolischen Aufschluss um Lignin aus Bambus zu extrahieren, und ermittelten TEAC-Werte von 0,282 – 0,447 $\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin für den DPPH-, 1,485 – 2,273 $\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin für den ABTS- und 0,579 – 0,767 $\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin für den FRAP-Assay.¹⁹⁵ Gong *et al.* untersuchten Essigsäure-Lignin und MWL aus Bambus und ermittelten TEAC-Werte von 0,265 – 0,633 $\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin für den DPPH- sowie 0,819 – 1,441 $\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin für den ABTS-Assay.¹⁹⁶ Diese Werte sind leicht höher als die in dieser Arbeit ermittelten Werte, was

sich durch Unterschiede in der verwendeten Biomasse und im Aufschlussprozess erklären lässt, aber auch mit variierenden Messbedingungen und Umwelteinflüssen bei den Assays.

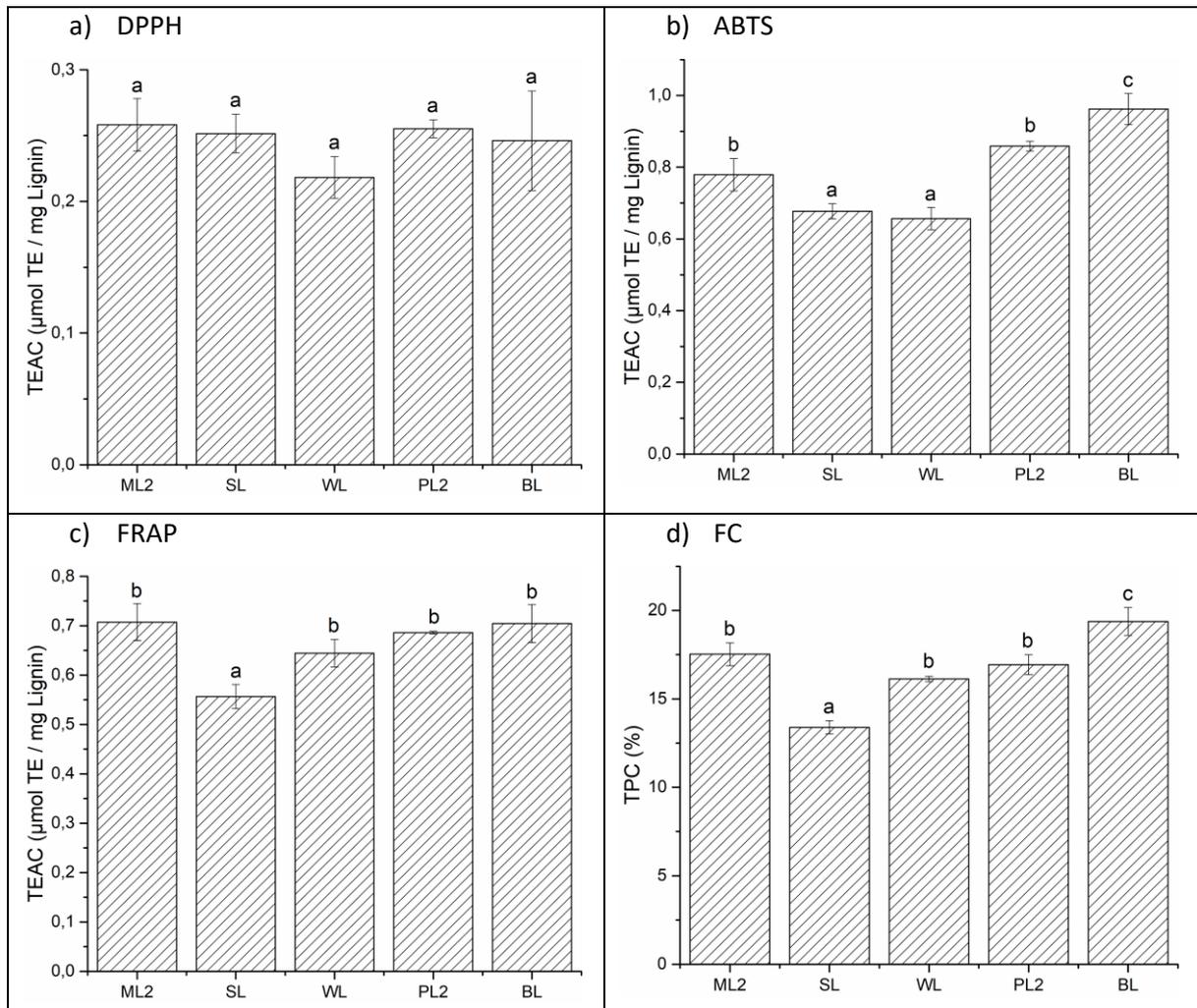


Abbildung 5-11: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

Bei ML2 handelt es sich wie bei WL um ein Graslignin, allerdings ähnelt es eher den Holzligninen und lässt sich in allen Assays nicht von PL2 unterscheiden. Für PL2 ebenso wie für SL existieren bisher allerdings noch keine Vergleichsdaten in der Literatur, beide wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal in Hinblick auf ihre antioxidativen Eigenschaften charakterisiert. Da es sich bei PL2 genauso wie bei BL um ein Hartholzlignin handelt, werden ähnliche Ergebnisse für beide erwartet: im DPPH- und FRAP-Assay zeigen sie keinen signifikanten Unterschied, im ABTS- und FC-Assay dagegen schon. SL ähnelt am ehesten WL: beide sind nur im FRAP- und FC-Assay zu unterscheiden, während es im DPPH- und ABTS-Assay keine signifikanten Unterschiede gibt. Damit zeigt sich für die antioxidative Kapazität ein etwas anderer Trend, als in den vorherigen Kapiteln beobachtet: während bei den Strukturuntersuchungen sowie dem Molekulargewicht SL eher den Holz- als den Grasligninen ähnelte, ist es hier ML2, welches abweicht.

Vergleicht man die Absolutwerte, die mit den verschiedenen Assays ermittelt wurden, sind diese für den ABTS-Assay am höchsten und für den DPPH-Assay am geringsten, was nicht nur

5. Lignine aus verschiedenen Biomassen

für Lignine sondern auch für Früchte¹⁹⁷, Gemüse¹⁹⁸ oder Öle¹⁹⁹ üblich ist. Der Grund dafür ist die höhere Sensitivität des ABTS-Assays.¹²³ Die TPC-Werte stimmen ebenfalls mit Literaturdaten überein, wo Angaben zwischen 15,6 – 32,3 % für OSL gemacht werden.^{107, 200} Neben dem Vergleich der Absolutwerte werden Standard-Scores (Abbildung 5-12) berechnet, die per Definition einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1 besitzen. Auf diese Weise erhält man einen einheitenlosen Wert, wodurch die Ergebnisse der verschiedenen Assays für jede einzelne Biomassen besser verglichen und beurteilt werden können. WL und SL zeigen fast ausschließlich negative Standard-Scores, während PL2 und BL nur positive Standard-Scores besitzen. Durch diese Darstellung werden außerdem die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der vier Assays besser ersichtlich: FRAP- und FC-Assay zeigen für alle Lignine die gleichen Tendenzen, während es gerade für BL und SL große Unterschiede zwischen dem DPPH- und den anderen drei Assays gibt. Diese Zusammenhänge spiegeln auch gut die Korrelationen zwischen den verschiedenen Assays wider, wenn alle Lignine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, betrachtet werden (Tabelle A 6 im Anhang). Das höchste R^2 findet sich zwischen dem FRAP- und FC-Assay ($R^2 = 0,944$), während auch der ABTS-Assay gut mit dem FRAP- ($R^2 = 0,763$) und FC-Assay ($R^2 = 0,757$) korreliert. Der DPPH-Assay zeigt dagegen nur schwache Zusammenhänge mit dem FRAP- ($R^2 = 0,447$), FC- ($R^2 = 0,440$) und ABTS-Assay ($R^2 = 0,326$). Des Weiteren besitzt der DPPH-Assay den höchsten Variationskoeffizienten (CV) von 5,30 % (Vgl. Tabelle A 1 im Anhang) und ist am wenigsten selektiv, da er, wie Abbildung 5-11 zu entnehmen ist, nicht zwischen den fünf OSL unterscheiden kann. Mit dem FRAP-Assay (CV = 0,74 %) kann nur SL von den restlichen vier OSL unterschieden werden, während mit dem ABTS- (CV = 0,25 %) und FC-Assay (CV = 1,14 %) sogar drei verschiedene Gruppen identifiziert werden können.

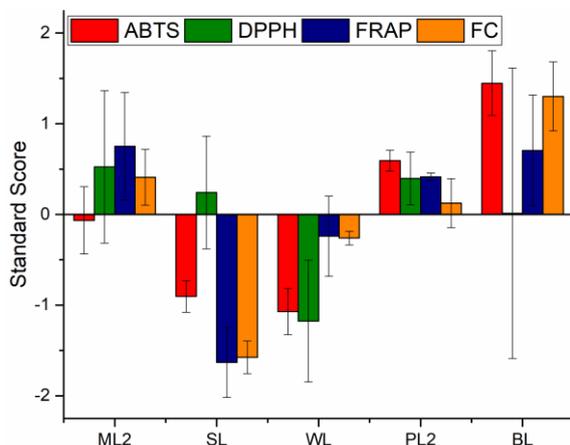


Abbildung 5-12: Vergleich der Standard-Scores der Lignine aus verschiedenen Biomassen mit vier verschiedenen Assays, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

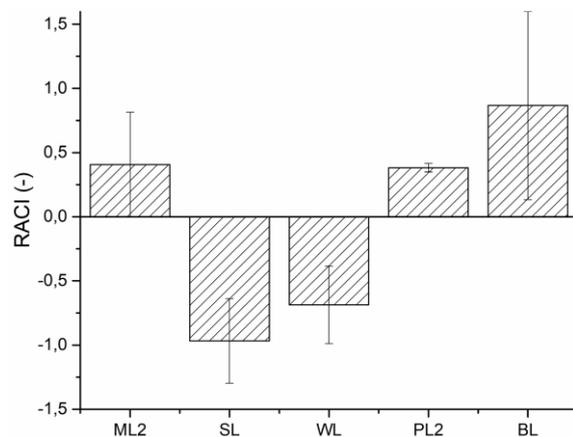


Abbildung 5-13: Relativer Index der antioxidativen Kapazität (*relative antioxidant capacity index*, RACI) der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Durch die Mittelung aller Assays mithilfe des relativen Index der antioxidativen Kapazität (*relative antioxidant capacity index*, RACI) (Abbildung 5-13) können zwei Gruppen unterschieden werden: PL2, BL und ML2 zeigen eine höhere antioxidative Kapazität als SL und WL. Obwohl es sich bei ML2 um ein Graslignin handelt, wird hier noch mal deutlich, dass es in seiner antioxidativen Kapazität eher mit den Holzligninen vergleichbar ist. Da es sich bei dem RACI um einen Durchschnittswert handelt, stellt er keine spezifische antioxidative Eigenschaft dar, sondern nur ein Ranking.¹⁴³ Wenn es darum geht, die verschiedenen Mechanismen zu unter-

suchen, die bei der antioxidativen Wirkung der Lignine eine Rolle spielen, ist es nicht sinnvoll, die Ergebnisse mehrerer Assays zu einem einzigen Wert zusammenzufassen. Wenn allerdings ein einfacher Maßstab gebraucht wird, um ein Lignin zu identifizieren, das am geeignetsten für eine bestimmte Anwendung ist, z.B. als Antioxidans, kann der RACI bei der Entscheidungsfindung hilfreich sein. Nichtsdestotrotz ist es unvermeidbar, mehrere Assays zu nutzen, um die unterschiedlichen Aspekte der antioxidativen Kapazität abzubilden und eine aussagekräftige Einordnung der antioxidativen Wirksamkeit zu erhalten.

5.8 Zusammenfassung

Anhand der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse konnte zunächst gezeigt werden, dass der genutzte katalysatorfreie Organosolv-Aufschluss zur reproduzierbaren Ligningewinnung geeignet ist, was einen grundlegenden Aspekt für die weitere Verwertung von Ligninen darstellt. Zum ersten Mal wurden Lignine aus *Silphium perfoliatum* isoliert, einer Low-Input-Pflanze, die genau wie Miscanthus für den Anbau auf EFAs im Greening geeignet ist. Die chemische Biomassezusammensetzung von Silphie ist ähnlich zu der der untersuchten Gräser *Miscanthus x giganteus* und Weizenstroh, die einen geringeren Ligningehalt als die Hölzer *Paulownia tomentosa* und Buche besitzen. Trotzdem ist die prozentuale Ligninausbeute für die gras- und krautartigen Pflanzen höher als für die Hölzer. Betrachtet man die Ligninstruktur, so ähnelt SL in seinem Monolignolverhältnis am ehesten BL, besitzt im Gegensatz zu BL allerdings ähnlich wie PL2 auch Spuren an H-Einheiten. ML2 und WL weisen einen höheren Gehalt an H-Einheiten auf sowie Anteile an pCA und T, die sich nur in diesen beiden Ligninen detektieren lassen. Eine ähnliche Gruppierung der Lignine lässt sich auch anhand des Gehalts an Methoxy- und Ethoxygruppen feststellen, von denen in ML2 und WL ein geringerer Anteil vorhanden ist als bei SL, PL2 und BL. Beim Molekulargewicht zeigt sich ein etwas anderer Trend: die Holzlignine PL2 und BL besitzen das höchste M_n und M_w , während SL am ehesten WL ähnelt und ML2 die niedrigsten Molmassen aller Lignine aufweist. Alle diese strukturellen Unterschiede können einen Einfluss auf die Eigenschaften der Lignine haben, wie z.B. auf die antioxidative Kapazität. Diese wird mithilfe vier verschiedener Assays bestimmt, wobei PL2 und SL zum ersten Mal in Hinblick auf diese Eigenschaft untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Holzlignine BL und PL2 höhere TEAC- und TPC-Werte besitzen als die gras- bzw. krautartigen Lignine WL und SL. Hier stellt nun ML2 als Graslignin eine Ausnahme dar, da es mit seiner antioxidativen Kapazität eher den Holzligninen ähnelt. Insgesamt kann durch die Kombination der vier Assays gezeigt werden, dass alle untersuchten OSL gute antioxidative Kapazitäten besitzen und somit für potenzielle Anwendungen als Antioxidantien geeignet sind.

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

In diesem Kapitel wird untersucht, ob die Partikelgröße der für den Organosolv-Aufschluss verwendeten Biomasse einen Einfluss auf die Ausbeute, Struktur, Molmasse und antioxidative Kapazität der Lignine hat. Dafür werden sowohl Miscanthus (Gras) als auch Paulownia (Holz) nach dem Mahlprozess mittels Siebung in drei verschiedene Fraktionen unterteilt und diese jeweils drei Mal aufgeschlossen. Auf die generellen Unterschiede zwischen den Ligninen aus den beiden Pflanzen sowie die verwendeten Analysemethoden wird nicht noch einmal im Detail eingegangen, da beides bereits in Kapitel 5 diskutiert wird. Die in Kapitel 6 vorgestellten Ergebnisse sind teilweise veröffentlicht in:

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y. B.; Schulze, M. Extraction of High-Purity Lignins via Catalyst-free Organosolv Pulping from Low-Input Crops. **2020**, *Biomacromolecules* 21 (5), 1929. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00123

6.1 Ausbeute der Lignine

Die Ausbeuten an Lignin angegeben in Prozent (bezogen auf den Ligningehalt der jeweiligen Biomasse, siehe Tabelle 5-1) sind in Abbildung 6-1 dargestellt. Alle Aufschlüsse wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt und führen zu vergleichbaren Ausbeuten mit absoluten Fehlern zwischen 0,3 % (ML3) und 1,2 % (ML2).

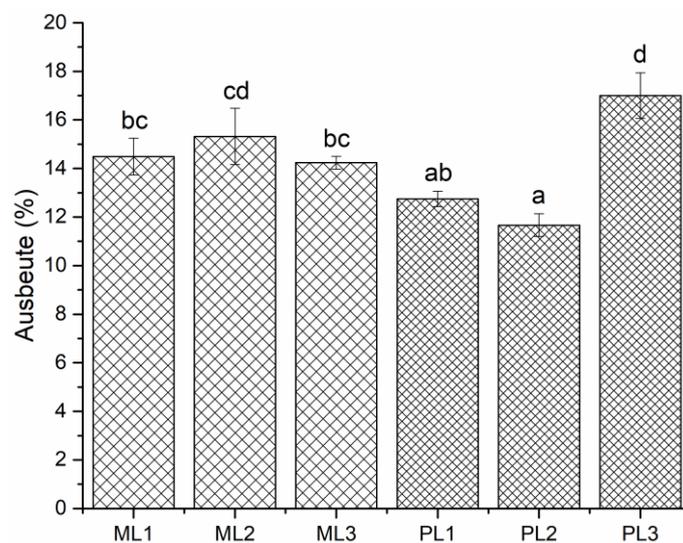


Abbildung 6-1: Vergleich der Ligninausbeute beim Organosolv-Aufschluss von Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

Bei den Ligninen aus Miscanthus kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Ausbeuten aus verschiedenen Partikelgrößen der Biomassen festgestellt werden, diese liegen zwischen $(14,2 \pm 0,3)$ % für ML3 und $(15,3 \pm 1,2)$ % für ML2. Die Ligninausbeute des Organosolv-Aufschlusses von Paulownia liegt für die mittlere Fraktionen PL2 mit $(11,7 \pm 0,5)$ % signifikant niedriger und für die kleinste Fraktion PL3 mit $(17,0 \pm 0,9)$ % deutlich höher als die der MLs. Ein eindeutiger Trend zwischen Partikelgröße der Biomasse und der Ligninausbeute kann nicht festgestellt werden und auch in der Literatur finden sich nicht immer klare Zusammenhänge. Im Allgemeinen führt eine kleinere Partikelgröße zu einer Zunahme der spezifischen Oberfläche und damit zu einer kürzeren Strecke für den Stofftransport^{162, 201}, was allerdings

hier nur für Paulownia, und nicht für Miscanthus beobachtet werden kann. Vergleichsdaten für Paulownia lassen sich nicht finden, allerdings gibt es Studien mit Buchenholz, bei dem es sich ebenfalls um ein Laubholz handelt. Zhou *et al.* untersuchten den Effekt der Partikelgröße bei der *fast pyrolysis* von Buchenholz und konnten die Ausbeute von 5 % für 14 mm auf 12 % für 0,3 mm erhöhen.¹⁶⁴ Hundt *et al.* untersuchten ebenfalls Buchenholz mit variierender Partikelgröße (0,1 – 1 mm; 2 – 4 mm; 4 – 6,3 mm), nutzten allerdings einen alkalischen Polyol-Aufschluss.²⁰² Zwar wurde nicht explizit die Ligninausbeute bestimmt, sondern nur der Ligningehalt des Zellstoffs nach dem Aufschluss, allerdings mit einem gegenläufigen Trend: je größer die verwendete Partikelgröße, desto geringer der Restligningehalt, sprich desto mehr Lignin konnte aus den Fasern gelöst werden. Der Einfluss der Partikelgröße (< 10 mm; < 4 mm; < 0,5 mm) auf den EtOH-Organosolv-Aufschluss von grasartigen Pflanzen, hier Weizenstroh, wurde von Wildschut *et al.* untersucht, allerdings ebenfalls ohne einen eindeutigen Trend.¹⁵⁹ Insgesamt ist der Einfluss der Partikelgröße schwierig einzuordnen, vor allem bei Angaben von „kleiner als“, da diese unspezifisch sind und sich die Größenverteilung innerhalb der Fraktion trotzdem unterscheiden kann.²⁰³ Bei der Zerkleinerung spielen vor allem die gewählte Mühle und die Art der Biomasse eine Rolle, sodass bei Miscanthus und Paulownia trotz gleicher Siebfraction eine unterschiedliche Verteilung nicht ausgeschlossen werden kann. Neben einem möglichen Einfluss der Partikelgröße auf die Ausbeute lässt sich zudem ein Einfluss auf die Ligninstruktur (Kapitel 6.2 und Kapitel 6.3) sowie auf die Molmasse (Kapitel 6.5) feststellen, wie im Folgenden diskutiert wird.

6.2 Qualitative Strukturuntersuchung

Die UV-Vis-Spektren der Lignine aus Miscanthus (Abbildung 6-2) und Paulownia (Abbildung 6-3) mit variierender Partikelgröße sind sich sehr ähnlich und zeigen keine deutlichen Unterschiede.

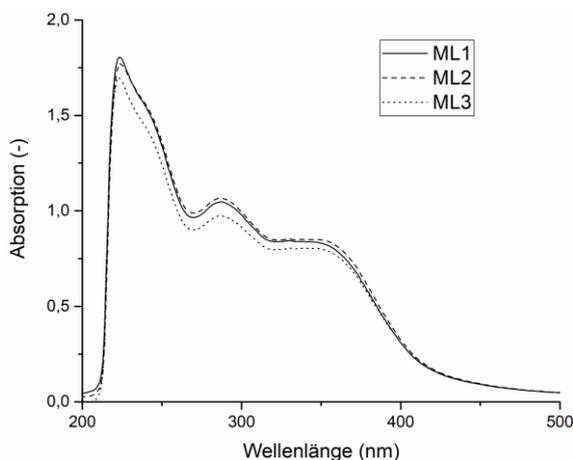


Abbildung 6-2: UV-Vis Spektren der Lignine aus Miscanthus mit variierender Partikelgröße, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten.

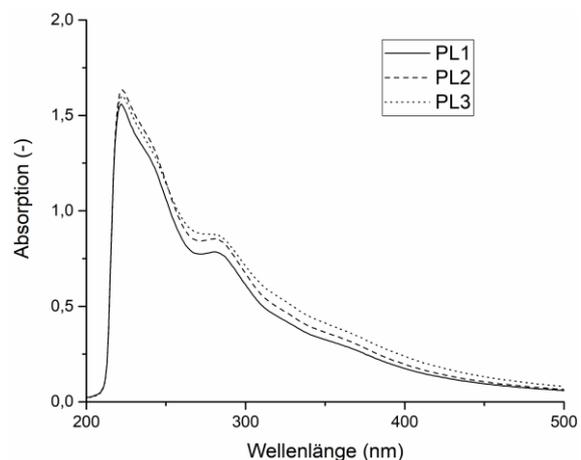


Abbildung 6-3: UV-Vis Spektren der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten.

Bei den MLs sind jeweils zwei Peaks (223 – 224 nm; 286 – 288 nm) und zwei Schultern (231 – 243 nm; 350 – 370 nm) vorhanden, während die PLs jeweils zwei Peaks (221 – 222 nm; 276 – 280 nm) und eine Schulter (232 – 243 nm) zeigen. Die grundsätzlichen Unterschiede zwischen den Biomassen sind also erkennbar, wie der Shift der unkonjugierten phenolischen

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

Gruppen von 286 – 288 nm (ML) zu 276 – 280 nm (PL) und die zusätzliche Schulter bei 330 – 331 nm bei den MLs, ein Einfluss der Partikelgröße auf die Struktur lässt sich mit der UV-Vis-Spektroskopie allerdings nicht beobachten.

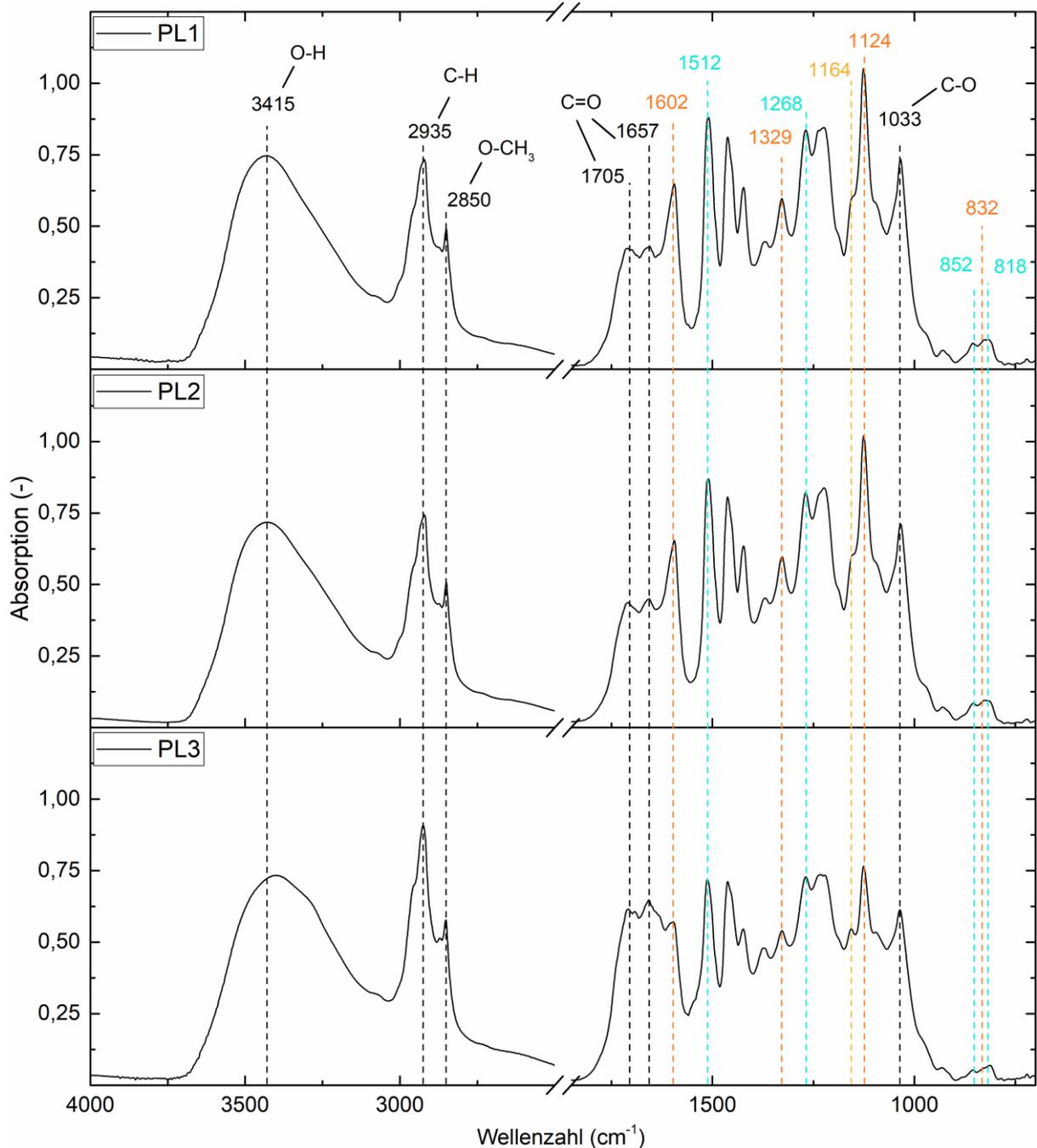


Abbildung 6-4: FTIR-Spektren der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).

Als weitere spektroskopische Methode zur qualitativen Strukturuntersuchung wurden FTIR-Messungen durchgeführt. Eine detaillierte Zuordnung der Signale ist in Tabelle A 2 im Anhang zu finden. Für die MLs ist auch hier kein Unterschied bei der variierenden Partikelgröße festzustellen (siehe Abbildung A 2): bei allen Ligninen sind dieselben Signale zu beobachten, lediglich mit geringen Intensitätsunterschieden. Anders ist es bei den PLs (siehe Abbildung 6-4): hier sind zwischen PL3 und den beiden größeren Siebfraktionen PL1 und PL2 Unterschiede zu

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

erkennen. Zum einen sind die Signale der G- (1512 cm^{-1}) und vor allem der S-Einheiten (1602 cm^{-1} ; 1329 cm^{-1} , 1124 cm^{-1}) in PL3 weniger stark ausgeprägt als in den anderen beiden PLs, zum anderen ist die C=O Streckschwingung in konjugierten Estergruppen, die auf ein HGS-Lignin hindeutet, bei $1164 - 1166\text{ cm}^{-1}$ in PL3 deutlicher zu erkennen, während PL1 und PL2 nur eine leichte Schulter zeigen. Da sich dieses Signal allerdings mit der C-H Deformationschwingung der S-Einheiten bei 1124 cm^{-1} überschneidet, könnte es auch lediglich an der Abnahme des S-Signals liegen, dass das HGS-Signal als ausgeprägter wahrgenommen wird. Im folgenden Kapitel 6.3 wird die Monolignolzusammensetzung mithilfe der HSQC NMR semi-quantitativ bestimmt, die FTIR-Spektren geben allerdings schon einen ersten Hinweis auf eine andere Monolignolzusammensetzung von PL3, mit geringerem G- und S- sowie einem möglicherweise höherem H-Anteil. Dabei wäre jedoch nicht davon auszugehen, dass die Zunahme der H-Einheiten durch eine Abspaltung der Methoxygruppen am Ring der G- und S-Einheiten verursacht wird, sondern durch eine bessere Zugänglichkeit zu verschiedenen Pflanzenteilen durch den Mahlprozess, in denen sich Ligningehalt und -struktur unterscheiden können. Zinovjev *et al.* untersuchten diesen Effekt bei der Extraktion von MWL und stellten fest, dass die Ligninextraktion bei den Mittellamellen beginnt und mit fortschreitender Mahldauer auch aus der Sekundärzellwand möglich ist.¹⁸⁸

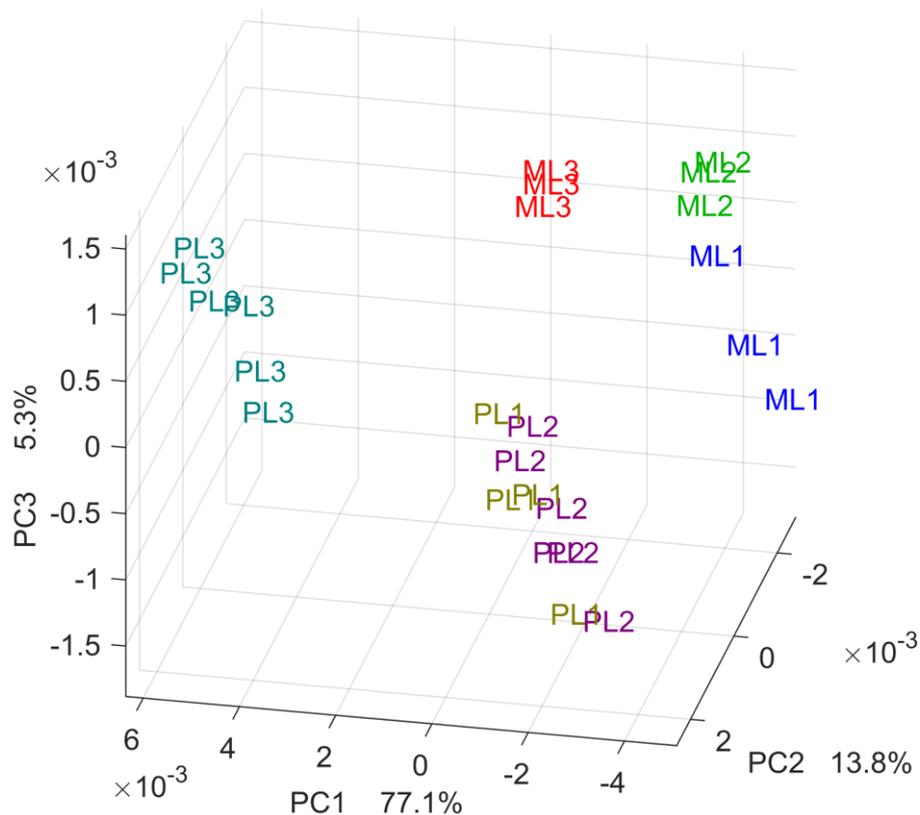


Abbildung 6-5: Hauptkomponentenanalyse der ¹H-NMR-Daten der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße.

Einen weiteren Hinweis auf strukturelle Unterschiede zwischen den Ligninen aus verschiedenen Partikelgrößen liefert die Hauptkomponentenanalyse der ¹H-NMR-Daten (Abbildung 6-5). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich wie zu erwarten die beiden Biomassen unterscheiden, aber auch, dass es innerhalb der Biomassen Unterschiede zwischen den Partikelgrößen gibt: die kleineren Partikelgrößen ML3 und PL3 weichen von den größeren Partikelgrößen ML1 und

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

ML2 bzw. PL1 und PL2 ab. Damit kann dieser Trend erstmals auch für die MLs beobachtet werden, auch wenn der Unterschied nicht so groß scheint wie bei den PLs.

Da in der Literatur bisher Vergleichsdaten zum Einfluss der Partikelgröße auf die Ligninstruktur fehlen und mithilfe der in diesem Kapitel diskutierten Methoden noch keine quantifizierbaren Werte ermittelt werden können, werden die Ergebnisse im Kontext mit den Monolignolverhältnissen, Bindungen und Substrukturen in Kapitel 6.3 diskutiert.

6.3 Monolignolverhältnisse, Bindungstypen und Substrukturen

Nachdem mit den in Kapitel 6.2 angewandten Methoden bereits Unterschiede zwischen den Ligninen aus gleicher Biomasse, aber variierender Partikelgröße festgestellt werden konnten, sollen diese nun mithilfe der HSQC NMR quantifiziert werden. Die aus den Spektren (Abbildung A 3 und Abbildung A 4 im Anhang) bestimmten Monolignolverhältnisse sind in Abbildung 6-6 zu sehen, die ermittelten Bindungstypen und Substrukturen in Abbildung 6-7. Eine Zusammenfassung der Werte findet sich in Tabelle 6-1. Eine detaillierte Zuordnung der HSQC NMR Signale ist im Anhang in Tabelle A 3 zu finden.

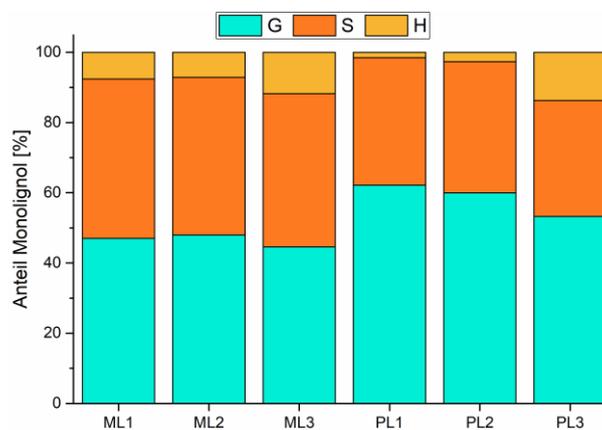


Abbildung 6-6: Anteil der Monolignole (siehe Abbildung 5-3) in Ligninen aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße.

Die MLs bestehen aus allen drei Monolignolen, wobei das S/G-Verhältnis zwischen $(0,94 \pm 0,01)$ für ML2 und $(0,98 \pm 0,04)$ für ML3 variiert und gut mit Literaturdaten übereinstimmt, wie bereits in Kapitel 5.4 diskutiert wurde. Während sich ML1 und ML2 in ihrer Zusammensetzung sehr ähneln, wird in ML3 ein etwas höherer Anteil an H-Einheiten detektiert. Ähnliches lässt sich auch bei den PLs beobachten: in PL1 und PL2 sind nur Spuren an H-Einheiten vorhanden, während PL3 mit $(17,2 \pm 0,4)$ % einen deutlich höheren Anteil dieser enthält. Bei beiden Biomassen nimmt für die kleinste Partikelgröße (ML3, PL3) das H/G-Verhältnis deutlich zu, während es sich für die größeren Partikelgrößen (ML1/ML2, PL1/PL2) nicht signifikant unterscheidet. Dies bestätigt die zumindest bei den PLs beobachteten Unterschiede in den FTIR-Spektren. Eine Erklärung, warum diese Tendenz bei den MLs nicht zu beobachten war, ist die Tatsache, dass auch in ML1 und ML2 schon ein größerer Anteil an H-Einheiten vorhanden ist, sodass alle FTIR-Spektren das HGS-Signal zeigen. Beim S/G-Verhältnis gibt es keinen einheitlichen Trend: bei den drei MLs ist kein Unterschied festzustellen, während es für PL3 deutlich höher ist als für PL1 bzw. PL2.

Bei den Bindungen und Substrukturen lassen sich ebenfalls Tendenzen erkennen: sowohl bei ML3 als auch bei PL3 wird ein etwas geringerer Anteil an Phenylcoumaran (C) detektiert als in ML1 und ML2 bzw. PL1 und PL2. Bei den MLs ist zudem eine geringere Anzahl an Resinolstruk-

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

turen (B) bei der kleinsten Partikelgröße festzustellen, während bei den β -Aryl-Etherbindungen (A) kein Trend zu sehen ist. Bei den PLs ist dies umgekehrt: mit kleinerer Partikelgröße der Biomasse nimmt die Anzahl an A ab bei fast konstantem Anteil an B. Spirodienon (D) findet sich wie erwartet nur in den PLs, unabhängig von der Partikelgröße in ähnlichen Anteilen. Insgesamt ist der Anteil an kondensierten Untereinheiten (KU) in den PLs deutlich höher, ein Trend abhängig von der Partikelgröße ist allerdings nicht festzustellen. Bei den MLs dagegen befinden sich ML1 und ML2 erneut in der gleichen Größenordnung, während ML3 nur noch ca. halb so viel KUs enthält. Tricin (T) und *p*-Coumarat (pCA) sind nur in den MLs vorhanden, allerdings unabhängig von der Partikelgröße. Zimtalkohol-Endgruppen (ZA) sind in allen Ligninen außer PL3 vorhanden.

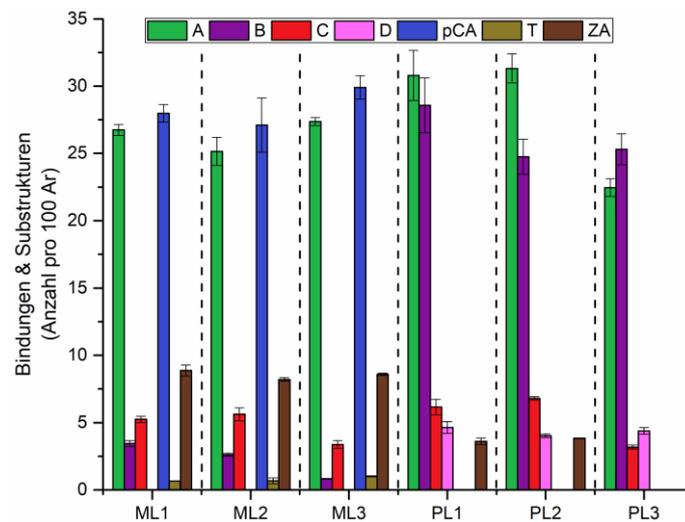


Abbildung 6-7: Anteil der Bindungstypen und Substrukturen (siehe Abbildung 5-5) in Ligninen aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Der Unterschied zwischen den verschiedenen Partikelgrößen ist wie schon bei der Ausbeute und der qualitativen Strukturuntersuchung bei den PLs deutlicher als bei den MLs zu beobachten. Der größte Unterschied liegt in der Abnahme an A in PL3, was damit erklärt werden kann, dass das Mahlen der Partikel bereits als mechanisch-chemische Vorbehandlung betrachtet werden kann, durch die chemische Bindungen zwischen Lignin und Hemicellulosen, aber auch innerhalb der Lignine aufgebrochen werden.^{201, 204} Da Etherbindungen geringere Bindungsenthalpien besitzen als C-C Bindungen²⁰⁵, werden diese bei längeren Mahlzeiten folglich zuerst gespalten, wie bei PL3 beobachtet.

Vergleichsdaten in der Literatur zum Einfluss der Partikelgröße auf die Ligninstruktur fehlen bisher. Es gibt zwar wenige Studien, die verschiedene Partikelgrößen unterschiedlicher Biomasse untersucht haben, allerdings liegt der Fokus meist auf dem Zellstoff bzw. der Delignifizierung dessen (Vgl. Kapitel 6.1), oder dem Einfluss auf eine anschließende enzymatische Hydrolyse.^{206, 207} Daneben ist lediglich für MWL der Einfluss des Mahlprozesses auf die Ligninstruktur relativ gut untersucht. Generell gilt MWL aufgrund der milden Aufschlussbedingungen bei neutralem pH-Wert als der nativen Ligninstruktur am nächsten. Nichtsdestotrotz kann der Mahlvorgang strukturelle Modifikationen im Lignin wie zusätzliche Carbonyl- oder Hydroxygruppen, insbesondere in Harthölzern verursachen.²⁰⁸ Neue phenolische Hydroxygruppen können z.B. durch die Spaltung von β -Aryl-Etherbindungen entstehen, deren Anteil in PL3 deutlich abgenommen hat. Daneben kann es durch die radikalische Spaltung der β -O-4-Bin-

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

dungen und anschließender Rekombination der β -Radikale auch zur Bildung neuer Strukturen kommen, wie verschiedene Alkyl-O-Alkyl-Ether.²⁰⁹ In Studien konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass die β -O-4-Strukturen abhängig von Faktoren wie der Mahlgeschwindigkeit und -dauer sind und ihre Anzahl mit dem Fortschritt des Mahlprozesses abnimmt.^{210, 211} Anzu-merken ist außerdem, dass alle diese Untersuchungen an Hölzern durchgeführt wurden. Min *et al.* ermittelten für MWL aus Hart- und Weichhölzern unterschiedliche optimalen Extraktionsbedingungen²¹², was auch die nicht vergleichbaren Ergebnisse von Paulownia und Miscanthus erklärt. Zusätzlich wurden hier abhängig von der Beschaffenheit der Biomasse unterschiedliche Mühlen für die Zerkleinerung von Miscanthus und Paulownia gewählt, was eine weitere Erklärung für die Unterschiede sein könnte.

Tabelle 6-1: Anteile der Monolignole (S, G, H) sowie der am häufigsten vorkommenden Bindungstypen (A, B, C, D) und Substrukturen (ZA, pCA, T) in Ligninen aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

	ML1	ML2	ML3	PL1	PL2	PL3
Monolignole [%]						
S	45,4 \pm 0,6	44,9 \pm 0,4	43,7 \pm 1,0	43,9 \pm 0,9	43,8 \pm 1,1	41,2 \pm 0,8
G	47,0 \pm 0,3	48,0 \pm 0,2	44,6 \pm 0,9	54,3 \pm 0,9	53,1 \pm 1,2	41,6 \pm 1,2
H	7,6 \pm 0,3	7,1 \pm 0,4	11,8 \pm 0,4	1,8 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3	17,2 \pm 0,4
Monolignolverhältnisse [-]						
S/G	0,97 \pm 0,02	0,94 \pm 0,01	0,98 \pm 0,04	0,81 \pm 0,03	0,83 \pm 0,04	0,99 \pm 0,05
H/G	0,16 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,26 \pm 0,01	0,03 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,41 \pm 0,02
Bindungen & Substrukturen [Anzahl pro 100 Aromaten (S + G + H)]						
A	26,7 \pm 0,4	25,1 \pm 1,0	27,4 \pm 0,3	30,8 \pm 1,9	31,3 \pm 1,1	22,4 \pm 0,7
B	3,5 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	0,8 \pm 0,0	28,6 \pm 2,0	24,8 \pm 1,3	25,3 \pm 1,1
C	5,2 \pm 0,2	5,6 \pm 0,5	3,4 \pm 0,3	6,2 \pm 0,6	6,8 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
D	-	-	-	4,6 \pm 0,4	4,0 \pm 0,1	4,4 \pm 0,2
ZA	8,9 \pm 0,4	8,2 \pm 0,1	8,6 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	3,8 \pm 0,0	-
pCA	28,0 \pm 0,7	27,1 \pm 2,0	29,9 \pm 0,9	-	-	-
T	0,7 \pm 0,0	0,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	-	-	-
Anteil an kondensierten Untereinheiten (KU) [%]						
	24,5 \pm 0,5	24,7 \pm 1,6	13,3 \pm 0,8	56,1 \pm 0,9	53,2 \pm 0,7	59,4 \pm 1,0

S: Syringol; G: Guajakol; H: *p*-Hydroxyphenyl; A: β -Aryl-Ether; B: Resinol; C: Phenylcoumaran; D: Spirodienon; ZA: Zimtalkohol; pCA: *p*-Coumarat; T: Tricin

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße unterscheiden lassen, insbesondere die kleinste Partikelgrößenfraktion weicht von den beiden größeren ab. Sowohl ML3 als auch PL3 zeigen einen höheren Anteil an H-Einheiten, während Unterschiede im S/G-Verhältnis und dem Anteil an A nur bei den PLs beobachtet werden. Um diese Zusammenhänge besser verstehen zu können, wäre es sinnvoll, in zukünftigen Studien nicht nur verschiedene Partikelgrößen zu vergleichen, sondern auch den Mahlvorgang inkl. der verwendeten Mühle selbst zu betrachten, um Zusammenhänge zwischen der Prozessstärke (Dauer, Temperatur) und den Änderungen in der Ligninstruktur besser erklären zu können.

6.4 Methoxy- und Ethoxygehalt

Der Gehalt an Methoxy- und Ethoxygruppen wurde mittels HS-GC-MS untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 6-2 dargestellt.

Tabelle 6-2: Ergebnisse der Bestimmung des Methoxy- und Ethoxygehaltes mittels HS-GC-MS der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung eines OSL.

	Methoxy (-OCH ₃) [mmol g ⁻¹]	Ethoxy (-OCH ₂ CH ₃) [mmol g ⁻¹]
ML1	2,99 \pm 0,12	0,36 \pm 0,05
ML2	2,93 \pm 0,11	0,32 \pm 0,04
ML3	2,95 \pm 0,14	0,29 \pm 0,04
PL1	4,94 \pm 0,29	0,58 \pm 0,13
PL2	5,1 \pm 0,33	0,65 \pm 0,12
PL3	5,06 \pm 0,30	0,63 \pm 0,08

Grundsätzlich besitzen die MLs einen geringeren Gehalt an Methoxy- und Ethoxygruppen als die PLs. Bei den MLs kann eine leichte Abnahme der Ethoxygruppen beobachtet werden, je kleiner die Partikelgröße, für die PLs bestätigt sich diese Beobachtung allerdings nicht. Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil an Methoxygruppen und der Partikelgröße der Biomasse kann nicht beobachtet werden, obwohl es Unterschiede in der Monolignolzusammensetzung der Lignine gibt (siehe Kapitel 6.3). Dies deutet darauf hin, dass neben den aromatischen Methoxygruppen der G- und S-Einheiten auch aliphatische Methoxygruppen an den α - oder β -Kohlenstoffatomen eine Rolle spielen, die sich allerdings nicht getrennt von den aromatischen Methoxygruppen quantifizieren lassen, wie bereits in Kapitel 5.5 diskutiert wurde. Erneut fehlen Literaturdaten zum Einfluss der Partikelgröße der Biomasse auf die OSL-Struktur, lediglich der Einfluss des Mahlprozesses bei der Gewinnung von MWL wurde bereits untersucht: Zinovjev *et al.* konnten keinen Einfluss auf den Methoxygehalt feststellen, da diese sich wie kleine Seitenketten verhalten und folglich bei topochemischen Prozessen wie dem Mahlvorgang nicht abgespalten werden.¹⁸⁸

6.5 Molmassenverteilung

Die Molmassen und Polydispersitäten sind in Abbildung 6-8 grafisch dargestellt, die zugehörigen Werte finden sich in Tabelle 6-3. Grundsätzlich stimmen diese in ihrer Größenordnung gut mit Literaturdaten überein, was bereits in Kapitel 5.6 diskutiert wurde und die PLs besitzen ein höheres M_n und M_w als die MLs. Während sich die MLs aus Biomasse mit variierender Partikelgröße nicht voneinander unterscheiden, kann bei den PLs ein Trend bezüglich M_w und PDI beobachtet werden: eine kleinere Partikelgröße führt zu einem höheren M_w und damit verbunden zu einem höheren PDI, während das M_n gleichbleibt.

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

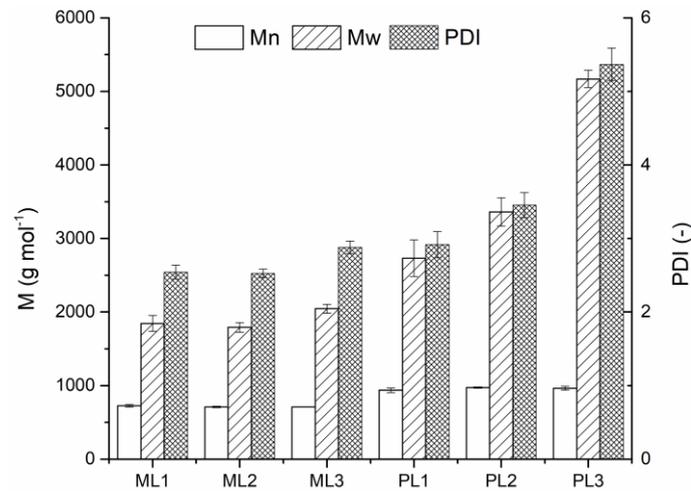


Abbildung 6-8: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Generell kann die Zugänglichkeit für den Aufschlussprozess durch die Partikelgröße der verwendeten Biomasse beeinflusst werden: sind die Biomassen feiner vermahlen, nimmt die spezifische Oberfläche zu, was eine kürzere Strecke für den Stofftransport bedeutet und so auch die Isolation größerer Ligninmoleküle erlaubt.²⁰¹ Darüber hinaus können höhere Molekulargewichte durch eine Repolymerisation in fein vermahlene Partikel verursacht werden, wie in verschiedenen Studien beobachtet wurde.^{208, 213}

Tabelle 6-3: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

	M_n (g mol ⁻¹)		M_w (g mol ⁻¹)		PDI [-]	
ML1	725 \pm 17	(a)	1845 \pm 107	(a)	2,54 \pm 0,09	(a)
ML2	710 \pm 10	(a)	1792 \pm 65	(a)	2,53 \pm 0,06	(a)
ML3	711 \pm 2	(a)	2045 \pm 59	(a)	2,88 \pm 0,09	(a)
PL1	936 \pm 30	(b)	2732 \pm 249	(b)	2,92 \pm 0,18	(a)
PL2	973 \pm 11	(b)	3361 \pm 193	(c)	3,45 \pm 0,17	(b)
PL3	964 \pm 27	(b)	5168 \pm 117	(d)	5,37 \pm 0,22	(c)

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Partikelgrößen der Paulownia lassen sich auch in der Molmassenverteilung beobachten (Abbildung 6-9). Während PL1 und PL2 bei 360–370 g mol⁻¹ ein kleines Signal besitzen, ist dort bei PL3 nur noch eine Schulter vorhanden. Auch das Maximum der Molmassenverteilung verschiebt sich von PL1 (1397 g mol⁻¹) zu PL3 (1496 g mol⁻¹) leicht hin zu größeren Molmassen. Des Weiteren zeigt PL3 einen kleinen breiten Peak bei ca. 20 000 g mol⁻¹. Bei den MLs sind keine so deutlichen Unterschiede zwischen den Verteilungen zu erkennen (siehe Anhang, Abbildung A 5), was dazu passt, dass sich auch die Massenmittelwerte und der PDI nicht signifikant unterscheiden.

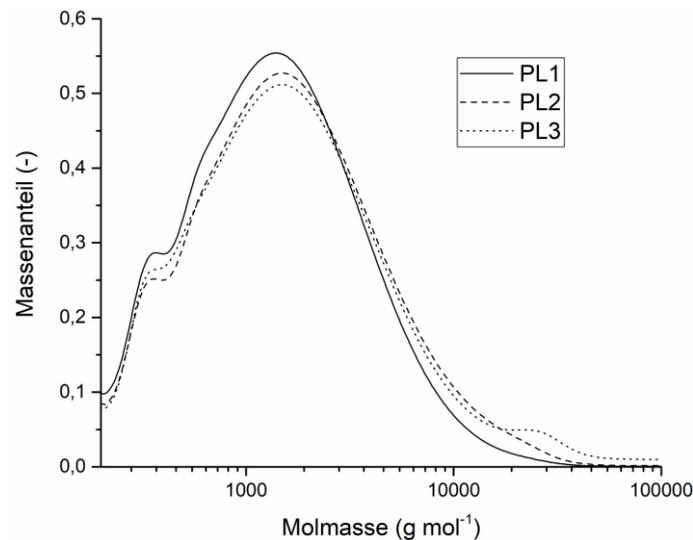


Abbildung 6-9: Molmassenverteilungen der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße.

6.6 Antioxidanz und Phenolgehalt

Die antioxidative Kapazität der Lignine wurde jeweils mit dem DPPH-, ABTS- und FRAP-Assay als *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) bestimmt und der Gesamtphenolgehalt (*total phenol content*, TPC) mit dem FC-Assay. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-10 dargestellt, die zugehörigen Rohdaten finden sich in Tabelle A 7 im Anhang. Auch hier zeigt der DPPH-Assay wieder die geringste Trennschärfe, es lassen sich lediglich zwei Gruppen unterscheiden, wobei innerhalb der MLs bzw. PLs keine Unterschiede festgestellt werden können. Mit dem FRAP- und FC-Assay können drei Gruppen beobachtet werden, mit dem ABTS-Assay sogar vier. Es lassen sich erneut keine eindeutigen Trends in Abhängigkeit der Partikelgröße der Biomasse feststellen. Innerhalb der MLs können nur mit dem FC-Assay signifikante Unterschiede gefunden werden: ML3 besitzt einen kleineren TPC als ML1 und ML2. Auch für PL3 liegt der TPC etwas niedriger, allerdings ist der Unterschied zu PL1 und PL2 hier nicht signifikant. Eine Zu- bzw. Abnahme der phenolischen Hydroxygruppen kann z.B. durch die Spaltung von Etherbindungen und eine Rekondensation der daraus resultierenden Carbeniumionen beeinflusst werden.⁷³ Eine Erklärung für den geringeren TPC bei kleinerer Partikelgröße könnten also Rekondensationsreaktionen sein, die bei dem intensiveren Mahlprozess auftreten. Durch die HSQC NMR (Kapitel 6.3) kann dies allerdings nicht bestätigt werden.

Für die PLs finden sich mit dem FRAP- und ABTS-Assay signifikante Unterschiede, der Trend ist allerdings gegenläufig zum TPC: PL3 besitzt jeweils einen höheren TEAC-Wert als PL1, während PL2 dazwischen liegt und sich von beiden nicht unterscheidet. Dieser unterschiedliche Trend bei der Partikelgröße, insbesondere des FRAP- und FC-Assays, spiegelt jedoch nicht die Korrelationen zwischen den Assays wider, wenn man alle Lignine, die in dieser Arbeit untersucht wurden, betrachtet (siehe Tabelle A 6 im Anhang). Aufgrund dessen, und da Literaturdaten zum Einfluss der Partikelgröße der Biomasse auf die antioxidativen Eigenschaften der daraus isolierten Lignine fehlen, ist eine Einordnung der Ergebnisse schwierig. Insgesamt sind zwischen ML1-3 und PL1-3 keine so deutlichen Unterschiede zu erkennen, wie bei den Ligninen aus verschiedenen Biomassen (Kapitel 5.7) oder Aufschlussprozessen (Kapitel 7.7), was darauf hindeutet, dass der Zerkleinerungsgrad der Biomasse vor dem Aufschluss nur einen geringen Einfluss auf die antioxidative Kapazität des gewonnenen Lignins besitzt.

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

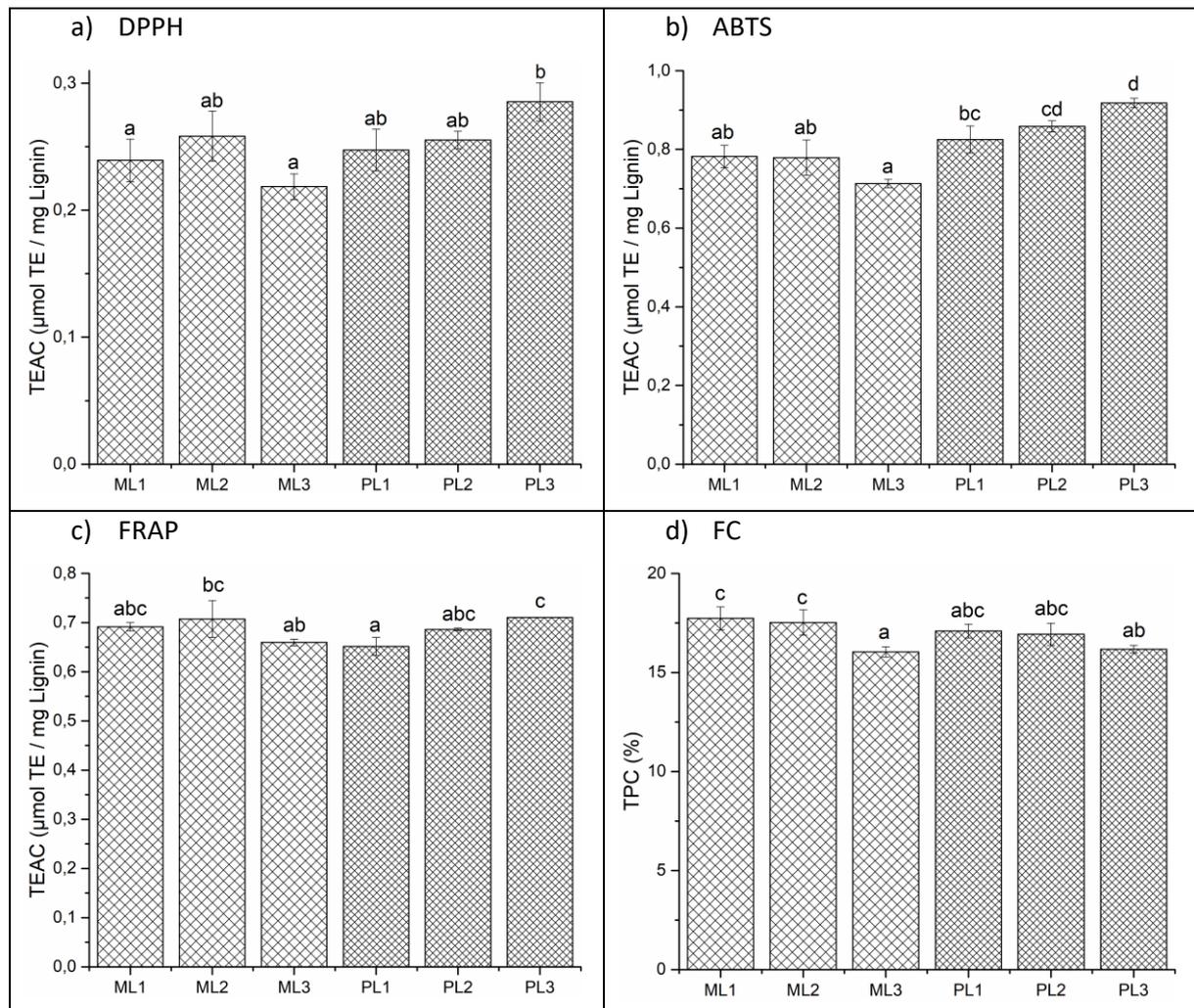


Abbildung 6-10: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

6.7 Zusammenfassung

In diesem Unterkapitel wurde der Einfluss der Partikelgröße der eingesetzten Biomasse diskutiert, wobei keine eindeutigen Trends erkennbar sind. Die Ausbeute lässt sich für PL3 im Gegensatz zu PL1 und PL2 signifikant erhöhen, während der Mahlgrad bei Miscanthus keine Auswirkungen auf die Ligninausbeute hat. Das gleiche gilt für die Molmassen und Polydispersitäten der Lignine: die MLs unterscheiden sich nicht, während M_w und PDI von PL1 zu PL3 bei gleichbleibendem M_n zunehmen. Bei der Monolignolzusammensetzung der Lignine zeigen beide Biomassen denselben Trend: ML3 und PL3 besitzen einen höheren Anteil an H-Einheiten als die Lignine aus größeren Biomassefraktionen. Beim Gehalt an Methoxy- und Ethoxygruppen sowie der Antioxidanz und dem TPC können keine Zusammenhänge beobachtet werden. Bisher wurde der Einfluss der Partikelgröße der Biomasse für den Organosolv-Prozess in der Literatur kaum untersucht, und wenn, dann nur in Hinblick auf die Delignifizierung ohne eine Charakterisierung der Ligninstruktur und -eigenschaften. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die verschiedenen Mahlgrade der Biomasse zu einem gewissen Teil einen Einfluss auf das isolierte Lignin haben können. Da allerdings nicht bei allen Analysemethoden belastbare Trends erkennbar sind, wäre in zukünftigen Studien die Ausweitung des Probensets

6. Lignine aus Biomasse mit variierender Partikelgröße

sinnvoll. Des Weiteren sollte nicht nur die Siebfraction als einzelner Wert betrachtet werden, sondern die Verteilung der Partikelgrößen innerhalb der Fraktion, und vor allem der Mahlprozess selbst inklusive Dauer und Temperatur. Die Untersuchungen von MWL in der Literatur zeigen, dass die Vermahlung der Biomasse als Vorbehandlung bereits zu Depolymerisations- und/oder Kondensationsreaktionen führen kann, die sich auf die Ausbeute, Struktur und Molmasse auswirken können.

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

In diesem Kapitel wird untersucht, wie sich der Aufschlussprozess und die Autohydrolyse als Vorbehandlung der Biomasse auf die Struktur, das Molekulargewicht und die antioxidative Kapazität der Lignine auswirken. Dafür wird zum einen unbehandelter Miscanthus durch Variation der Prozessparameter unterschiedlich aufgeschlossen, zum anderen wird der Miscanthus zunächst bei verschiedenen Temperaturen autohydrolysiert und anschließend derselbe Standardaufschluss zur Ligningewinnung genutzt. Alle Aufschlüsse werden dabei in dreifacher Wiederholung durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit des Prozesses zu untersuchen. Daneben werden auch ein Kraft-Lignin (KL) sowie Indulin AT (IAT) als kommerziell erhältliches Lignin zum Vergleich herangezogen. Auf die generelle Charakterisierung der Miscanthus-Lignine (MLs) sowie die verwendeten Analysemethoden wird nicht noch einmal im Detail eingegangen, da beides bereits in Kapitel 5 diskutiert wird.

7.1 Charakterisierung von Miscanthus nach verschiedenen Aufschlussprozessen

Um die Auswirkungen des Organosolv-Aufschlusses sowie der Autohydrolyse (AH) als Vorbehandlung auf die chemische Zusammensetzung der Biomasse zu untersuchen, wurde diese nach den NREL-Protokollen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-1 dargestellt. Die Werte des unbehandelten Miscanthus weichen dabei von den in Kapitel 5.1 (Tabelle 5-1) vorgestellten Werten ab, da die Untersuchungen in verschiedenen Laboren durchgeführt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit werden jeweils nur die Daten miteinander verglichen, die im selben Labor durchgeführt worden sind.

Tabelle 7-1: Chemische Zusammensetzung von Miscanthus nach verschiedenen Aufschlussprozessen, bestimmt nach den NREL-Protokollen¹³⁴⁻¹³⁶, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

	Miscanthus unbehandelt	Miscanthus nach Standardaufschluss	Miscanthus nach AH 180 °C	Miscanthus nach AH 180 °C & Standardaufschluss
Lignin [%]	29,4 \pm 0,4	21,1 \pm 0,7	37,4 \pm 0,8	21,0 \pm 0,3
Cellulose [%]	40,0 \pm 0,8	49,3 \pm 3,7	46,4 \pm 0,2	59,9 \pm 0,2
Hemicellulose [%]	17,2 \pm 0,6	17,9 \pm 1,9	2,9 \pm 0,1	3,6 \pm 0,3
Asche [%]	2,83 \pm 0,01	1,98 \pm 0,02	0,99 \pm 0,04	1,13 \pm 0,00

Der verwendete EtOH-Organosolv-Aufschluss dient der Ligningewinnung aus verschiedenen Biomassen, in diesem Fall Miscanthus. Die Abnahme des Ligningehaltes in der Biomasse lässt sich anhand der NREL-Ergebnisse gut beobachten: während der unbehandelte Miscanthus noch (29,4 \pm 0,4) % Lignin enthält, sind es nach dem Aufschluss nur noch (21,1 \pm 0,7) %. Beim Gehalt an Hemicellulosen gibt es keine signifikanten Änderungen, während der prozentuale Anteil an Cellulose aufgrund von Konzentrationseffekten steigt.²¹⁴ Da dieser Effekt nur bei der Cellulose zu beobachten ist, scheint auch eine leichte Abnahme der Hemicellulosen durch den Organosolv-Aufschluss wahrscheinlich, der durch den Konzentrationseffekt jedoch überdeckt werden könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte in zukünftigen Versuchen neben dem Feststoffrückstand auch das Filtrat untersucht werden, um ein vollständigeres Bild der Verteilung der einzelnen Bestandteile in den verschiedenen Fraktionen zu erhalten. Brosse *et al.* nutzten ebenfalls einen EtOH-Organosolv-Aufschluss zur Ligningewinnung aus Miscanthus und untersuchten die Zusammensetzung des Feststoffrückstands bei variierenden Prozess-

parametern (170 – 190 °C; 60 – 80 min; 0,5 – 1,2 % H₂SO₄): sie stellten dabei eine Abnahme sowohl des Lignins als auch der Hemicellulosen fest, während beim Gehalt an Cellulose kein eindeutiger Trend festzustellen war.¹⁵⁶ Die beobachtete Abnahme der Hemicellulosen im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen kann mit dem sauer-katalysierten Aufschluss erklärt werden, was zu einem Abbau der Zucker führen kann. Ähnliche Trends können auch beim Organosolv-Aufschluss anderer Biomassen beobachtet werden: Carvalheiro *et al.* schlossen Lignin aus Weizenstroh und Eukalyptus auf, wobei hauptsächlich Lignin und kleinere Anteile Zucker aus den Biomassen gelöst wurden, während Cellulose fast vollständig im festen Rückstand zurück blieb.²⁰³ Kalogiannis *et al.* untersuchten die Organosolv-Delignifizierung von Buchenholz in EtOH (60 %) ohne Katalysator, wobei die größte Abnahme beim Ligninanteil festgestellt wurde bei vollständiger Wiedergewinnung der Cellulose in der Pulpe.²¹⁵

Neben der Änderung der Zusammensetzung des Miscanthus beim Aufschluss wurde auch die Auswirkung der AH bei 180 °C betrachtet: diese führt zu einer deutlichen Abnahme der Hemicellulosen, deren Anteil von (17,2 ± 0,6) % auf (2,9 ± 0,1) % sinkt. Im Gegensatz dazu steigen der prozentuale Ligninanteil von (29,4 ± 0,4) % auf (37,4 ± 0,8) % und der Cellulosegehalt von (40,0 ± 0,8) % auf (46,4 ± 0,2) %. Auch eine Abnahme des Aschegehaltes in der Biomasse nach der AH ist in der Literatur bereits beschrieben.^{214, 216} Die Abnahme des Anteils an Hemicellulosen lässt sich mit der Säurekonstanten des Wassers erklären, welche bei hohen Temperaturen zunimmt und somit die Konzentration von Hydronium-Ionen (H₃O⁺) im Reaktionsmedium erhöht wird. Dies führt wiederum zur Hydrolyse der Acetylgruppen in den Hemicellulosen, wodurch kleine Mengen an Essigsäure generiert werden, die als Katalysator bei der weiteren Hydrolyse der Zucker fungieren.⁷⁴ Obama *et al.* konnten diesen Trend ebenfalls bei der AH (150 °C; 8 h) von Miscanthus beobachten: der Anteil an Hemicellulosen sank von 24,18 % auf 8,50 %, was im anschließenden Organosolv-Aufschluss die Zugänglichkeit des Lignins begünstigte.¹⁵⁷ Auch wenn die Zusammensetzung des Miscanthus hier nur exemplarisch für die AH bei 180 °C untersucht wurde, wurde diese noch bei zwei weiteren Temperaturen (120 °C; 150 °C) durchgeführt. Die Auswirkung der AH-Temperatur (140 – 220 °C) wurde von Saad *et al.* anhand von *Ziziphus lotus*, einem Laubbaum, untersucht: mit steigender Temperatur nehmen Lignin- und Cellulosegehalt zu, während es zu einer fast vollständigen Entfernung der Zucker kommt.²¹⁷ Diese Beobachtung deckt sich mit den hier dargestellten Ergebnissen, und wird auch durch Literaturdaten zur AH weiterer Biomassen, wie z.B. *Paulownia elongata x fortunei*³⁵, *Eucommia ulmoides* (Chinesischer Guttaperchabaum)²¹⁸ oder Mais²¹⁴ bestätigt.

Als letztes wurde der Miscanthus nach der Kombination aus AH bei 180 °C und Standard-Organosolv-Aufschluss charakterisiert. Verglichen mit dem Miscanthus nach dem Standardaufschluss ohne AH ist ein ähnlicher Ligningehalt in der Biomasse vorhanden, während der Anteil an Hemicellulosen deutlich abgenommen hat. Der Celluloseanteil steigt erneut aufgrund der Konzentrationseffekte an. Dieser Effekt könnte auch dafür verantwortlich sein, dass der Ligningehalt scheinbar gleich bleibt, obwohl in der Literatur eine höhere Delignifizierungsrate nach vorheriger AH der Biomasse beschrieben ist.⁷⁴ Insgesamt können mithilfe der hier dargestellten Ergebnisse keine Aussagen zu Massenbilanzen der einzelnen Bestandteile der Biomasse getätigt werden. Dafür hätten, wie bereits diskutiert, auch die flüssigen Fraktionen nach dem Aufschluss bzw. der AH untersucht werden müssen, um ein vollständiges Bild der Verteilung von Lignin, Cellulose und Hemicellulose zu erhalten. Daneben wurden nicht alle

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

Bestandteile der Biomasse, wie z.B. Extraktstoffe oder Proteine, berücksichtigt, was dazu führt, dass die Summe der ermittelten Biomassebestandteile bei lediglich 85 – 90 % liegt, was eine finale Bilanzierung weiter erschwert.

7.2 Ausbeute und Reinheit der Lignine

Die Ausbeuten an OSL bei verschiedenen Aufschlussparametern sind in Abbildung 7-1 dargestellt. Die Ausbeute in % bezieht sich dabei auf die Masse an Lignin im unbehandelten Miscanthus. Durch die AH ändert sich zwar der Anteil an Lignin in der Biomasse, wie in Kapitel 7.1 gezeigt wurde, allerdings liegen die Daten zur Zusammensetzung nur exemplarisch für die AH bei 180 °C vor und nicht für die anderen beiden Vorbehandlungstemperaturen. Aus diesem Grund wird für eine bessere Vergleichbarkeit für alle Organosolv-Aufschlüsse auf den Lignin-gehalt des ursprünglichen Miscanthus (siehe Tabelle 5-1) zurückgerechnet.

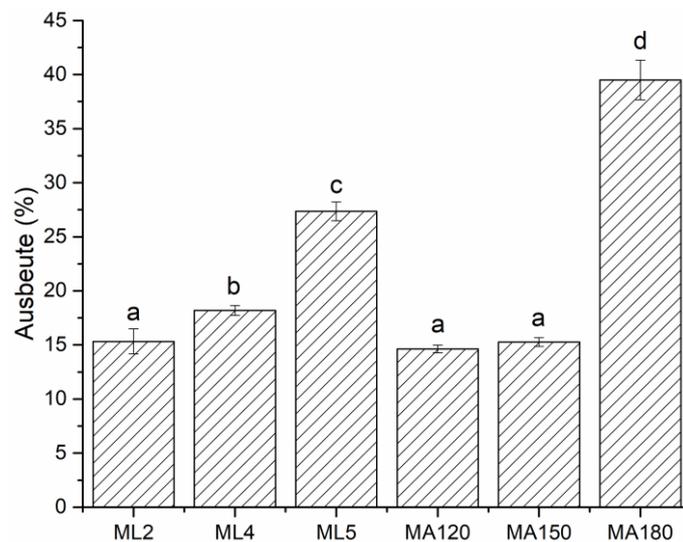


Abbildung 7-1: Ligninausbeute aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

Wie in Abbildung 7-1 zu sehen ist, kann die Ligninausbeute durch Anpassung der Aufschlussparameter oder eine vorherige AH bei 180 °C signifikant erhöht werden. Die Ausbeute des Standardaufschlusses (ML2) von $(15,3 \pm 1,2)$ % lässt sich durch eine Verdopplung der Aufschlussdauer (ML4) auf $(18,2 \pm 0,5)$ % erhöhen. Durch eine zusätzliche Verringerung der EtOH-Konzentration von 80% auf 60% (ML5) steigt die Ausbeute weiter auf $(27,4 \pm 0,9)$ %. Der Einfluss der Aufschlussdauer auf die Ligninausbeute ist in der Literatur bereits gut untersucht und bestätigt das hier dargestellte Ergebnis, dass mit längerer Prozesszeit die Ausbeute erhöht werden kann.^{62, 160, 161} Ein größerer Einfluss wird der Konzentration des Lösemittels, in diesem Fall EtOH, zugeschrieben: Marques *et al.* optimierten die Ligningewinnung aus verschiedenen Biomassen und konnten nur einen kleinen Einfluss der Reaktionszeit finden, allerdings eine hohe Abhängigkeit von der EtOH-Konzentration, die im Optimalfall zwischen 60 – 80 % liegen sollte.²¹⁹ Pan *et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss der EtOH-Konzentration auf die Ligninausbeute, deren Maximum sie mit einer Konzentration von 65 % EtOH erreichten.²²⁰ Bei der Delignifizierung handelt es sich um eine Kombination aus dem Abbau des Lignins, welche durch geringere EtOH-Konzentrationen und damit einhergehend höhere Konzentrationen an Hydronium-Ionen und einem niedrigeren pH Wert begünstigt wird, und der Löslichkeit der

abgebauten Ligninfragmente, für die wiederum eine höhere EtOH-Konzentration benötigt wird.²²⁰

Der Einfluss der AH vor dem Standardaufschluss hängt stark von der Temperatur ab, bei der diese durchgeführt wird: bei 120 °C (MA120) und 150 °C (MA150) bleibt die Ausbeute mit jeweils $(14,6 \pm 0,4) \%$ und $(15,3 \pm 0,4) \%$ unverändert verglichen mit dem Standardaufschluss. Die AH bei 180 °C (MA180) führt zu einer mehr als doppelt so hohen Ligninausbeute von $(39,5 \pm 1,8) \%$. Dass eine vorherige AH die Delignifizierung beim Organosolv-Prozess erhöhen kann, ist in der Literatur bereits beschrieben^{217, 218, 221}, allerdings wird in vielen Studien zur AH der Fokus auf die Wiedergewinnung der Zucker, insbesondere Xylan gelegt, und nicht auf das Lignin.⁷⁴

Neben der Betrachtung einzelner Prozessparameter gibt es verschiedene Ansätze, diese zu eigenständigen Variablen zusammenzufassen, um so verschiedene Prozesse besser miteinander vergleichen zu können. Ein Beispiel dafür ist der H-Faktor, der die Parameter Zeit und Temperatur kombiniert, indem das Zeitintegral unter der Temperaturkurve während des Aufschlussprozesses bestimmt wird. Meist wird er im Rahmen der statistischen Versuchsplanung genutzt, um die Ausbeute des Organosolv-Prozesses zu verbessern.^{222, 223} Eine andere Möglichkeit ist die Berechnung der kombinierten Prozessstärke (*combined severity factor*, CSF), bei der neben Zeit und Temperatur auch der pH-Wert mit einberechnet wird.²²⁴ Der CSF hat seinen Ursprung in der Optimierung der Delignifizierung der Biomasse und damit einhergehend der Extraktion von Cellulose, die eng mit der Ligninextraktion verknüpft ist.⁷³ In dieser Arbeit wurde auf die Berechnung des CSF verzichtet, da der Fokus nicht auf der Prozess- und damit Ausbeuteoptimierung liegt. Nichtsdestotrotz können die aus der Literatur bekannten Beobachtungen, dass eine erhöhte Temperatur und Aufschlussdauer zu einer Erhöhung der Prozessstärke und damit verbunden zu einer höheren Ligninausbeute führen, bestätigt werden. Des Weiteren führen die unterschiedlichen Aufschlussbedingungen bzw. Vorbehandlungen auch zu Änderungen der Struktur (Monolignolverhältnis, Bindungstypen, funktionelle Gruppen), des Molekulargewichts und der antioxidativen Eigenschaften, was in der Literatur allerdings selten diskutiert wird. Aus diesem Grund fokussiert diese Arbeit nicht die Prozessoptimierung, sondern den Einfluss des Aufschlusses auf die Ligninstruktur, wie in den folgenden Unterkapiteln diskutiert werden wird.

Neben der Ausbeute wurde zusätzlich exemplarisch die chemische Zusammensetzung ausgewählter Lignine untersucht, für einen Vergleich des Aufschlusses ohne (ML2) und mit vorheriger AH (MA180), sowie des KL als Referenz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-2 dargestellt. Alle Lignine besitzen mit über 90 % Ligninanteil eine sehr hohe Reinheit. KL enthält einen deutlich höheren Gehalt an Asche und Hemicellulosen als ML2 und MA180, was typisch für Alkali-Lignine im Vergleich zu OSL ist.¹⁰⁷ In der Literatur finden sich etwas geringere Vergleichswerte zur Reinheit von OSL aus *Miscanthus*: Bauer *et al.* nutzten ebenfalls einen EtOH-Organosolv-Prozess und erzielten Reinheiten zwischen 86,2 – 89,4 %⁶², während Villaverde *et al.* Acetosolv- und Formosolv-Lignin mit einem Ligninanteil von 90,4 % bzw. 92,1 % isolierten sowie einem leicht höheren Anteil an Kohlenhydraten von 1,4 % bzw. 2,2 %²²⁵. Mit dem hier genutzte unkatalysierten Organosolv-Prozess können folglich sehr hohe Reinheiten erzielt werden. Durch eine vorherige AH der Biomasse wird diese zudem noch weiter erhöht und der Anteil an Cellulose, Hemicellulose sowie der Aschegehalt erniedrigt. Auch diese Beobachtung wird von Literaturdaten bestätigt.^{214, 217}

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

Tabelle 7-2: Chemische Zusammensetzung ausgewählter Lignine bestimmt nach den NREL-Protokollen^{134–136}, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

	ML2	MA180	KL
Lignin [%]	93,3 \pm 0,2	96,7 \pm 0,3	96,0 \pm 1,0
Cellulose [%]	0,7 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
Hemicellulose [%]	0,1 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1
Asche [%]	0,13 \pm 0,07	0,06 \pm 0,00	1,32 \pm 0,00

7.3 Qualitative Strukturuntersuchung

In Abbildung 7-2 sind die UV-Vis-Spektren der MLs ohne AH nach variierendem Aufschlussprozess im Vergleich mit KL und Indulin AT (IAT) dargestellt. Die MLs haben ihr Maximum bei 224 – 225 nm mit einer Schulter bei 231 – 244 nm. Ein weiteres kleineres Maximum liegt bei 286 – 288 nm. Die zweite Schulter bei 350 – 370 nm ist bei ML2 deutlich zu erkennen, während sie bei ML4 und ML5 schwächer ausgeprägt ist. Dies deutet auf einen abnehmenden Anteil an Estern der Hydroxycimtsäure, wie z.B. *p*-Coumarat, in diesen Ligninen hin.¹⁷⁰ Im Gegensatz dazu besitzen KL und IAT ihr Maximum bei etwas größeren Wellenlängen von 228 – 232 nm, was typisch ist für Nadelholz-Lignine, die hauptsächlich aus G-Einheiten bestehen²²⁶, im Vergleich zu den MLs die aus allen drei Monolignoleinheiten aufgebaut sind.

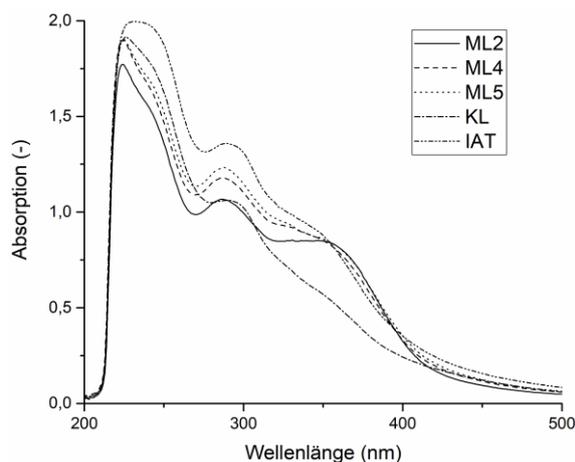


Abbildung 7-2: UV-Vis-Spektren der Miscanthus-Lignine nach variierendem Aufschlussprozess sowie KL und IAT, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten.

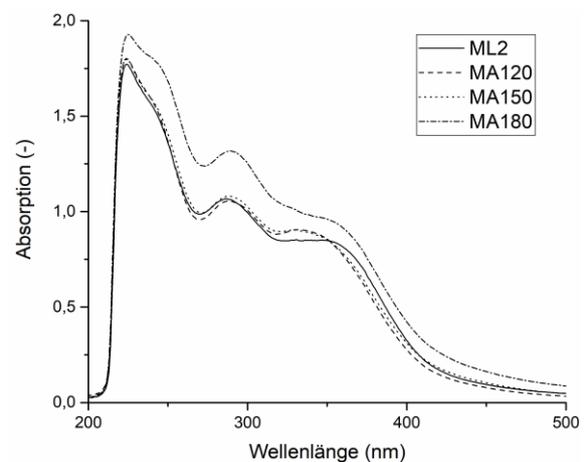


Abbildung 7-3: UV-Vis-Spektren der Miscanthus-Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten.

Der Vergleich der UV-Vis Spektren der Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss ist in Abbildung 7-3 zu sehen. Die Lage der Banden ändert sich kaum, da alle Lignine aus derselben Biomasse bestehen, lediglich die Intensitäten unterscheiden sich. Das insgesamt größere Integral von MA180 ist ein weiteres Indiz für die hohe Reinheit dieses Lignins (siehe Kapitel 7.2). Die zwei Maxima liegen bei 224 – 225 nm und 286 – 289 nm, die Schulter bei 231 – 243 nm ist bei MA180 etwas ausgeprägter als bei den anderen MAs und ML2. Des Weiteren ist die zweite Schulter für MA120 und MA150 zu etwas kleineren Wellenlängen (340 – 350 nm) verschoben im Vergleich zu ML2 und MA180 (350 – 370 nm).

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

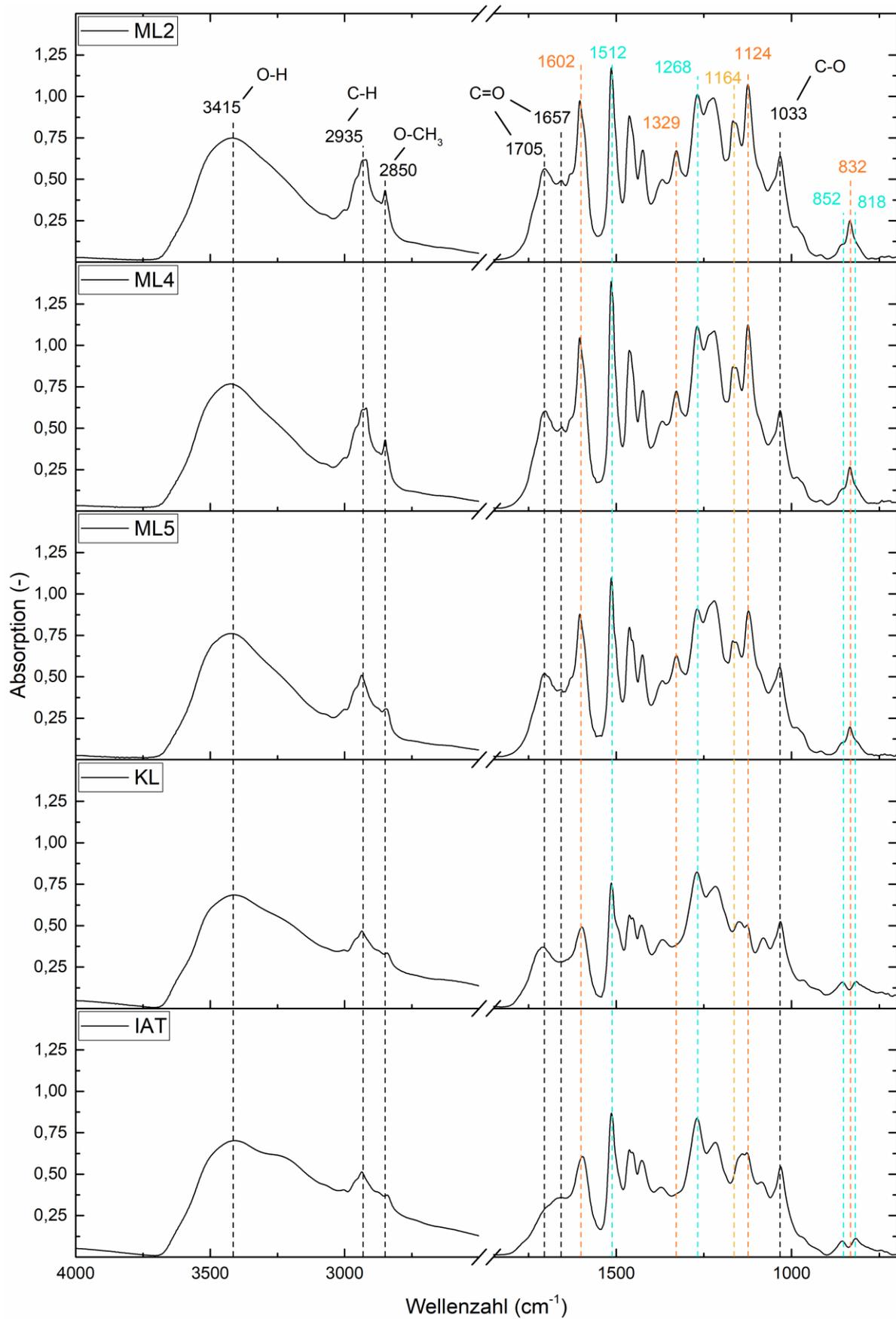


Abbildung 7-4: FTIR-Spektren der der Miscanthus-Lignine nach variierenden Aufschlussprozessen sowie KL und IAT. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

Auch in den FTIR-Spektren lassen sich Unterschiede zwischen den Ligninen feststellen. In Abbildung 7-4 sind die MLs ohne AH nach variierendem Aufschlussprozess sowie KL und IAT gegenübergestellt. Eine detaillierte Zuordnung der Signale findet sich in Tabelle A 2 im Anhang. Bei den MLs lassen sich Signale der G- (1512 cm^{-1} , 1268 cm^{-1}) und S-Einheiten (1602 cm^{-1} , 1329 cm^{-1} , 1124 cm^{-1}) detektieren, sowie die für HGS-Lignine typische C=O Streckschwingung in konjugierten Estergruppen bei 1164 cm^{-1} . Letztere ist bei KL und IAT nicht vorhanden, genauso wie die Signale der S-Einheiten bei 1329 cm^{-1} und 1124 cm^{-1} . Dies deutet, wie schon die UV-Vis Spektren gezeigt haben, darauf hin, dass KL und IAT hauptsächlich aus G-Einheiten aufgebaut sind, was jedoch eher auf die unterschiedliche Biomasse (Nadelhölzer) zurückzuführen ist als auf den Aufschlussprozess. Charakteristisch für G-Einheiten sind außerdem die zwei Peaks der C-H-out-of-plane-Deformationsschwingung in der Fingerprint-Region bei $852 - 854\text{ cm}^{-1}$ und $815 - 823\text{ cm}^{-1}$. Daneben ist auch das Signal der Methoxygruppen bei 2850 cm^{-1} bei KL und IAT weniger ausgeprägt, was daran liegen könnte, dass G-Einheiten nur eine Methoxygruppe am Ring besitzen, statt zwei wie die S-Einheiten.

Insgesamt können mit der FTIR- und UV-Vis-Spektroskopie Unterschiede zwischen den verschiedenen Ligninen festgestellt werden, vor allem wenn sich diese in ihrer Monolignolzusammensetzung unterscheiden. Dies ist der Fall beim Vergleich der MLs mit KL und IAT, zwischen den MLs werden jedoch keine signifikanten Unterschiede entdeckt. Dasselbe gilt auch beim Vergleich der FTIR-Spektren der Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss (siehe Abbildung A 6 im Anhang): sowohl ML2 als auch die MAs zeigen die gleichen für Lignin typische Banden, wobei lediglich die Intensitäten leicht variieren. Eine detailliertere Analyse der Monolignolanteile sowie Bindungen und Substrukturen kann mithilfe der HSQC NMR durchgeführt werden, wie im folgenden Kapitel 7.4 diskutiert wird.

7.4 Monolignolverhältnisse, Bindungstypen und Substrukturen

Die Monolignolverhältnisse sowie die Anteile der verschiedenen Bindungstypen und Substrukturen in den MLs wurden mithilfe der HSQC NMR semiquantitativ bestimmt. Die Spektren der jeweiligen Lignine (Abbildung A 7) sowie eine detaillierte Zuordnung der Signale (Tabelle A 3) sind im Anhang zu finden. Die aus den Spektren bestimmten Monolignolverhältnisse sind in Abbildung 7-5 zu sehen, die Bindungstypen finden sich in Abbildung 7-6. Eine Zusammenfassung der Werte sowie der Vergleich mit KL und IAT ist in Tabelle 7-3 gegeben.

Bei dem Monolignolverhältnis werden nur sehr geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen beobachtet. Da es sich um die gleiche Biomasse handelt, ist dies nicht verwunderlich. Lediglich MA180 weist einen etwas höheren Anteil an H-Einheiten von ($13,4 \pm 1,0$) % auf im Vergleich zu den restlichen Ligninen, bei denen der Anteil zwischen $5,9 - 7,3$ % liegt. Da bei der AH vor allem Hemicellulosen aus dem Miscanthus gelöst werden (siehe Kapitel 7.1), kommt es zu einer Spaltung der Lignin-Kohlenhydrat-Bindungen, was beim anschließenden Organosolv-Aufschluss die Zugänglichkeit zu verschiedenen Pflanzenteilen, in denen sich Ligningehalt und -struktur unterscheiden können, verbessert, wie auch bereits in Kapitel 6.2 für den Mahlprozess diskutiert wurde. Im Gegensatz zu den MLs bestehen KL und IAT nur aus G-Einheiten, was typisch für Nadelholz-Lignine ist⁷⁹, und das Fazit der UV-Vis- und FTIR-Spektroskopie bestätigt.

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

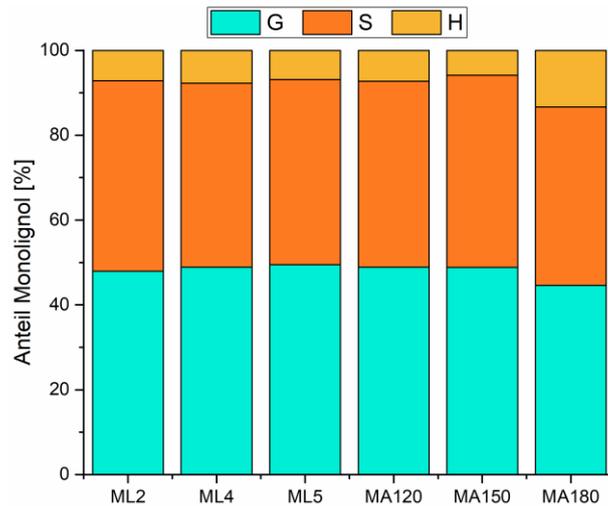


Abbildung 7-5: Anteil der Monolignole (siehe Abbildung 5-3) in Miscanthus-Ligninen nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen.

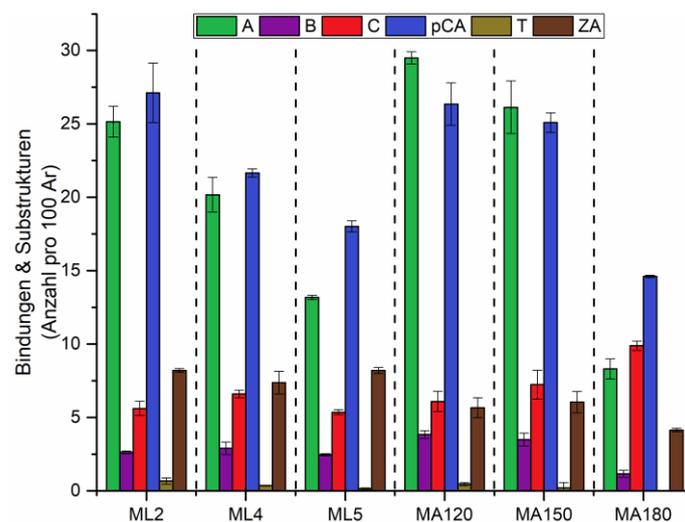


Abbildung 7-6: Anteil der Bindungstypen und Substrukturen (siehe Abbildung 5-5) in Miscanthus-Ligninen nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Bei den Bindungen sind deutlichere Unterschiede abhängig vom Aufschlussprozess festzustellen: vor allem die Anzahl an β -Aryl-Etherbindungen (A) nimmt von ML2 ($25,1 \pm 1,0$) über ML4 ($20,2 \pm 1,2$) zu ML5 ($13,2 \pm 0,2$) ab. Da Etherbindungen geringere Bindungsenthalpien besitzen als C-C Bindungen²⁰⁵, werden diese bei längerer Aufschlussdauer oder höheren Temperaturen folglich zuerst gespalten. Yao *et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss der Aufschlussdauer während des Organosolvprozesses und konnten eine Abnahme von 50,5 A pro 100 Aromaten nach 5 min auf 36,7 A pro 100 Aromaten nach 60 min feststellen.²²⁷ Auch für andere Aufschlussprozesse wie z.B. das Dampfexplosionsverfahren bestätigt sich die Beobachtung, dass eine Erhöhung der Prozessstärke mit einer Abnahme von A einhergeht.²¹³ Der Vergleich von ML4 und ML5 zeigt zudem, dass auch die EtOH-Konzentration einen Einfluss auf A hat: je geringer diese ist, desto höher ist die Konzentration an Protonen, was die Spaltung der Etherbindungen begünstigt.²²⁰ Für den Anteil an *p*-Coumarat (pCA) zeigt sich der gleiche Trend wie für A (ML2 > ML4 > ML5), was daran liegt, dass es sich ebenfalls um eine C-O-Bindung mit geringerer Bindungsenthalpie als die der C-C-Bindungen handelt.²⁰⁵ Auch dieser Trend konnte

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

bereits mithilfe der UV-Vis-Spektroskopie beobachtet werden (siehe Kapitel 7.3). Der Anteil an Resinol (B) ändert sich nicht signifikant, da diese Struktur hauptsächlich über eine Dimerisierung während der Ligninsynthese und nicht bei der Ligninmodifizierung während des Aufschlussprozesses geformt wird.⁶² Für Phenylcoumaran (C) kann kein eindeutiger Trend beobachtet werden, während sich die Anzahl an Zimtalkohol-Endgruppen (ZA) und Tricin (T) nicht verändert.

Tabelle 7-3: Anteile der Monolignole (S, G, H) sowie der am häufigsten vorkommenden Bindungstypen (A, B, C, D) und Substrukturen (ZA, pCA, T) in Ligninen aus *Miscanthus* nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie von KL und IAT.

	ML2	ML4	ML5	MA120	MA150	MA180	KL	IAT
Monolignole [%]								
S	44,9 \pm 0,4	43,4 \pm 0,4	43,7 \pm 0,1	43,8 \pm 1,3	45,3 \pm 1,8	42,0 \pm 0,5	-	-
G	48,0 \pm 0,2	48,9 \pm 0,1	49,5 \pm 0,2	48,9 \pm 1,2	48,8 \pm 1,4	44,6 \pm 1,0	100	100
H	7,1 \pm 0,4	7,7 \pm 0,4	6,9 \pm 0,1	7,3 \pm 0,2	5,9 \pm 1,1	13,4 \pm 1,0	-	-
Monolignolverhältnisse [-]								
S/G	0,94 \pm 0,01	0,89 \pm 0,01	0,88 \pm 0,01	0,90 \pm 0,05	0,93 \pm 0,06	0,94 \pm 0,03	-	-
H/G	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,14 \pm 0,00	0,15 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03	-	-
Bindungen & Substrukturen [Anzahl pro 100 Aromaten (S + G + H)]								
A	25,1 \pm 1,0	20,2 \pm 1,2	13,2 \pm 0,2	29,5 \pm 0,4	26,1 \pm 1,8	8,3 \pm 0,7	1,1	8,4
B	2,6 \pm 0,1	2,9 \pm 0,4	2,5 \pm 0,4	3,8 \pm 0,3	3,5 \pm 0,4	1,2 \pm 0,2	2,4	2,3
C	5,6 \pm 0,5	6,6 \pm 0,3	5,4 \pm 0,2	6,1 \pm 0,7	7,2 \pm 1,0	9,9 \pm 0,3	1,3	1,7
D	-	-	-	-	-	-	-	-
ZA	8,2 \pm 0,1	7,4 \pm 0,8	8,2 \pm 0,2	5,7 \pm 0,7	6,0 \pm 0,7	4,1 \pm 0,1	-	-
pCA	27,1 \pm 2,0	21,7 \pm 0,3	18,0 \pm 0,4	26,4 \pm 1,4	25,1 \pm 0,7	14,6 \pm 0,1	-	-
T	0,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1	0,2 \pm 0,4	-	-	-
Anteil an kondensierten Untereinheiten (KU) [%]								
	24,7 \pm 1,6	32,0 \pm 0,7	37,2 \pm 0,6	25,2 \pm 1,3	29,2 \pm 2,7	57,1 \pm 0,7	77,6	32,1

S: Syringol; G: Guajakol; H: *p*-Hydroxyphenyl; A: β -Aryl-Ether; B: Resinol; C: Phenylcoumaran; D: Spirodienon; ZA: Zimtalkohol; pCA: *p*-Coumarat; T: Tricin

Bei den Ligninen nach AH-Vorbehandlung sind ebenfalls Abhängigkeiten bestimmter Bindungstypen von den unterschiedlichen Temperaturen und somit Prozessstärken zu beobachten: der Anteil an A nimmt von MA120 (29,5 \pm 0,4) über MA150 (26,1 \pm 1,8) zu MA180 (8,3 \pm 0,7) ab, genauso wie der Anteil an pCA. Bei ZA und T sind dagegen keine eindeutigen Trends zu erkennen, dafür allerdings bei B und C. Während der Anteil an B mit zunehmender Temperatur leicht sinkt, steigt der Anteil an C an. Insgesamt führt dies trotzdem zu einem deutlichen Anstieg des Anteils an kondensierten Untereinheiten (KU): für MA120 liegt dieser bei (25,2 \pm 1,3) %, steigt für MA150 leicht an auf (29,2 \pm 2,7) % und für MA180 nimmt er mit (57,1 \pm 0,7) % deutlich zu. Araya *et al.* untersuchten den Einfluss der AH-Temperatur auf die Ligninstruktur anhand *Eucalyptus globulus* und kamen zu demselben Ergebnis wie hier dargestellt: mit steigender Temperatur und somit höherer Prozessstärke nimmt der Anteil an A ab, während es zur Bildung neuer kondensierter Ligninstrukturen kommt.²²⁸ Dass der Anstieg der KU von MA150 zu MA180 deutlich größer ausfällt als für MA120 zu MA150, obwohl die gleiche Temperaturdifferenz vorliegt, könnte an der unterschiedlichen Aktivierungsenergie der Depolymerisations- und Kondensationsreaktionen liegen, wie von Meyer *et al.* untersucht wurde: die Spaltung der Etherbindungen nimmt in direkter Abhängigkeit der Temperatur zu, während

die Bildung von C-C-Bindungen am aromatischen Ring deutlich mehr Energie benötigt, die erst ab einer gewissen Temperatur erreicht wird.²²⁹ Allerdings sollte auch angemerkt werden, dass der höhere Anteil an KU hauptsächlich auf die Abnahme von A zurückzuführen ist, während C in einem deutlich kleineren Maßstab ansteigt

In den beiden Alkali-Ligninen KL und IAT lassen sich im Gegensatz zu den MLs nur A, B und C nachweisen. Hu *et al.* untersuchten ebenfalls IAT mittels HSQC NMR und fanden mit jeweils 8,2 A, 4,3 B und 1,1 C pro 100 Aromaten Werte in derselben Größenordnung.²³⁰ KL besitzt dagegen einen deutlich geringeren Anteil von nur 1,1 A pro 100 Aromaten, während B und C vergleichbar mit IAT sind.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Monolignolzusammensetzung durch den Organosolv-Aufschluss oder die AH als Vorbehandlungen kaum beeinflusst wird, sondern viel mehr von der Art der Biomasse (Gras vs. Holz) abhängt. Auf die verschiedenen Bindungstypen, über die die Monolignoleinheiten verknüpft sind, haben die Prozessparameter jedoch einen großen Einfluss: je höher die Prozessstärke (abhängig von Temperatur, Zeit und EtOH-Konzentration), desto mehr Etherbindungen werden gespalten und desto höher die Wahrscheinlichkeit der Rekondensation der Ligninfragmente. Dies wirkt sich auch auf weitere Eigenschaften wie das Molekulargewicht (siehe Kapitel 7.6) oder den Phenolgehalt (siehe Kapitel 7.7) aus, wie im Folgenden diskutiert wird.

7.5 Methoxy- und Ethoxygehalt

Der Gehalt an Methoxy- und Ethoxygruppen wurde mittels HS-GC-MS untersucht, die Ergebnisse sind in Tabelle 7-4 dargestellt. Grundsätzlich besitzen die MLs einen geringeren Gehalt an Methoxygruppen als die MAs, bei den Ethoxygruppen kann kein eindeutiger Trend festgestellt werden. Diese Änderung kann nicht direkt auf Unterschiede in der Monolignolzusammensetzung der Lignine zurückgeführt werden, da diese sich mit Ausnahme von MA180 kaum unterscheiden (siehe Kapitel 7.4).

Tabelle 7-4: Ergebnisse der Bestimmung des Methoxy- und Ethoxygehaltes mittels HS-GC-MS der Lignine aus *Miscanthus* nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen sowie KL, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung eines Lignins.

	Methoxy (-OCH ₃) [mmol g ⁻¹]	Ethoxy (-OCH ₂ CH ₃) [mmol g ⁻¹]
ML2	2,93 \pm 0,11	0,32 \pm 0,04
ML4	2,97 \pm 0,11	0,35 \pm 0,05
ML5	2,95 \pm 0,12	0,31 \pm 0,04
MA120	3,24 \pm 0,22	0,44 \pm 0,09
MA150	3,32 \pm 0,25	0,38 \pm 0,07
MA180	3,30 \pm 0,14	0,35 \pm 0,06
KL	4,21 \pm 0,12	0,01 \pm 0,01

Da es sich bei dem Monolignolanteil, wie bereits in Kapitel 5.5 diskutiert wurde, um einen relativen Wert handelt, während die Methoxygruppen als Absolutwert angegeben werden, kann dies eine Erklärung für den fehlenden Zusammenhang zwischen beiden Parametern sein. Eine weitere Möglichkeit, ist, dass neben den aromatischen Methoxygruppen der G- und S-Einheiten auch aliphatische Methoxygruppen an den α - oder β -Kohlenstoffatomen eine Rolle spielen und während der verschiedenen Aufschlussprozesse bzw. Vorbehandlungen modifi-

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

ziert werden. Zudem zeigt MA180 (exemplarisch für die aus den autohydrolysierten Biomassen gewonnen Lignine) eine höhere Reinheit als ML2, was die (semiquantitative) Bestimmung der Monomierzusammensetzung oder auch der funktionellen Gruppen beeinflussen kann.

Das KL besitzt mit $(4,21 \pm 0,12)$ mmol g⁻¹ einen deutlich höheren Methoxygehalt als die OSL, was im Vergleich mit Literaturdaten $(4,2 - 6,3)$ mmol g⁻¹^{189, 191, 231} für KL dennoch eher gering ist. Ethoxygruppen sind dagegen nicht vorhanden, was dafür spricht, dass diese während des EtOH-Organosolv-Prozesses in die Struktur der OSL eingebracht werden.⁶²

7.6 Molmassenverteilung

Die Molmassen und Polydispersitäten der MLs aus verschiedenen Aufschlussprozessen sind in Abbildung 7-7 grafisch dargestellt, die zugehörigen Werte sowie der Vergleich mit KL und IAT findet sich in Tabelle 7-5. Grundsätzlich stimmen diese in ihrer Größenordnung gut mit Literaturdaten überein, was bereits in Kapitel 5.6 diskutiert wurde.

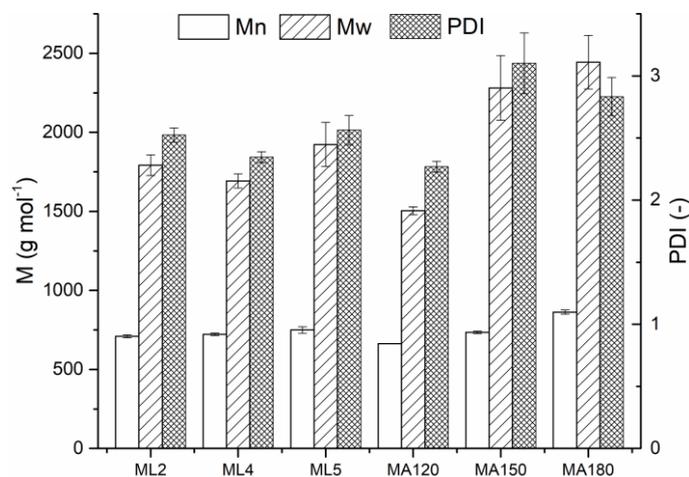


Abbildung 7-7: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Beim Vergleich der Lignine mit variierenden Prozessparametern, aber ohne AH, sind keine eindeutigen Trends zu erkennen: ihr M_w und der PDI unterscheidet sich nicht signifikant, lediglich das M_n ist für ML5 mit (750 ± 21) g mol⁻¹ signifikant höher als für ML2 mit (710 ± 10) g mol⁻¹. Auch in der Literatur finden sich keine einheitlichen Zusammenhänge zwischen der Aufschlussdauer und der Molekulargewichtsverteilung. Tao *et al.* isolierten Lignin aus Pappelholz mittels Organosolv-Aufschluss nach verschiedenen Zeitpunkten und konnten dabei zwar im Mittel eine Abnahme von M_n und M_w feststellen, allerdings nicht in direktem Zusammenhang mit der Reaktionszeit.²³² Pan *et al.* stellten fest, dass die Reaktionszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Molmasse der isolierten Lignine hat.²²⁰ Im Gegensatz dazu konnten sie allerdings einen Effekt der EtOH-Konzentration feststellen: sowohl das Molekulargewicht als auch der PDI nahmen mit steigender EtOH-Konzentration zu, was mit den hier dargestellten Ergebnissen (Vergleich von ML4 und ML5) nicht bestätigt werden konnte. Huijgen *et al.* konnten ebenfalls keinen Einfluss der Prozessparameter auf die Molekulargewichtsverteilung der OSL aus Weizenstroh feststellen¹⁶¹ und auch Bergrath *et al.* fanden in einer Literaturstudie keinen Zusammenhang zwischen der Reaktionszeit und dem Molekulargewicht, da je nach Studie sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme von M_w und M_n beobachtet werden konnte.⁷³

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

Tabelle 7-5: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus *Miscanthus* nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie KL und IAT. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

	M_n (g mol ⁻¹)		M_w (g mol ⁻¹)		PDI [-]	
ML2	710 \pm 10	(b)	1792 \pm 65	(ab)	2,53 \pm 0,06	(ab)
ML4	722 \pm 8	(bc)	1693 \pm 45	(ab)	2,35 \pm 0,04	(a)
ML5	750 \pm 21	(c)	1924 \pm 140	(bc)	2,56 \pm 0,12	(ab)
MA120	663 \pm 2	(a)	1504 \pm 25	(a)	2,27 \pm 0,04	(a)
MA150	735 \pm 8	(bc)	2281 \pm 205	(cd)	3,10 \pm 0,24	(c)
MA180	862 \pm 13	(d)	2444 \pm 169	(d)	2,83 \pm 0,16	(bc)
KL	1352	(f)	5012	(e)	3,71	(d)
IAT	1124	(e)	4528	(e)	4,03	(d)

Die niedrigsten Werte aller Lignine für M_n , M_w und den PDI besitzt MA120, was damit erklärt werden könnte, dass die AH bei niedriger Temperatur bereits zur Spaltung der Etherbindungen führt, aber Kondensationsreaktionen noch nicht stattfinden. Wird die AH-Temperatur erhöht, steigen M_n und M_w an, beim PDI ist kein Zusammenhang erkennbar. Auch hier finden sich in der Literatur keine einheitlichen Trends zum Einfluss der AH auf die Struktur der isolierten Organosolv-Lignine.⁷³ Grzybek *et al.* untersuchten die AH mit 3 % Na₂SO₃ bei 90 °C vor dem Organosolv-Aufschluss aus drei verschiedenen Biomassen und konnten keine Zusammenhänge mit M_n , M_w oder dem PDI feststellen.²³³ Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die optimalen Aufschlussbedingungen, sowohl beim Organosolvprozess, als auch bei der AH, von Biomasse zu Biomasse unterschiedlich sind. Ein Grund dafür können unterschiedliche Monolignolzusammensetzungen sein: in Studien wurde bereits festgestellt, dass G-Einheiten eine höhere Neigung zu Rekondensationsreaktionen aufweisen.^{234, 235} Da G-Einheiten den größten Teil aller hier untersuchten MLs ausmachen, scheint eine Zunahme der Molekulargewichte aufgrund von Kondensationsreaktionen zunächst plausibel. Li *et al.* untersuchten die De- und Repolymerisation während des Dampfexplosionsverfahren von Espenholz und fanden einen ähnlichen Trend wie bei den hier dargestellten Ergebnissen: mit steigender Prozessstärke nahm das Molekulargewicht der Lignine bei einer Abnahme der β -Aryl-Etherbindungen zu, was sie auf einen hohen Anteil an Kondensationsreaktionen zurückführten.²¹³ Auch die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Anteile an Phenylcoumaran (C) und KU mit steigender AH-Temperatur zwar leicht zunehmen, allerdings nehmen die Etherbindungen in viel größerem Maßstab ab (siehe Kapitel 7.4), was eher für eine Abnahme des Molekulargewichts sprechen würde. Eine andere Erklärung für die Zunahme der Molekulargewichte könnte die bessere Zugänglichkeit zu größeren Ligninmolekülen beim Organosolv-Aufschluss sein, die durch die Entfernung der Zucker während der AH begünstigt wird.

Die Unterschiede in den Massenmittelwerten der verschiedenen Lignine lassen sich auch in den Molmassenverteilungen (Abbildung 7-8 und Abbildung 7-9) beobachten. Beim Vergleich von ML2, ML4 und ML5 ist gut zu sehen, dass ML5 einen kleineren Massenanteil im Bereich von 330 – 340 g mol⁻¹ besitzt, was die höheren Werte für M_n und M_w erklärt. Betrachtet man die Lignine nach vorheriger AH, zeigt MA120 den größten Massenanteil an kleinen Molekülen, außerdem liegt das zweite Maximum bei einer niedrigeren Molmasse (1044 g mol⁻¹) im Vergleich mit MA150 (1248 g mol⁻¹) und MA180 (1300 g mol⁻¹).

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

Die beiden Alkali-Lignine KL und IAT besitzen jeweils signifikant höhere Molmassen und Polydispersitäten als die OSL, was gut mit Literaturdaten übereinstimmt.^{139, 236, 237} Beide zeigen zwar auch einen geringen Massenanteil an kleinen Molekülen bei 339 g mol^{-1} (KL) und 330 g mol^{-1} (IAT), das Maximum liegt allerdings höher bei 1857 g mol^{-1} (KL) und 1807 g mol^{-1} (IAT) im Vergleich zu den OSL und die Molekulargewichtsverteilung ist deutlich breiter. Das M_n (1124 g mol^{-1}) und M_w (4528 g mol^{-1}) von IAT liegen in der erwarteten Größenordnung: Rohde *et al.* ermittelten Molekulargewichte von 1100 g mol^{-1} (M_n) und 4500 g mol^{-1} (M_w) für acetyliertes IAT in THF relativ zu Polystyrol, was trotz der verschiedenen Messparameter gut mit dem hier gemessenen Wert übereinstimmt.¹⁹²

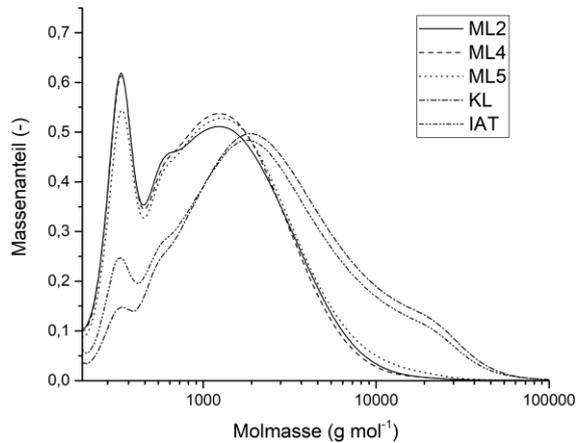


Abbildung 7-8: Molmassenverteilungen der Miscanthus-Lignine nach variierenden Aufschlussprozessen sowie KL und IAT.

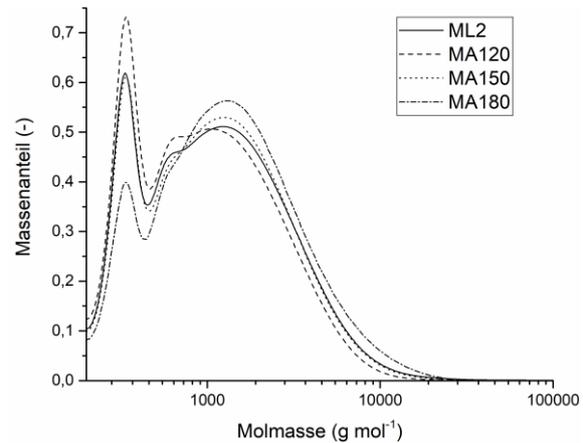


Abbildung 7-9: Molmassenverteilungen der Miscanthus-Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Dauer des Aufschlusses keinen signifikanten Einfluss auf die Molmasse hat, eine geringere EtOH-Konzentration und die AH-Temperatur dagegen schon. Die beobachtete Zunahme von M_n und M_w könnte zum einen an Kondensationsreaktionen liegen, die in der HSQC NMR zwar beobachtet wurden, allerdings in viel kleinerem Maßstab als die Depolymerisation. Eine weitere Möglichkeit ist die bessere Zugänglichkeit zu größeren Ligninmolekülen, sowohl durch die geänderte Lösemittelkonzentration als auch durch die Entfernung der Zucker durch die vorherige AH bei $180 \text{ }^\circ\text{C}$.

7.7 Antioxidanz und Phenolgehalt

Für die Ermittlung der antioxidativen Kapazität der Lignine wurde die *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC) jeweils mit dem DPPH-, ABTS- und FRAP-Assay bestimmt, sowie der Gesamtphenolgehalt (*total phenol content*, TPC) mithilfe des FC-Assays. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-10 dargestellt, die zugehörigen Werte finden sich in Tabelle A 8 im Anhang.

Alle vier Assays zeigen eine Zunahme des TEAC- und TPC-Wertes von ML4 und ML5 im Vergleich zu ML2. Im DPPH-Assay zeigt ML4 die höhere antioxidative Kapazität als ML5, bei den anderen drei Assays ist es umgekehrt. Pan *et al.* untersuchten die Zusammenhänge zwischen den Organosolv-Aufschlussbedingungen, der Ligninstruktur und der Antioxidanz und kamen zu ähnlichen Ergebnissen: sowohl eine längere Reaktionszeit als auch eine geringere EtOH-Konzentration führten zu einer Zunahme der aromatischen Hydroxygruppen, was auf die Spaltung der Etherbindungen (siehe Kapitel 7.4) zurückzuführen ist. Mit dieser Zunahme des Phenolgehaltes steigt auch die Antioxidanz an.²²⁰ Guo *et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss der Reaktionszeit beim Organosolv-Aufschluss von Pappelholz. Je länger der Aufschluss

dauerte, desto höher war der Gehalt an phenolischen Hydroxygruppen, allerdings bestimmt mittels ^{31}P -NMR.²³⁸ Auch Bae *et al.* isolierten EtOH-Lignin bei verschiedenen Aufschlussbedingungen mit dem Ergebnis, dass eine höhere Prozessstärke zu weniger Etherbindungen, mehr phenolischen Hydroxygruppen und einem geringeren IC_{50} -Wert führt, was für eine höhere anti-oxidative Aktivität spricht.²³⁹ Neben der Zunahme der phenolischen Hydroxygruppen wird in allen Studien zudem eine Abnahme der aliphatischen Hydroxygruppen beobachtet⁷³, was hier allerdings nicht untersucht wurde.

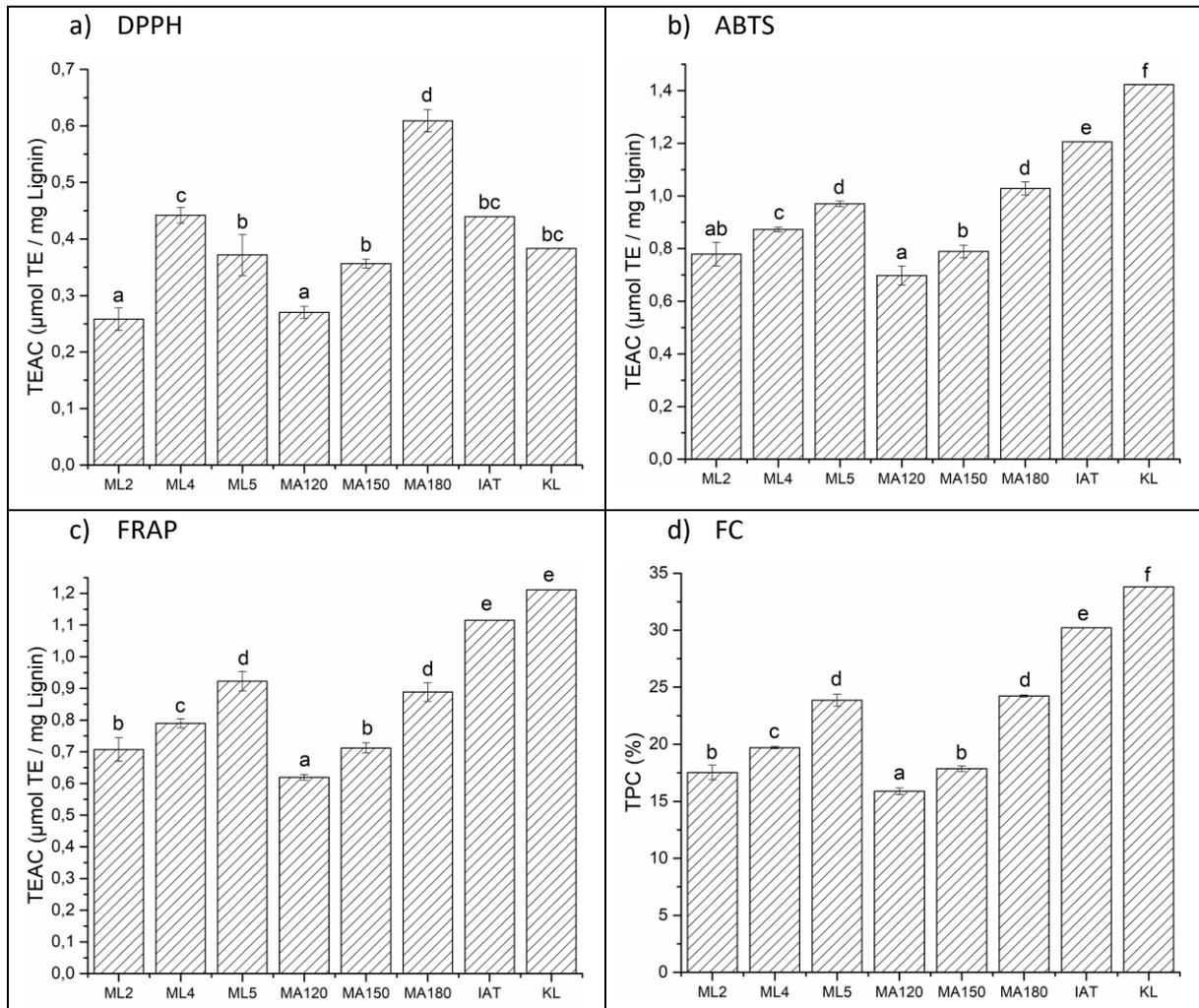


Abbildung 7-10: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Miscanthus-Lignine nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie KL und IAT. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

Beim Vergleich der autohydrolysierten Lignine lässt sich in allen vier Assays eine Zunahme des TEAC bzw. des TPC mit steigender Temperatur beobachten. Auch wenn es in der Literatur kaum Studien gibt, die die Auswirkungen verschiedener AH-Temperaturen auf die Antioxidanz bzw. den Phenolgehalt untersuchen, lässt sich auch diese Beobachtung gut mit der zunehmenden Prozessstärke der Vorbehandlung erklären: harschere Bedingungen führen zu einer Spaltung der Etherbindungen, wodurch sich der Gehalt an phenolischen Hydroxygruppen und somit die Antioxidanz erhöht. In der HSQC NMR (siehe Kapitel 7.4) konnte die Abnahme der Etherbindungen gut beobachtet werden, während die Repolymerisationsprodukte nur in kleinerem Maßstab zugenommen haben. Lediglich Ibrahim *et al.* untersuchten den Einfluss verschiedener AH-Bedingungen (150 – 170 °C, 60 – 120 min, mit/ohne 20 mM H_2SO_4) auf das

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

anschließend isolierte EtOH-OSL, und fanden mit zunehmender Prozessstärke einen höheren Anteil an phenolischen Hydroxygruppen.⁷⁴ Der Vergleich von Organosolv-Aufschlüssen mit und ohne vorheriger AH ist hingegen oft beschrieben: Michelin *et al.* isolierten Lignin aus Maiskolben und ermittelten für die bei 200 °C autohydrolysierte Biomasse einen höheren TPC sowie geringe IC₅₀-Werte im DPPH- und ABTS-Assay im Vergleich zum unbehandelten Mais.²¹⁴ Morales *et al.* untersuchten die Ligningewinnung nach vorheriger AH bei 179 °C aus Mandelschalen und bei 200 °C aus Walnusschalen und ermittelten ebenfalls einen höheren TPC der Lignine nach der AH der Biomassen.²⁰⁰ Wen *et al.* konnten durch AH von Bambus bei 180 °C ebenfalls den Anteil an phenolischen Hydroxygruppen im Vergleich zur unbehandelten Biomasse erhöhen.²²¹ All diese Studien nutzten Temperaturen über 179 °C für die AH, um den TPC im Vergleich zur unbehandelten Biomasse zu steigern. Dies deckt sich mit den hier dargestellten Ergebnissen: MA180 besitzt einen signifikant höheren TPC als ML2. MA150 dagegen unterscheidet sich nicht von ML2, während MA120 sogar einen niedrigeren TPC aufweist. Dies deutet darauf hin, dass eine gewisse Temperatur für die Vorbehandlung benötigt wird, um einen Einfluss auf TPC und Antioxidanz nehmen zu können.

Neben dem in der Literatur gut beschriebenen Zusammenhang zwischen dem Anteil phenolischer Hydroxygruppen und der Antioxidanz gibt es auch Hinweise darauf, dass Methoxygruppen, insbesondere in *ortho*-Position zu den Hydroxygruppen, die Antioxidanz erhöhen können.²⁴⁰ Ein Zusammenhang zwischen TPC und Methoxygehalt konnte hier nicht nachgewiesen werden: der Anteil an Methoxygruppen unterscheidet sich nur zwischen den Ligninen mit und ohne AH, innerhalb dieser beiden Gruppen jedoch nicht. Ein weiterer oft beschriebener Trend ist der Einfluss der Molekulargewichtsverteilung auf die Antioxidanz: diese sinkt mit steigendem M_n, M_w und PDI.²²⁰ Auch dieser Zusammenhang konnte mit den hier ermittelten Daten nicht bestätigt werden.

Die Alkali-Lignine KL und IAT zeigen im ABTS-, FRAP- und FC-Assay die mit Abstand höchsten Werte für TEAC und TPC. Dies passt zu der Annahme, dass ein geringer Anteil an Etherbindungen zu einem hohen Gehalt an phenolischen Hydroxygruppen und einer hohen Antioxidanz führt. Allerdings besitzt das KL auch einen höheren Anteil an Restzuckern (siehe Kapitel 7.2), was zu höheren TPC-Werten führen kann, da neben Phenolen auch weitere oxidierbare Gruppen mit dem Reagenz reagieren können. Im DPPH-Assay schneiden KL und IAT schlechter ab als MA180 und sind vergleichbar mit ML4 und ML5. Insgesamt zeigt der Vergleich der Assays erneut, dass der DPPH-Assay leicht abweichende Ergebnisse von den anderen dreien liefert: im FRAP- und FC-Assay werden alle Miscanthus-Lignine mithilfe des Tukey-Tests in die gleichen Gruppen eingeteilt, und auch der ABTS-Assay zeigt eine ähnliche Tendenz. Dies passt wiederum gut zu den Ergebnissen der Korrelationen zwischen den Assays bei Betrachtung aller in dieser Arbeit untersuchten Lignine (siehe Tabelle A 6 im Anhang) und wird auch deutlich, wenn man die Standard-Scores der MLs in Abbildung 7-11 miteinander vergleicht: hier fällt lediglich der DPPH-Assay bei der Einstufung der Lignine aus der Reihe. Zudem besitzt der DPPH-Assay, wie bereits in Kapitel 5.7 und Kapitel 6.6 diskutiert wurde, die geringste Trennschärfe: mit ihm können vier Gruppen voneinander unterschieden werden, während es mit dem FRAP-Assay fünf und dem ABTS- und FC-Assay sogar sechs Gruppen sind.

Durch die Mittelung der Ergebnisse aller vier Assays kann ein relativer Index der antioxidativen Kapazität (*relative antioxidant capacity index*, RACI) ermittelt werden (siehe Abbildung 7-12). Diese Darstellung verdeutlicht noch einmal die bisher aufgezeigten Trends: eine längere Auf-

schlussdauer (ML4) sowie die Kombination mit einer geringeren EtOH-Konzentration (ML5) erhöht die antioxidative Kapazität, während dies bei der vorherigen AH nur mit einer Temperatur von 180 °C (MA180) möglich ist. Bei niedrigeren AH-Temperaturen (MA120 & MA150) kann die Antioxidanz nicht deutlich verbessert werden.

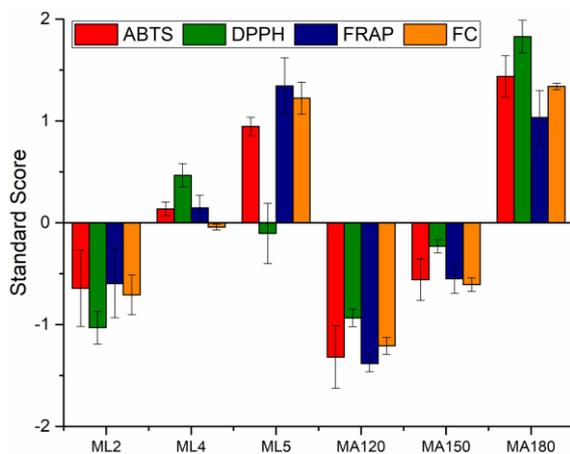


Abbildung 7-11: Vergleich der Standard-Scores der Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen mit vier verschiedenen Assays, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

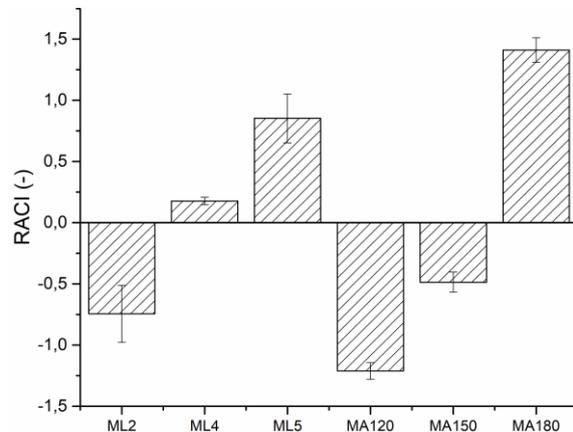


Abbildung 7-12 Relativer Index der antioxidativen Kapazität (*relative antioxidant capacity index*, RACI) der Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

Abschließend lässt sich feststellen, dass über die Wahl der Aufschlussbedingungen bzw. einer entsprechenden Vorbehandlung der Biomasse die Antioxidanz bzw. der Phenolgehalt in den Ligninen variiert werden kann. Eine höhere Prozessstärke führt durch die Spaltung der Etherbindungen zu einer Zunahme der phenolischen Hydroxygruppen, was sich positiv auf die antioxidative Kapazität der Lignine auswirkt. Rekondensationsreaktionen wurden mithilfe der HSQC NMR zwar ebenfalls beobachtet, allerdings in viel kleinerem Ausmaß als die Depolymerisation, sodass der TPC trotzdem steigt.

7.8 Zusammenfassung

Anhand der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass sich sowohl über die Wahl der Aufschlussbedingungen als auch durch eine vorherige AH der Biomasse die Ausbeute sowie die Struktur und Eigenschaften der isolierten Lignine variieren lassen. Bereits bei der Analyse der chemischen Zusammensetzung der Miscanthus-Biomasse kann die Delignifizierung beim Organosolv-Aufschluss gut beobachtet werden. Die AH führt zu einer fast vollständigen Entfernung der Zucker und einer Verringerung des Aschegehalts, wodurch die Anteile an Lignin und Cellulose zunehmen. Die Ausbeute der OSL lässt sich durch eine längere Aufschlussdauer sowie eine geringere EtOH-Konzentration steigern, während die AH erst ab einer gewissen Temperatur einen Einfluss hat. Daneben wirkt sich die AH auch auf die Reinheit der isolierten Lignine aus: für MA180 ist sie höher als für ML2. Beide besitzen einen deutlich geringeren Anteil an Hemicellulose und Asche als KL.

Bereits mit simplen spektroskopischen Methoden wie der UV-Vis- und FTIR-Spektroskopie lässt sich eine unterschiedliche Monolignolzusammensetzung zwischen den Miscanthus-Ligninen und KL sowie IAT feststellen, was durch die HSQC NMR bestätigt wurde. Der Anteil der Monolignole wird dabei durch den Organosolv-Aufschluss oder die AH als Vorbehandlungen kaum beeinflusst, sondern hängt von der Biomasse (Gras vs. Holz) ab. Im Gegensatz dazu hat

7. Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen

der Aufschlussprozess sehr wohl einen Einfluss auf die Bindungstypen, über die die Monolignole miteinander verknüpft sind: je höher die Prozessstärke (Temperatur, Zeit, EtOH-Konzentration), desto mehr Etherbindungen werden gespalten. Die Rekondensation der Ligninfragmente konnte ebenfalls beobachtet werden, allerdings in geringerem Maße als die Depolymerisation. Diese Spaltung der Etherbindungen führt zu einem höheren TPC und damit auch zu einer höheren antioxidativen Kapazität der Lignine. Im Widerspruch dazu steht die Zunahme der Molekulargewichte der Lignine nach Aufschluss in geringerer EtOH-Konzentration oder nach AH bei 180 °C: der Anteil an kondensierten Untereinheiten nimmt zwar zu, aber auch der TPC. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die bessere Zugänglichkeit zu größeren Ligninmolekülen durch die geänderte Lösemittelzusammensetzung oder die Entfernung der Zucker bei der AH sein. Der Gehalt an Methoxygruppen unterscheidet sich zwischen den Ligninen mit und ohne vorherige AH, innerhalb dieser beiden Gruppen jedoch nicht. Beim Ethoxygehalt gibt es einen Unterschied zwischen den OSL und KL, was dafürspricht, dass die Ethoxylierung während des ethanolischen Organosolv-Prozesses stattfindet.

Insgesamt passen die Ergebnisse der verschiedenen Analysenmethoden zum Großteil gut zueinander und werden von Literaturdaten gestützt: eine höhere Prozessstärke (längere Aufschlussdauer, geringere EtOH-Konzentration) führt zu einer Spaltung der Etherbindungen und damit zu einem höheren Gehalt an phenolischen Hydroxygruppen und einer gesteigerten Antioxidanz. Lediglich die Zunahme der Molmasse lässt sich nicht mit der Abnahme der Bindungen erklären, könnte aber an der besseren Zugänglichkeit bzw. Löslichkeit größerer Ligninmoleküle liegen. Durch die vorherige AH bei 180 °C kann die Reinheit der Lignine erhöht werden, ebenso wie die Ausbeute und der TPC bzw. die Antioxidanz.

IV Zusammenfassung und Ausblick

Lignin, das am häufigsten vorkommende aromatische Biopolymer auf der Erde, birgt ein bisher unausgeschöpftes Potential. Seine heterogene Struktur, die von verschiedenen Faktoren wie Biomasse und Aufschlussprozess abhängt, behindert allerdings noch immer die großflächige Anwendung. Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf die Struktur und Antioxidanz von Organosolv-Ligninen, was einen wichtigen Schritt in Hinblick auf die spätere Nutzung, vor allem für stoffliche Anwendungen, darstellt. Die Ligninisolierung erfolgte aus den drei sogenannten Low-Input-Pflanzen Miscanthus, Paulownia und Silphie, wobei letztere zum ersten Mal für die Ligningewinnung erprobt wurde, sowie aus Weizenstroh und Buchenholz, die in der Literatur bereits gut beschrieben sind. Daneben wurde der Einfluss der Partikelgröße der Biomasse am Beispiel von Miscanthus und Paulownia untersucht, sowie die Variation der Aufschlussparameter (Zeit, EtOH-Konzentration) bei gleicher Biomasse und die Autohydrolyse dieser vor dem Aufschluss. Als Referenz wurden zudem das kommerzielle Indulin AT und ein Kraft-Lignin herangezogen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass der genutzte katalysatorfreie Organosolv-Aufschluss bezogen auf den Restgehalt an Polysacchariden sehr reine Lignine in reproduzierbaren Ausbeuten und Qualitäten liefert, was ebenfalls einen grundlegenden Aspekt für die weitere Verwertung des Lignins darstellt. Die Ausbeute variiert dabei zum einen abhängig von der Biomasse, lässt sich zum anderen aber auch durch Vorbehandlungen und die gewählten Aufschlussparameter steigern. Durch eine feinere Vermahlung der Paulownia konnte die Ausbeute erhöht werden. Beim Organosolv-Aufschluss aus Miscanthus steigerten eine längere Aufschlussdauer und eine geringere EtOH-Konzentration die Ausbeute. Das gleiche konnte mit der Autohydrolyse bei 180 °C erzielt werden, die zusätzlich eine höhere Reinheit des isolierten Lignins liefert.

Die Monomerzusammensetzung der Lignine wird hauptsächlich durch die Art der Biomasse bestimmt. Während die Graslignine aus allen drei Monolignolen aufgebaut sind und die für sie typischen Anteile an Tricin und *p*-Coumarat aufweisen, bestehen die Laubholz- und Silphie-Lignine mehrheitlich aus S- und G-Einheiten und weisen Spuren bis keine Anteile an H-Einheiten auf. Die Nadelholzlignine (KL und IAT) bestehen nur aus G-Einheiten. Durch die Variation des Aufschlussprozesses lässt sich die Monomerzusammensetzung kaum verändern, lediglich durch das feinere Vermahlen der Biomassen konnte dies gelingen: für die kleinste Siebfraktion nahm der Anteil an H-Einheiten zu, was sich durch eine bessere Zugänglichkeit zu verschiedenen Pflanzenteilen erklären lässt, in denen sich Ligningehalt und -struktur unterscheiden können. Die Anzahl der verschiedenen Bindungstypen und Substrukturen hängt zum einen von der Monolignolzusammensetzung der Lignine ab, kann aber zum anderen auch durch den Mahl- oder Aufschlussprozess variiert werden: je höher die Prozessstärke (Mahlgrad der Biomasse, Aufschlusstemperatur und -dauer, EtOH-Konzentration), desto mehr Etherbindungen werden gespalten. Die Rekondensation der Ligninfragmente konnte ebenfalls beobachtet werden, allerdings in geringerem Maße als die Depolymerisation.

Ebenfalls untersucht wurde der Gehalt an Methoxy- und Ethoxygruppen, wobei sich jedoch nur zwischen den verschiedenen Biomassen leichte Unterschiede im Methoxygehalt feststellen ließen, sowie zwischen den Ligninen mit und ohne vorherige Autohydrolyse der Biomasse. Beim Ethoxygehalt gibt es einen Unterschied zwischen den Organosolv- und Kraft-Ligninen,

was dafürspricht, dass die Ethoxylierung während des ethanolschen Organosolv-Prozesses stattfindet.

Das Molekulargewicht wird sowohl von der Art der Biomasse als auch von den Vorbehandlungen und Aufschlussbedingungen beeinflusst: die Holzlignine weisen höhere Molmassen auf als die Gras- und Krautlignine. Ein Einfluss der Partikelgröße lässt sich nur bei den Paulownia-Ligninen beobachten, wo M_w und PDI bei gleichbleibendem M_n zunehmen, während es bei den Miscanthus-Ligninen keine Änderungen gibt. Auch die verschiedenen Aufschlussprozesse bestätigen den bei Paulownia beobachteten Trend: eine höhere Prozessstärke führt zu höheren Molekulargewichten und Polydispersitäten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Monomerzusammensetzung: hier wurden hauptsächlich Depolymerisationsreaktionen, nämlich die Spaltung der Etherbindungen beobachtet, eine höhere Molmasse deutet jedoch auf Rekondensationsreaktionen hin. Da es sich bei beiden jedoch nicht um absolute, sondern relative Methoden handelt, könnte dies eine mögliche Erklärung sein. Eine andere ist die bessere Zugänglichkeit zu größeren Ligninmolekülen durch die Vorbehandlung oder den Aufschlussprozess.

Allerdings passt die Zunahme des TPC sehr gut zu der Abnahme der Etherbindungen durch die Variation des Aufschlusses: werden Etherbindungen gespalten, entstehen neue phenolische Hydroxygruppen in der Ligninstruktur, die sich positiv auf die Antioxidanz auswirken, wie hier gezeigt werden konnte. Bei der Variation der Partikelgröße der Biomasse konnte weder bei Miscanthus noch bei Paulownia ein eindeutiger Trend bezüglich des TPC oder der Antioxidanz festgestellt werden. Bei den Organosolv-Ligninen aus verschiedenen Biomassen zeigen die Laubholzlignine die höchste Antioxidanz. Hier stellt Miscanthus-Lignin mit einer deutlich höheren Antioxidanz als Weizenstroh und Silphie eine Ausnahme der Gras- bzw. Krautlignine dar. Alles in allem entspricht der Einfluss der Biomasse auf die Ligninstruktur und -eigenschaften den aus der Literatur bekannten Daten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Biomassetypen ließen sich gut erkennen. Nicht so eindeutig ist der Einfluss der Partikelgröße der Biomasse: diese Arbeit liefert Hinweise darauf, dass verschiedene Mahlgrade zu einem gewissen Teil einen Einfluss auf das isolierte Lignin haben können. Um jedoch belastbare Aussagen zu diesem Einfluss treffen zu können, wäre in zukünftigen Studien eine Ausweitung des Probensets sinnvoll, sowie eine Betrachtung des Mahlprozesses selbst inklusive Dauer und entstehender Temperatur. Die Ergebnisse der verschiedenen Aufschlussprozesse passen wiederum gut zu Literaturdaten: eine höhere Prozessstärke führt zu einer Spaltung der Etherbindungen und damit zu einem höheren TPC und einer gesteigerten Antioxidanz. Auf diese Weise ist es also durchaus möglich, die Eigenschaften der isolierten Lignine anzupassen, allerdings sind dazu noch weitere Studien nötig. Hier wurde exemplarisch jeweils nur ein Prozessparameter geändert, für ein tieferes Verständnis der Struktur-Eigenschafts-Beziehungen sollten jedoch Versuchsreihen angesetzt werden, um die Auswirkungen auf Struktur und Eigenschaften der Lignine besser zu verstehen. Dies würde einen weiteren wichtigen Grundstein setzen für die zukünftige stoffliche Nutzung der Lignine, z.B. als Polyole oder Antioxidantien.

Literaturverzeichnis

1. Kumar, B.; Bhardwaj, N.; Agrawal, K.; Chaturvedi, V.; Verma, P. (2020) Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Process Technol* 199, 106244. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>.
2. Hassan, S. S.; Williams, G. A.; Jaiswal, A. K. (2019) Moving towards the second generation of lignocellulosic biorefineries in the EU: Drivers, challenges, and opportunities. *Renew Sustain Energy Rev* 101, 590–599. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.11.041>.
3. Chen, M.; Li, Y.; Liu, H.; Zhang, D.; Shi, Q.-S.; Zhong, X.-Q.; Guo, Y.; Xie, X.-B. (2023) High value valorization of lignin as environmental benign antimicrobial. *Mater Today Bio* 18, 100520. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100520>.
4. Suota, M. J.; Kochevka, D. M.; Ganter Moura, M. G.; Pirich, C. L.; Matos, M.; Magalhães, W. L. E.; Ramos, L. P. (2021) Lignin functionalization strategies and the potential applications of its derivatives – A Review. *Bioresources* 16 (3), 6471–6511. <https://doi.org/10.15376/biores.16.3.Suota>.
5. Sugiarto, S.; Leow, Y.; Tan, C. L.; Wang, G.; Kai, D. (2022) How far is Lignin from being a biomedical material? *Bioact Mater* 8, 71–94. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.023>.
6. Alzagameem, A.; Bergs, M.; Do, X. T.; Klein, S. E.; Rumpf, J.; Larkins, M.; Monakhova, Y.; Pude, R.; Schulze, M. (2019) Low-Input Crops as Lignocellulosic Feedstock for Second-Generation Biorefineries and the Potential of Chemometrics in Biomass Quality Control. *Appl Sci* 9 (11), 2252. <https://doi.org/10.3390/app9112252>.
7. European Commission (2018) A sustainable Bioeconomy for Europe: Strengthening the connection between economy, society and the environment: Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions
8. Clifton-Brown, J.; Harfouche, A.; Casler, M. D.; Dylan Jones, H.; Macalpine, W. J.; Murphy-Bokern, D.; Smart, L. B.; Adler, A.; Ashman, C.; Awty-Carroll, D.; Bastien, C.; Bopper, S.; Botnari, V.; Brancourt-Hulmel, M.; Chen, Z.; Clark, L. V.; Cosentino, S.; Dalton, S.; Davey, C.; Dolstra, O.; Donnison, I.; Flavell, R.; Greef, J.; Hanley, S.; Hastings, A.; Hertzberg, M.; Hsu, T.-W.; Huang, L. S.; Iurato, A.; Jensen, E.; Jin, X.; Jørgensen, U.; Kiesel, A.; Kim, D.-S.; Liu, J.; McCalmont, J. P.; McMahan, B. G.; Mos, M.; Robson, P.; Sacks, E. J.; Sandu, A.; Scalici, G.; Schwarz, K.; Scordia, D.; Shafiei, R.; Shield, I.; Slavov, G.; Stanton, B. J.; Swaminathan, K.; Taylor, G.; Torres, A. F.; Trindade, L. M.; Tschaplinski, T.; Tuskan, G. A.; Yamada, T.; Yeon Yu, C.; Zalesny, R. S.; Zong, J.; Lewandowski, I. (2019) Breeding progress and preparedness for mass-scale deployment of perennial lignocellulosic biomass crops switchgrass, miscanthus, willow and poplar. *Glob Change Biol Bioenergy* 11 (1), 118–151. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12566>.
9. Cossel, M. von; Lewandowski, I.; Elbersen, B.; Staritsky, I.; van Eupen, M.; Iqbal, Y.; Mantel, S.; Scordia, D.; Testa, G.; Cosentino, S. L.; Maliarenko, O.; Eleftheriadis, I.; Zanetti, F.; Monti, A.; Lazdina, D.; Neimane, S.; Lamy, I.; Ciadamidaro, L.; Sanz, M.; Esteban Carrasco, J.; Ciria, P.; McCallum, I.; Trindade, L. M.; van Loo, E. N.; Elbersen, W.; Fernando, A. L.; Papazoglou, E. G.; Alexopoulou, E. (2019) Marginal Agricultural Land Low-Input Systems for Biomass Production. *Energies* 12 (16), 3123. <https://doi.org/10.3390/en12163123>.

10. Scordia, D.; Cosentino, S. (2019) Perennial Energy Grasses: Resilient Crops in a Changing European Agriculture. *Agriculture* 9 (8), 169. <https://doi.org/10.3390/agriculture9080169>.
11. Müller, A.; Weigelt, J.; Götz, A.; Schmidt, O.; Lobos Alva, I.; Matuschke, I.; Ehling, U.; Beringer, T. (2015) The Role of Biomass in the Sustainable Development Goals: A Reality Check and Governance Implications: IASS Working Paper. Institute for Advanced Sustainability Studies (IASS)
12. Federal Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection; Federal Ministry of Education and Research; Federal Ministry of Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety; Federal Ministry of Economics and Technology (2012) Biorefineries Roadmap: as part of the German Federal Government action plans for the material and energetic utilisation of renewable raw materials, Berlin, Germany.
13. Brosse, N.; Dufour, A.; Meng, X.; Sun, Q.; Ragauskas, A. (2012) Miscanthus: a fast-growing crop for biofuels and chemicals production. *Biofuels, Bioprod Bioref* 6 (5), 580–598. <https://doi.org/10.1002/bbb.1353>.
14. Kellogg, E. A. (2013) C4 photosynthesis. *Curr Biol* 23 (14), R594-9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.066>.
15. Bergs, M.; Monakhova, Y.; Diehl, B. W.; Konow, C.; Völkerling, G.; Pude, R.; Schulze, M. (2021) Lignins Isolated via Catalyst-Free Organosolv Pulping from *Miscanthus x giganteus*, *M. sinensis*, *M. robustus* and *M. nagara*: A Comparative Study. *Molecules* 26 (4). <https://doi.org/10.3390/molecules26040842>.
16. da Costa, R. M. F.; Lee, S. J.; Allison, G. G.; Hazen, S. P.; Winters, A.; Bosch, M. (2014) Genotype, development and tissue-derived variation of cell-wall properties in the lignocellulosic energy crop *Miscanthus*. *Ann Bot* 114 (6), 1265–1277. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu054>.
17. Schäfer, J.; Sattler, M.; Iqbal, Y.; Lewandowski, I.; Bunzel, M. (2019) Characterization of *Miscanthus* cell wall polymers. *Glob Change Biol Bioenergy* 11 (1), 191–205. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12538>.
18. Cha, Y.-L.; An, G. H.; Yang, J.; Moon, Y.-H.; Yu, G.-D.; Ahn, J.-W. (2015) Bioethanol production from *Miscanthus* using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* mbc 2 isolated from the respiration-deficient mutants. *Renew Energy* 80, 259–265. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.02.016>.
19. Parveen, I.; Wilson, T.; Donnison, I. S.; Cookson, A. R.; Hauck, B.; Threadgill, M. D. (2013) Potential sources of high value chemicals from leaves, stems and flowers of *Miscanthus sinensis* 'Goliath' and *Miscanthus sacchariflorus*. *Phytochemistry* 92, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.04.004>.
20. Scagline-Mellor, S.; Griggs, T.; Skousen, J.; Wolfrum, E.; Holásková, I. (2018) Switchgrass and Giant *Miscanthus* Biomass and Theoretical Ethanol Production from Reclaimed Mine Lands. *Bioenerg Res* 11 (3), 562–573. <https://doi.org/10.1007/s12155-018-9915-2>.
21. Moll, L.; Wever, C.; Völkerling, G.; Pude, R. (2020) Increase of *Miscanthus* Cultivation with New Roles in Materials Production—A Review. *Agronomy* 10 (2), 308. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020308>.
22. Kraska, T.; Kleinschmidt, B.; Weinand, J.; Pude, R. (2018) Cascading use of *Miscanthus* as growing substrate in soilless cultivation of vegetables (tomatoes, cucumbers) and

- subsequent direct combustion. *Sci Hortic* 235, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.032>.
23. Aurbacher, J.; Benke, M.; Formowitz, B.; Glauert, T.; Heiermann, M.; Herrmann, C.; Idler, C.; Kornatz, P.; Nehring, A.; Rieckmann, C.; Rieckmann, G.; Reus, D.; Vetter, A.; Vollrath, B.; Wilken, F.; Willms, M. (2012) Energiepflanzen für Biogasanlagen: Niedersachsen
 24. Moll, L.; Höller, M.; Hubert, C.; Korte, C. A. C.; Völkening, G.; Wever, C.; Pude, R. (2022) Cup Plant (*Silphium perfoliatum* L.) Biomass as Substitute for Expanded Polystyrene in Bonded Leveling Compounds. *Agronomy* 12 (1), 178. <https://doi.org/10.3390/agronomy12010178>.
 25. Gansberger, M.; Montgomery, L. F.; Liebhard, P. (2015) Botanical characteristics, crop management and potential of *Silphium perfoliatum* L. as a renewable resource for biogas production: A review. *Ind Crops Prod* 63, 362–372. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.09.047>.
 26. Wever, C.; Höller, M.; Becker, L.; Biertümpfel, A.; Köhler, J.; van Inghelandt, D.; Westhoff, P.; Pude, R.; Pestsova, E. (2019) Towards high-biomass yielding bioenergy crop *Silphium perfoliatum* L.: phenotypic and genotypic evaluation of five cultivated populations. *Biomass Bioenergy* 124, 102–113. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.03.016>.
 27. Haag, N. L.; Nägele, H.-J.; Reiss, K.; Biertümpfel, A.; Oechsner, H. (2015) Methane formation potential of cup plant (*Silphium perfoliatum*). *Biomass Bioenergy* 75, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.02.012>.
 28. Cumplido-Marin, L.; Graves, A. R.; Burgess, P. J.; Morhart, C.; Paris, P.; Jablonowski, N. D.; Facciotto, G.; Bury, M.; Martens, R.; Nahm, M. (2020) Two Novel Energy Crops: *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby and *Silphium perfoliatum* L. - State of Knowledge. *Agronomy* 10 (7), 928. <https://doi.org/10.3390/agronomy10070928>.
 29. Klímek, P.; Meinlschmidt, P.; Wimmer, R.; Plinke, B.; Schirp, A. (2016) Using sunflower (*Helianthus annuus* L.), topinambour (*Helianthus tuberosus* L.) and cup-plant (*Silphium perfoliatum* L.) stalks as alternative raw materials for particleboards. *Ind Crops Prod* 92, 157–164. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.004>.
 30. Höller, M.; Lunze, A.; Wever, C.; Deutschle, A. L.; Stücker, A.; Frase, N.; Pestsova, E.; Spiess, A. C.; Westhoff, P.; Pude, R. (2021) Meadow hay, *Sida hermaphrodita* (L.) Rusby and *Silphium perfoliatum* L. as potential non-wood raw materials for the pulp and paper industry. *Ind Crops Prod* 167, 113548. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113548>.
 31. Rodríguez-Seoane, P.; Díaz-Reinoso, B.; Moure, A.; Domínguez, H. (2020) Potential of Paulownia sp. for biorefinery. *Ind Crops Prod* 155, 112739. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112739>.
 32. Gong, C.; Bujanovic, B. (2014) Impact of Hot-Water Extraction on Acetone-Water Oxygen Delignification of Paulownia Spp. and Lignin Recovery. *Energies* 7 (2), 857–873. <https://doi.org/10.3390/en7020857>.
 33. Ye, X.; Chen, Y. (2015) Kinetics study of enzymatic hydrolysis of Paulownia by dilute acid, alkali, and ultrasonic-assisted alkali pretreatments. *Biotechnol Bioprocess Eng* 20 (2), 242–248. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0490-x>.
 34. Cheng, J. Q.; Sun, Y. Y.; Chen, Y. C.; Liu, Y.; Hu, Y. Y.; Cheng, J. J. (2012) Optimization of Dilute Acid Pretreatment of Paulownia for the Production of Bioethanol by Respond Surface Methodology. *Adv Mat Res* 550-553, 1066–1070. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.550-553.1066>.

35. Del Río, P. G.; Domínguez, V. D.; Domínguez, E.; Gullón, P.; Gullón, B.; Garrote, G.; Romaní, A. (2020) Comparative study of biorefinery processes for the valorization of fast-growing Paulownia wood. *Bioresour Technol* 314, 123722. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123722>.
36. Pegoretti de Souza, H.; Muñoz, F.; Mendonça, R. T.; Sáez, K.; Olave, R.; Segura, C.; de Souza, D. P. L.; de Paula Protásio, T.; Rodríguez-Soalleiro, R. (2021) Influence of lignin distribution, physicochemical characteristics and microstructure on the quality of biofuel pellets made from four different types of biomass. *Renew Energy* 163, 1802–1816. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.065>.
37. Zahedi, M.; Tabarsa, T.; Ashori, A.; Madhoushi, M.; Shakeri, A. (2013) A comparative study on some properties of wood plastic composites using canola stalk, Paulownia, and nanoclay. *J Appl Polym Sci* 129 (3), 1491–1498. <https://doi.org/10.1002/app.38849>.
38. García, J. C.; Zamudio, M. A. M.; Pérez, A.; Feria, M. J.; Gomide, J. G.; Colodette, J. L.; López, F. (2011) Soda-AQ pulping of Paulownia wood after hydrolysis treatment. *Biore-sources* 6 (2), 971–986
39. Del Río, P. G.; Pérez-Pérez, A.; Garrote, G.; Gullón, B. (2022) Manufacturing of hemicellulosic oligosaccharides from fast-growing Paulownia wood via autohydrolysis: Microwave versus conventional heating. *Ind Crops Prod* 187, 115313. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115313>.
40. Brandt, A.; Gräsvik, J.; Hallett, J. P.; Welton, T. (2013) Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem* 15 (3), 550. <https://doi.org/10.1039/c2gc36364j>.
41. Imlimthan, S.; Figueiredo, P.; Santos, H. A.; Sarparanta, M.; Luzi, F.; Yang, W.; Ma, P.; Torre, L.; Puglia, D. (2021) Introduction to lignocellulosic materials. In: Hélder A. Santos, Patrícia Figueiredo (eds) *Lignin-based Materials for Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Implementation*. Elsevier, pp 1–34.
42. Tribot, A.; Amer, G.; Abdou Alio, M.; Baynast, H. de; Delattre, C.; Pons, A.; Mathias, J.-D.; Callois, J.-M.; Vial, C.; Michaud, P.; Dussap, C.-G. (2019) Wood-lignin: Supply, extraction processes and use as bio-based material. *Eur Polym J* 112, 228–240. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.01.007>.
43. Macfarlane, A. L.; Mai, M.; Kadla, J. F. (2014) Bio-based chemicals from biorefining: lignin conversion and utilisation. In: Waldron K (ed) *Advances in biorefineries: Biomass and waste supply chain exploitation*, Online-ausg. Woodhead Pub, Cambridge, UK, pp 659–692.
44. Emonet, A.; Hay, A. (2022) Development and diversity of lignin patterns. *Plant Physiol* 190 (1), 31–43. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac261>.
45. Kai, D.; Tan, M. J.; Chee, P. L.; Chua, Y. K.; Yap, Y. L.; Loh, X. J. (2016) Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. *Green Chem* 18 (5), 1175–1200. <https://doi.org/10.1039/C5GC02616D>.
46. Behr, A.; Seidensticker, T. (2018) *Einführung in die Chemie nachwachsender Rohstoffe: Vorkommen, Konversion, Verwendung*. Lehrbuch. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
47. Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y. B.; Schulze, M. (2020) Extraction of High-Purity Lignins via Catalyst-free Organosolv Pulping from Low-Input Crops. *Biomacromolecules* 21 (5), 1929–1942. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00123>.
48. del Río, J. C.; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Elder, T.; Kim, H.; Ralph, J. (2020) Lignin Monomers from beyond the Canonical Monolignol Biosynthetic Pathway: Another Brick in the

- Wall. *ACS Sustain Chem Eng* 8 (13), 4997–5012. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01109>.
49. Matsushita, Y. (2015) Conversion of technical lignins to functional materials with retained polymeric properties. *J Wood Sci* 61 (3), 230–250. <https://doi.org/10.1007/s10086-015-1470-2>.
 50. Calvo-Flores, F. G.; Dobado, J. A.; Isac-Garcia, J. I.; Martín-Martínez, F. J. (2015) Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials: Chemistry, technology and applications. Wiley Series in Renewable Resources. Wiley, Chichester, West Sussex, UK.
 51. Zevallos Torres, L. A.; Lorenci Woiciechowski, A.; Andrade Tanobe, V. O. de; Karp, S. G.; Guimarães Lorenci, L. C.; Faulds, C.; Soccol, C. R. (2020) Lignin as a potential source of high-added value compounds: A review. *J Clean Prod* 263, 121499. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121499>.
 52. Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y.; Schulze, M. (2021) Types of lignin, properties, and structural characterization techniques. In: Hélder A. Santos, Patrícia Figueiredo (eds) Lignin-based Materials for Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Implementation. Elsevier, pp 105–158.
 53. Erdocia, X.; Hernández-Ramos, F.; Morales, A.; Izaguirre, N.; Hoyos-Martínez, P. L. de; Labidi, J. (2021) Lignin extraction and isolation methods. In: Hélder A. Santos, Patrícia Figueiredo (eds) Lignin-based Materials for Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Implementation. Elsevier, pp 61–104.
 54. Melro, E.; Filipe, A.; Sousa, D.; Medronho, B.; Romano, A. (2021) Revisiting lignin: a tour through its structural features, characterization methods and applications. *New J Chem* 45 (16), 6986–7013. <https://doi.org/10.1039/D0NJ06234K>.
 55. Laurichesse, S.; Avérous, L. (2014) Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. *Prog Polym Sci* 39 (7), 1266–1290. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.11.004>.
 56. Borand, M. N.; Karaosmanoğlu, F. (2018) Effects of organosolv pretreatment conditions for lignocellulosic biomass in biorefinery applications: A review. *J Renew Sustain Energy* 10 (3), 33104. <https://doi.org/10.1063/1.5025876>.
 57. Duval, A.; Lawoko, M. (2014) A review on lignin-based polymeric, micro- and nano-structured materials. *React Funct Polym* 85, 78–96. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.09.017>.
 58. Margarida Martins, M.; Carvalheiro, F.; Gírio, F. (2022) An overview of lignin pathways of valorization: from isolation to refining and conversion into value-added products. *Biomass Conv Bioref*. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02701-z>.
 59. Saha, M.; Saynik, P. B.; Borah, A.; Malani, R. S.; Arya, P.; Shivangi; Moholkar, V. S. (2019) Dioxane-based extraction process for production of high quality lignin. *Bioresour Technol Rep* 5, 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.01.018>.
 60. Brandt, A.; Chen, L.; van Dongen, B. E.; Welton, T.; Hallett, J. P. (2015) Structural changes in lignins isolated using an acidic ionic liquid water mixture. *Green Chem* 17 (11), 5019–5034. <https://doi.org/10.1039/C5GC01314C>.
 61. Wang, K.; Bauer, S.; Sun, R.-C. (2012) Structural transformation of Miscanthus × giganteus lignin fractionated under mild formosolv, basic organosolv, and cellulolytic enzyme conditions. *J Agric Food Chem* 60 (1), 144–152. <https://doi.org/10.1021/jf2037399>.

62. Bauer, S.; Sorek, H.; Mitchell, V. D.; Ibáñez, A. B.; Wemmer, D. E. (2012) Characterization of *Miscanthus giganteus* lignin isolated by ethanol organosolv process under reflux condition. *J Agric Food Chem* 60 (33), 8203–8212. <https://doi.org/10.1021/jf302409d>.
63. El Hage, R.; Brosse, N.; Sannigrahi, P.; Ragauskas, A. (2010) Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. *Polym Degrad Stab* 95 (6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.012>.
64. El Hage, R.; Chrusciel, L.; Desharnais, L.; Brosse, N. (2010) Effect of autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* on lignin structure and organosolv delignification. *Bioresour Technol* 101 (23), 9321–9329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.143>.
65. El Hage, R.; Perrin, D.; Brosse, N. (2012) Effect of the Pre-Treatment Severity on the Antioxidant Properties of Ethanol Organosolv *Miscanthus x giganteus* Lignin. *Nat Resour* 03 (02), 29–34. <https://doi.org/10.4236/nr.2012.32005>.
66. García, A.; Toledano, A.; Andrés, M. Á.; Labidi, J. (2010) Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochem* 45 (6), 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.02.015>.
67. Bergs, M.; Völkerling, G.; Kraska, T.; Pude, R.; Do, X. T.; Kusch, P.; Monakhova, Y.; Konow, C.; Schulze, M. (2019) *Miscanthus X Giganteus* Stem Versus Leaf-Derived Lignins Differing in Monolignol Ratio and Linkage. *Int J Mol Sci* 20 (5), 1200. <https://doi.org/10.3390/ijms20051200>.
68. Bergs, M.; Do, X. T.; Rumpf, J.; Kusch, P.; Monakhova, Y.; Konow, C.; Völkerling, G.; Pude, R.; Schulze, M. (2020) Comparing chemical composition and lignin structure of *Miscanthus x giganteus* and *Miscanthus nagara* harvested in autumn and spring and separated into stems and leaves. *RSC Adv* 10 (18), 10740–10751. <https://doi.org/10.1039/C9RA10576J>.
69. Rencoret, J.; Marques, G.; Gutiérrez, A.; Nieto, L.; Jiménez-Barbero, J.; Martínez, Á. T.; del Río, J. C. (2009) Isolation and structural characterization of the milled-wood lignin from *Paulownia fortunei* wood. *Ind Crops Prod* 30 (1), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.03.004>.
70. Zamudio, M. A.; Alfaro, A.; Alva, H. E. de; García, J. C.; García-Morales, M.; López, F. (2015) Biorefinery of paulownia by autohydrolysis and soda-anthraquinone delignification process. Characterization and application of lignin. *J Chem Technol Biotechnol* 90 (3), 534–542. <https://doi.org/10.1002/jctb.4345>.
71. Domínguez, E.; Del Río, P. G.; Romaní, A.; Garrote, G.; Gullón, P.; Vega, A. de (2020) Formosolv Pretreatment to Fractionate Paulownia Wood Following a Biorefinery Approach: Isolation and Characterization of the Lignin Fraction. *Agronomy* 10 (8), 1205. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081205>.
72. Damm, T.; Grande, P. M.; Jablonowski, N. D.; Thiele, B.; Disko, U.; Mann, U.; Schurr, U.; Leitner, W.; Usadel, B.; Domínguez de María, P.; Klose, H. (2017) OrganoCat pretreatment of perennial plants: Synergies between a biogenic fractionation and valuable feedstocks. *Bioresour Technol* 244 (Pt 1), 889–896. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.027>.
73. Bergrath, J.; Rumpf, J.; Burger, R.; Do, X. T.; Wirtz, M.; Schulze, M. (2023) Beyond Yield Optimization: The Impact of Organosolv Process Parameters on Lignin Structure. *Macro Materials & Eng.* <https://doi.org/10.1002/mame.202300093>.

74. Ibrahim, Q.; Kruse, A. (2020) Prehydrolysis and organosolv delignification process for the recovery of hemicellulose and lignin from beech wood. *Bioresour Technol Rep* 11, 100506. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100506>.
75. Brunow, G.; Lundquist, K. (2010) Functional Groups and Bonding Patterns in Lignin (Including the Lignin-Carbohydrate Complexes). In: Heitner C, Dimmel DR, Schmidt JA (eds) *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*. CRC Press; Taylor & Francis, Boca Raton, pp 267–299.
76. Haghdan, S.; Renneckar, S.; Smith, G. D. (2016) Sources of Lignin. In: Faruk O, Sain M (eds) *Lignin in Polymer Composites*. William Andrew/Elsevier, Kidlington, Oxford, UK, Waltham, MA, pp 1–11.
77. Patil, N. D.; Tanguy, N. R.; Yan, N. (2016) Lignin Interunit Linkages and Model Compounds. In: Faruk O, Sain M (eds) *Lignin in Polymer Composites*. William Andrew/Elsevier, Kidlington, Oxford, UK, Waltham, MA, pp 27–47.
78. Vanholme, R.; Meester, B. de; Ralph, J.; Boerjan, W. (2019) Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. *Curr Opin Biotechnol* 56, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>.
79. Schutyser, W.; Renders, T.; van den Bosch, S.; Koelewijn, S.-F.; Beckham, G. T.; Sels, B. F. (2018) Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chem Soc Rev* 47 (3), 852–908. <https://doi.org/10.1039/c7cs00566k>.
80. Collins, M. N.; Nechifor, M.; Tanasă, F.; Zănoagă, M.; McLoughlin, A.; Stróżyk, M. A.; Culebras, M.; Teacă, C.-A. (2019) Valorization of lignin in polymer and composite systems for advanced engineering applications - A review. *Int J Biol Macromol* 131, 828–849. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.069>.
81. Giummarella, N.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J.; Lawoko, M. (2019) A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem* 21 (7), 1573–1595. <https://doi.org/10.1039/C8GC03606C>.
82. Lupoi, J. S.; Singh, S.; Parthasarathi, R.; Simmons, B. A.; Henry, R. J. (2015) Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renew Sust Energ Rev* 49, 871–906. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.091>.
83. Rashid, T.; Kait, C. F.; Murugesan, T. (2016) A “Fourier Transformed Infrared” Compound Study of Lignin Recovered from a Formic Acid Process. *Procedia Eng* 148, 1312–1319. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.547>.
84. Giraudeau, P. (2014) Quantitative 2D liquid-state NMR. *Magn Reson Chem* 52 (6), 259–272. <https://doi.org/10.1002/mrc.4068>.
85. Fardus-Reid, F.; Warren, J.; Le Gresley, A. (2016) Validating heteronuclear 2D quantitative NMR. *Anal Methods* 8 (9), 2013–2019. <https://doi.org/10.1039/C6AY00111D>.
86. Lu, X.; Gu, X.; Shi, Y. (2022) A review on lignin antioxidants: Their sources, isolations, antioxidant activities and various applications. *Int J Biol Macromol* 210, 716–741. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.228>.
87. Wang, H.; Pu, Y.; Ragauskas, A.; Yang, B. (2019) From lignin to valuable products-strategies, challenges, and prospects. *Bioresour Technol* 271, 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.072>.
88. Zinovyev, G.; Sulaeva, I.; Podzimek, S.; Rössner, D.; Kilpeläinen, I.; Summerskii, I.; Rosenau, T.; Potthast, A. (2018) Getting Closer to Absolute Molar Masses of Technical Lignins. *ChemSusChem* 11 (18), 3259–3268. <https://doi.org/10.1002/cssc.201801177>.

89. Baumberger, S.; Abaecherli, A.; Fasching, M.; Gellerstedt, G.; Gosselink, R.; Hortling, B.; Li, J.; Saake, B.; Jong, E. de (2007) Molar mass determination of lignins by size-exclusion chromatography: towards standardisation of the method. *Holzforschung* 61 (4), 205. <https://doi.org/10.1515/HF.2007.074>.
90. Tolbert, A.; Akinosho, H.; Khunsupat, R.; Naskar, A. K.; Ragauskas, A. J. (2014) Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies. *Biofuels, Bioprod Bioref* 8 (6), 836–856. <https://doi.org/10.1002/bbb.1500>.
91. Burger, R.; Rumpf, J.; Do, X. T.; Monakhova, Y. B.; Diehl, B. W. K.; Rehahn, M.; Schulze, M. (2021) Is NMR Combined with Multivariate Regression Applicable for the Molecular Weight Determination of Randomly Cross-Linked Polymers Such as Lignin? *ACS Omega* 6 (44), 29516–29524. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c03574>.
92. Lancefield, C. S.; Constant, S.; Peinder, P. de; Bruijninx, P. C. A. (2019) Linkage Abundance and Molecular Weight Characteristics of Technical Lignins by Attenuated Total Reflection-FTIR Spectroscopy Combined with Multivariate Analysis. *ChemSusChem* 12 (6), 1139–1146. <https://doi.org/10.1002/cssc.201802809>.
93. Mancini, M.; Duca, D.; Toscano, G. (2019) Laboratory customized online measurements for the prediction of the key-parameters of biomass quality control. *J Near Infrared Spec* 27 (1), 15–25. <https://doi.org/10.1177/0967033518825341>.
94. Burger, R.; Lindner, S.; Rumpf, J.; Do, X. T.; Diehl, B. W. K.; Rehahn, M.; Monakhova, Y. B.; Schulze, M. (2022) Benchtop versus high field NMR: Comparable performance found for the molecular weight determination of lignin. *J Pharm Biomed Anal* 212, 114649. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114649>.
95. Wang, X.; Li, C.; Liang, D.; Zou, Y.; Li, P.; Ma, F. (2015) Phenolic compounds and antioxidant activity in red-fleshed apples. *J Funct Foods* 18, 1086–1094. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.013>.
96. Apak, R. (2019) Current Issues in Antioxidant Measurement. *J Agric Food Chem* 67 (33), 9187–9202. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03657>.
97. Rácz, A.; Papp, N.; Balogh, E.; Fodor, M.; Héberger, K. (2015) Comparison of antioxidant capacity assays with chemometric methods. *Anal Methods* 7 (10), 4216–4224. <https://doi.org/10.1039/C5AY00330J>.
98. López-Alarcón, C.; Denicola, A. (2013) Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta* 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>.
99. Munteanu, I. G.; Apetrei, C. (2021) Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* 22 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
100. Xie, J.; Schaich, K. M. (2014) Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 62 (19), 4251–4260. <https://doi.org/10.1021/jf500180u>.
101. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53 (6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>.
102. Faustino, H.; Gil, N.; Baptista, C.; Duarte, A. P. (2010) Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules* 15 (12), 9308–9322. <https://doi.org/10.3390/molecules15129308>.
103. Korte, I.; Kreyenschmidt, J.; Wensing, J.; Bröring, S.; Frase, J. N.; Pude, R.; Konow, C.; Havelt, T.; Rumpf, J.; Schmitz, M.; Schulze, M. (2021) Can Sustainable Packaging Help to

- Reduce Food Waste? A Status Quo Focusing Plant-Derived Polymers and Additives. *Appl Sci* 11 (11), 5307. <https://doi.org/10.3390/app11115307>.
104. Espinoza-Acosta, J. L.; Torres-Chávez, P. I.; Ramírez-Wong, B.; López-Saiz, C. M.; Montaño-Leyva, B. (2016) Antioxidant, Antimicrobial, and Antimutagenic properties of Technical Lignins and Their Applications. *Bioresources* 11 (2), 5452–5481
 105. Azadfar, M.; Gao, A. H.; Bule, M. V.; Chen, S. (2015) Structural characterization of lignin: a potential source of antioxidants guaiacol and 4-vinylguaiacol. *Int J Biol Macromol* 75, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.049>.
 106. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In: Packer L (ed) *Methods in Enzymology: Oxidants and Antioxidants. Part A*. Academic Press, pp 152–178.
 107. García, A.; González Alriols, M.; Spigno, G.; Labidi, J. (2012) Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. *Biochem Eng J* 67, 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.013>.
 108. Ponomarenko, J.; Dizhbite, T.; Lauberts, M.; Viksna, A.; Dobeles, G.; Bikovens, O.; Telysheva, G. (2014) Characterization of Softwood and Hardwood LignoBoost Kraft Lignins with Emphasis on their Antioxidant Activity. *Bioresources* 9 (2), 2051–2068. <https://doi.org/10.15376/biores.9.2.2051-2068>.
 109. Arshanitsa, A.; Ponomarenko, J.; Dizhbite, T.; Andersone, A.; Gosselink, R. J.; van der Putten, J.; Lauberts, M.; Telysheva, G. (2013) Fractionation of technical lignins as a tool for improvement of their antioxidant properties. *J Anal Appl Pyrol* 103, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2012.12.023>.
 110. Aminzadeh, S.; Lauberts, M.; Dobeles, G.; Ponomarenko, J.; Mattsson, T.; Lindström, M. E.; Sevastyanova, O. (2018) Membrane filtration of kraft lignin: Structural characteristics and antioxidant activity of the low-molecular-weight fraction. *Ind Crops Prod* 112, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.042>.
 111. An, L.; Si, C.; Wang, G.; Sui, W.; Tao, Z. (2019) Enhancing the solubility and antioxidant activity of high-molecular-weight lignin by moderate depolymerization via in situ ethanol/acid catalysis. *Ind Crops Prod* 128, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.009>.
 112. Huang, C.; Tang, S.; Zhang, W.; Tao, Y.; Lai, C.; Li, X.; Yong, Q. (2018) Unveiling the Structural Properties of Lignin–Carbohydrate Complexes in Bamboo Residues and Its Functionality as Antioxidants and Immunostimulants. *ACS Sustain Chem Eng* 6 (9), 12522–12531. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03262>.
 113. Ilyasov, I. R.; Beloborodov, V. L.; Selivanova, I. A.; Terekhov, R. P. (2020) ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int J Mol Sci* 21 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>.
 114. Bibi Sadeer, N.; Montesano, D.; Albrizio, S.; Zengin, G.; Mahomoodally, M. F. (2020) The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* 9 (8), 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>.
 115. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53 (10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>.

116. Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. (2016) Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *J Agric Food Chem* 64 (5), 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>.
117. Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. (2016) Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J Agric Food Chem* 64 (5), 1028–1045. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04743>.
118. Apak, R.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Çapanoğlu, E. (2016) Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 3. Reactive Oxygen and Nitrogen Species (ROS/RNS) Scavenging Assays, Oxidative Stress Biomarkers, and Chromatographic/Chemometric Assays. *J Agric Food Chem* 64 (5), 1046–1070. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04744>.
119. Alam, N.; Bristi, N. J.; Rafiquzzaman, M. (2013) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J* 21 (2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
120. Carocho, M.; Morales, P.; Ferreira, I. C. (2018) Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci Technol* 71, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>.
121. Yuan, G.; Chen, X.; Li, D. (2016) Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Res Int* 89 (Pt 1), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.004>.
122. Witzler, M.; Alzagameem, A.; Bergs, M.; Khaldi-Hansen, B. E.; Klein, S. E.; Hielscher, D.; Kamm, B.; Kreyenschmidt, J.; Tobiasch, E.; Schulze, M. (2018) Lignin-Derived Biomaterials for Drug Release and Tissue Engineering. *Molecules* 23 (8), 1885. <https://doi.org/10.3390/molecules23081885>.
123. Rumpf, J.; Burger, R.; Schulze, M. (2023) Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *Int J Biol Macromol* 233, 123470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>.
124. Schaich, K. M.; Tian, X.; Xie, J. (2015) Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods* 14, 111–125. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.
125. Nenadis, N.; Tsimidou, M. Z. (2018) DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) radical scavenging mixed-mode colorimetric assay(s). In: Apak R, Çapanoğlu E, Shahidi F (eds) Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications, First edition. Wiley, Hoboken, NJ, USA, pp 141–164.
126. Cano, A.; Arnao, M. B. (2018) ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/ Trolox® -Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. In: Apak R, Çapanoğlu E, Shahidi F (eds) Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications, First edition. Wiley, Hoboken, NJ, USA, pp 117–140.
127. Teow, C. C.; Truong, V.-D.; McFeeters, R. F.; Thompson, R. L.; Pecota, K. V.; Yencho, G. C. (2007) Antioxidant activities, phenolic and β -carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem* 103 (3), 829–838. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.033>.

128. Charles, D. J. (2013) Antioxidant Assays. In: Charles DJ (ed) Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources, 1st ed. Springer New York, New York, NY, pp 9–38.
129. Benzie, I. F. F.; Devaki, M. (2018) The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. In: Apak R, Çapanoğlu E, Shahidi F (eds) Measurement of antioxidant activity and capacity: Recent trends and applications, First edition. Wiley, Hoboken, NJ, USA, pp 77–106.
130. Folin, O.; Ciocalteu, V. (1927) On Tyrosine and Tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73, 627-650
131. Agbor, G. A.; Vinson, J. A.; Donnelly, P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet*, 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>.
132. Cheng, X.-C.; Guo, X.-R.; Qin, Z.; Liu, H.-M.; He, J.-R.; Wang, X.-D. (2022) Sequential aqueous acetone fractionation and characterization of Brauns native lignin separated from Chinese quince fruit. *Int J Biol Macromol* 201, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.114>.
133. Wei, X.; Liu, Y.; Luo, Y.; Shen, Z.; Wang, S.; Li, M.; Zhang, L. (2021) Effect of organosolv extraction on the structure and antioxidant activity of eucalyptus kraft lignin. *Int J Biol Macromol* 187, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.082>.
134. Sluiter, A.; Hames, B.; Hyman, D.; Payne, C.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Wolfe, J. (2008) Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples: Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42621, Golden, CO, USA.
135. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D. (2008) Determination of Ash in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42622, Golden, CO, USA.
136. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. (2012) Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL/TP-510-42618, Golden, CO, USA.
137. Cordella, C. B.; Bertrand, D. (2014) SAISIR: A new general chemometric toolbox. *Trends Anal Chem* 54, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.009>.
138. Cheng, K.; Sorek, H.; Zimmermann, H.; Wemmer, D. E.; Pauly, M. (2013) Solution-state 2D NMR spectroscopy of plant cell walls enabled by a dimethylsulfoxide-d₆/1-ethyl-3-methylimidazolium acetate solvent. *Anal Chem* 85 (6), 3213–3221. <https://doi.org/10.1021/ac303529v>.
139. Constant, S.; Wienk, H. L. J.; Frissen, A. E.; Peinder, P. de; Boelens, R.; van Es, D. S.; Grisel, R. J. H.; Weckhuysen, B. M.; Huijgen, W. J. J.; Gosselink, R. J. A.; Bruijninx, P. C. A. (2016) New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. *Green Chem* 18 (9), 2651–2665. <https://doi.org/10.1039/C5GC03043A>.
140. Sumerskii, I.; Zweckmair, T.; Hettegger, H.; Zinovyev, G.; Bacher, M.; Rosenau, T.; Potthast, A. (2017) A fast track for the accurate determination of methoxyl and ethoxyl groups in lignin. *RSC Adv* 7 (37), 22974–22982. <https://doi.org/10.1039/C7RA00690J>.
141. Alzagameem, A.; Khaldi-Hansen, B. E.; Büchner, D.; Larkins, M.; Kamm, B.; Witzleben, S.; Schulze, M. (2018) Lignocellulosic Biomass as Source for Lignin-Based Environmentally Benign Antioxidants. *Molecules* 23 (10), 2664. <https://doi.org/10.3390/molecules23102664>.

142. Yang, L.; Wang, D.; Zhou, D.; Zhang, Y. (2016) Effect of different isolation methods on structure and properties of lignin from valonea of *Quercus variabilis*. *Int J Biol Macromol* 85, 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.005>.
143. Sun, T.; Tanumihardjo, S. A. (2007) An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *J Food Sci* 72 (9), R159–65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00552.x>.
144. Hafez, I.; Hassan, E. B. (2015) Rapid liquefaction of giant miscanthus feedstock in ethanol–water system for production of biofuels. *Energy Convers Manag* 91, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.12.016>.
145. Sun, S.; Liu, F.; Zhang, L.; Fan, X. (2018) One-step process based on the order of hydrothermal and alkaline treatment for producing lignin with high yield and antioxidant activity. *Ind Crops Prod* 119, 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.030>.
146. Rossberg, C.; Bremer, M.; Machill, S.; Koenig, S.; Kerns, G.; Boeriu, C.; Windeisen, E.; Fischer, S. (2015) Separation and characterisation of sulphur-free lignin from different agricultural residues. *Ind Crops Prod* 73, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.001>.
147. Monteil-Rivera, F.; Phuong, M.; Ye, M.; Halasz, A.; Hawari, J. (2013) Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. *Ind Crops Prod* 41, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.049>.
148. Ma, P.; Gao, Y.; Zhai, H. (2013) Fractionated Wheat Straw Lignin and Its Application as Antioxidant. *Bioresources* 8 (4). <https://doi.org/10.15376/biores.8.4.5581-5595>.
149. Buranov, A. U.; Mazza, G. (2008) Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind Crops Prod* 28 (3), 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>.
150. Ye, X.; Zhang, Z.; Chen, Y.; Cheng, J.; Tang, Z.; Hu, Y. (2016) Physico-chemical pretreatment technologies of bioconversion efficiency of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. *Ind Crops Prod* 87, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.045>.
151. Wang, S.; Dai, G.; Yang, H.; Luo, Z. (2017) Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: A state-of-the-art review. *Prog Energy Combust Sci* 62, 33–86. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.05.004>.
152. Rossberg, C.; Janzon, R.; Saake, B.; Leschinsky, M. (2019) Effect of Process Parameters in Pilot Scale Operation on Properties of Organosolv Lignin. *Bioresources* 14 (2), 4543–4559. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.4543-4559>.
153. Masche, M.; Puig-Arnavat, M.; Jensen, P. A.; Holm, J. K.; Clausen, S.; Ahrenfeldt, J.; Henriksen, U. B. (2019) From wood chips to pellets to milled pellets: The mechanical processing pathway of Austrian pine and European beech. *Powder Technol* 350, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.03.002>.
154. Brosse, N.; El Hage, R.; Chaouch, M.; Pétrissans, M.; Dumarçay, S.; Gérardin, P. (2010) Investigation of the chemical modifications of beech wood lignin during heat treatment. *Polym Degrad Stab* 95 (9), 1721–1726. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.05.018>.
155. Takada, M.; Minami, E.; Kawamoto, H. (2021) Topochemistry of the Delignification of Japanese Beech (*Fagus crenata*) Wood by Supercritical Methanol Treatment. *ACS Omega* 6 (32), 20924–20930. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02345>.
156. Brosse, N.; Sannigrahi, P.; Ragauskas, A. (2009) Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* Using the Ethanol Organosolv Process for Ethanol Production. *Ind Eng Chem Res* 48 (18), 8328–8334. <https://doi.org/10.1021/ie9006672>.

157. Obama, P.; Ricochon, G.; Muniglia, L.; Brosse, N. (2012) Combination of enzymatic hydrolysis and ethanol organosolv pretreatments: effect on lignin structures, delignification yields and cellulose-to-glucose conversion. *Bioresour Technol* 112, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.080>.
158. Weidener, D.; Dama, M.; Dietrich, S. K.; Ohrem, B.; Pauly, M.; Leitner, W.; Domínguez de María, P.; Grande, P. M.; Klose, H. (2020) Multiscale analysis of lignocellulose recalcitrance towards OrganoCat pretreatment and fractionation. *Biotechnol Biofuels* 13, 155. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01796-8>.
159. Wildschut, J.; Smit, A. T.; Reith, J. H.; Huijgen, W. J. J. (2013) Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. *Bioresour Technol* 135, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.050>.
160. Ramezani, N.; Sain, M. (2019) Non-catalytic green solvent lignin isolation process from wheat straw and the structural analysis. *Renew Energy* 140, 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.026>.
161. Huijgen, W.; Telysheva, G.; Arshanitsa, A.; Gosselink, R.; de Wild, P. J. (2014) Characteristics of wheat straw lignins from ethanol-based organosolv treatment. *Ind Crops Prod* 59, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.003>.
162. Rashid, T.; Gnanasundaram, N.; Appusamy, A.; Kait, C. F.; Thanabalan, M. (2018) Enhanced lignin extraction from different species of oil palm biomass: Kinetics and optimization of extraction conditions. *Ind Crops Prod* 116, 122–136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.056>.
163. Ibrahim, Q.; Arauzo, P. J.; Kruse, A. (2020) The effect of using different acids to catalyze the prehydrolysis stage on the organosolv delignification of beech wood in two-stage process. *Renew Energy* 153, 1479–1487. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.111>.
164. Zhou, S.; Garcia-Perez, M.; Pecha, B.; McDonald, A. G.; Westerhof, R. J. (2014) Effect of particle size on the composition of lignin derived oligomers obtained by fast pyrolysis of beech wood. *Fuel* 125, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.016>.
165. Caparrós, S.; Díaz, M. J.; Ariza, J.; López, F.; Jiménez, L. (2008) New perspectives for *Paulownia fortunei* L. valorisation of the autohydrolysis and pulping processes. *Bioresour Technol* 99 (4), 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.028>.
166. González Arzola, K.; Polvillo, O.; Arias, M. E.; Perestelo, F.; Carnicero, A.; González-Vila, F. J.; Falcón, M. A. (2006) Early attack and subsequent changes produced in an industrial lignin by a fungal laccase and a laccase-mediator system: an analytical approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 73 (1), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0630-0>.
167. Singh, A.; Yadav, K.; Kumar Sen, A. (2012) Sal (*Shorea Robusta*) Leaves Lignin Epoxidation and Its Use in Epoxy Based Coatings. *Am J Polym Sci* 2 (1), 14–18. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20120201.03>.
168. Seca, A. M.; Cavaleiro, J. A.; Domingues, F. M.; Silvestre, A. J.; Evtuguin, D.; Neto, C. P. (2000) Structural characterization of the lignin from the nodes and internodes of *Arundo donax* reed. *J Agric Food Chem* 48 (3), 817–824. <https://doi.org/10.1021/jf9910988>.
169. Ibrahim, M. N. M.; Iqbal, A.; Shen, C. C.; Bhawani, S. A.; Adam, F. (2019) Synthesis of lignin based composites of TiO₂ for potential application as radical scavengers in sunscreen formulation. *BMC Chem*, 13 (1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13065-019-0537-3>.

170. Vivekanand, V.; Chawade, A.; Larsson, M.; Larsson, A.; Olsson, O. (2014) Identification and qualitative characterization of high and low lignin lines from an oat TILLING population. *Ind Crops Prod* 59, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.019>.
171. Prozil, S. O.; Evtuguin, D. V.; Silva, A. M. S.; Lopes, L. P. C. (2014) Structural characterization of lignin from grape stalks (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem* 62 (24), 5420–5428. <https://doi.org/10.1021/jf502267s>.
172. Lu, Y.; Lu, Y.-C.; Hu, H.-Q.; Xie, F.-J.; Wei, X.-Y.; Fan, X. (2017) Structural Characterization of Lignin and Its Degradation Products with Spectroscopic Methods. *J Spectrosc* 2017, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2017/8951658>.
173. Singh, S. K.; Dhepe, P. L. (2018) Experimental evidences for existence of varying moieties and functional groups in assorted crop waste derived organosolv lignins. *Ind Crops Prod* 119, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.002>.
174. El Hage, R.; Brosse, N.; Chrusciel, L.; Sanchez, C.; Sannigrahi, P.; Ragauskas, A. (2009) Characterization of milled wood lignin and ethanol organosolv lignin from miscanthus. *Polym Degrad Stab* 94 (10), 1632–1638. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2009.07.007>.
175. Ralph, J.; Landucci, L. L. (2010) NMR of Lignins. In: Heitner C, Dimmel DR, Schmidt JA (eds) *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry*. CRC Press; Taylor & Francis, Boca Raton, pp 137–243.
176. Crestini, C.; Melone, F.; Sette, M.; Saladino, R. (2011) Milled wood lignin: A linear oligomer. *Biomacromolecules* 12 (11), 3928–3935. <https://doi.org/10.1021/bm200948r>.
177. Sheng, Y.; Ma, Z.; Wang, X.; Han, Y. (2021) Ethanol organosolv lignin from different agricultural residues: Toward basic structural units and antioxidant activity. *Food Chem* 376, 131895. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131895>.
178. Mbotchak, L.; Le Morvan, C.; Duong, K. L.; Rousseau, B.; Tessier, M.; Fradet, A. (2015) Purification, structural characterization, and modification of organosolv wheat straw lignin. *J Agric Food Chem* 63 (21), 5178–5188. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02071>.
179. Guo, Z.; Li, D.; You, T.; Zhang, X.; Xu, F.; Zhang, X.; Yang, Y. (2020) New Lignin Streams Derived from Heteropoly Acids Enhanced Neutral Deep Eutectic Solvent Fractionation: Toward Structural Elucidation and Antioxidant Performance. *ACS Sustain Chem Eng* 8 (32), 12110–12119. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c03491>.
180. Lange, H.; Schiffels, P.; Sette, M.; Sevastyanova, O.; Crestini, C. (2016) Fractional Precipitation of Wheat Straw Organosolv Lignin: Macroscopic Properties and Structural Insights. *ACS Sustain Chem Eng* 4 (10), 5136–5151. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01475>.
181. Zheng, L.; Lu, G.; Pei, W.; Yan, W.; Li, Y.; Zhang, L.; Huang, C.; Jiang, Q. (2021) Understanding the relationship between the structural properties of lignin and their biological activities. *Int J Biol Macromol* 190, 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.168>.
182. Groenewold, G. S.; Johnson, K. M.; Fox, S. C.; Rae, C.; Zarzana, C. A.; Kersten, B. R.; Rowe, S. M.; Westover, T. L.; Gresham, G. L.; Emerson, R. M.; Hoover, A. N. (2017) Pyrolysis Two-Dimensional GC-MS of Miscanthus Biomass: Quantitative Measurement Using an Internal Standard Method. *Energy Fuels* 31 (2), 1620–1630. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b02645>.
183. Margellou, A. G.; Lazaridis, P. A.; Charisteidis, I. D.; Nitsos, C. K.; Pappa, C. P.; Fotopoulos, A. P.; van den Bosch, S.; Sels, B. F.; Triantafyllidis, K. S. (2021) Catalytic fast pyrolysis of

- beech wood lignin isolated by different biomass (pre)treatment processes: Organosolv, hydrothermal and enzymatic hydrolysis. *Appl Catal A: Gen* 623, 118298. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118298>.
184. Zijlstra, D. S.; Santi, A. de; Oldenburger, B.; Vries, J. de; Barta, K.; Deuss, P. J. (2019) Extraction of Lignin with High β -O-4 Content by Mild Ethanol Extraction and Its Effect on the Depolymerization Yield. *J Vis Exp* (143), e58575. <https://doi.org/10.3791/58575>.
185. He, Q.; Ziegler-Devin, I.; Chrusciel, L.; Obame, S. N.; Hong, L.; Lu, X.; Brosse, N. (2020) Lignin-First Integrated Steam Explosion Process for Green Wood Adhesive Application. *ACS Sustain Chem Eng* 8 (13), 5380–5392. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01065>.
186. Vanderghem, C.; Richel, A.; Jacquet, N.; Blecker, C.; Paquot, M. (2011) Impact of formic/acetic acid and ammonia pre-treatments on chemical structure and physico-chemical properties of Miscanthus x giganteus lignins. *Polym Degrad Stab* 96 (10), 1761–1770. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2011.07.022>.
187. Li, H.; Chai, X.-S.; Liu, M.; Deng, Y. (2012) Novel method for the determination of the methoxyl content in lignin by headspace gas chromatography. *J Agric Food Chem* 60 (21), 5307–5310. <https://doi.org/10.1021/jf300455g>.
188. Zinovyev, G.; Sumerskii, I.; Rosenau, T.; Balakshin, M.; Potthast, A. (2018) Ball Milling's Effect on Pine Milled Wood Lignin's Structure and Molar Mass. *Molecules* 23 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092223>.
189. Sarosi, O.; Sulaeva, I.; Fitz, E.; Sumerskii, I.; Bacher, M.; Potthast, A. (2021) Lignin Resists High-Intensity Electron Beam Irradiation. *Biomacromolecules* 22 (10), 4365–4372. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00926>.
190. Musl, O.; Sulaeva, I.; Sumerskii, I.; Mahler, A. K.; Rosenau, T.; Falkenhagen, J.; Potthast, A. (2021) Mapping of the Hydrophobic Composition of Lignosulfonates. *ACS Sustain Chem Eng* 9 (49), 16786–16795. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c06469>.
191. Musl, O.; Galler, S.; Wurzer, G.; Bacher, M.; Sulaeva, I.; Sumerskii, I.; Mahler, A. K.; Rosenau, T.; Potthast, A. (2022) High-Resolution Profiling of the Functional Heterogeneity of Technical Lignins. *Biomacromolecules* 23 (3), 1413–1422. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01630>.
192. Rohde, V.; Böringer, S.; Tübke, B.; Adam, C.; Dahmen, N.; Schmiedl, D. (2019) Fractionation of three different lignins by thermal separation techniques-A comparative study. *Glob Change Biol Bioenergy* 11 (1), 206–217. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12546>.
193. Hansen, B.; Kusch, P.; Schulze, M.; Kamm, B. (2016) Qualitative and Quantitative Analysis of Lignin Produced from Beech Wood by Different Conditions of the Organosolv Process. *J Polym Environ* 24 (2), 85–97. <https://doi.org/10.1007/s10924-015-0746-3>.
194. Matsushita, Y.; Jo, E.-K.; Inakoshi, R.; Yagami, S.; Takamoto, N.; Fukushima, K.; Lee, S.-C. (2013) Hydrothermal reaction of sulfuric acid lignin generated as a by-product during bioethanol production using lignocellulosic materials to convert bioactive agents. *Ind Crops Prod* 42, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.030>.
195. Sun, S.-N.; Cao, X.-F.; Xu, F.; Sun, R.-C.; Jones, G. L. (2014) Structural features and antioxidant activities of lignins from steam-exploded bamboo (*Phyllostachys pubescens*). *J Agric Food Chem* 62 (25), 5939–5947. <https://doi.org/10.1021/jf5023093>.

196. Gong, W.; Xiang, Z.; Ye, F.; Zhao, G. (2016) Composition and structure of an antioxidant acetic acid lignin isolated from shoot shell of bamboo (*Dendrocalamus Latiforus*). *Ind Crops Prod* 91, 340–349. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.023>.
197. Zhang, H.; Yang, Y.; Zhou, Z. (2018) Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *J Integr Agric* 17 (1), 256–263. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61664-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61664-2).
198. Stratil, P.; Klejdus, B.; Kubán, V. (2006) Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables--evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem* 54 (3), 607–616. <https://doi.org/10.1021/jf052334j>.
199. Samaniego Sánchez, C.; Troncoso González, A. M.; García-Parrilla, M. C.; Quesada Granados, J. J.; La López García de Serrana, H.; López Martínez, M. C. (2007) Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal Chim Acta* 593 (1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037>.
200. Morales, A.; Labidi, J.; Gullón, P. (2021) Impact of the lignin type and source on the characteristics of physical lignin hydrogels. *Sustain Mater Technol*, e00369. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00369>.
201. Barakat, A.; Mayer-Laigle, C.; Solhy, A.; Arancon, R. A. D.; Vries, H. de; Luque, R. (2014) Mechanical pretreatments of lignocellulosic biomass: towards facile and environmentally sound technologies for biofuels production. *RSC Adv* 4 (89), 48109–48127. <https://doi.org/10.1039/C4RA07568D>.
202. Hundt, M.; Schnitzlein, K.; Schnitzlein, M. G. (2013) Alkaline polyol pulping and enzymatic hydrolysis of hardwood: effect of pulping severity and pulp composition on cellulase activity and overall sugar yield. *Bioresour Technol* 136, 672–679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.084>.
203. Carvalho, F.; Duarte, L. C.; Pires, F.; Van-Dúnem, V.; Sanfins, L.; Roseiro, L. B.; Gírio, F. (2022) Effective Mild Ethanol-Based Organosolv Pre-Treatment for the Selective Valorization of Polysaccharides and Lignin from Agricultural and Forestry Residues. *Energies* 15 (15), 5654. <https://doi.org/10.3390/en15155654>.
204. Liu, H.; Chen, X.; Ji, G.; Yu, H.; Gao, C.; Han, L.; Xiao, W. (2019) Mechanochemical deconstruction of lignocellulosic cell wall polymers with ball-milling. *Bioresour Technol* 286, 121364. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121364>.
205. Kim, S.; Chmely, S. C.; Nimlos, M. R.; Bomble, Y. J.; Foust, T. D.; Paton, R. S.; Beckham, G. T. (2011) Computational Study of Bond Dissociation Enthalpies for a Large Range of Native and Modified Lignins. *J Phys Chem Lett* 2 (22), 2846–2852. <https://doi.org/10.1021/jz201182w>.
206. Wang, Z.; Zhu, X.; Deuss, P. J. (2021) The effect of ball milling on birch, pine, reed, walnut shell enzymatic hydrolysis recalcitrance and the structure of the isolated residual enzyme lignin. *Ind Crops Prod* 167, 113493. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113493>.
207. Sipponen, M. H.; Laakso, S.; Baumberger, S. (2014) Impact of ball milling on maize (*Zea mays* L.) stem structural components and on enzymatic hydrolysis of carbohydrates. *Ind Crops Prod* 61, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.052>.
208. Sun, Z.; Fridrich, B.; Santi, A. de; Elangovan, S.; Barta, K. (2018) Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform Chemicals. *Chem Rev* 118 (2), 614–678. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00588>.

209. Zhu, X.; Sipilä, J.; Potthast, A.; Rosenau, T.; Balakshin, M. (2023) Exploring Alkyl-O-Alkyl Ether Structures in Softwood Milled Wood Lignins. *J Agric Food Chem* 71 (1), 580–591. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06375>.
210. Ikeda, T.; Holtman, K.; Kadla, J. F.; Chang, H.; Jameel, H. (2002) Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J Agric Food Chem* 50 (1), 129–135. <https://doi.org/10.1021/jf010870f>.
211. Fujimoto, A.; Matsumoto, Y.; Chang, H.; Meshitsuka, G. (2005) Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin. *J Wood Sci* 51 (1), 89–91. <https://doi.org/10.1007/s10086-004-0682-7>.
212. Min, D.; Waters Smith, S.; Chang, H.; Jameel, H. (2013) Influence of Isolation Condition on Structure of Milled Wood Lignin Characterized by Quantitative ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Bioresources* 8 (2), 1790–1800. <https://doi.org/10.15376/biores.8.2.1790-1800>.
213. Li, J.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. (2007) Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour Technol* 98 (16), 3061–3068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.018>.
214. Michelin, M.; Liebentritt, S.; Vicente, A. A.; Teixeira, J. A. (2018) Lignin from an integrated process consisting of liquid hot water and ethanol organosolv: Physicochemical and antioxidant properties. *Int J Biol Macromol* 120 (Pt A), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.046>.
215. Kalogiannis, K. G.; Matsakas, L.; Aspden, J.; Lappas, A. A.; Rova, U.; Christakopoulos, P. (2018) Acid Assisted Organosolv Delignification of Beechwood and Pulp Conversion towards High Concentrated Cellulosic Ethanol via High Gravity Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. *Molecules* 23 (7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071647>.
216. Amendola, D.; Faveri, D. M. de; Egües, I.; Serrano, L.; Labidi, J.; Spigno, G. (2012) Autohydrolysis and organosolv process for recovery of hemicelluloses, phenolic compounds and lignin from grape stalks. *Bioresour Technol* 107, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.108>.
217. Saad, S.; Dávila, I.; Mannai, F.; Labidi, J.; Moussaoui, Y. (2022) Effect of the autohydrolysis treatment on the integral revalorisation of *Ziziphus lotus*. *Biomass Conv Bioref.* <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02457-6>.
218. Zhu, M.-Q.; Wen, J.-L.; Su, Y.-Q.; Wei, Q.; Sun, R.-C. (2015) Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on *Eucommia ulmoides* Oliver for an effective enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol* 185, 378–385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.061>.
219. Marques, F. P.; Colares, A. S.; Cavalcante, M. N.; Almeida, J. S.; Lomonaco, D.; Silva, L. M. A.; Freitas Rosa, M. de; Leitão, R. C. (2022) Optimization by Response Surface Methodology of Ethanosolv Lignin Recovery from Coconut Fiber, Oil Palm Mesocarp Fiber, and Sugarcane Bagasse. *Ind Eng Chem Res* 61 (11), 4058–4067. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c04362>.
220. Pan, X.; Kadla, J. F.; Ehara, K.; Gilkes, N.; Saddler, J. N. (2006) Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 54 (16), 5806–5813. <https://doi.org/10.1021/jf0605392>.

221. Wen, J.-L.; Sun, S.-N.; Yuan, T.-Q.; Xu, F.; Sun, R.-C. (2013) Fractionation of bamboo culms by autohydrolysis, organosolv delignification and extended delignification: understanding the fundamental chemistry of the lignin during the integrated process. *Bioresour Technol* 150, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.015>.
222. Yáñez-S, M.; Rojas, J.; Castro, J.; Ragauskas, A.; Baeza, J.; Freer, J. (2013) Fuel ethanol production from Eucalyptus globulus wood by autocatalized organosolv pretreatment ethanol-water and SSF. *J Chem Technol Biotechnol* 88 (1), 39–48. <https://doi.org/10.1002/jctb.3895>.
223. Vergara, P.; Ladero, M.; García-Ochoa, F.; Villar, J. C. (2018) Valorization of Cynara Cardunculus crops by ethanol-water treatment: Optimization of operating conditions. *Ind Crops Prod* 124, 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.064>.
224. Abatzoglou, N.; Chornet, E.; Belkacemi, K.; Overend, R. P. (1992) Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation. *Chem Eng Sci* 47 (5), 1109–1122. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)80235-5](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80235-5).
225. Villaverde, J. J.; Li, J.; Ek, M.; Ligeró, P.; Vega, A. de (2009) Native lignin structure of Miscanthus x giganteus and its changes during acetic and formic acid fractionation. *J Agric Food Chem* 57 (14), 6262–6270. <https://doi.org/10.1021/jf900483t>.
226. Lin, S. Y. (1992) Ultraviolet Spectrophotometry. In: Lin SY, Dence CW (eds) *Methods in Lignin Chemistry*. Springer, Berlin, pp 217–232.
227. Yao, L.; Chen, C.; Yoo, C. G.; Meng, X.; Li, M.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J.; Dong, C.; Yang, H. (2018) Insights of Ethanol Organosolv Pretreatment on Lignin Properties of Broussonetia papyrifera. *ACS Sustain Chem Eng* 6 (11), 14767–14773. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03290>.
228. Araya, F.; Troncoso, E.; Mendonça, R. T.; Freer, J. (2015) Condensed lignin structures and re-localization achieved at high severities in autohydrolysis of Eucalyptus globulus wood and their relationship with cellulose accessibility. *Biotechnol Bioeng* 112 (9), 1783–1791. <https://doi.org/10.1002/bit.25604>.
229. Meyer, J. R.; Li, H.; Zhang, J.; Foston, M. B. (2020) Kinetics of Secondary Reactions Affecting the Organosolv Lignin Structure. *ChemSusChem* 13 (17), 4557–4566. <https://doi.org/10.1002/cssc.202000942>.
230. Hu, Z.; Du, X.; Liu, J.; Chang, H.; Jameel, H. (2016) Structural Characterization of Pine Kraft Lignin: BioChoice Lignin vs Indulin AT. *J Wood Chem Technol* 36 (6), 432–446. <https://doi.org/10.1080/02773813.2016.1214732>.
231. Pichler, T.; Maitz, S.; Kienberger, M. (2020) Influence of long-term heat treatment of kraft black liquor on lignin precipitation and material properties. *Holzforschung* 74 (3), 286–292. <https://doi.org/10.1515/hf-2019-0143>.
232. Tao, J.; Hosseinaei, O.; Delbeck, L.; Kim, P.; Harper, D. P.; Bozell, J. J.; Rials, T. G.; Labbé, N. (2016) Effects of organosolv fractionation time on thermal and chemical properties of lignins. *RSC Adv* 6 (82), 79228–79235. <https://doi.org/10.1039/C6RA16296G>.
233. Grzybek, J.; Sepperer, T.; Petutschnigg, A.; Schnabel, T. (2021) Organosolv Lignin from European Tree Bark: Influence of Bark Pretreatment. *Materials* 14 (24). <https://doi.org/10.3390/ma14247774>.
234. Timilsena, Y. P.; Audu, I. G.; Rakshit, S. K.; Brosse, N. (2013) Impact of the lignin structure of three lignocellulosic feedstocks on their organosolv delignification. Effect of carbonium

- ion scavengers. *Biomass Bioenergy* 52, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.040>.
235. Komatsu, T.; Yokoyama, T. (2021) Revisiting the condensation reaction of lignin in alkaline pulping with quantitativity part I: the simplest condensation between vanillyl alcohol and creosol under soda cooking conditions. *J Wood Sci* 67 (1). <https://doi.org/10.1186/s10086-021-01978-4>.
236. Domínguez-Robles, J.; Tamminen, T.; Liitiä, T.; Peresin, M. S.; Rodríguez, A.; Jääskeläinen, A.-S. (2018) Aqueous acetone fractionation of kraft, organosolv and soda lignins. *Int J Biol Macromol* 106, 979–987. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.102>.
237. Li, Z.; Ge, Y. (2012) Antioxidant activities of lignin extracted from sugarcane bagasse via different chemical procedures. *Int J Biol Macromol* 51 (5), 1116–1120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.09.004>.
238. Guo, Y.; Zhou, J.; Wen, J.; Sun, G.; Sun, Y. (2015) Structural transformations of triploid of *Populus tomentosa* Carr. lignin during auto-catalyzed ethanol organosolv pretreatment. *Ind Crops Prod* 76, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.020>.
239. Bae, S.; Choi, J.-H.; Ahn, M.; Kim, R.; Kim, H. (2023) Ethanol organosolv lignin as a substitute for commercial antioxidants, focusing on the structural properties and synergistic effect with myricetin. *Food Chem* 418, 136009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136009>.
240. Dizhbite, T.; Telysheva, G.; Jurkjane, V.; Viesturs, U. (2004) Characterization of the radical scavenging activity of lignins - natural antioxidants. *Bioresour Technol* 95 (3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.02.024>.
241. Davaritouchae, M.; Hiscox, W. C.; Terrell, E.; Mancini, R. J.; Chen, S. (2020) Mechanistic studies of milled and Kraft lignin oxidation by radical species. *Green Chem* 22 (4), 1182–1197. <https://doi.org/10.1039/C9GC04162A>.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Vergleich der in dieser Studie genutzten Antioxidanz-Assays. ¹²³	20
Tabelle 3-1: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 3-2: Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 4-1: Zur Ligninisolation verwendete Biomassen.	26
Tabelle 4-2: Übersicht der isolierten Lignine inkl. Probenkürzel und Aufschlussbedingungen.	27
Tabelle 4-3: Messbedingungen der HS-GC-MS Methode.	30
Tabelle 4-4: Messbedingungen der GPC-Analysen.	30
Tabelle 5-1: Chemische Zusammensetzung der Biomassen, bestimmt nach den NREL- Protokollen. ^{134–136}	34
Tabelle 5-2: Anteile der Monolignole (S, G, H) sowie der am häufigsten vorkommenden Bindungstypen (A, B, C, D) und Substrukturen (ZA, pCA, T) in Ligninen aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.	47
Tabelle 5-3: Ergebnisse der Bestimmung des Methoxy- und Ethoxygehaltes mittels HS-GC-MS der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung eines OSL.....	48
Tabelle 5-4: Molmassenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n =$ 3).....	51
Tabelle 6-1: Anteile der Monolignole (S, G, H) sowie der am häufigsten vorkommenden Bindungstypen (A, B, C, D) und Substrukturen (ZA, pCA, T) in Ligninen aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.....	62

Tabelle 6-2: Ergebnisse der Bestimmung des Methoxy- und Ethoxygehaltes mittels HS-GC-MS der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung eines OSL.	63
Tabelle 6-3: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).	64
Tabelle 7-1: Chemische Zusammensetzung von Miscanthus nach verschiedenen Aufschlussprozessen, bestimmt nach den NREL-Protokollen ¹³⁴⁻¹³⁶ , angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.	68
Tabelle 7-2: Chemische Zusammensetzung ausgewählter Lignine bestimmt nach den NREL-Protokollen ¹³⁴⁻¹³⁶ , angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.	72
Tabelle 7-3: Anteile der Monolignole (S, G, H) sowie der am häufigsten vorkommenden Bindungstypen (A, B, C, D) und Substrukturen (ZA, pCA, T) in Ligninen aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie von KL und IAT.	76
Tabelle 7-4: Ergebnisse der Bestimmung des Methoxy- und Ethoxygehaltes mittels HS-GC-MS der Lignine aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen sowie KL, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung der Dreifachbestimmung eines Lignins.	77
Tabelle 7-5: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie KL und IAT. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).	79

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Links: blühender <i>Miscanthus x giganteus</i> im Sommer (Copyright 2017, Katharina Walbrück). Rechts: getrockneter <i>Miscanthus x giganteus</i> kurz vor der Ernte (Copyright 2018, CKA).	11
Abbildung 2-2: Links: blühende Silphie (Copyright 2016, CKA). Rechts: Querschnitt des Stängels der durchwachsenen Silphie (Copyright 2019, Niklas Frase).	11
Abbildung 2-3: Links: blühender Paulowniabaum. Rechts: Baumstamm einer siebenjährigen Paulownia (Copyright 2019, Georg Völkerling).	12
Abbildung 2-4: Cellulose, Hemicellulose und Lignin in den Zellwänden von Pflanzen. ⁴⁰	13
Abbildung 2-5: Die Monolignole <i>p</i> -Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol formen die spezifischen Substrukturen <i>p</i> -Hydroxyphenyl (H), Guajakol (G) und Syringol (S) im Lignin. ⁴⁷	14
Abbildung 2-6: Etherbindungen (v. l. n. r.): β -Aryl-Ether (β -O-4'), α -Aryl-Ether (α -O-4'), Biphenyl-Ether (4-O-5'). ⁴⁷	14
Abbildung 2-7: Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen (v. l. n. r.): 1,2-Diarylpropan (β -1'), Biphenyl (5-5'), Resinol (β - β'). ⁴⁷	15
Abbildung 2-8: Komplexere Strukturen (v. l. n. r.): Dibenzodioxocin (α -O-4'/ β -O-4'/5-5'), Phenylcoumaran (α -O-4'/ β -5'), Spirodienon (β -1'/ β -O-4'). ⁴⁷	15
Abbildung 2-9: Strukturformeln des DPPH-Radikals (links) sowie des ABTS-Radikalkations (rechts).....	21
Abbildung 2-10: Fe ³⁺ -TPTZ-Komplex.	22
Abbildung 5-1: Vergleich der Ligninausbeute beim Organosolv-Aufschluss verschiedener Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).	36
Abbildung 5-2: UV-Vis Spektren der Lignine aus verschiedenen Biomassen, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten.....	38
Abbildung 5-3: Monolignoleinheiten im Lignin. G: Guajakol; S: Syringol; H: <i>p</i> -Hydroxyphenyl. ⁴⁷	39

Abbildung 5-4: FTIR-Spektren der Lignine aus verschiedenen Biomassen. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).....	40
Abbildung 5-5: Bindungstypen und Substrukturen im Lignin. ^{47, 139}	42
Abbildung 5-6: HSQC NMR-Spektren der Lignine aus verschiedenen Biomassen. Links: aliphatische Seitenkettenregion (δ_C/δ_H 50 – 90/2,8 – 5,8 ppm). Rechts: aromatische Region (δ_C/δ_H 90 – 150/6,0 – 8,0 ppm). Farbige Peaks lassen sich den Strukturen in Abbildung 5-3 und in Abbildung 5-5 derselben Farbe zuordnen.	44
Abbildung 5-7: Anteil der Monolignole (G-, S- und H-Einheiten, siehe Abbildung 5-3) in Ligninen aus verschiedenen Biomassen.	45
Abbildung 5-8: Anteil der Bindungstypen und Substrukturen (siehe Abbildung 5-5) in Ligninen aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.	46
Abbildung 5-9: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.	50
Abbildung 5-10: Molmassenverteilungen der Lignine aus verschiedenen Biomassen.	52
Abbildung 5-11: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).	53
Abbildung 5-12: Vergleich der Standard-Scores der Lignine aus verschiedenen Biomassen mit vier verschiedenen Assays, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.	54
Abbildung 5-13: Relativer Index der antioxidativen Kapazität (<i>relative antioxidant capacity index</i> , RACI) der Lignine aus verschiedenen Biomassen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.....	54
Abbildung 6-1: Vergleich der Ligninausbeute beim Organosolv-Aufschluss von Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).	56

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 6-2: UV-Vis Spektren der Lignine aus Miscanthus mit variierender Partikelgröße, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten..... 57
- Abbildung 6-3: UV-Vis Spektren der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten..... 57
- Abbildung 6-4: FTIR-Spektren der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb). 58
- Abbildung 6-5: Hauptkomponentenanalyse der $^1\text{H-NMR}$ -Daten der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße. 59
- Abbildung 6-6: Anteil der Monolignole (siehe Abbildung 5-3) in Ligninen aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße. 60
- Abbildung 6-7: Anteil der Bindungstypen und Substrukturen (siehe Abbildung 5-5) in Ligninen aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. 61
- Abbildung 6-8: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses..... 64
- Abbildung 6-9: Molmassenverteilungen der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße. 65
- Abbildung 6-10: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$)..... 66
- Abbildung 7-1: Ligninausbeute aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$). 70
- Abbildung 7-2: UV-Vis-Spektren der Miscanthus-Lignine nach variierendem Aufschlussprozess sowie KL und IAT, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 1 cm Quarzglasküvetten. 72

Abbildung 7-3: UV-Vis-Spektren der Miscanthus-Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss, gemessen in NaOH (0,1 M) mit einer Konzentration von 50 µg mL ⁻¹ in 1 cm Quarzglasküvetten.....	72
Abbildung 7-4: FTIR-Spektren der der Miscanthus-Lignine nach variierenden Aufschlussprozessen sowie KL und IAT. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).....	73
Abbildung 7-5: Anteil der Monolignole (siehe Abbildung 5-3) in Miscanthus-Ligninen nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen.....	75
Abbildung 7-6: Anteil der Bindungstypen und Substrukturen (siehe Abbildung 5-5) in Miscanthus-Ligninen nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.	75
Abbildung 7-7: Massenmittelwerte (M_n , M_w) und Polydispersitätsindex (PDI) der Lignine aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.	78
Abbildung 7-8: Molmassenverteilungen der Miscanthus-Lignine nach variierenden Aufschlussprozessen sowie KL und IAT.	80
Abbildung 7-9: Molmassenverteilungen der Miscanthus-Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss.....	80
Abbildung 7-10: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Miscanthus-Lignine nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, angegeben als Mittelwert ± Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie KL und IAT. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).	81
Abbildung 7-11: Vergleich der Standard-Scores der Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen mit vier verschiedenen Assays, dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.....	83
Abbildung 7-12 Relativer Index der antioxidativen Kapazität (<i>relative antioxidant capacity index</i> , RACI) der Lignine aus verschiedenen Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen, dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.....	83

Anhang

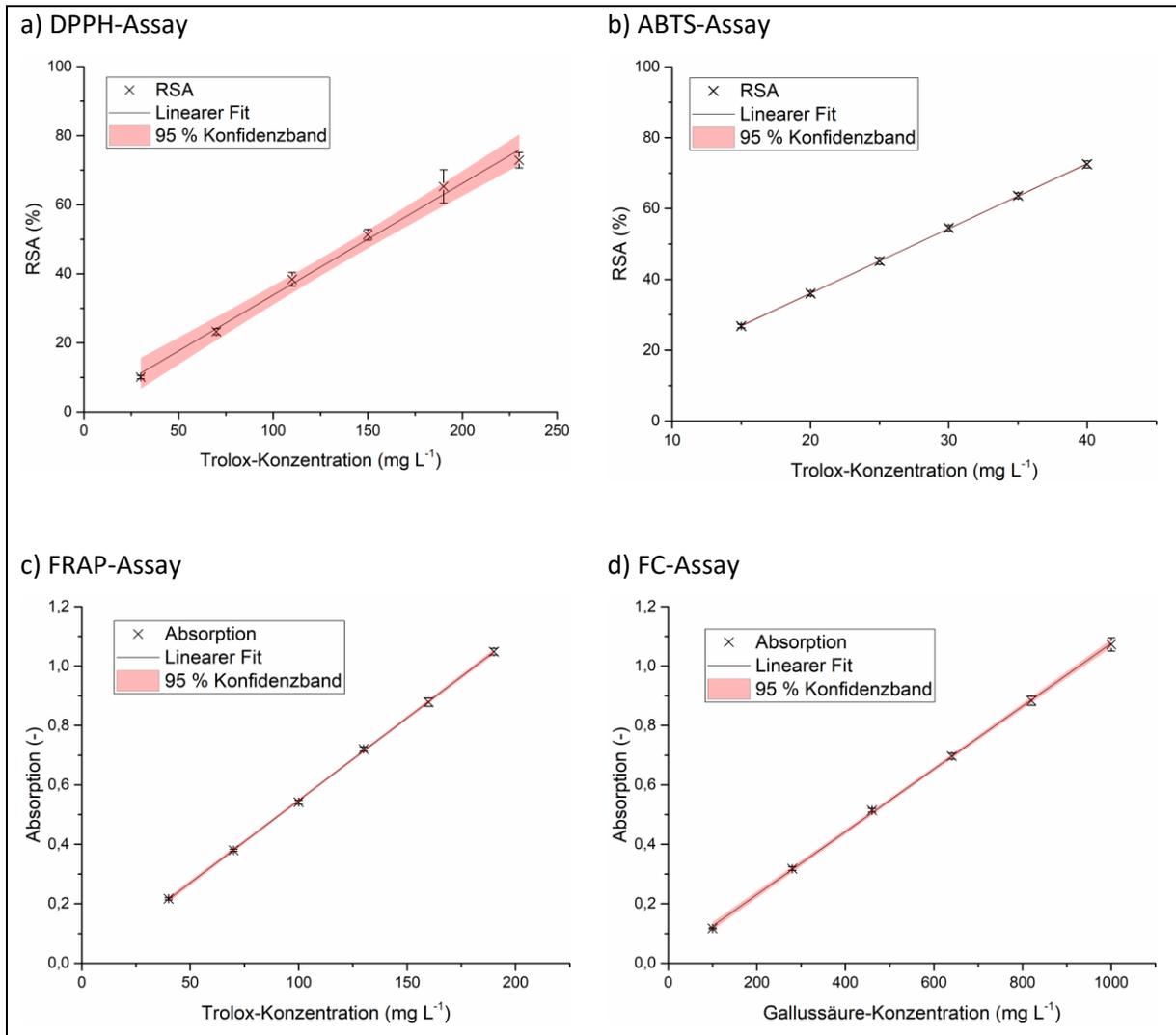


Abbildung A 1: Vergleich der Kalibrationen der verschiedenen Assays, Messwerte als Mittelwert \pm Standardabweichung. Es wurden keine signifikanten Ausreißer detektiert ($p < 0,05$). RSA: Aktivität als Radikalfänger (*radical scavenging activity*).

Tabelle A 1: Ergebnisse der linearen Kurvenanpassung der verschiedenen Assays. Für Steigung und Achsenabschnitt sind Mittelwert \pm Standardabweichung gegeben.

	DPPH	ABTS	FRAP	FC
m	0,323 \pm 0,013	1,831 \pm 0,006	0,006 \pm 0,000	0,001 \pm 0,000
b	1,508 \pm 1,957	- 0,576 \pm 0,174	- 0,007 \pm 0,005	0,633 \pm 0,019
R ²	0,99326	0,99996	0,99982	0,99972
RSS	19,886	0,064	0,000	0,000
RMSE	2,230	0,126	0,005	0,007
MSD	6,894	0,069	0,849	6,293
CV	5,30 %	0,25 %	0,74 %	1,14 %

m: Steigung; b: Achsenabschnitt; R²: Bestimmtheitsmaß; RSS: Residuenquadratsumme; RMSE: Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers; MSD: Verfahrensstandardabweichung; CV: Variationskoeffizient

Tabelle A 2: Zuordnung der FTIR-Banden.^{47, 61, 170}

Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung
3411 – 3439	O-H Streckschwingung (phenolisch & aliphatisch)
2923 – 2937	C-H Streckschwingung in Alkylgruppen (–CH ₂ – & –CH ₃)
2843 – 2850	O-CH ₃ Streckschwingung
1704 – 1710	C=O Streckschwingung (unkonjugiert)
1656 – 1661	C=O Streckschwingung (konjugiert)
1594 – 1604	C-C Streckschwingung des aromatischen Skeletts (S- > G-Einheiten), symmetrisch
1509 – 1515	C-C Streckschwingung des aromatischen Skeletts (G- > S-Einheiten), asymmetrisch
1461 – 1463	C-H asymmetrische Deformationsschwingung (–CH ₂ – & –CH ₃)
1421 – 1427	C-C Streckschwingung des aromatischen Skeletts; C-H <i>in-plane</i> Deformationsschwingung
1366 – 1375	O-H <i>in-plane</i> Deformationsschwingung (phenolische OH); C-H symmetrische Streckschwingung in aliphatischen –CH ₃
1327 – 1330	C-O Streckschwingung des aromatischen Skeletts (S-Einheiten)
1266 – 1268	C-O Streckschwingung des aromatischen Skeletts (G-Einheiten); C-O-C Streckschwingung
1218 – 1225	C-O (H) Streckschwingung der phenolischen OH
1164 – 1166	C=O Streckschwingung in konjugierten Estergruppen, typisch für HGS-Lignine
1123 – 1128	C-H <i>in-plane</i> Deformationsschwingung, aromatisch (S-Einheiten)
1080 – 1086	C-O Deformationsschwingung in sekundären Alkoholen & aliphatischen Ethern
1032 – 1034	Aromatische C-H <i>in-plane</i> Deformationsschwingung (G-, S-Einheiten); C-O Deformationsschwingung in primären Alkoholen
967 – 985	C-C <i>out-of-plane</i> Deformationsschwingung (–HC=CH–)
917 – 929	C-H <i>out-of-plane</i> Deformationsschwingung (aromatischer Ring)
852 – 854	C-H <i>out-of-plane</i> Deformationsschwingung in Position 2 und 6 (G-Einheiten)
830 – 833	C-H <i>out-of-plane</i> Deformationsschwingung in Position 2, 5 und 6 (S-Einheiten)
815 – 823	C-H <i>out-of-plane</i> Deformationsschwingung in Position 2 und 6 (G-Einheiten)

Anhang

Tabelle A 3: Zuordnung der $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ Korrelationen in den HSQC NMR-Spektren der Lignine.^{62, 69, 139, 178, 241}

Bindungen & Endgruppen		Aromatische Strukturen	
Zuordnung	$\delta_{\text{C}} / \delta_{\text{H}}$ [ppm]	Zuordnung	$\delta_{\text{C}} / \delta_{\text{H}}$ [ppm]
β -Aryl-Ether (A)		Syringol (S)	
A $_{\alpha}$	71,3 / 4,8	S $_{2,6}$	104,1 / 6,7
A $_{\beta}$ (G)	83,5 / 4,3	S' $_{2,6}$	106,2 / 7,3
A $_{\beta}$ (S)	85,7 / 4,1	Guajakol (G)	
A $_{\gamma}$	59,5 / 3,5	G $_2$	110,1 / 6,9
A' $_{\gamma}$	63,2 / 4,3	G $_5$	114,9 / 6,8
(α -OEt) A	63,7 / 3,3	G $_6$	118,8 / 6,7
Resinol (B)		<i>p</i> -Hydroxyphenyl (H)	
B $_{\alpha}$	84,8 / 4,6	H $_{2,6}$	127,1 / 7,2
B $_{\beta}$	53,3 / 3,0	<i>p</i> -Coumarat (pCA)	
B $_{\gamma}$	70,3 / 4,1 & 70,8 / 3,8	pCA $_{2,6}$	129,9 / 7,4
Phenylcoumaran (C)		pCA $_{\alpha}$	144,5 / 7,4
C $_{\alpha}$	86,8 / 5,4	pCA $_{\beta}$	113,5 / 6,2
C $_{\beta}$	52,8 / 3,4	Tricin (T)	
C $_{\gamma}$	62,5 / 3,7	T $_{2,6}$	104,0 / 7,3
Spirodienon (D)		T $_3$	105,3 / 7,2
D $_{\alpha}$	84,8 / 4,8	T $_6$	98,3 / 6,2
D $_{\beta}$	60,8 / 2,8	T $_8$	93,9 / 6,6
Zimtalkohol-Endgruppe (ZA)			
ZA $_{\alpha,\beta}$	129,7 / 6,2		
ZA $_{\gamma}$	60,9 / 4,1		

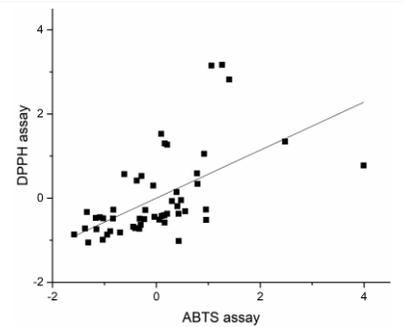
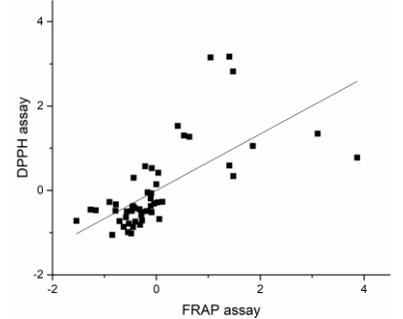
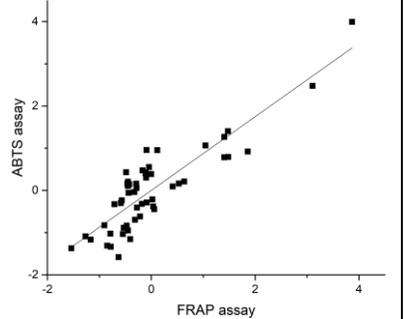
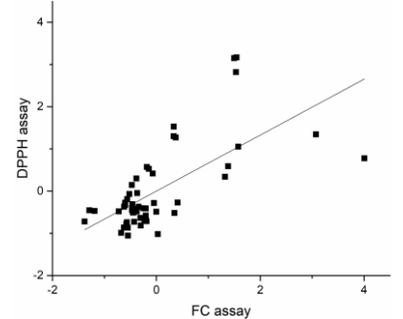
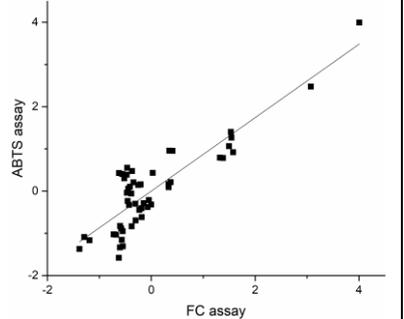
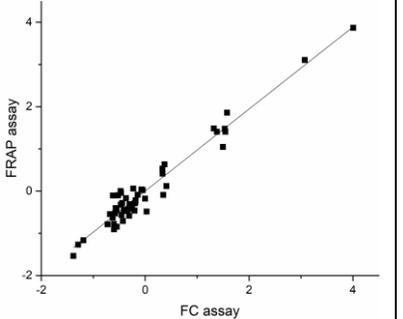
Tabelle A 4: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus verschiedenen Biomassen als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

	TEAC $_{\text{DPPH}}$		TEAC $_{\text{ABTS}}$		TEAC $_{\text{FRAP}}$		TPC	
	[$\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin]							
							[%]	
ML2	0,26 \pm 0,02	(a)	0,78 \pm 0,04	(b)	0,71 \pm 0,04	(b)	17,5 \pm 0,6	(b)
SL	0,25 \pm 0,01	(a)	0,68 \pm 0,02	(a)	0,56 \pm 0,02	(a)	13,4 \pm 0,4	(a)
WL	0,22 \pm 0,02	(a)	0,66 \pm 0,03	(a)	0,64 \pm 0,03	(b)	16,1 \pm 0,2	(b)
PL2	0,26 \pm 0,01	(a)	0,86 \pm 0,01	(b)	0,69 \pm 0,00	(b)	16,9 \pm 0,6	(b)
BL	0,25 \pm 0,04	(a)	0,96 \pm 0,04	(c)	0,70 \pm 0,04	(b)	19,4 \pm 0,8	(c)

Tabelle A 5: Vergleich der Aktivität als Radikalfänger (*radical scavenging activity*, RSA) der Lignine aus verschiedenen Biomassen als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses.

	RSA $_{\text{DPPH}}$	RSA $_{\text{ABTS}}$
	[%]	
ML2	22,4 \pm 2,6	53,3 \pm 2,9
SL	22,0 \pm 1,7	45,6 \pm 1,7
WL	19,2 \pm 1,2	44,8 \pm 2,5
PL2	22,2 \pm 1,0	58,2 \pm 0,9
BL	21,5 \pm 2,9	65,6 \pm 2,8

Tabelle A 6: Korrelation der Ergebnisse als Standard- Scores der vier Assays (DPPH, ABTS, FRAP, FC) aller gemessenen Lignine.

	DPPH	ABTS	FRAP	FC
DPPH	-	$m = 0,571 \pm 0,116$ $R^2 = 0,326$	$m = 0,668 \pm 0,105$ $R^2 = 0,447$	$m = 0,663 \pm 0,106$ $R^2 = 0,440$
ABTS		-	$m = 0,873 \pm 0,069$ $R^2 = 0,763$	$m = 0,870 \pm 0,070$ $R^2 = 0,757$
FRAP			-	$m = 0,972 \pm 0,033$ $R^2 = 0,944$
FC				-

m: Steigung; R²: Bestimmtheitsmaß

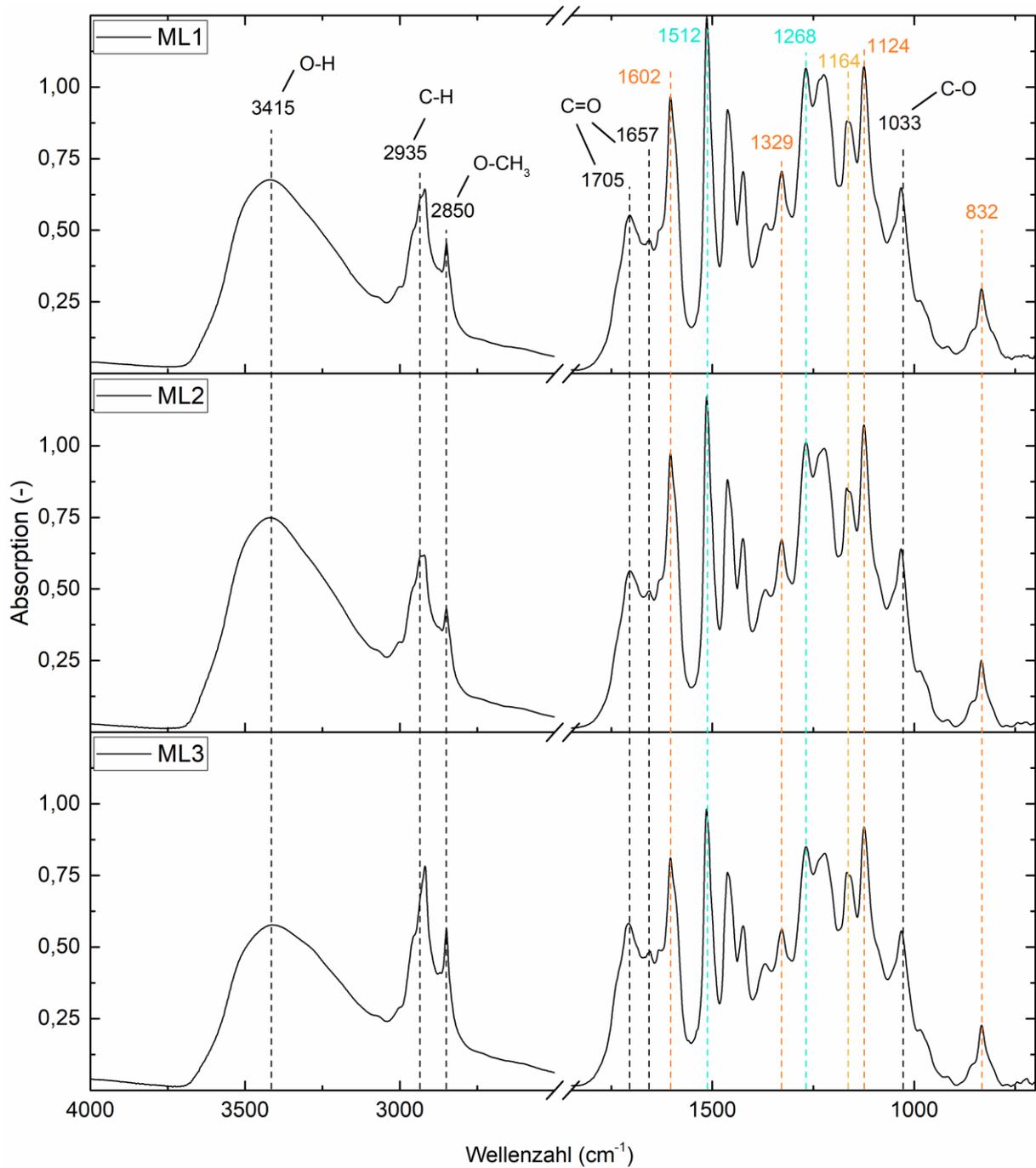


Abbildung A 2: FTIR-Spektren der Lignine aus Miscanthus mit variierender Partikelgröße. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).

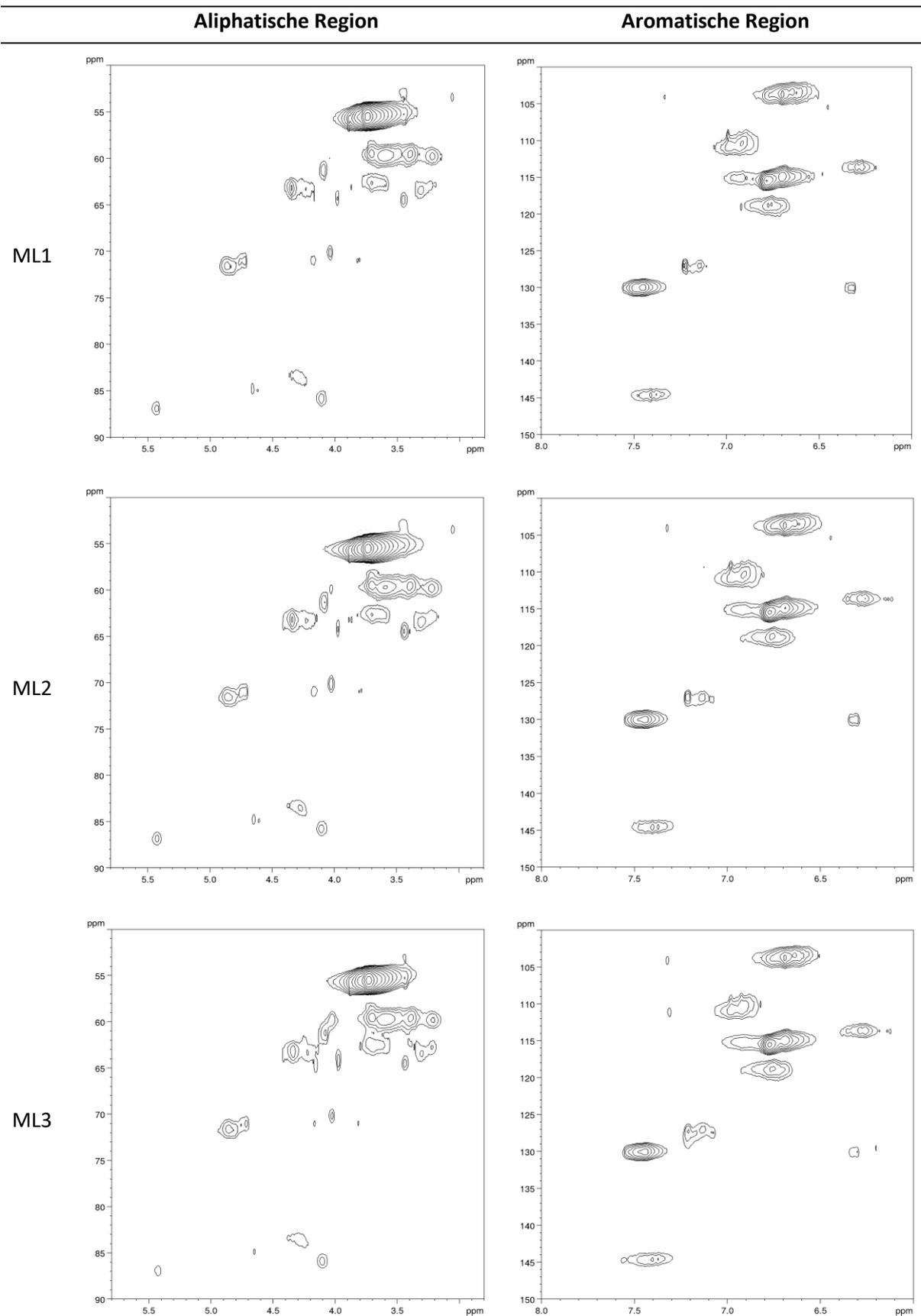


Abbildung A 3: HSQC NMR-Spektren der Lignine aus Miscanthus mit variierender Partikelgröße. Links: aliphatische Seitenkettenregion ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 50 – 90/2,8 – 5,8 ppm). Rechts: aromatische Region ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$ 100 – 150/6,0 – 8,0 ppm).

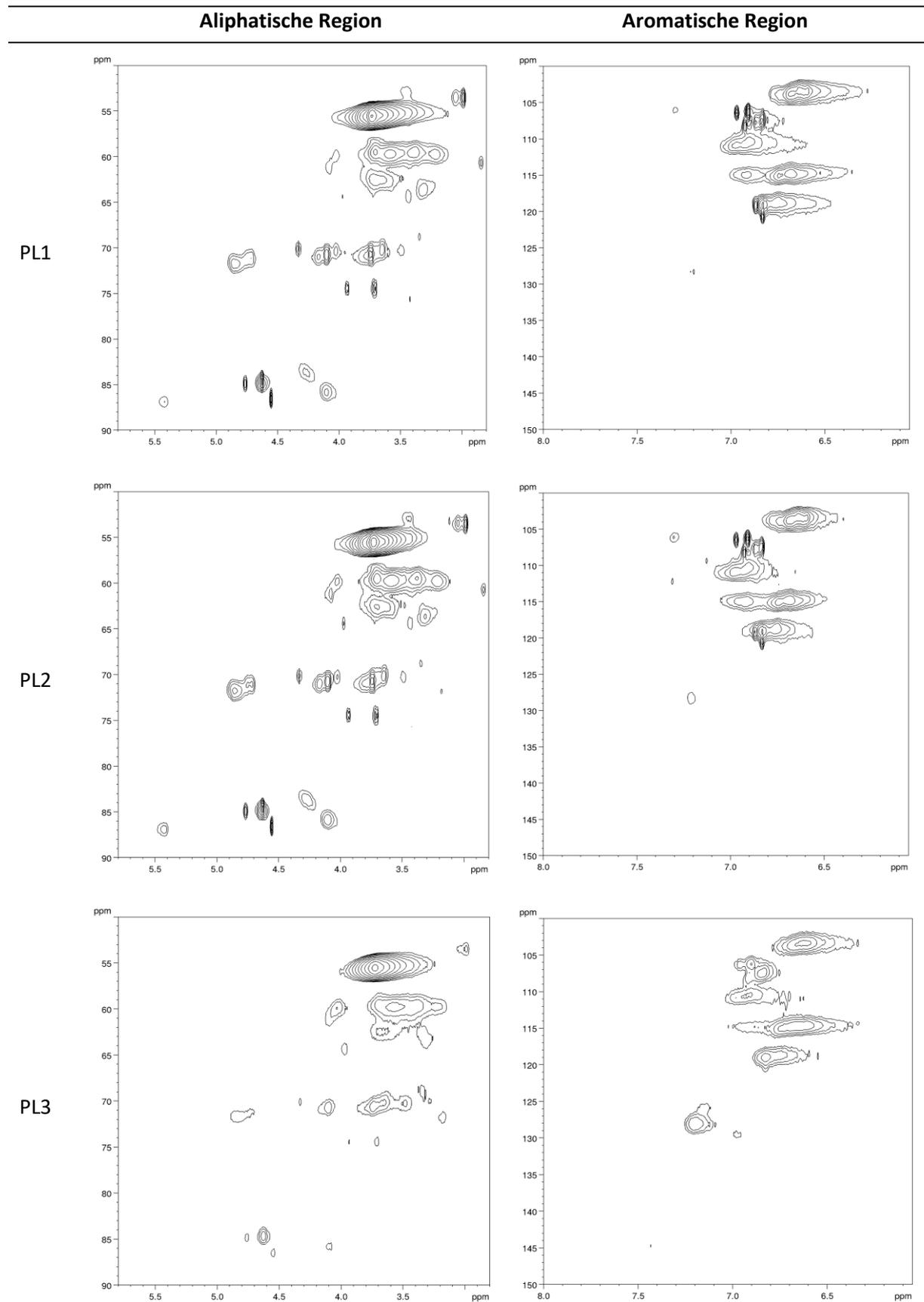


Abbildung A 4: HSQC NMR-Spektren der Lignine aus Paulownia mit variierender Partikelgröße. Links: aliphatische Seitenkettenregion (δ_C/δ_H 50 – 90/2,8 – 5,8 ppm). Rechts: aromatische Region (δ_C/δ_H 100 – 150/6,0 – 8,0 ppm).

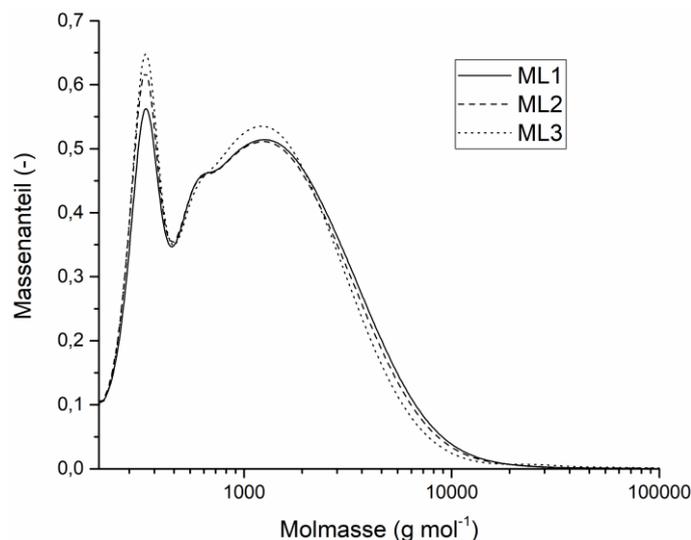


Abbildung A 5: Molmassenverteilungen der Lignine aus Miscanthus mit variierender Partikelgröße.

Tabelle A 7: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus Miscanthus und Paulownia mit variierender Partikelgröße als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

	TEAC _{DPPH}		TEAC _{ABTS}		TEAC _{FRAP}		TPC	
	[$\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin]						[%]	
ML1	0,24 \pm 0,02	(a)	0,78 \pm 0,03	(ab)	0,69 \pm 0,01	(abc)	17,7 \pm 0,6	(c)
ML2	0,26 \pm 0,02	(ab)	0,78 \pm 0,04	(ab)	0,71 \pm 0,04	(bc)	17,5 \pm 0,6	(c)
ML3	0,22 \pm 0,01	(a)	0,71 \pm 0,01	(a)	0,66 \pm 0,01	(ab)	16,0 \pm 0,3	(a)
PL1	0,25 \pm 0,02	(ab)	0,83 \pm 0,03	(bc)	0,65 \pm 0,02	(a)	17,1 \pm 0,4	(abc)
PL2	0,26 \pm 0,01	(ab)	0,86 \pm 0,01	(cd)	0,69 \pm 0,00	(abc)	16,9 \pm 0,6	(abc)
PL3	0,29 \pm 0,02	(b)	0,92 \pm 0,01	(d)	0,71 \pm 0,00	(c)	16,2 \pm 0,2	(ab)

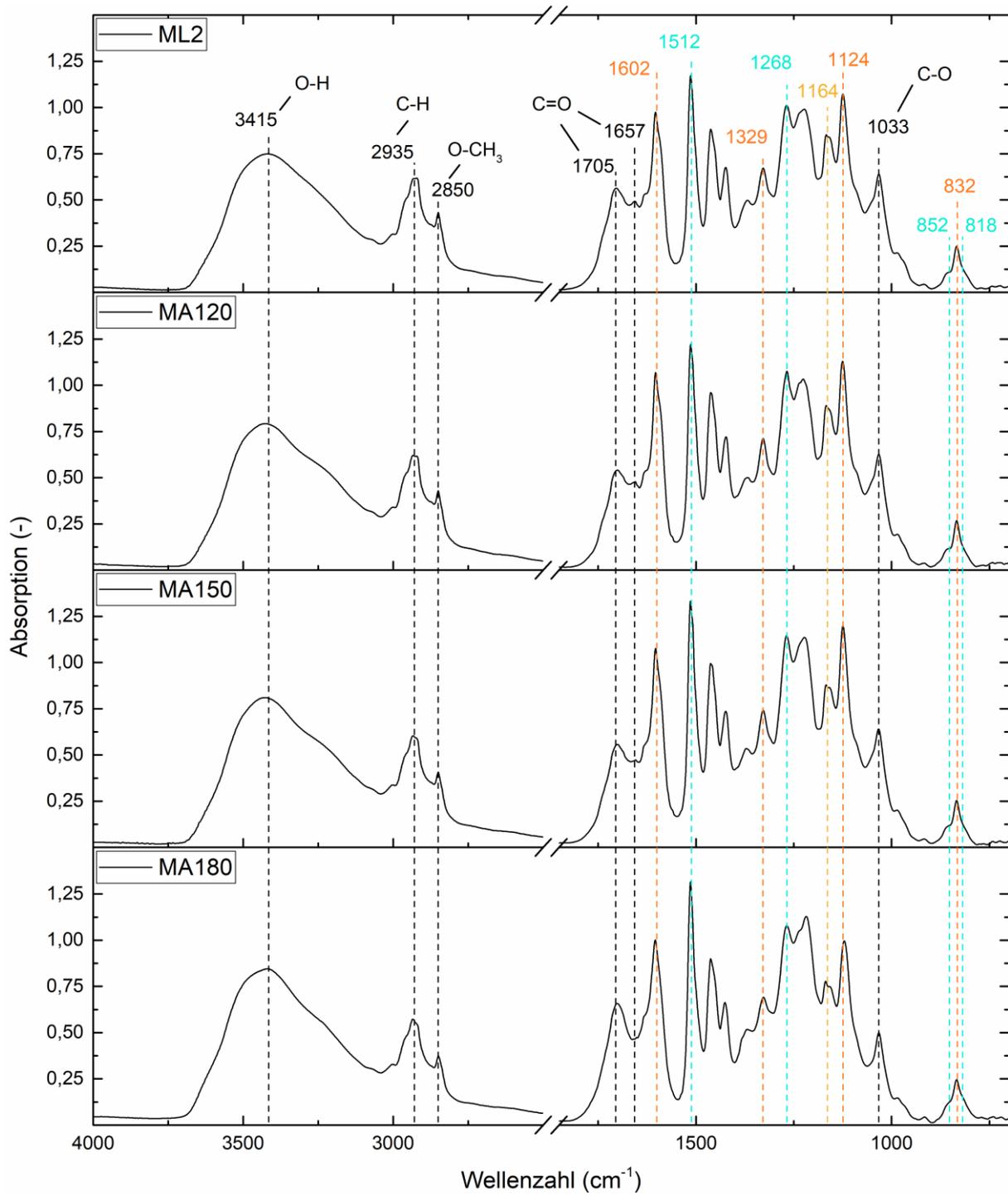
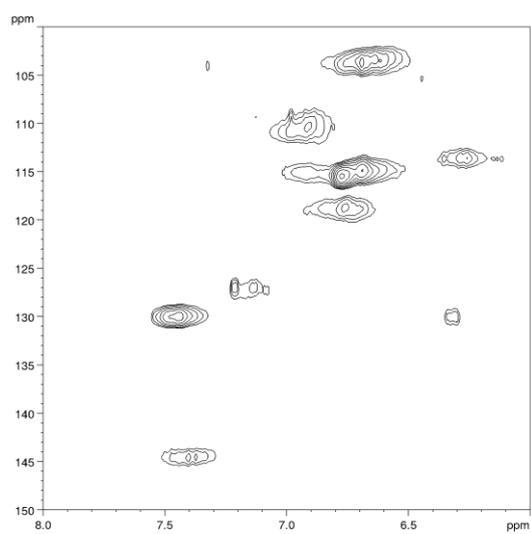
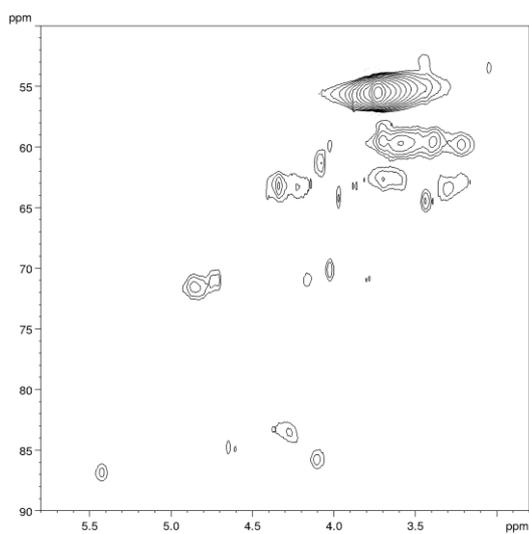


Abbildung A 6: FTIR-Spektren der Miscanthus-Lignine mit und ohne AH nach Standardaufschluss. Signale, die sich einer bestimmten Monolignoleinheit zuordnen lassen, entsprechen derselben Farbe wie in Abbildung 5-3 (G: türkis; S: orange; H: gelb).

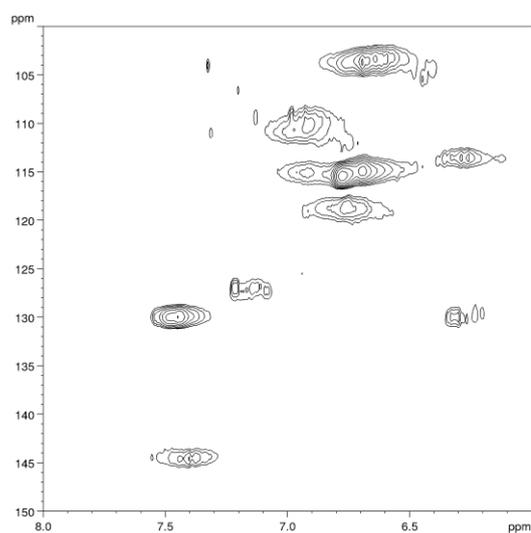
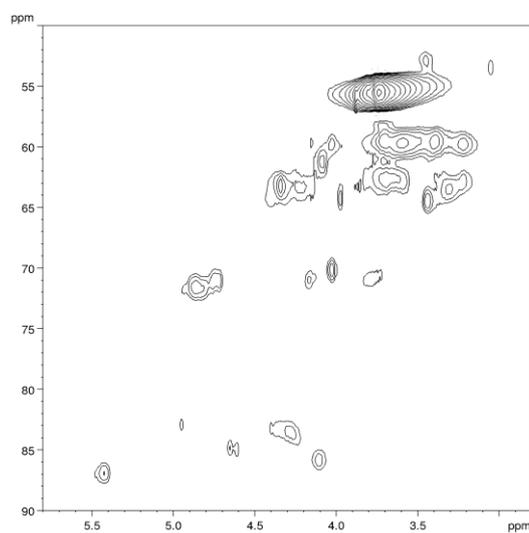
Aliphatische Region

Aromatische Region

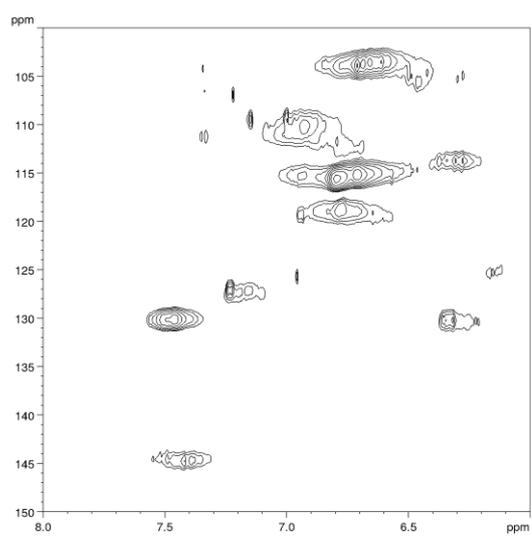
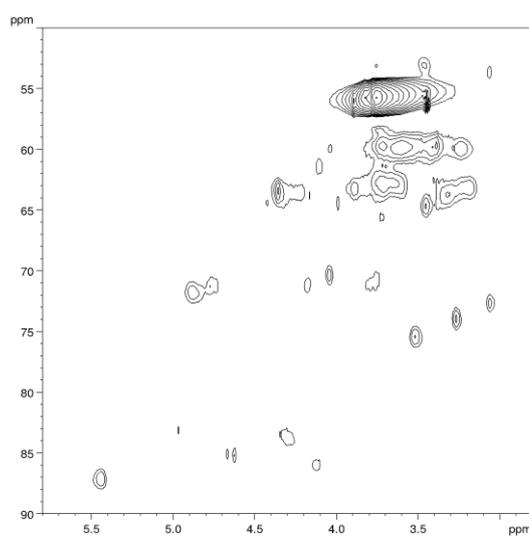
ML2



ML4

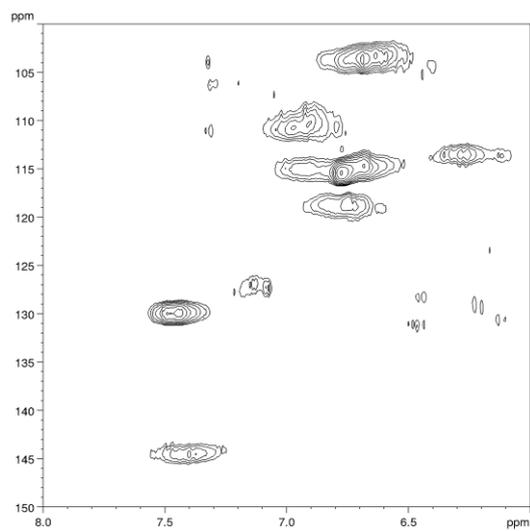
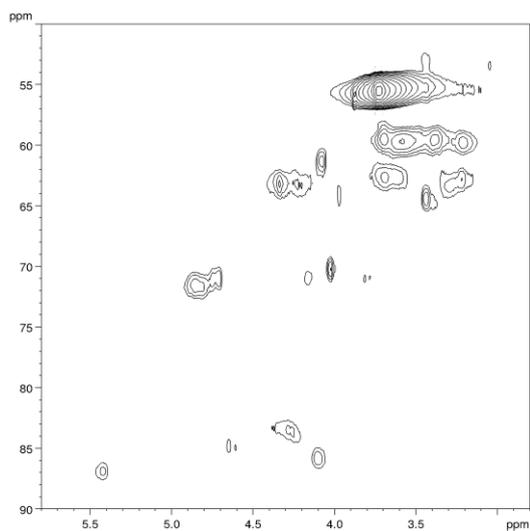


ML5

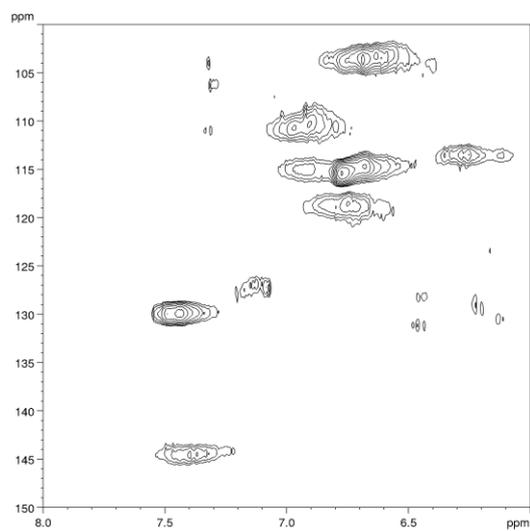
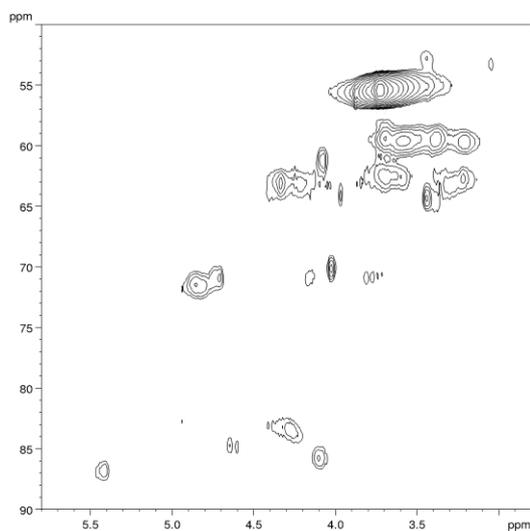


Anhang

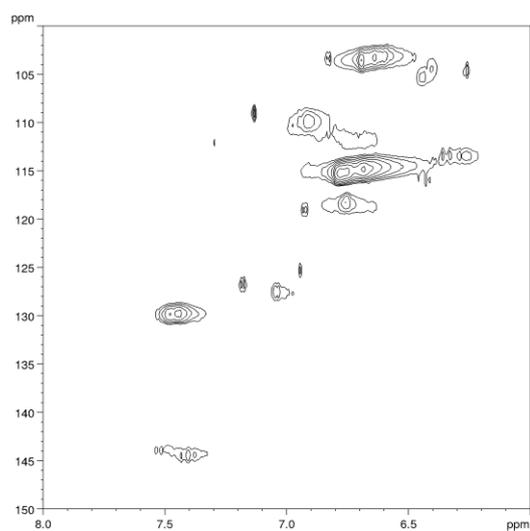
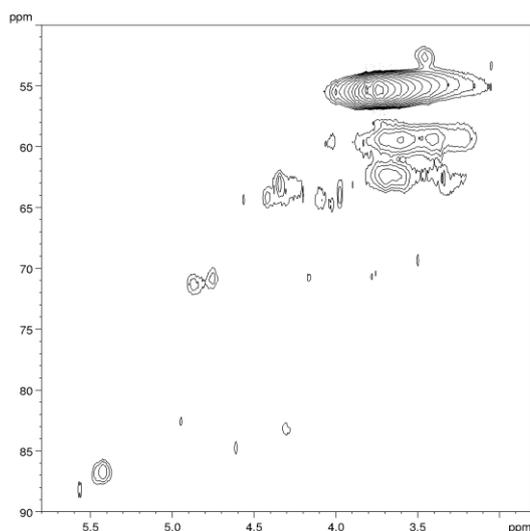
MA120



MA150



MA180



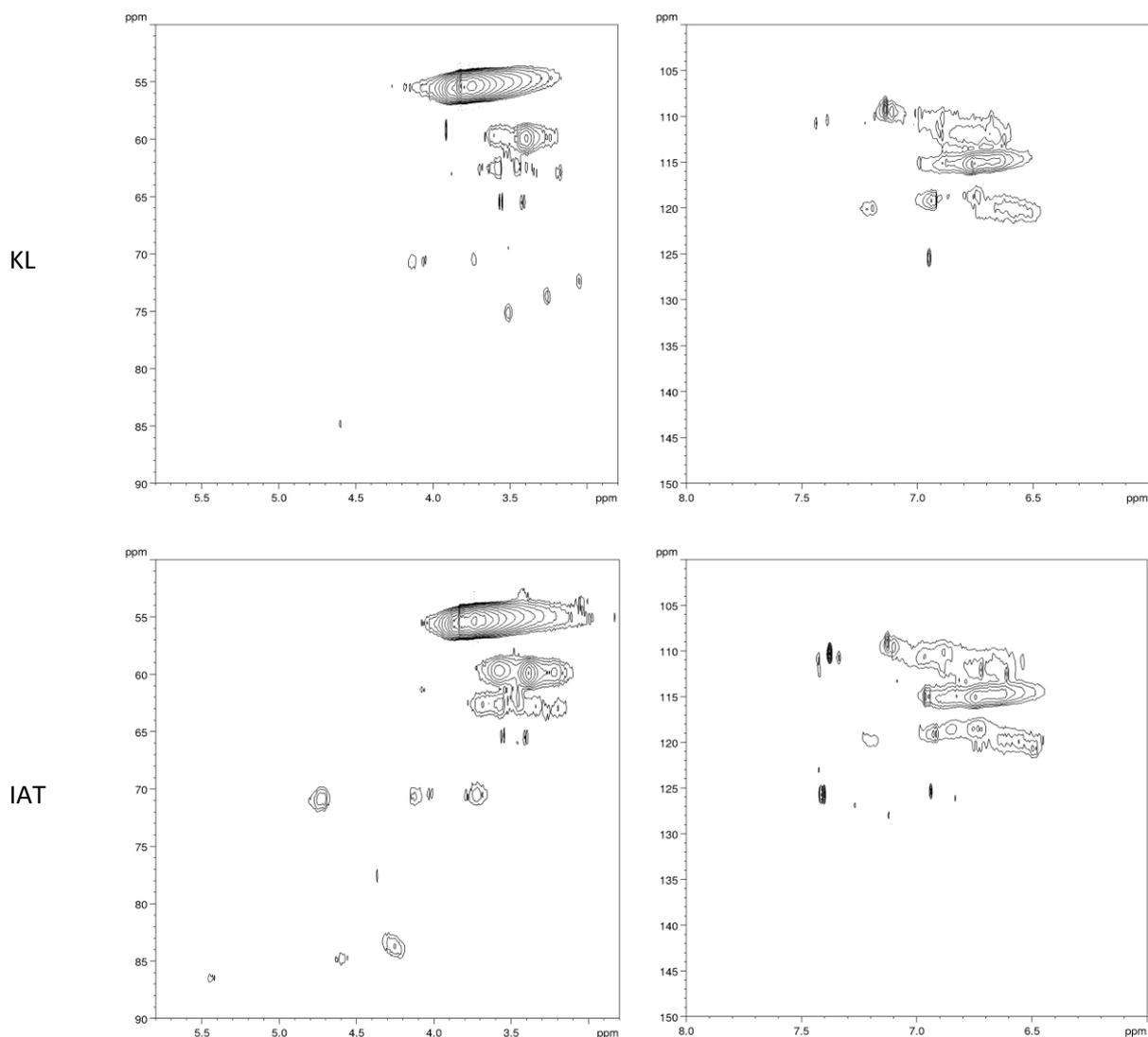


Abbildung A 7: HSQC NMR-Spektren der Lignine aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen sowie KL und IAT. Links: aliphatische Seitenkettenregion (δ_C/δ_H 50 – 90/2,8 – 5,8 ppm). Rechts: aromatische Region (δ_C/δ_H 100 – 150/6,0 – 8,0 ppm).

Tabelle A 8: Vergleich der TEAC- und TPC-Werte der Lignine aus Miscanthus nach variierenden Aufschlussprozessen und Vorbehandlungen als Mittelwert \pm Standardabweichung des dreifachen Organosolv-Aufschlusses, sowie KL und IAT. Verschiedene Buchstaben stehen für einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten innerhalb eines Assays (einfaktorielle ANOVA; $p < 0,05$; $n = 3$).

	TEAC _{DPPH}		TEAC _{ABTS}		TEAC _{FRAP}		TPC	
	[$\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ Lignin]							
ML2	0,26 \pm 0,02	(a)	0,78 \pm 0,04	(ab)	0,71 \pm 0,04	(b)	17,5 \pm 0,6	(b)
ML4	0,44 \pm 0,01	(c)	0,87 \pm 0,01	(c)	0,79 \pm 0,01	(c)	19,7 \pm 0,1	(c)
ML5	0,37 \pm 0,04	(b)	0,97 \pm 0,01	(d)	0,92 \pm 0,03	(d)	23,9 \pm 0,5	(d)
MA120	0,27 \pm 0,01	(a)	0,70 \pm 0,04	(a)	0,62 \pm 0,01	(a)	15,9 \pm 0,3	(a)
MA150	0,36 \pm 0,01	(b)	0,79 \pm 0,02	(b)	0,71 \pm 0,02	(b)	17,9 \pm 0,2	(b)
MA180	0,61 \pm 0,02	(d)	1,03 \pm 0,02	(d)	0,89 \pm 0,03	(d)	24,2 \pm 0,1	(d)
KL	0,44	(bc)	1,21	(e)	1,12	(e)	30,2	(e)
IAT	0,38	(bc)	1,42	(f)	1,21	(e)	33,8	(f)

Publikationsliste

Veröffentlichungen (*peer reviewed*) während der Promotion:

Bergrath, J.; **Rumpf, J.**; Burger, R.; Do, X. T.; Wirtz, M.; Schulze, M. Beyond Yield Optimization: The Impact of Organosolv Process Parameters on Lignin Structure. **2023**, *Macromol. Mater. Eng.*, 2300093. DOI: 10.1002/mame.202300093

Rumpf, J.; Burger, R.; Schulze, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **2023**, *Int. J. Biol. Macromol.*, 233, 123470. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123470.

Lindner, S.; Burger, R.; Rutledge, D. N.; Do, X. T.; **Rumpf, J.**; Diehl, B. W. K.; Schulze, M.; Monakhova, Y. B. Is the Calibration Transfer of Multivariate Calibration Models Between High- and Low-Field NMR Instruments Possible? A Case Study of Lignin Molecular Weight. **2022**, *Anal. Chem.*, 94 (9), 3997. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c05125.

Burger, R.; Lindner, S.; **Rumpf, J.**; Do, X. T.; Diehl, B. W.; Rehahn, M.; Monakhova, Y. B.; Schulze, M. Benchtop versus high field NMR: Comparable performance found for the molecular weight determination of lignin. **2022**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 212, 114649. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.114649.

Korte, I.; Kreyenschmidt, J.; Wensing, J.; Bröring, S.; Frase, J. N.; Pude, R.; Konow, C.; Havelt, T.; **Rumpf, J.**; Schmitz, M.; Schulze, M. Can Sustainable Packaging Help to Reduce Food Waste? A Status Quo Focusing Plant-Derived Polymers and Additives. **2021**, *Appl. Sci.* 11 (11), 5307. DOI: 10.3390/app11115307.

Burger, R.; **Rumpf, J.**; Do, X. T.; Monakhova, Y. B.; Diehl, B. W. K.; Rehahn, M.; Schulze, M. Is NMR Combined with Multivariate Regression Applicable for the Molecular Weight Determination of Randomly Cross-Linked Polymers Such as Lignin? **2021**, *ACS Omega* 6 (44), 29516. DOI: 10.1021/acsomega.1c03574.

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y. B.; Schulze, M. Extraction of High-Purity Lignins via Catalyst-free Organosolv Pulping from Low-Input Crops. **2020**, *Biomacromolecules* 21 (5), 1929. DOI: 10.1021/acs.biomac.0c00123.

Buchkapitel:

Alzagameem, A.; Bergrath, J.; **Rumpf, J.**; Schulze, M. (2022) Lignin and Lignin-Based Composites for Packaging Applications. In: *Micro And Nanolignin In Aqueous Dispersions And Polymers*. Herausgeber: Puglia, D., Santulli, C.; Sarasini, F. Elsevier, 131-172. ISBN: 978-0-12-823702-1.

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y.; Schulze, M. (2021) Types of lignin, properties, and structural characterization techniques. In: *Lignin-Based Materials for Biomedical Applications: Preparation, Characterization and Implementation*. Herausgeber: Santos, H. A.; Figueiredo, P. Elsevier, 105-158. ISBN: 978-0-12-820303-3.

Vorträge (*Redner):

Rumpf, J.*; Burger, R.; Do, X. T.; Pude, R.; Schulze, M.: Comparing the four spectrophotometric assays DPPH, ABTS, FRAP and Folin-Ciocalteu to evaluate the antioxidant capacity of a set of lignins. ACS Spring Meeting 2023. 26. – 30.03.2023, Indianapolis, US.

Rumpf, J.; Burger, R.*; Do, X. T.; Schulze, M.: Study of the Structure and Antioxidant Activity of Organosolv Lignins from Various Biomasses. EPF European Polymer Congress, 26.06 – 01.07.2022, Prag, CZ.

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Bergs, M.; Diehl, B. W. K; Monakhova, Y. B.; Pude, R.; Rehahn, M.; Schulze, M.*: Extraction of High-Purity Lignins via Catalyst-free Organosolv Pulping from Low-input Crops. ACS Spring Meeting 2021, 5. – 30.04.2021, Online.

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Bergs, M.; Monakhova, Y. B.; Diehl, B. W. K; Pude, R.; Rehahn, M.; Schulze, M.*: Lignins from Low-Input Crops: Biomass Origin Assignment via Chemometric Data Analysis. 15th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems (SDEWES), 01. – 05.09.2020, Online/ Köln, DE.

Rumpf, J.*; Armbruster, F.; Schulze, M.: The Potential of *Miscanthus* as Lignocellulose Feedstock for the Development of Novel Packaging Materials. 10. Internationale Tagung des MEG e.V., 29. – 31.10.2019, Franzensbad, CZ. Veröffentlicht in: *Bioökonomie – aber nicht ohne Miscanthus*. Herausgeber: Dr. Ralf Pude. CentMa GmbH, 46-53. ISBN: 978-3-927331-02-0.

Poster:

Rumpf, J.; Dreier, T.; Völkerling, G.; Pude, R.; Schulze, M.: Nachwachsende Rohstoffe zur Ligningewinnung und deren Einsatz in nachhaltigen Verpackungen. 11. Internationale Tagung des MEG e.V., 27. – 29.11.2022, Bettemburg, LU. Veröffentlicht in: *Circular sustainability contribution: Miscanthus and Perennial Energy Grasses*. Herausgeber: Dr. Ralf Pude. CentMa GmbH, 49-54. ISBN: 978-3-927331-04-4.

Rumpf, J.; Burger, R.; Do, X. T.; Kreyenschmidt, J.; Schulze, M.: Antioxidant Activity of Lignins from Renewable Resources. GDCh – Wissenschaftsforum Chemie, 29.08. – 01.09.2021, Online.

Rumpf, J.; Do, X. T.; Burger, R.; Monakhova, Y. B.; Diehl, B. W. K.; Streffer, F.; Schönicke, P.; Schulze, M.: Comparing Lignins from Various Pulping Procedures: Organosolv vs Kraft vs LX Process. 5th Green and Sustainable Chemistry Conference, 10. – 11.11.2020, Online.

Rumpf, J.; Armbruster, F.; Schulze, M. Lignins from Renewable Resources: Structural Characterization and Antioxidant Activities. GDCh – Wissenschaftsforum Chemie, 15. – 18.09.2019, Aachen, DE.

Rumpf, J.; Klein, S. E.; Kraska, T.; Pude, R.; Witzleben, S.; Schulze, M.: Folin-Ciocalteu-Assay for the Determination of the Antioxidant Activity of Kraft and Organosolv Lignin. GDCh-Jahrestagung der Fachgruppe „Nachhaltige Chemie“, 17. – 19.09.2018, Aachen, DE.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen zu bedanken, die mich während meiner Promotion und der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst kann ich nicht genug betonen, wie dankbar ich für die konstante persönliche und wissenschaftliche Betreuung durch Frau Prof. Dr. Margit Schulze bin, die immer zur Stelle war, um mich in jeder Situation zu unterstützen. Vielen Dank für die Möglichkeit, in deiner Arbeitsgruppe arbeiten und forschen zu dürfen, die vielen produktiven und wenn nötig auch ermutigenden Gespräche, die jederzeit sehr wertschätzende Zusammenarbeit und natürlich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Ebenso möchte ich Prof. Dr. Ralf Pude meinen aufrichtigen Dank für sein Engagement und die Unterstützung während der letzten Jahre sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Steffen Witzleben für die gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere für den Zugang zum Labor und den verschiedenen Analysengeräten in Rheinbach. Danke an die Spectral Service AG, insbesondere an Prof. Dr. Bernd Diehl und Prof. Dr. Yulia Monakhova, für die Ermöglichung der NMR-Messungen, sowie dem Wood K Plus, insbesondere Prof. Dr. Birgit Kamm und Dr. Franz Zeppetbauer für die NREL- und HS-GC-MS-Analysen. Den Mitarbeitern des INRES der Universität Bonn, insbesondere Georg Völkering, Jan Niklas Frase und Lüders Moll, möchte ich für die Bereitstellung der Biomassen und die gute Zusammenarbeit danken. Ebenso bedanke ich mich bei der LXP Group für die Bereitstellung der Biomasseproben und die Durchführung der NREL-Messungen. Daneben geht ein weiterer Dank an Prof. Dr. Judith Kreyenschmidt, Prof. Dr. Michaela Schmitz, Imke Korte und Thomas Havelts für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meine Kollegen an der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg: an Katharina Walbrück, Markus Witzler, René Burger, Xuan Tung Do, Jonas Bergrath, Dominik Büchner, Philipp Gillemot und Roman Grimmig, für das produktive und tolle Arbeitsklima, den guten fachlichen Austausch und wertvolle Diskussionen, aber auch für die vielen guten Momente abseits des Arbeitsalltags. Danke auch an Friederike Armbruster und Laura Berger, die mich im Rahmen ihrer Masterprojekte bei den Organosolv-Aufschlüssen unterstützt haben.

Ich bin außerdem sehr dankbar, dass meine Forschung von einer Reihe verschiedener Institutionen unterstützt wurde, unter anderem von der Europäischen Union über den Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE.NRW), vom BMBF im Rahmen des Programms FHprof-Unt, dem Graduierteninstitut der H-BRS vertreten durch Prof. Dr. Rainer Herpers und Dr. Rita Cornely, der Gleichstellungsstelle der H-BRS in Person von Annegret Schnell und Dr. Barbara Hillen, dem TREE Institut sowie dem Promotionskolleg NRW.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden, ganz besonders bei Lara, Sarah, Annika, Chantal und Api bedanken, und natürlich bei Jan Luca und meinen Eltern: vielen Dank für eure immerwährende Unterstützung in den letzten Jahren, sei es in Form von aufmunternden Worten, offenen Ohren oder Ablenkung, wann immer nötig. Danke, dass ihr mir immer den Rücken freigehalten und auch in schwierigen Phasen an mich geglaubt habt.