

Stefanie Redik

Modification of Kraft Lignin
-
Kraft-Lignin Modifizierungen

MASTER THESIS

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Diplom-Ingenieurin

der Studienrichtung Technische Chemie
erreicht an der

Technischen Universität Graz



unter der Betreuung von
Ing. PhD. Gregorova Adriana
Institut für Chemische Technologie von Materialien
Technische Universität Graz

Graz, August 2012

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

.....

(Unterschrift)

Danksagung

Ich möchte Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Franz Stelzer und meiner Betreuerin Ing. PhD. Gregorova Adriana für die Korrektur und die Unterstützung während meiner Arbeit danken.

Weiters bedanke ich mich bei der Firma Zellstoff Pöls AG, die ihre Schwarzlauge für diese Diplomarbeit zur Verfügung gestellt hat und der OeAD-GmbH Austrian Agency for International Cooperation in Education and Research, die mir einen Aufenthalt in Zlin, Tschechien ermöglicht hat.

Für die finanzielle Unterstützung durch das Förderstipendium der Technischen Universität Graz bedanke ich mich recht herzlich.

Außerdem danke ich Josefine Hobisch, die die thermogravimetrischen Messungen und die Gelpermeationschromatographie für mich durchgeführt hat und Dr. Petra Kaschnitz, die mich bei den NMR-Messungen tatkräftig unterstützt hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Ing. PhD. Sedlarik und Ing. Pavel Kucharczyk von der Bata Universität in Zlin (Tschechien), sowie, Prof. Dr. Gübitz, Dr. Gibson Nyanhongo und DI Barbara Thallinger (Umweltbiotechnologie, TU Graz) für die gute Zusammenarbeit.

Bei allen Kollegen und Kolleginnen am Institut bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank geht aber vor allem an meine BürokollegInnen, Katrin, Julia und Hanno, die mir meine Arbeitszeit gehörig erleichtert haben, sowie Nicole, auf die ich immer zählen konnte und meinen Freund Michael, der mir in allen Lebenslagen zur Seite gestanden hat.

Ein großes Dankeschön gebührt meiner Familie und meinen engen Freunden. Sie haben mich schon mein ganzes Leben lang unterstützt und mir in jeglichen Situationen weiter geholfen.

Kurzfassung

Kraft-Lignin ist ein technisches Lignin welches durch saure Präzipitation aus Schwarzlauge gewonnen wird. Aufgrund der überwiegenden Verwendung von Schwarzlauge als Energielieferant der Zellstoffindustrie, sind die Anwendungen von Kraft-Lignin begrenzt. In der Natur tritt Lignin als komplexes phenolisches Polymer mit stabilisierender und schützender Wirkung auf. Damit besitzt Kraft-Lignin das Potential als Füllstoff für Kautschuk, als Stabilisator für Kunststoffe, als Additiv in Phenol-basierenden Harzen oder als Material zur Herstellung von Kohlenstofffasern zu dienen. Das Ziel dieser Diplomarbeit bestand darin, die antioxidativen und antibakteriellen Eigenschaften von Kraft-Lignin, isoliert aus einer Schwarzlauge, welche vor allem aus Nadelholz gewonnen wurde, zu untersuchen. Das dabei auftretende Problem ist, dass jegliche Isolierung von Lignin zu einer signifikanten Veränderung der resultierenden Struktur und damit auch zu einer Veränderung der Eigenschaften des Lignins führt. Das isolierte Kraft-Lignin wurde durch Methylierung, Reduktion und Acetylierung modifiziert. Mit Hilfe der Elementaranalyse (C, H, N, S) und der Protonen-NMR-Spektroskopie wurde die chemische Zusammensetzung der Ligninpräparate analysiert. Darüber hinaus wurden das Molekulargewicht mittels Gelpermeationschromatographie und die thermische Stabilität mittels thermogravimetrischer Analyse bestimmt. Unmodifiziertes Kraft-Lignin zeigte keine antibakterielle Aktivität, jedoch wies dieses eine hohe antioxidative Wirksamkeit auf. Die besten antibakteriellen Eigenschaften zeigte das Ligninpräparat nach der Reduktion mit anschließender Acetylierung. Das reduzierte / acetylierte Kraft-Lignin besitzt antibakterielle Wirkung gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien.

Schlüsselwörter: Kraft-Lignin, Antioxidative Eigenschaften, Antibakterielle Eigenschaften

Abstract

Kraft lignin is an industrial lignin derived by the acid precipitation of spent black liquors. Its usability is limited due to the predominant usage of the spent black liquor as an energy source for the pulp mill. In nature, lignin occurs as a complex phenolic polymer with the stabilizing and protective effect. Kraft lignin as a raw material has the potential for the utilization as a filler for rubber, a stabilizer for plastic materials, and an additive to phenol-based resins, or a material for manufacturing of carbon fibres. The aim of the present diploma work was to investigate potential antioxidant and antibacterial properties of Kraft lignin isolated from the spent black liquor derived mainly from softwood. The problem is that any isolation of lignin has a significant effect on its resulting structure and its properties. The isolated Kraft lignin was modified by methylation, reduction, and acetylation. The composition of lignin samples was determined by elemental analysis (C, H, N, S) and proton magnetic resonance. Moreover, its molecular weight properties were determined by gel permeation chromatography and thermal stability by thermogravimetric analysis. The non-modified Kraft lignin showed no antibacterial activity but on the other side the high antioxidant effectiveness. It was found that the most effective modification from the view point of the antibacterial activity was the combination of reduction and acetylation. The reduced/acetylated Kraft lignin possessed antibacterial effectiveness against both gram-positive and gram-negative bacteria.

Keywords: Kraft-Lignin, antioxidative properties, antibacterial properties

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung Lignin	8
1.1. Allgemeine Grundlagen.....	8
1.1.1. Historische Entwicklung.....	8
1.1.2. Genetischer Ursprung.....	8
1.1.3. Struktur.....	9
1.1.4. Eigenschaften.....	12
1.1.5. Isolierung - Aufschlussverfahren.....	13
1.1.6. Typen von Lignin	17
1.1.7. Papier- und Zellstoffindustrie	17
1.1.8. Schwarzlauge	18
1.1.9. Verwendung von Lignin	19
1.2. Lignin als Antioxidans.....	20
1.2.1. Antioxidantien in Polymeren.....	20
1.2.2. Die antioxidative Wirkung von Lignin	21
1.3. Lignin mit antibakteriellen Eigenschaften.....	23
2. Zielsetzung	24
3. Experimenteller Teil	25
3.1. Materialien	25
3.2. Methoden	27
3.2.1. Extraktion von Lignin aus der Schwarzlauge.....	27
3.2.2. Modifizierungen.....	27
3.2.3. Lösungsmittlextraktion	29
3.2.4. Enzymatische Modifizierung von Kraft-Lignin mit Laccase	29
3.2.5. Charakterisierung.....	30
4. Ergebnisse und Diskussion	39
4.1. Charakterisierung der Schwarzlauge BL-ZP (Black liquor Zellstoff Pöls).....	39
4.1.1. Chemische und physikalische Charakterisierung	39

4.1.2. Spektroskopische Charakterisierung.....	39
4.1.3. Klason Lignin- und Aschegehalt.....	45
4.1.4. Resümee	45
4.2. Charakterisierung der Ligninpräparate der Reihe L2	45
4.2.1. Molekulargewichtsbestimmung	45
4.2.2. Physikalische Charakterisierung	48
4.2.3. Spektroskopische Charakterisierung.....	51
4.2.4. Zusammensetzung der L2-Ligninpräparate.....	63
4.2.5. Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften.....	65
4.2.6. Charakterisierung der antibakteriellen Eigenschaften.....	68
4.2.7. Resümee	70
4.3. Modifizierung der molekularen Eigenschaften von Kraft-Lignin und Kombination mit Modifizierungen	71
4.3.1. Lösungsmittlextraktion	71
4.3.1.1. Charakterisierung der extrahierten Ligninpräparate.....	75
4.3.2. Enzymatische Modifizierung von Kraft-Lignin mit Laccase	75
4.3.2.1. Charakterisierung der enzymatische modifizierten Ligninpräparate.....	75
4.3.3. Kombination der Modifizierungen.....	77
4.3.3.1. Charakterisierung des Ligninpräparates L2red_acet_MeOH	75
4.3.4. Resümee	91
5. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	93
Publikationsliste von Stefanie Redik	94
Abkürzungen	94
Abbildungsverzeichnis	95
Tabellenverzeichnis	97
Literaturverzeichnis	99

1. Einführung Lignin

1.1. Allgemeine Grundlagen

1.1.1. Historische Entwicklung

Forschungen auf dem Gebiet Lignin werden schon Jahrhunderte lang betrieben. 1838 beschreibt Anselme Payen in Frankreich das verkrustende Material, das die Cellulose in der Zellwand des Holzes umgibt. Dieses verkrustende Material wird später als Lignin, welches sich von dem lateinischen Wort „lignum“ für Holz ableitet, bezeichnet (1). Beinahe zwanzig Jahre später, im Jahr 1857 publiziert Franz Ferdinand Schulze, Chemiker an der Universität Greifswald „Beiträge zur Kenntnis des Lignins“. Diese Arbeit stellt den Beginn zu weiteren Forschungen am Thema Lignin dar. Schulze beschreibt in seiner Publikation die Isolierung von Cellulose aus Holz. Er behandelte Holz mit Salpetersäure und Kaliumchlorat. Den gelösten Teil bezeichnet er als Lignin (2).

Erste Anwendung findet Lignin in der Produktion von Vanillin. 1874 synthetisieren die deutschen Chemiker W. Haarmann und F. Tiemann Vanillin aus dem Cambialsaft von Nadelhölzern. Ein Jahr später, 1875 startet die industrielle Produktion von Vanillin. Die Firma Haarmann und Reimer verwendet dabei die Substanz Coniferin, welche aus dem Saft der Nadelhölzer isoliert wird, als Precursor (4). In der Produktion wird Coniferin zu Glucovanillin oxidiert und weiter zu Vanillin und Glucose aufgespalten (3). Vor allem die Parfum- und Schokoladenindustrie sind damals an der Produktion von Vanillin interessiert (4).

1.1.2. Genetischer Ursprung

Lignocellulose wird das Material bezeichnet, welches die Zellwand von verholzten Pflanzen bildet. Sie besteht aus den polymeren Kohlenhydraten Cellulose und Hemicellulose sowie aus Lignin, einem komplexen phenolischen Polymer. Die Phenylpropan-Einheit von Lignin ist mit den Kohlenhydraten der Pflanze über Ether Bindungen verknüpft (2). Es gibt keine exakte Zusammensetzung der Lignocellulose, sie ist je nach Pflanzenart verschieden. Laubholz besteht aus 30-43% Cellulose, 19-30% Hemicellulose und 20-25% Lignin (Buche: 25% Lignin, Pappel: 23% Lignin, Erle: 26% Lignin) und unterscheidet sich damit von Nadelholz, welches aus 40-48% Cellulose, 19-25% Hemicellulose und 26-31% Lignin zusammengesetzt wird (Fichte: 29% Lignin). Stroh wiederum besteht aus 38-40% Cellulose, 20-30% Hemicellulose und 6-20% Lignin (5).

Lignin in der pflanzlichen Zellwand, in seiner ursprünglichen Form wird als Protolignin bezeichnet (1).

Neben den Hauptbestandteilen Cellulose, Hemicellulose und Lignin befinden sich im Holz noch Harze, Wachse, Terpene, Phenole, Gerbstoffe, Chinone, Farbstoffe, Fette, Zucker, Eiweiß und Mineralstoffe (6). Die Aufgabenbereiche der Hauptbestandteile sind dabei klar verteilt. Cellulose und Hemicellulose formen die Zellwand und dienen als Gerüstsubstanz der Zellwand. Lignin ist die Kittsubstanz, die die lignocellulosischen Fasern zusammenhält und für die Steifigkeit und Druckfestigkeit, sowie die Wasserundurchlässigkeit des Materials sorgt. Zusätzlich schützt Lignin die Pflanze vor Bakterien und Mikroorganismen (5).

Die Biosphäre enthält $3 \cdot 10^{11}$ Tonnen Lignin und wächst jährlich um $2 \cdot 10^{10}$ Tonnen (7). In Österreich wachsen pro Jahr 31 Millionen Festmeter Holz. Nur 2 Drittel des jährlichen Zuwachses werden genutzt, dabei erhöht sich die Waldfläche um 2000 Hektar pro Jahr. Das entspricht einem Festmeter pro Sekunde (6).

1.1.3. Struktur

Die Phenylpropan-Einheit bildet das Grundgerüst der Struktur von Lignin. Diese Baueinheiten sind über C-O-C und C-C Bindungen verknüpft und es ergibt sich daraus eine dreidimensional-vernetzte Polymerstruktur. Ein paar wenige Prozent der Gerüststruktur-Einheiten stellen keine Phenylpropaneinheiten dar: Ihre Seitenkette fehlt oder ist kürzer, oder die Einheit wird durch eine Chinoid-Gruppe ersetzt (8).

Im Gegensatz zu anderen Biopolymeren ist Lignin ein Netzwerkpolymer, welches aus der radikalischen, wasserstoffabspaltenden Polymerisation von Monolignolen gebildet wird. Es existieren drei verschiedene Monolignole: Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol (Siehe Abbildung 1). Das Wachstum kann als oxidative Kupplung zwischen einem Phenoxyradikal eines Monolignols und eines Radikals, entstanden aus dem phenolischen Zentrum des Polymers, gesehen werden. Die Polymerisation folgt dabei keinem bestimmten Schema (5).

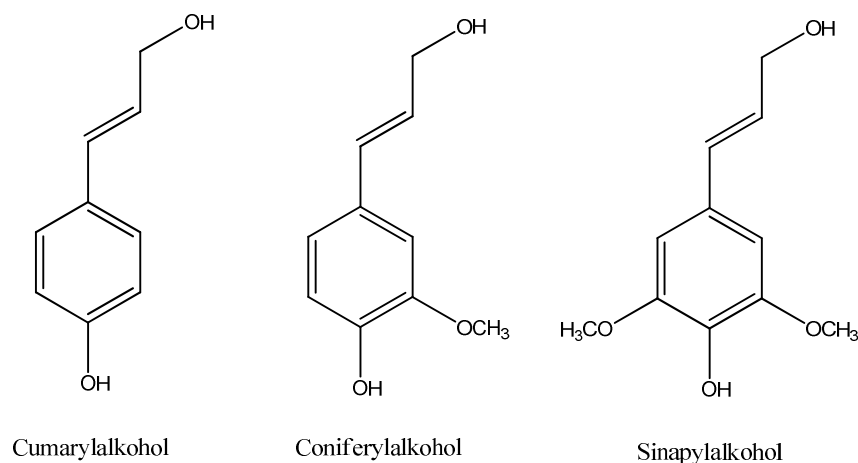


Abbildung 1: Monolignole

Je nach genetischem Ursprung setzt sich Lignin aus unterschiedlichen Gehalten der Monolignole zusammen (Siehe Tabelle 1) (9).

Tabelle 1: Monolignolgehalt verschiedener Lignine

Lignin	Cumaryleinheiten	Coniferyleinheiten	Sinapyleinheiten
Nadelholzlignin	14%	80%	6%
Laubholzlignin	4%	53%	43%
Gräserholzlignin	30%	50%	20%

Aus den drei Monolignolen ergeben sich die Lignin-Baueinheiten para-Hydroxyphenylpropan (p-H), gebildet aus Cumarylalkohol, Guaiacyl (G), gebildet aus Coniferylalkohol und Syringyl (S), gebildet aus Sinapylalkohol (Siehe Abbildung 2) (10). Wobei das Verhältnis der Lignin-Baueinheiten in jeder Pflanze unterschiedlich ist. In Einjahrespflanzen treten die Einheiten in gleichen Mengenverhältnissen auf (1:1:1), Lignin, welches aus Fichtenholz isoliert wird zeigt ein Verhältnis von Guaiacyl zu Syringyl von 2:1 (11).

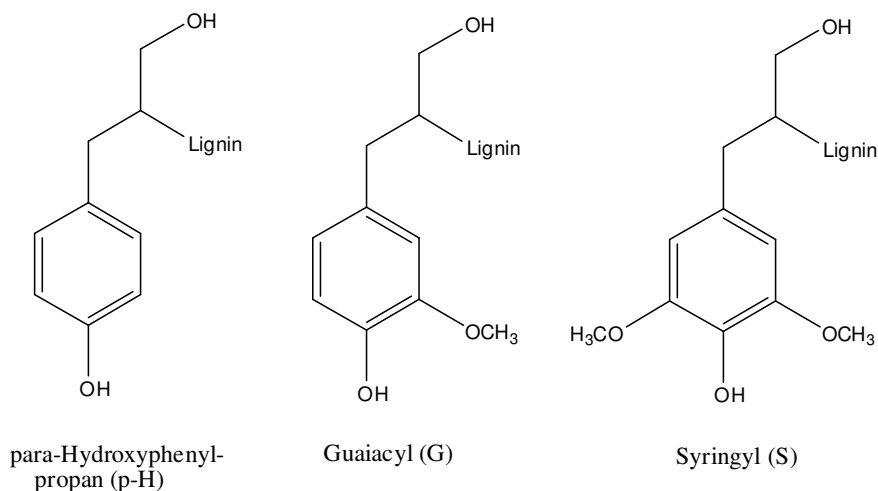


Abbildung 2: Lignin-Baueinheiten

Die Monomere des Lignins können auf unterschiedliche Art und Weise miteinander verbunden sein. Daraus ergeben sich folgende Verknüpfungen:

β -O-4-Verknüpfung, β - β -Verknüpfung, β -5-Verknüpfung, β -1-Verknüpfung, 5-5-Verknüpfung, 5-O-4-Verknüpfung (Siehe Abbildung 3). Die β -O-4-Verknüpfung ist die am häufigsten auftretende Verknüpfungsart (40-60%) (12).

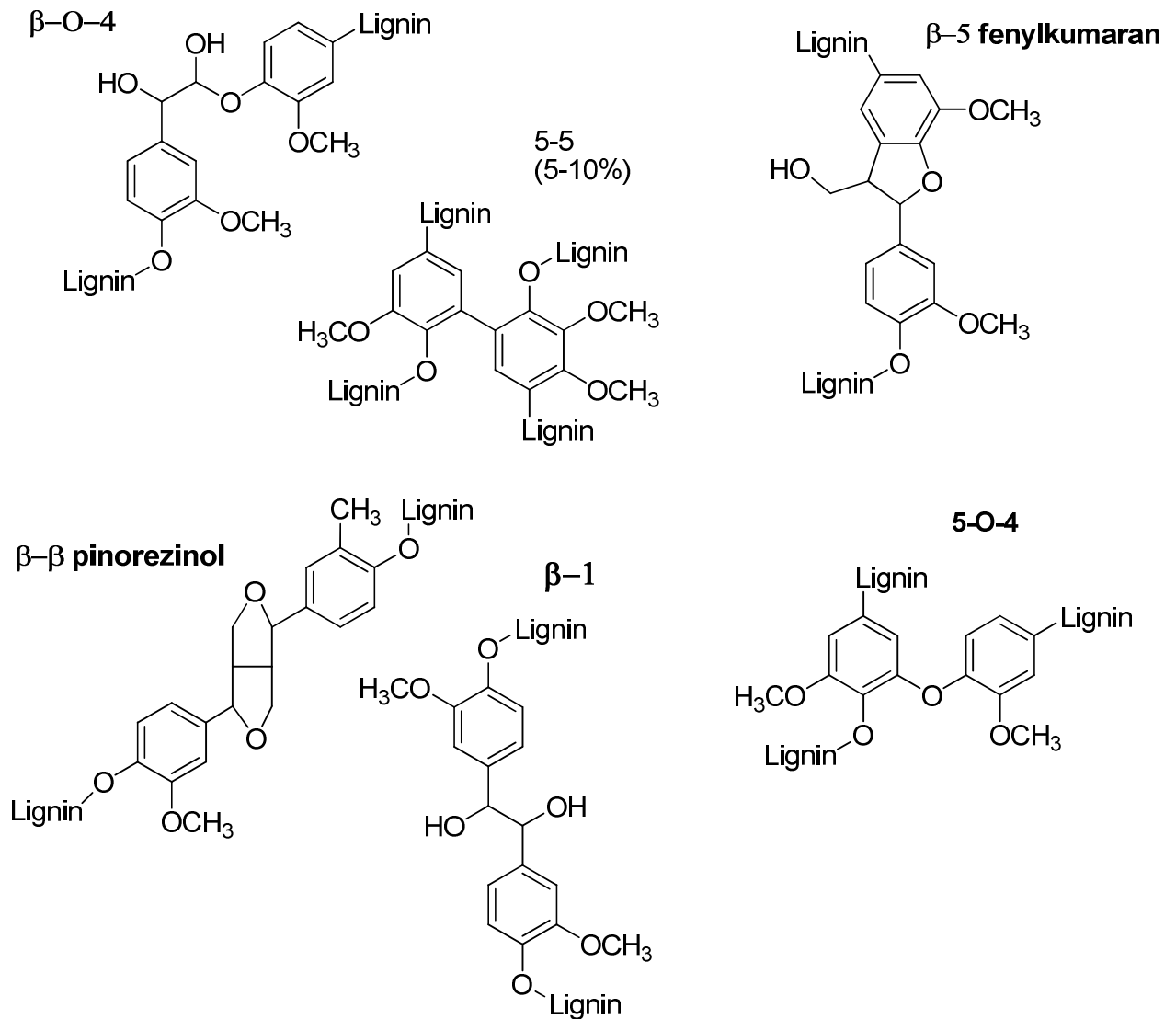


Abbildung 3: Lignin Verknüpfungen

Aufgrund der etlichen Faktoren, die die Struktur von Lignin beeinflussen, lässt sich für Lignin keine exakte Struktur ermitteln. Die 1977 von Adler publizierte Lignin Struktur aus Fichtenholz ist die gebräuchlichste Struktur und stellt ein grobes Schema der strukturellen Merkmale des Materials dar (13).

Wie aus dem Strukturvorschlag von Adler hervorgeht, weist Lignin eine große Vielfalt an funktionellen Gruppen auf. Lignin enthält Hydroxyl-Gruppen (phenolisch und alkoholisch), Methoxyl-Gruppen, Carbonyl- und Carboxyl-Gruppen (14).

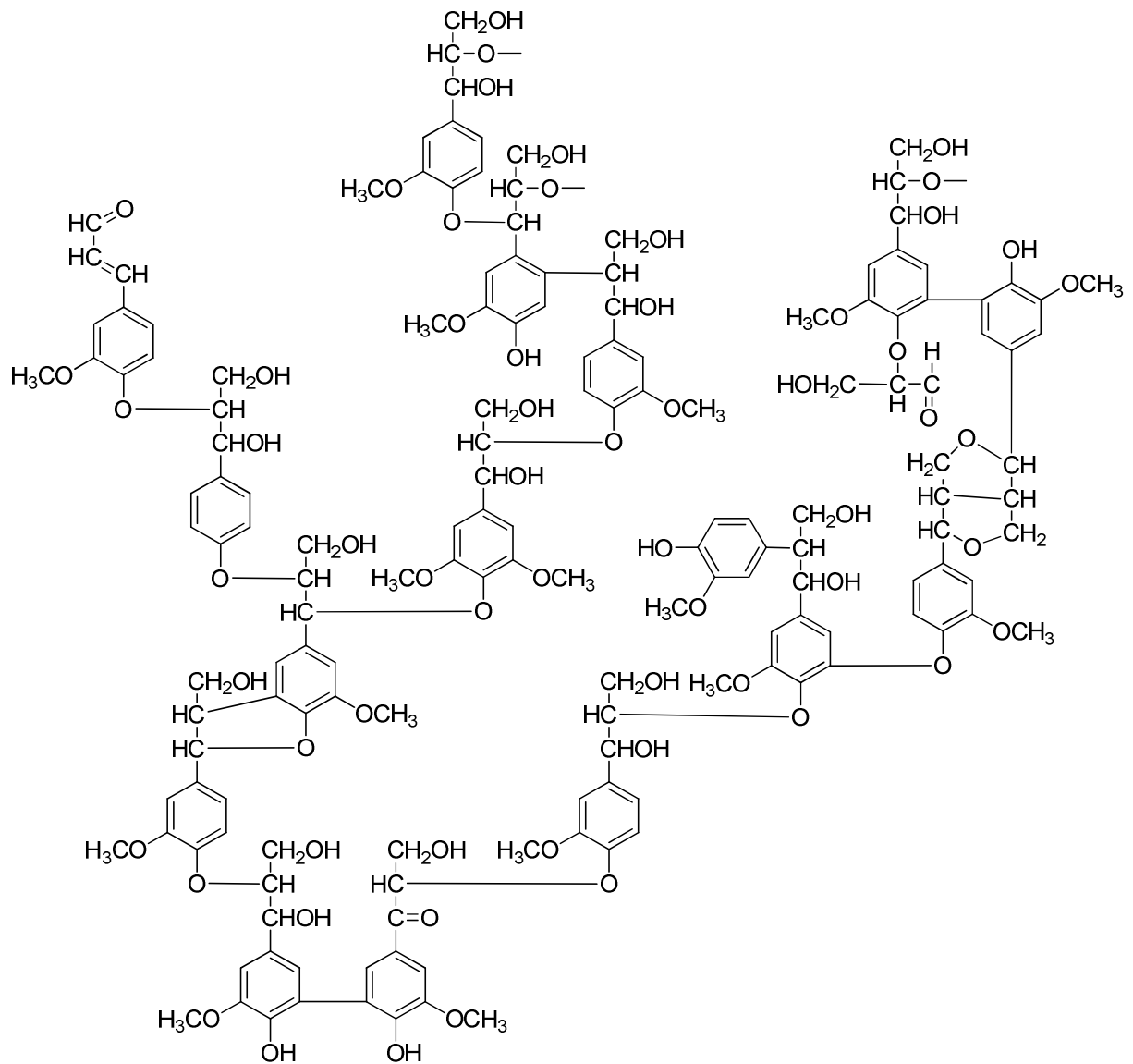


Abbildung 4: Ligninstruktur von Adler (13)

Die Struktur des Lignins hat großen Einfluss auf das Molekulargewicht. Dieses steigt mit dem Grad der Verknüpfungen, die das aromatische Grundgerüst (Skeleton) verbinden (15) (16) (10).

1.1.4. Eigenschaften

Wie schon die chemische Struktur von Lignin, sind auch seine Eigenschaften abhängig von einigen Faktoren (17):

- genetischer Ursprung
- natürliche Wachstumsbedingungen
- Alter der Pflanze
- Isolierungsmethode

Protolignin wird in der Literatur als amorphe, farblose Substanz (18) mit thermoplastischen Eigenschaften beschrieben. Sein Molekulargewicht ist bis heute nicht bekannt (19).

Aus dem Holzrohstoff isoliertes Lignin ist ein braun- bis creme-färbiges, amorphes Pulver (20). Das Molekulargewicht hängt von der Isolierungsmethode ab und liegt zwischen 2000 und 150000 g/mol (siehe Kapitel 1.1.5., Tabelle 3) (5). Es ist meist unlöslich in Wasser, den meisten organischen Lösungsmitteln und konzentrierter Schwefelsäure. Dagegen löst es sich in heißen alkalischen Lösungen. Zersetzung des Lignins erfolgt durch Chlor und durch verschiedene Enzyme. Es existiert kein exakter Schmelzpunkt, die Glasübergangstemperatur von Lignin liegt zwischen 135°C und 230°C (21).

1.1.5. Isolierung - Aufschlussverfahren

In diesem Kapitel wird auf den chemischen Aufschluss von Holz eingegangen, daneben existieren auch der mechanischen und der thermischen Aufschluss und deren Kombinationen.

Beim Aufschluss von Holz werden Bindungen im hölzernen Material gebrochen. Das natürliche Ligninpolymer spaltet sich dabei in lösliche Polymerfragmente auf (22). Die Aufschlussverfahren können mit Hilfe von Säure, Base, organischen oder wässrigen Lösungen durchgeführt werden. Parameter, wie z.B. Zeit und Temperatur werden je nach Methode unterschiedlich gewählt und modifiziert (11). Die Temperatur beeinflusst die Bindekraft von Lignin, welche mit steigender Temperatur sinkt. Die Erweichungstemperatur des Lignins ist je nach Holzart individuell und ist stark von der Feuchtigkeit des Holzes abhängig. Sie kann durch Sulfonierung des Holzes (Zugabe von Na_2SO_3) herabgesetzt werden (22).

Chemische Aufschlussmethoden von Lignocellulose können folgend eingeteilt werden (5).

1. Prozesse mit Lignin als Rückstand
 - a.) Dampf/Druck Prozess (Autohydrolyse)
 - b.) Hydrolyse mit schwachen Säuren
 - c.) Hydrolyse mit konzentrierten Säuren oder wasserfreien Säuren

2. Prozesse mit Cellulose und Hemicellulose als Rückstand

a.) Alkalischer Aufschluss oder Sodaverfahren

Dieses ist das älteste unter den chemischen Aufschlussverfahren. 1854 wird in England die erste Zellstoff Manufaktur, betrieben mit dem Sodaverfahren, eröffnet. Die Delignifizierung erfolgt beim alkalischen Aufschluss durch Erhitzen des Holzrohstoffes in einer Natronlauge.

b.) Sulfatverfahren

Dieses Verfahren entwickelte sich aus dem Sodaverfahren. Carl S. Dahl setzt 1879 der Natronlauge zusätzlich Natriumsulfat zu, welches sich unter den alkalischen Bedingungen zu Natriumsulfid umsetzt. In den 1930er Jahren wird diese Art des Aufschlusses populär, da jegliches Holz, welches für das Sulfitverfahren ungeeignet ist, verwendet werden kann. Heute ist es das gängigste Verfahren weltweit.

Der Name Sulfatverfahren leitet sich von der Make-up-Chemikalie dieses Prozesses, dem Natriumsulfat, ab. Die aktiven Substanzen sind allerdings Natronlauge und das aus der Make-up-Chemikalie gebildete Natriumsulfid (siehe Abbildung 5).

Während die Hackschnitzel in der Lauge gekocht werden, kommt es zum Bruch der Ligninmoleküle zu kleineren Fragmenten. Die Natriumsalze dieser Ligninfragmente sind im basischen Milieu (pH~14) löslich. Während des Kochprozesses lösen sich allerdings nicht nur 80% des Lignins, auch 50% der Hemicellulose und 10% der Cellulose gehen dabei in Lösung.

Dieses Verfahren produziert starkes Papier und kann alle Holzarten und auch Einjahrespflanzen als Ausgangssubstanzen verwerten. Ein weiterer Vorteil ist das effektive Chemikalienrückgewinnungsverfahren, welches während des Prozesses zur Anwendung kommt:

Nach der Abtrennung der Cellulosefasern fällt als Nebenprodukt des Prozesses Schwarzlauge an. Diese enthält gelöste Ligninprodukte. Sie wird unter Zugabe des Salzkuchens (Natriumsulfat) eingedampft und verbrannt. Natriumcarbonat und Natriumsulfid werden rückgewonnen und löslich gemacht. Die erhaltene Grünlauge wird mit Calciumoxid versetzt, um aus Natriumcarbonat Natronlauge zu generieren (dabei entsteht Calciumcarbonat). Damit wird Weißlauge erhalten, die wieder in den Kochprozess gelangt (22).

Nachteilig an diesem Verfahren sind der niedrige Weißgrad des hergestellten Papiers und der damit verbundene höhere Bleichaufwand. Weiters ist aufgrund des unangenehmen Geruches, der während des Prozesses gebildet wird eine Geruchentsorgungsanlagen erforderlich.

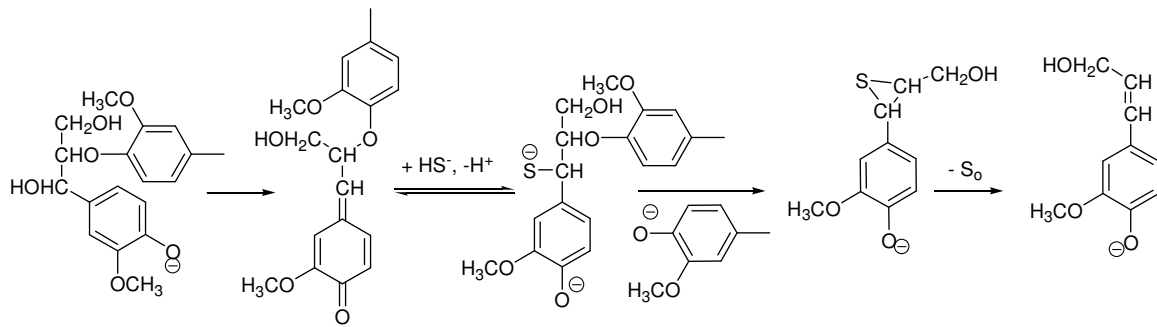


Abbildung 5: chemische Reaktionen beim Sulfatverfahren (23)

c.) Sulfitverfahren

1857 entwickelte ein Chemiker namens Tilghman aus Philadelphia das Verfahren. 1874 folgte in Schweden die erste kommerzielle Zellstofffabrik die das Sulfitverfahren einsetzte.

Bis 1950 ist es das weltweit wichtigste Verfahren zur Produktion von Zellstoff. Erst mit der Entwicklung bzw. der Verbesserung der Bleichtechnologie erlangte der Sulfatprozess größere Bedeutung. Heute wird das Sulfitverfahren nur in 2-3% der weltweiten Zellstoffproduktion angewandt.

Der Name Sulfitverfahren bezieht sich auf das Aufschlussion (HSO_3^- ; SO_3^{2-}) des Prozesses. Heute gibt es unterschiedliche Verfahren mit verschiedenen Basen (Mg, Ca, Na, ...). Die Delignifizierung erfolgt bei einem pH-Wert von ca. 5. Lignin wird dabei als Salz der Ligninsulfonsäure entfernt.

Der Nachteil dieser Methode liegt in der Chemikalienrückgewinnung, welche bei diesem Verfahren nicht angewandt werden kann. Die Kochlauge wird lediglich verdampft und zur Energieerzeugung genutzt. Die danach verbleibende Asche wird nicht weiterverarbeitet.

d.) Organosolvverfahren

Die Holzrohstoffe werden bei diesen Verfahren in einem Lösungsmittel gekocht.

Dabei treten je nach Methode verschiedene Lösungsmittel in Einsatz:

- *Alcellprozess*: Ethanol als Lösungsmittel (24)
- *Acetosolvprozess*: Essigsäure als Lösungsmittel
- *Formacellprozess*: Ameisensäure als Lösungsmittel
- *Organocellprozess*: Methanol als Lösungsmittel

e.) Phenolverfahren

f.) Extraktion mit H_2O – Hydrothermalverfahren (Druck, hohe Temperatur)

In Tabelle 2 sind die zwei häufigsten Aufschlussverfahren Sulfat- und Sulfiterverfahren kurz zusammengefasst.

Tabelle 2: Gegenüberstellung des Sulfat- und des Sulfiterverfahrens

Parameter	Sulfatverfahren	Sulfiterverfahren
Verwendete Chemikalien	NaOH Na ₂ S	H ₂ SO ₄ M(HSO ₃) M = Ca, Mg, Na, NH ₄
Kochzeit	2-4 Stunden	4-20 Stunden
pH-Wert der Lösung	13+	1-2
Kochtemperatur	170-180 °C	120-135 °C

Gemäß den angeführten Aufschlussverfahren werden unterschiedliche Ligninprodukte isoliert. Das Sulfiterverfahren produziert Lignosulfonate, Kraft-Lignin wird durch das Sulfatverfahren erhalten (25).

Die Isolierungsmethode hat großen Einfluss auf das resultierende Ligninprodukt. Jede Isolierungsmethode verändert die Struktur des Lignins. Bis heute gelang es nicht Lignin mit dem Erhalt seiner ursprünglichen Struktur, als so genanntes Protolignin, zu isolieren. In Tabelle 3 sind einige Eigenschaften von Ligninen aus unterschiedlichen Isolierungs-Verfahren gegenübergestellt (5).

Tabelle 3: Ligninprodukte aus verschiedenen Aufschlussverfahren (5)

Eigenschaft	Nadelholz Kraft-Lignin	Nadelholz Lignosulfonat	Stroh Soda-Lignin
Kohlenstoff [%]	66	53	56
Wasserstoff [%]	5,9	5,4	7,5
Methoxy [%]	14	12,5	-
Asche [%]	3	2,5	<2,5
Schwefel [%]	1,6	6-7,9	-
Wasserlöslichkeit	niedrig	sehr hoch	sehr niedrig
Mn [g/mol]	2000	400-150000	2300-2900

1.1.6. Typen von Lignin

Jede Art der Isolierung verändert das dadurch erhaltene Lignin. Lignin im Holzrohstoff, in seiner natürlichen Form, wird als Protolignin bezeichnet (1). Bis heute ist es nicht gelungen diese Struktur während der Isolierung zu erhalten. Daraus ergeben sich unterschiedliche Typen von Lignin. Der Name bezieht sich dabei oft auf die entsprechende Vorbehandlung. Generell unterscheidet man zwei Gruppen:

- Technisches Lignin

Das sind Ligninprodukte, die als Nebenprodukte bei einer industriellen Produktion anfallen. Dazu zählen unter anderem Lignosulfonate aus dem Sulfidverfahren, Kraft-Lignin aus dem Sulfatverfahren, Soda-Lignin aus dem alkalischen Aufschluss und Organosolv-Lignin aus den Organosolvverfahren.

- Natives Lignin

Natives Lignin hat keinen Bezug zu industriellen Prozessen. Es wird mit Hilfe unterschiedlicher Methoden aus seinem natürlichen Ursprung isoliert. Eines der ältesten Arten von Lignin ist "Klason" oder "Säureunlösliches" Lignin. Der Holzrohstoff wird mit Alkohol-Benzol extrahiert und anschließend mit Schwefelsäure behandelt. Der daraus resultierende Rückstand wird als Klason Lignin bezeichnet. Andere, später entwickelte Lignin Typen sind Willstätter Lignin, Purves Lignin und Freudenberg oder Cuproxam Lignin. Die Isolierung dieser Lignin Typen geht schon wie beim Klason Lignin darauf zurück, nicht-Lignin-Komponenten zu entfernen. Weitere Lignin Typen werden erhalten, indem Lignin von den nicht-Lignin-Komponenten entfernt wird. Dazu zählen Brauns Lignin und Björkman oder "milled wood" Lignin. Björkman Lignin ist dem Ursprungs-Lignin, Protolignin, am ähnlichsten (26).

1.1.7. Papier- und Zellstoffindustrie

Die Papier- und Zellstoffindustrie sowie die Biotreibstoffraffinerien sind weltweit die größten Produzenten von technischem Lignin (11). Pro Jahr werden ca. 50 Millionen Tonnen Lignin als Nebenprodukt in der Papier- und Zellstoffindustrie produziert (27).

Ziel bei der Papierherstellung ist es, Lignin möglichst vollständig zu entfernen, während Hemicellulose und Cellulose bestehen bleiben sollen. Oft werden aber auch Hemicellulose und Cellulose während des Prozesses angegriffen und abgebaut und damit liegt die durchschnittliche Ausbeute der Papierherstellung nur zwischen 40 und 50%. Vergleicht man

im Gegensatz dazu den mechanischen Aufschluss von Holz, weist dieser eine deutlich höhere Ausbeute von 90-95% auf (22).

Das anfallende Lignin wird hauptsächlich als Brennstoff und Energielieferant verwendet, um Dampf und Energie zu produzieren (28). Nur 2 Massenprozent davon werden auf andere Weise weiterverwendet (29).

1.1.8. Schwarzlauge

Schwarzlauge fällt als Hauptnebenprodukt bei der Herstellung von Papier an. Sie wird hauptsächlich zur Energieproduktion verwendet (30).

Die chemische Zusammensetzung der Schwarzlauge hängt von den verwendeten Rohstoffen als auch von den Prozessbedingungen ab. Allgemein kann Schwarzlauge aber als komplexe wässrige Lösung mit organischen Komponenten der Pflanzen, wie Lignin, Polysaccharide etc. und anorganischen Komponenten wie lösliche Salze beschrieben werden (31). Abbildung 6 zeigt die Struktur der Schwarzlauge, hauptsächlich bestehend aus Wasser, Lignin, Polysaccharid-Clustern und Salzionen.

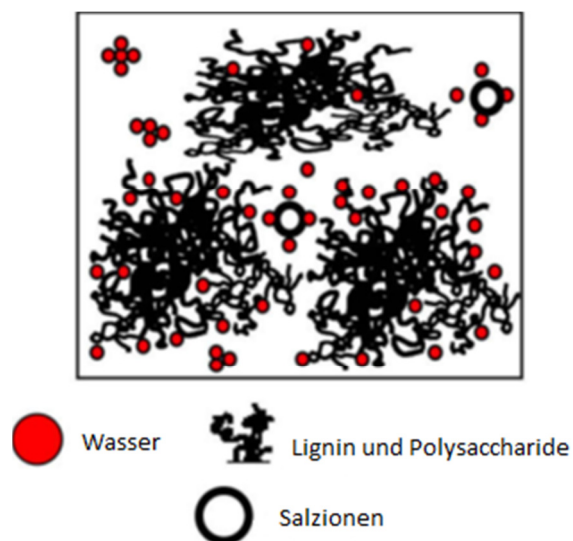


Abbildung 6: vereinfachtes Schema der Struktur von Schwarzlauge (32)

1.1.9. Verwendung von Lignin

Die Verwendung von Lignin kann in folgende Gruppen eingeteilt werden (5):

1. Verwendung in Polymeren

Lignin kann als Haftmittel für Holz oder als Verstärker, Kleber und Antioxidans in der Gummiindustrie eingesetzt werden (33) (34) (35) (36) (37) (38). Als Beton-Additiv verbessert Lignin die Niedertemperaturzähigkeit und -resistenz.

2. Verwendung als Polymerkomponente

Lignin kommt als Co-Reaktant für Polymere und Harze zum Einsatz (5). Aufgrund der ähnlichen Struktur (polyphenolische Ringe verbunden durch kurze aliphatische Ketten) wird es z.B. als Ersatz von Phenol-Formaldehyd Harzen verwendet (39).

3. Fraktionierung in niedermolekulare Substanzen

Die aromatische Struktur des Lignins stellt ein großes Potential dar, aromatische Substanzen sowie andere Chemikalien daraus herzustellen. Kommerziell allerdings werden derzeit nur einige wenige niedermolekulare Chemikalien aus Lignin generiert. Aus Lignosulfonaten von Nadelholz kann Vanillin dargestellt werden. Die Produktion von Dimethylsulfoxid (5), Chinone, Aldehyde und aliphatische Säuren kann aus dem Ausgangsprodukt Lignin erfolgen (40). Weiters können Tenside aus Lignin hergestellt werden.

4. Vollständiger Abbau zu Gas, Öl und Kohle durch Pyrolyse (5)

Lignin, mit seiner aromatischen Struktur, besitzt damit das Potential erdölbasierende Rohstoffe als Quelle für verschiedene phenolische Produkte, wie z.B.: Harze, Tenside, zu ersetzen (41) (42). Als natürliches Produkt ist es zudem relativ immun gegenüber dem steigenden Energiepreis. Zusätzliche Eigenschaften, wie zum Teil antioxidative Aktivität und biologische Abbaubarkeit sprechen für die Verwendung von ligninhaltigen Produkten. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen, physikalischen und strukturellen Eigenschaften der verschiedenen Lignin Typen, muss der Verwendungszweck bei jedem Lignin individuell gewählt werden. Dabei spielen der genetische Ursprung und die Vorgeschichte des Lignins eine große Rolle. Als Beispiel werden die Einsatzgebiete von Lignosulfonate aus dem Sulfitverfahren und Kraft-Lignin aus dem Sulfatverfahren gegenübergestellt (Tabelle 4) (5).

Tabelle 4: Verwendungszwecke Lignosulfonate und Kraft-Lignin (5)

Lignosulfonate	Kraft-Lignin
Futterpellettbinder, Futtermittelzusatz	Gummi Verstärker
Straßenentstauber	Ruß Ersatz
Tenside, Disperser (wasserlöslich über den gesamten pH Bereich) (43)	Rohmaterial für die Produktion von Methylsulfonaten
	Phenolharz Komponente

1.2. Lignin als Antioxidans

1.2.1. Antioxidantien in Polymeren

Antioxidantien sind Substanzen, welche die Oxidation durch die Atmosphäre und die daraus resultierenden Abbaureaktionen in Polymeren, Gleitmittel, Nahrungsmittel und Tierfutter-Additive verhindern.

Polymere Materialien bestehen aus langkettigen Makromolekülen. Diese Ketten können durch Hitze, ionische Strahlung, mechanische Belastung und chemische Reaktionen brechen und freie Radikale erzeugen. Durch Sauerstoffzufuhr werden diese Radikale zu Peroxy-Radikalen umgewandelt, welche zu Kettenreaktionen führen, die das Polymer abbauen. Um diese Oxidation zu verhindern werden Antioxidantien in polymere Materialien eingebracht (5). Um als Antioxidans in Polymeren zum Einsatz zu kommen, müssen einige Kriterien erfüllt werden: gute Löslichkeit im Polymer, Mobilität, geringe Flüchtigkeit, die Fähigkeit zu stabilisieren (44) (45), relativ niedriges Molekulargewicht und eine enge Molekulargewichtsverteilung (46) (47).

Ausgehend von den unterschiedlichen Abbaureaktionen werden Antioxidantien in verschiedene Gruppen eingeteilt. Dazu gehören freie Radikalfänger, Hydroperoxid-Zersetzer, Antiozonisierungsmittel, Fotoantioxidantien, Fotostabilisatoren und Hitzestabilisatoren. Viele Zersetzungsreaktionen laufen über einen radikalischen Mechanismus ab, deswegen liegt besonderes Interesse in Substanzen, welche dazu in der Lage sind, freie Radikale einzufangen (48) (49). Diese freien Radikalfänger werden als Primäre Antioxidantien bezeichnet. Dazu zählen die Substanzklassen der Phenole und der sekundären Arylamine.

Da Lignin eine phenolische Grundstruktur besitzt, nimmt man eine antioxidative Aktivität an. Derzeit werden in der Industrie hauptsächlich Butylhydroxytoluol (BHT), Butylhydroxyanisol

(BHA), Propylgallat (PG), natürliche Tocopherole und polymere Phenole eingesetzt. Diese Substanzen haben einen relativ hohen Preis und viele von ihnen basieren auf Erdöl. Lignin, als natürliches, relativ billiges Biopolymer besitzt das Potential zur Substitution der derzeit gängigen Antioxidantien (36) (45) (50) (51) (52). Mögliche Anwendungsgebiete antioxidativ wirkender Ligninprodukte liegen in der Gummiindustrie, der Schmierstoffindustrie und in der Verwendung als Futtermittelzusatz (5) (35) (37) (45).

1.2.2. Die antioxidative Wirkung von Lignin

Catignani et al. erforschen schon im Jahr 1982 die antioxidative Aktivität von Kraft-Lignin anhand der Oxidation von Maiskeimöl. Dabei stellt sich heraus, dass Kraft-Lignin dieselbe antioxidative Fähigkeit wie Vitamin E besitzt (53). Mehr als zwanzig Jahre später zeigt die Forschungsgruppe von Dizhbite, dass die radikalfangende Aktivität der Methanol-löslichen Fraktion von Kraft-Lignin 4,5-fach höher ist, als die des reinen Kraft-Lignins (47). Im selben Jahr weist ebenfalls die Forschungsgruppe Dizhbite et al. die antioxidative Wirkung von Soda-Lignin nach (54).

Essentiell für die antioxidative Wirkung von Lignin sind seine freien phenolischen Hydroxylgruppen (47) (55) (56).

Abbildung 7 zeigt den radikalfangenden und –stabilisierenden Mechanismus von Lignin. Die antioxidative Wirkung einer phenolischen Substanz basiert nicht nur auf der Eigenschaft Phenoxy-Radikale zu bilden, sondern auch darin, diese zu stabilisieren. Phenolische Strukturen mit Substituenten, welche die Fähigkeit besitzen die Phenoxy-Radikale zu stabilisieren, zeigen höhere antioxidative Aktivität als phenolische Strukturen ohne Substituenten. Methoxylgruppen, welche zu den elektronenschiebenden Substituenten zählen, in der ortho-Position, stabilisieren das Phenoxy-Radikal durch Resonanz, konjugierte Doppelbindungen erzeugen einen Stabilisierungseffekt durch Delokalisierung. Konjugierte Carbonylgruppen erzeugen einen negativen Effekt auf die antioxidative Aktivität einer phenolischen Substanz (55).

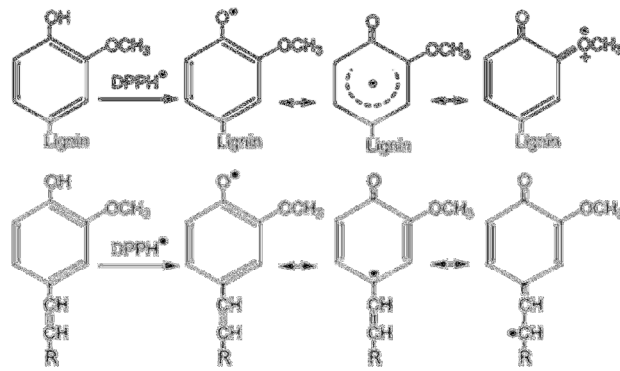


Abbildung 7: radikalfangen und -stabilisieren von Lignin (55)

Niedermolekulare Lignine mit einer engen Molekulargewichtsverteilung besitzen eine höhere antioxidative Aktivität als Lignine mit einem höheren Molekulargewicht (47) (52). Erniedrigung des Molekulargewichtes geht einher mit einer Spaltung von Etherbindungen und führt damit zu neuen phenolischen Hydroxylgruppen, welche für die antioxidative Aktivität maßgeblich verantwortlich sind. Da die Konzentration an phenolischen Hydroxylgruppen in niedermolekularen Ligninen höher ist als in höhermolekularen Ligninen, weisen diese höhere antioxidative Wirkung auf (57).

Wie Dizhbite et al. zeigen spielt die Reinheit des Lignins ebenfalls eine Rolle in ihrer antioxidativen Aktivität. Die Anwesenheit von nicht-Ligninkomponenten wie Hemicellulose kann die radikalfangende Eigenschaft von Lignin drastisch verringern, da Kohlenhydrate Wasserstoffbrückenbindungen zu phenolischen Hydroxylgruppen ausbilden können. Diese sind dadurch nicht mehr in der Lage, Radikale zu bilden und zu stabilisieren (47).

Damit hängt die antioxidative Aktivität von Lignin von verschiedenen Faktoren ab, welche maßgeblich von der Isolierungsmethode beeinflusst werden. Mit anderen Worten bestimmt die Art der Isolierung die antioxidativen Fähigkeiten des gewonnenen Lignins. Laut einer Studie von Pan et al. steigert eine Isolierungsmethode mit hoher Protonenkonzentration den Gehalt an phenolischen Hydroxylgruppen und damit auch die antioxidative Wirkung (57). Eine portugiesische Studie aus dem Jahr 2010 zeigt für Kraft-Lignin präzipitiert mit Salzsäure bei verschiedenen pH-Werten (1, 2, 4, 6, 12) jedoch ein gegenteiliges Ergebnis. Den höchsten Gehalt an phenolischen Hydroxylgruppen und damit die größte antioxidative Aktivität weist Kraft-Lignin präzipitiert bei einem pH-Wert von 6 auf (58).

Es befinden sich bereits antioxidative Produkte basierend auf Lignin am Markt. Caromax™ zum Beispiel ist ein Nahrungsergänzungsmittel, gewonnen aus dem Holz vom

Johannisbrotbaum. Aufgrund seines hohen Gehaltes an Lignin und Polyphenolen wird angenommen, dass es Cholesterolsenkende Wirkung und antioxidative Aktivität im menschlichen Körper zeigt (36).

1.3. Lignin mit antibakteriellen Eigenschaften

Mit der Entdeckung der Hemmwirkung einer Schimmelpilzkolonie (*Penicillium notatum*) gegenüber Staphylokokken durch den britischen Bakteriologen Alexander Fleming, wird im Jahr 1929 der Beginn der Geschichte der Antibiotika geschrieben (59). Penicillin ist der erste natürlich vorkommender antimikrobielle Wirkstoff. In den darauffolgenden Jahren entwickelt sich das Gebiet der antibakteriellen Wirkstoffe zu einem gefragten Forschungsbereich, etliche antibakterielle Substanzen werden entdeckt und verschiedene Varianten diese Substanzklassen einzuteilen werden vorgeschlagen (60).

Schon 1989 gibt es erste Forschungsergebnisse über die antibakteriellen Eigenschaften von Lignin. Lignin, isoliert aus Schwarzlaug von Bagasse nach dem Soda- und dem Sulfatverfahren wird auf seine antibakterielle Wirkung gegen drei Bakterienstämme getestet. Es zeigt sich, dass Lignin gegen den gramnegativen Bakterienstamm *Escherichia coli* keine, jedoch gegen die grampositiven Bakterienstämme *Bacillus subtilis* und *Bacillus mycoides* antibakterielle Wirkung aufweist (61). Ligninproben isoliert aus Laub- und Nadelholz zeigen in einer späteren Studie 1994 antibakterielle Eigenschaften gegen verschiedene Hefen (62). 2004 publizieren Dizhbite et al. ihre Untersuchungsergebnisse über die antibakteriellen Eigenschaften von Kraft-Lignin. Die Methanol-lösliche Fraktion des Kraft-Lignins erweist sich als Inhibitor gegen phytopathogene Bakterien (47). 2011 befasst sich die Forschungsgruppe von Xin Donga et al. mit Lignin, isoliert aus Resten der Ethanolproduktion für Biotreibstoff aus Maispflanzen. Die pflanzlichen Überreste werden mit alkalischen Lösungen bei unterschiedlichen Temperaturen und unterschiedlichen Zeiten extrahiert. Das dadurch isolierte Lignin zeigt antibakterielle Eigenschaften gegenüber den grampositiven Bakterienstämmen (*Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*) und gegenüber Hefe (*Candida lipolytica*). Gegenüber gramnegativen Bakterienstämmen (*Escherichia coli* und *Salmonella Enteritidis*) jedoch, bestätigt sich das Ergebnis von Nada et al. 1989, Lignin weist keine antibakterielle Wirkung auf (17).

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll das Nebenprodukt Schwarzlauge von der Firma Zellstoff Pöls AG aus dem Sulfatverfahren charakterisiert werden. Die strukturellen Eigenschaften sollen mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden (ATR-IR-Spektroskopie, ¹H-NMR-Spektroskopie) analysiert werden. Aus der Schwarzlauge soll des Weiteren Kraft-Lignin isoliert werden. Das isolierte Kraft-Lignin soll durch verschiedene Reaktionen (Acetylierung, Methylierung und Reduktion mit anschließender Acetylierung) modifiziert werden, das heißt funktionelle Gruppen sollen in das Kraft-Lignin eingebracht werden. Von Kraft-Lignin als auch von den modifizierten Kraft-Ligninpräparaten soll eine Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften durchgeführt werden. Für die Testung sollen ein grampositiver und ein gramnegativer Bakterienstamm ausgewählt werden. Die molekularen Eigenschaften von Kraft-Lignin sollen modifiziert werden. Es sollen zum einen eine Lösungsmittelextraktion und zum anderen eine enzymatische Modifizierung durchgeführt werden, mit Hilfe derer die molekularen Eigenschaften verändert werden können. Das Ziel ist eine Auswahl der vielversprechendsten Modifizierungen oder deren Kombination zu treffen, um die antibakteriellen und molekularen Eigenschaften von Kraft-Lignin isoliert aus Schwarzlauge zu verbessern.

3. Experimenteller Teil

3.1. Materialien

Alle in dieser Diplomarbeit verwendeten kommerziellen Chemikalien sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Chemikalienliste mit Eigenschaften

Chemikalie	Firma	CAS Nummer	Molekulargewicht [g/mol]	Dichte [g/cm ³]
Aceton	Sigma-Aldrich	67-64-1	58,08	0,791
Bernsteinsäure ≥99,0%	Sigma-Aldrich	110-15-6	118,09	1,55
Acetylchlorid	Fluka Analytical	75-36-5	78,50	1,104
Chloroform	Sigma-Aldrich	67-66-3	119,38	1,47
Dichlormethan	Sigma-Aldrich	75-09-2	84,93	1,33
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	67-68-5	78,13	1,1
DMSO D6 +0,03%TMS V/V	Euriso-top	2206-27-1	-	-
DPPH 90%	Fluka	1898-66-4	394,32	1,4
1,4-Dioxan	Roth	123-91-1	88,11	1,03
Epichlorhydrin	Sigma-Aldrich	106-89-8	92,53	1,18
Ethanol	AustrAlco	64-17-5	46,07	0,79
Essigsäureanhydrid	Fluka Analytic	108-24-7	102,09	1,081
Essigsäureethylester	Sigma-Aldrich	141-78-6	88,11	0,90
1-Hydroxybenzotriazol	Sigma-Aldrich	2592-95-2	135,13	1
Irganox 1010	Ciba Specialty Chemicals	6683-19-8	1178	1,15
Kaliumhydroxid	Roth	1310-58-3	56,11	2,04
Kaliumdiphosphat	Sigma-Aldrich	7320-34-5	330,35	2,534
Laccase von <i>Trametes villosa</i> (Produkt Nummer: NS 51002)	Novozyme	-	-	-
Methanol	Sigma-Aldrich	67-56-1	32,04	0,791
2-Methoxyethanol ≥99 %	Fluka	109-86-4	76,10	0,965
Natriumhydroxid	Roth	1310-73-2	40,01	2,13

Pyridin	Sigma-Aldrich	110-86-1	79,10	0,978
Salzsäure 37%	Sigma-Aldrich	7647-01-0	36,46	1,19
Schwefelsäure 98%	Roth	7664-93-9	98,08	1,84
Trimethylaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich	593-81-7	95,6	-
Tetrahydrofuran	Roth	109-99-9	72,11	0,388
Pepton aus Fleisch	Roth	-	-	-
Fleischextrakt	Roth	-	-	-
Agar-Agar	Roth	-	-	-
Nutrient broth	Cadersky-Envitech	-	-	-
Escherichia Coli	Züchtung von Umweltbiotechnologie TU Graz	-	-	-
Staphylococcus Aureus	Züchtung von Umweltbiotechnologie TU Graz	-	-	-

Schwarzlauge der Firma Zellstoff Pöls AG

Die verwendete Schwarzlauge in dieser Diplomarbeit wird von der Firma Zellstoff Pöls AG bezogen. Beim Sulfatverfahren der Zellstoff Pöls AG wird ein kontinuierlicher Kocher mit Hackschnitzel aus 70% Fichte, 25% Kiefer und 5% Lärche, die fast ausschließlich aus der näheren Umgebung der Firma stammen, befüllt. Rund 60 % dieses Holzes stammt aus der Durchforstung. Diese Holzstücke werden mit Dampf auf 120°C vorerhitzt und anschließend in einer stark alkalischen Lauge, welcher Natriumsulfid zugegeben wird, bei 160°C bis 170°C unter einem Druck von 8 bis 9 bar gekocht. Die Cellulosefasern werden vom Lignin durch Abbau mit Hilfe der gebildeten Hydrogensulfid-Ionen getrennt und fallen dabei aus, Lignin, Hemicellulose und Harze allerdings werden aufgelöst und ausgewaschen. Diese Flüssigkeit wird Schwarzlauge genannt. Die Schwarzlauge wird durch Verdampfen von ca. 15% auf ca. 70-75% Feststoffgehalt aufkonzentriert (6).

Die chemischen sowie physikalischen Eigenschaften der Schwarzlauge werden im Kapitel 4.1. Charakterisierung der Schwarzlauge BL-ZP (Black liquor Zellstoff Pöls) beschrieben.

3.2. Methoden

3.2.1. Extraktion von Lignin aus der Schwarzlauge

Durch Fällung mit Säure (98% H₂SO₄) wird aus der Schwarzlauge Kraft-Lignin (L2) erhalten. Die Isolierung erfolgt bei einem pH-Wert von 2 (63). Das isolierte Lignin wird mit destilliertem Wasser gewaschen bis der pH-Wert neutral ist. Anschließend wird das erhaltene Material gefriergetrocknet und 24 Stunden in einem Vakuumofen bei 40 °C getrocknet.

3.2.2. Modifizierungen

Die folgenden Modifizierungen werden durch beispielhafte Reaktionsgleichungen dargestellt.

Acetylierung

5g Kraft-Lignin L2 wird durch Acetylierung modifiziert (Abbildung 8).

Kraft-Lignin wird in Essigsäureanhydrid/Pyridin (7:1) bei Raumtemperatur gelöst. Nach 10 Stunden wird die Lösung in Wasser (500mL) ausgefällt und 24 Stunden gerührt. Das Präzipitat wird abfiltriert und mit destilliertem Wasser nachgewaschen bis der pH-Wert neutral ist. Anschließend wird das erhaltene Material gefriergetrocknet und 24 Stunden in einem Vakuumofen bei 40 °C getrocknet. Die so erhaltene Probe wird mit L2acet bezeichnet. Die Ausbeute an Produkt beträgt 91,2%.

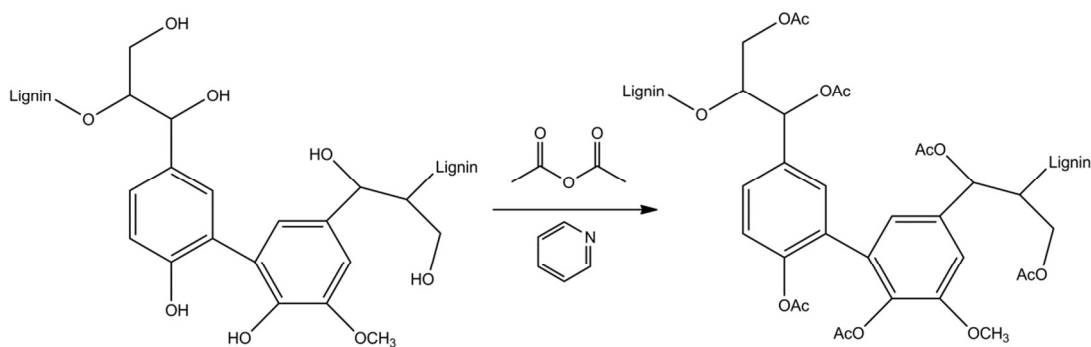


Abbildung 8: Acetylierung von Lignin

Methylierung

5g Kraft-Lignin L2 wird durch Methylierung modifiziert (Abbildung 9).

Zu der Kraft-Lignin Lösung (L2 in Dimethylsulfoxid/Wasser (10:1)) werden bei 40 °C Dimethylsulfat (10mL) und Kaliumhydroxid (11,3mL, 33,6% KOH in Wasser) zugegeben. Nach der Zugabe wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Durch Ausfällen der Lösung

in Wasser und Ansäuerung mit Essigsäureanhydrid auf einen pH-Wert von 5-6 wird ein brauner Niederschlag erhalten. Das Präzipitat wird abfiltriert und mit destilliertem Wasser nachgewaschen bis der pH-Wert neutral ist. Anschließend wird das erhaltene Material gefriergetrocknet und 24 Stunden in einem Vakuumofen bei 40°C getrocknet. Die so erhaltene Probe wird mit L2met bezeichnet. Die Ausbeute an Produkt beträgt 67,7%.

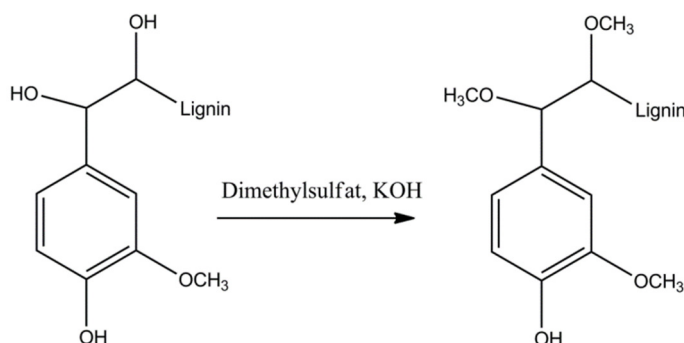


Abbildung 9: Methylierung von Lignin

Reduktion-Acetylierung

5g Kraft-Lignin L2 wird durch Reduktion-Acetylierung modifiziert (Abbildung 10).

Zu der Kraft-Lignin Lösung (L2 in Dioxan/Wasser (2:1)) wird bei Raumtemperatur langsam Natriumborhydrid (1,6g) zugegeben. Nach der Zugabe wird 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch Ausfällen der Lösung in Wasser (300mL) und Essigsäureanhydrid (100mL) wird ein brauner Niederschlag erhalten. Das Präzipitat wird abfiltriert und mit destilliertem Wasser nachgewaschen bis der pH-Wert neutral ist. Anschließend wird das erhaltene Material gefriergetrocknet und 24 Stunden in einem Vakuumofen bei 40°C getrocknet. Die so erhaltene Probe wird mit L2red_acet bezeichnet. Die Ausbeute an Produkt beträgt 77,9%.

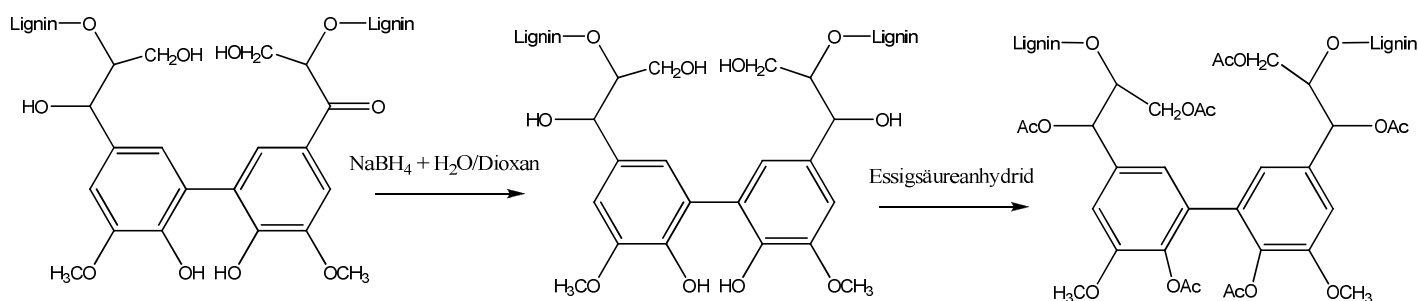


Abbildung 10: Reduktion-Acetylierung von Lignin

3.2.3. Lösungsmittlextraktion

Kraft-Lignin L2 wird in verschiedenen Lösungsmitteln (Aceton, Dichlormethan, Dioxan, Methanol und Tetrahydrofuran) extrahiert (65).

1g Kraft-Lignin L2 wird in Lösungsmittel (10mL) eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Ungelöstes Material wird von der Lösung abgetrennt. Der lösliche Anteil der Probe wird nach Verdampfen des Lösungsmittels gefriergetrocknet. Schließlich werden die Proben 24 Stunden in einem Vakuumofen bei 40°C getrocknet. Die so erhaltenen Proben werden mit Probenbezeichnung_LM bezeichnet. Alle extrahierten Probenbezeichnungen sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: extrahierte Ligninproben L2

Probenbezeichnung	Extraktions-Lösungsmittel
L2_Aceton	Aceton
L2_DCM	Dichlormethan
L2_Dioxan	Dioxan
L2_MeOH	Methanol
L2_THF	Tetrahydrofuran

3.2.4. Enzymatische Modifizierung von Kraft-Lignin mit Laccase

Kraft-Lignin L2 wird mit dem Enzym Laccase modifiziert (Abbildung 11). Es werden vier Modifizierungen hergestellt, die sich voneinander in der Zeit, in der Laccase in der Probe aktiv ist, unterscheiden (Tabelle 7). Außerdem wird eine Blank Probe L2_B (Bufferlösung + Mediatorlösung + Probe) hergestellt.

Tabelle 7: enzymatisch modifizierte L2 Proben tabelliert nach Reaktionszeit mit Laccase

Probe	Reaktionszeit mit Laccase [min]
L2_1	0
L2_2	30
L2_3	60
L2_4	90

Herstellung der Lösungen mit Kraft-Lignin L2 (1g), 50mM Bufferlösung (50mL, 0,30g Bernsteinsäure in 50mL Wasser, mit Natronlauge auf pH 4,5 eingestellt), 50mM Mediatorlösung (1mL, 1-Hydroxybenzotriazolein Ethanol) und Laccase (50µL). Die hergestellten Lösungen werden bei 37°C und 80rpm unterschiedliche Zeit (siehe Tabelle 7) inkubiert. Nach der Inkubation werden die Probenlösungen 10 Minuten im Wasserbad gekocht um das Enzym zu deaktivieren.

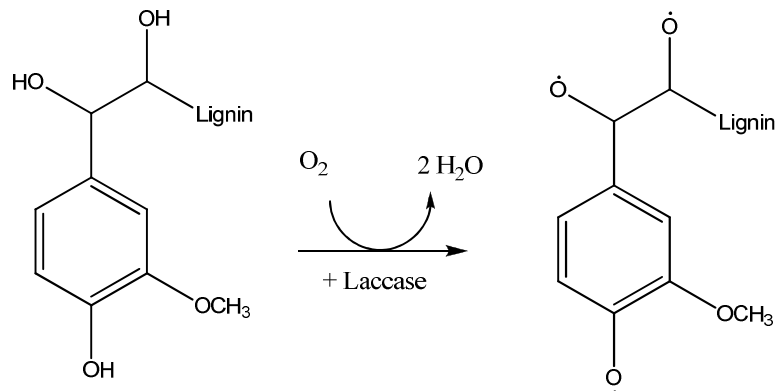


Abbildung 11: Reaktion von Laccase mit Lignin (66)

3.2.5. Charakterisierung

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Molekulargewichtsmittel M_n (Zahlenmittel) und M_w (Massenmittel) sowie der PDI (Polydispersitätsindex) der Proben werden mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC) ermittelt. Die GPC Analyse wird mit folgenden Parametern und Geräten durchgeführt:

Als Laufmittel wird THF mit einer Flussrate von 1mL/min verwendet. Es treten ein ERC 3315a Entgaser und eine L6000A Pumpe von Merck-Hitachi in Einsatz. Die Auftrennung der Probe erfolgt durch folgende Säulen: Vorsäule von PSS (Polymer Standards Service) 5µm, 8x 50mm und 3 Trennsäulen von PSS, SDV 5µm, 8x 300mm (je 1x 10⁶ Angström, je 1x 10⁴ Angström und je 1x 10³ Angström) Ein Differential Refraktometer sowie ein Viskosimeter von Viscotek dienen als Detektorsystem.

4-7mg der Proben werden in 2mL THF gelöst und nach 24 Stunden analysiert. Die Auswertung erfolgt gegen eine Eichkurve mit 12 eng verteilten Polystyrolstandards von der Firma PSS. Das M_n der Standards liegt zwischen 1670000 und 680g/mol.

Viskositätsmessung

Die dynamische Viskosität der Ligninproben wird mit Hilfe eines Ubbelohde Viskosimeter U0a der Firma Technosklo s.r.o, Czech Republik gemessen. Die Kapillare hat einen Durchmesser von 0,46mm.

Für die Messung werden von jeder Ligninprobe drei verschieden konzentrierte Lösungen benötigt. Lösungen mit folgender Konzentration werden hergestellt:

- 0,1g/25mL
- 0,2g/25mL
- 0,3g/25mL

Als Lösungsmittel dient Dioxan/Wasser (1:1). Vor der Messung werden die Probenlösungen im Wasserbad auf 30°C temperiert. Die exakte Messung der Zeit, die eine Probenlösung zum Durchfluss durch die Kapillare benötigt dient zur Berechnung der Grenzviskosität (Staudinger Index) (67).

Die relative Viskosität (η_{rel}) wird durch die Durchflusszeiten der Probenlösungen sowie des reinen Lösungsmittels ermittelt.

$$[\eta_{rel}] = \frac{t_{Probe}}{t_{LM}} \quad \text{mit}$$

η_{rel}	... relative Viskosität
t_{Probe}	... Durchflusszeit der Probenlösung [sec]
t_{LM}	... Durchflusszeit des reinen Lösungsmittels [sec]

(1)

Aus der relativen Viskosität kann die spezifische Viskosität (η_{sp}) berechnet werden.

$$[\eta_{sp}] = [\eta_{rel}] - 1 \quad \text{mit}$$

η_{sp}	... spezifische Viskosität
-------------	----------------------------

(2)

In einem Graphen wird die spezifische Viskosität gegen die Konzentration (c) aufgetragen und auf $c = 0$ extrapoliert. Der so ermittelte Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse entspricht dem Staudinger-Index ($[\eta]$).

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{[\eta_{sp}]}{c} \right)$$

(3)

mit

$[\eta]$...Staudinger-Index, Grenzviskosität

c ... Konzentration in g/100mL

Partikelgrößenanalyse

Eine Partikelgrößenverteilung der Ligninproben wird mit einem Lasergranulometer CILAS 1064 Naß aufgenommen. Der Messbereich des Lasergranulometers liegt zwischen 0,04µm und 500,00 µm. Die Ligninproben (0,01g/cm³ in Wasser) werden vor der Messung mit Kaliumdiphosphat mit Hilfe des Laborrührwerks HD2200 der Firma Bandelin electronic und des Geräte-Typs UW 2206 30 Sekunden mit 60rpm dispergiert.

Abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie (ATR-IR)

ATR-IR Spektren werden mit Hilfe eines Perkin Elmer Spectrum One der Serien Nummer 52407 mit ATR-Aufsatz aufgenommen. Die Lignin Pulver Proben können direkt im Wellenzahlen-Bereich von 4000,00cm⁻¹ bis 450,00cm⁻¹ gemessen werden. Pro Messung werden 32 Spektren aufgezeichnet und gemittelt. Die Auflösung der Spektren beträgt 4,00cm⁻¹.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR-Spektren der Proben werden mit einem Bruker Avance III Spektrometer bei 300MHz aufgenommen. Die Ligninproben werden vor der Messung nach der Vorschrift von A.R. Goncalves et al. acetyliert (68).

Je 10mg der acetylierten Proben werden in DMSO-d₆ mit 0,03%TMS gelöst. Die Proben werden bei 25°C und einem Pulswinkel von 30° gemessen. 1024 Scans und 5 Sekunden Delay Zeit werden für die Messungen gewählt.

Thermogravimetrie (Thermogravimetrische Analyse (TG) und DTG)

Die thermischen Eigenschaften der Ligninproben werden mit Hilfe eines Netzsch STA-449C TG-DTA/DSC Mess-Gerätes bestimmt. Der thermische Abbau der Proben erfolgt unter einer Heliumatmosphäre mit einem Gasfluss von 50mL/min. Als Temperaturprogramm werden eine Starttemperatur von 20°C, eine Endtemperatur von 550°C und eine konstante Heizrate von 10°C/min gewählt. Die Proben durchlaufen das Programm in geschlossenen Aluminiumoxid Tiegel, wobei mit einer Pinzette ein Loch in den Deckel gestochen wird, um

das Entweichen des Gases zu ermöglichen. Die Probeneinwaage beträgt zirka 5mg. Der Beginn und das Ende des thermischen Abbaus der Proben werden durch die Onset-Temperatur (T_{onset}) sowie durch die Zersetzungstemperatur (T_{end}) signalisiert.

Bestimmung von Klason Lignin (säureunlösliches Lignin)

Mit Hilfe der Methode in TAPPI-13m-54 wird der Gehalt an säureunlöslichem Lignin in den Proben bestimmt (69).

Pro Probe werden zwei Bestimmungen durchgeführt und ein Mittelwert der Ergebnisse berechnet.

Je 0,5g getrocknete (2h im Ofen bei 105°C) Probe ($m(\text{Probe})$) werden in ein Becherglas eingewogen. 7,5mL 72%ige H_2SO_4 werden zugeben und mit einem Glasstab verrührt. Die Temperatur der Probenlösung wird mit Hilfe eines Eisbades zwei Stunden zwischen 18°C und 20°C gehalten. Alle 15 Minuten erfolgt eine Durchmischung mit Hilfe eines Glasstabes. Das Probengemisch wird anschließend in einen Rundkolben überführt und mit 280mL destilliertem Wasser verdünnt. Diese Verdünnung ergibt eine 3%ige Säure. Die Probenlösung wird vier Stunden auf Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird mit einer zuvor getrockneten (2h im Ofen bei 105°C) und tarierten Glasfritte S4 abgesaugt. Schließlich wird die Fritte mit dem Niederschlag getrocknet (2h im Ofen bei 105°C) und das Gewicht notiert. Daraus ergibt sich die Masse des Präzipitats ($m(\text{Präzipitat})$). Der Klason Lignin Gehalt errechnet sich nach Gleichung 4.

$$\text{Klason Lignin [\%]} = \frac{m(\text{Präzipitat})}{m(\text{Probe})} * 100 \quad (4)$$

Bestimmung von säurelöslichem Lignin

Mit Hilfe der Methode in TAPPI Method UM-250,1985b wird der Gehalt an säurelöslichem Lignin in den Proben bestimmt (70).

Pro Probe werden zwei Bestimmungen durchgeführt und ein Mittelwert der Ergebnisse berechnet.

Das klare Filtrat nach der Säurehydrolyse der Ligninprobe (in Bestimmung von Klason Lignin) wird zur UV/VIS Messung verwendet. Die Absorption des Filtrats wird bei 205nm in

einer Präzisions-Küvette aus Quarzglas SUPRASIL Z600180 von Hellma mit einer Schichtdicke von 1cm an einem Shimadzu UV-1800 Spectrophotometer gemessen. Als Referenzprobe dient 3%ige H₂SO₄.

Da der Wert der Absorption über 0,7 liegt, werden die Proben 1:20 mit der 3%igen H₂SO₄ verdünnt.

Der Gehalt an säurelöslichem Lignin errechnet sich nach dem Lambert-Beerschem Gesetz (5).

$$Lignin \left[\frac{g}{L} \right], B = \frac{A (Absorption) * D (Verdünnung)}{b (Schichtdicke) * a (Absorptionskoeffizient)} \quad (5)$$

mit

	D ... Verdünnung (1/20)
	b ... Schichtdicke (1cm)
	a ... Absorptionskoeffizient (110L/(g*cm))
	V ... Volumen Filtrat (287,5mL)
	m ... Masse der Probe (0,4705g)

$$Lignin [\%] = \frac{B * V (Filtrat) * 100}{1000 * m (Probe)} \quad (6)$$

Aschebestimmung

Mit Hilfe der Methode von A. Sluiter et al. wird der Aschegehalt bestimmt. Ein Muffelofen des Typs Carbolite CWF1300 wird für die Veraschung der Substanzen verwendet (71).

Pro Probe werden zwei Bestimmungen durchgeführt und ein Mittelwert der Ergebnisse berechnet.

Die Edelstahl Tiegel durchlaufen zum Ausheizen das gesamte Temperaturprogramm (Tabelle 8 und Abbildung 12). Anschließend kühlen die Tiegel 30 Minuten im Exsikkator aus bevor ihr Gewicht (m(Tiegel leer)) notiert wird. Je 0,5g Probe werden in die Tiegel eingewogen und durchlaufen im Muffelofen das Temperaturprogramm. Nach dem Auskühlen der Tiegel im Exsikkator wird ihr Gewicht (m(Tiegel mit Asche)) notiert. Aus der Differenz der beiden Massen ergibt sich die Masse der Asche (7).

$$m(Asche) = m(Tiegel mit Asche) - m(Tiegel leer) \quad (7)$$

Tabelle 8: Temperaturprogramm für die Veraschung

Phase ^a	Rampe [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
1	-	105	12
2	10	250	30
3	20	575	180
4	-	105	-

^a Start des Temperaturprogramms bei 105°C

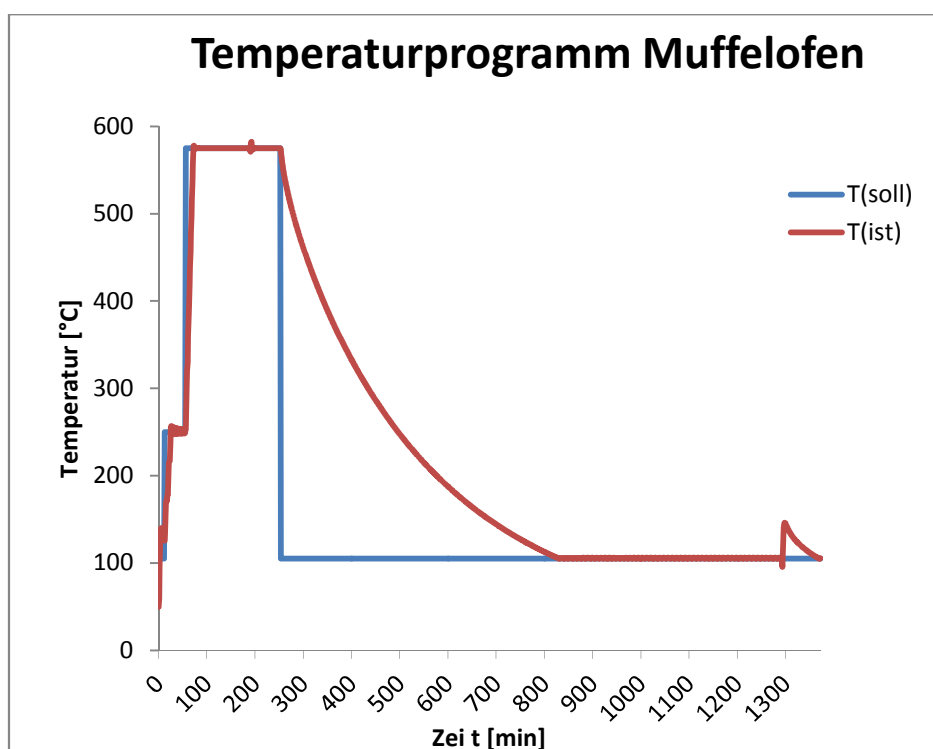


Abbildung 12: Temperaturprogramm des Muffelofens während der Veraschung

Elementaranalyse (CHNS)

Die Ligninproben werden mit Hilfe eines Universal-Elementaranalysator Vario El III auf ihren Gehalt an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel untersucht. Mit Hilfe von Gleichung 8 errechnet sich auch ihr Sauerstoffgehalt.

$$O = 100 - \text{Asche} - C - H - N - S \quad (8)$$

mit	
Asche	... Aschegehalt [%]
O	... Sauerstoffgehalt [%]
C	... Kohlenstoffgehalt [%]
H	... Wasserstoffgehalt [%]
N	... Stickstoffgehalt [%]
S	... Schwefelgehalt [%]

Test auf antioxidative Eigenschaften

DPPH-Test: Bestimmung der radikalfangenden Eigenschaften

Die Fähigkeit der Ligninpräparate als Antioxidans zu wirken wird mit dem DPPH-Test ermittelt. Da das 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Radikal eine violette Färbung (Absorptionsmaximum bei 518nm) aufweist, die aufgrund des ungepaarten Elektrons am Stickstoffatom zustande kommt, ändert sich seine Farbe, wenn das freie Elektron des Radikals mit einem Wasserstoffatom des zu untersuchenden Antioxidans zu einem Elektronenpaar reagiert. Dabei entsteht das reduzierte DPPH-H (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazin) und die Farbe schlägt auf gelb um (Abbildung 13). Durch die Absorptionsmessung an einem Shimadzu UV-3101-PC UV/Vis/NIR Spektrometer bei 518nm wird die antioxidative Wirkung der Proben ermittelt. Als Referenz dient Irganox 1010, welches in der Kunststoffindustrie häufig als Antioxidans eingesetzt wird (50).

Eine ethanolische DPPH Stammlösung (70 µM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl in Ethanol) wird 24 Stunden vor der Messung vorbereitet (vier Stunden Rühren um eine vollständige Lösung des DPPH in Ethanol zu garantieren) und vor Lichteinfall geschützt, bei Raumtemperatur gelagert. Für die photometrische Messung werden 800µL der DPPH Stammlösung mit 200µL Probenlösung (Ligninproben in DMSO verschiedener Konzentration: 0,5-0,03mg/mL) oder Irganox 1010 (verschieden konzentrierte Lösungen: 0,5-0,03mg/mL) gemischt. Die Absorption der Lösungen bei 518nm wird 600 Sekunden (Start der Messung 60 Sekunden nach der Durchmischung) aufgezeichnet. Da diese Zeit noch nicht ausreichend ist, wird alle 30 Minuten die Absorption gemessen, bis ein konstanter Wert erreicht wird (zirka 4 Stunden).

Die Restkonzentration an DPPH in den Probenlösungen sowie in der Referenzlösung (Irganox 1010) nach 4 Stunden wird nach der photometrischen Messung mit Hilfe des

Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt (Gleichung 9). Der Wert des Absorptionskoeffizienten beträgt $15400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (72). Die Schichtdicke der Küvette beträgt 1cm.

$$c(\text{DPPH}) = \frac{A(\text{Absorption})}{b(\text{Schichtdicke}) * a(\text{Absorptionskoeffizient})} \quad (9)$$

Mit Hilfe der unterschiedlich konzentrierten Irganox-Lösungen kann eine Kalibrationskurve aufgestellt werden um die Stöchiometrie der Reaktion von Irganox 1010 mit DPPH zu ermitteln. Das Verhältnis $\gamma(\text{Irganox 1010}) / \gamma(\text{DPPH})$ gibt an, wie viel Mol Irganox 1010 für die Reduktion von einem Mol DPPH benötigt werden (Gleichung 10).

$$c(\text{Irganox 1010}) = c(\text{DPPH}) * \frac{\gamma(\text{Irganox 1010})}{\gamma(\text{DPPH})} \quad (10)$$

Die radikalfangenden Eigenschaften der Ligninpräparate werden mit jenen von Irganox 1010 verglichen und als Irganox 1010 equivalent antioxidant capacity (IEAC) angegeben. Dieser Wert entspricht der Menge an Irganox 1010 dessen antioxidative Aktivität äquivalent zu 1g Ligninpräparat ist.

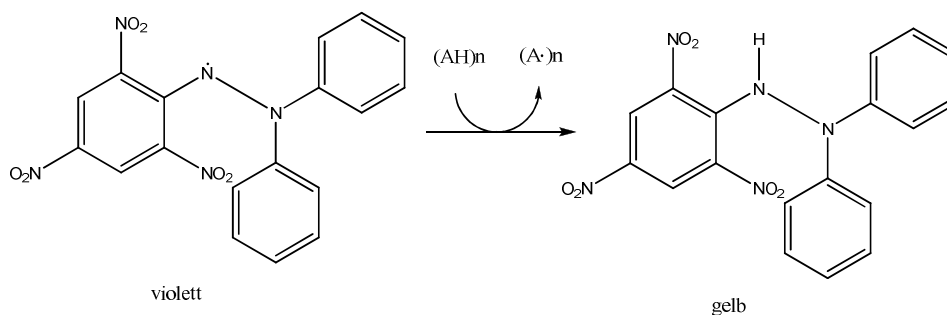


Abbildung 13: Reaktion des DPPH Radikals mit Antioxidans (73)

Test auf antibakterielle Eigenschaften

Die Ligninpräparate werden auf ihre antibakteriellen Eigenschaften getestet. Zwei Typen von Bakterien werden für die Testungen gewählt: Staphylococcus aureus (grampositiv) und Escherichia coli (gramnegativ). Verschiedene antibakterielle Testungen werden durchgeführt.

Bouillondilutionstest der Präparate der L2-Reihe sowie von L2red_acet_MeOH

Die festen Ligninproben (0,02g) werden direkt in eine Mischung von Nutrient broth (1980µL) und Bakterienstammlösung (20µL) eingebracht. Als Bakterienstammlösungen dienen Staphylococcus aureus- und Escherichia coli- Lösungen. Die Lösungen werden bei 37°C und 130rpm für 24 Stunden inkubiert.

Von den Ligninpräparaten wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Außerdem wird eine Blank Probe (Nutrient broth + Bakterien Suspension) mit getestet.

Nach der Inkubation wird auf einem EppendorfBioPhotometer die optische Dichte bei 600nm der Probenlösungen gemessen.

Mit Hilfe von Gleichung 11 wird die Reduktion des Bakterienwachstums berechnet.

$$\text{Reduktion}(\%) = 100 - \frac{100 \times OD600(\text{Probe})}{OD600(\text{Blank})} \quad (11)$$

mit
OD600 ... Absorption bei 600nm

Agarplattendiffusionstest (Vortest) der Probe L2red_acet_MeOH

Agarplatten werden mit Bakterienstammlösungen bestrichen. Als Bakterienstammlösungen dienen Staphylococcus aureus - (1:3 verdünnt mit physiologischer Lösung) und Escherichia coli - (1:10 verdünnt mit physiologischer Lösung) Lösungen. Die Agarplatten werden direkt mit dem Ligninpräparate L2red_acet_MeOH versehen und 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubation zeigen konzentrische Klarzonen die Größe der Hemmung des Bakterienwachstums an (60). Es erfolgt eine Vierfachbestimmung der Ligninprobe. Eine Agarplatte pro Bakterienstamm wird ohne Ligninprobe inkubiert und dient als Blank Probe.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Charakterisierung der Schwarzlauge BL-ZP (Black liquor Zellstoff Pöls)

4.1.1. Chemische und physikalische Charakterisierung

Die Schwarzlauge hat eine dunkelbraun bis schwarze Farbe. Der Geruch ist sehr intensiv und schwefelig.

Der pH-Wert der Schwarzlauge wird mit einem Mettler Toledo Seven Easy pH-Meter gemessen. Er beträgt 12,4.

4.1.2. Spektroskopische Charakterisierung

Abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie (ATR-IR)

Die Zuordnung der Banden erfolgt durch Vergleich der gemessenen ATR-IR-Banden mit jenen aus einigen Veröffentlichungen (10) (30) (65) (74) (75) (76) (77), sowie aus zwei Büchern (78) (79).

In Tabelle 9 sind die Wellenzahlen der gemessenen ATR-IR-Banden den funktionellen Gruppen zugeordnet. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die gemessenen ATR-IR-Spektren des Feststoffgehaltes der Schwarzlauge BL-ZP und des Kraft-Ligninpräparates L2 zum Vergleich.

Tabelle 9: Zuordnung der ATR-IR-Banden des Feststoffes der Schwarzlauge und zum Vergleich der Kraft-Ligninprobe L2

Feststoff Schwarzlauge BL-ZP		L2	
Wellenzahl [cm ⁻¹]	Schwingung, Zuordnung	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Schwingung, Zuordnung
3351	OH	3403	st O-H, phenolische und aliphatische OH, COO-H
-	-	2974	st C-H, CH ₃ und CH ₂
-	-	1698	st C=O, unkonjugierte CO, R-CHO
-	-	1599	st C=C, Aromat, st C=O
1588	Carboxylat, Diketon	-	-
1498	st C=C-OH	1514	st C=C-OH
-	-	1464	$\delta_{\text{asymmetrisch}}$ C-H, CH ₃ und CH ₂
-	-	1429	st C-C, Aromat, CH von Methyl

1415	CH ₃ -S- , -CH ₂ -S-	1429	CH ₃ -S-, -CH ₂ -S-
-	-	1374	δ_{ip} O-H, phenolische OH
1358	Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	1374	Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung
-	-	1269	Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung, st C-O, Guaiacyl
1223	st C-O(H) + C-O(Ar), phenolische OH und Ether	1216	st C-O(H) + C-O(Ar), phenolische OH und Ether
1128	δ_{ip} Ar C-H, Guaiacyl	1127	δ_{ip} Ar C-H, Guaiacyl
-	-	1105	C-O-C
1079	C=S, C-O-C	1076	C=S, C-O-C
1029	st C-O	1076	C-O-C
-	-	1035	st C-O(H) + C-O-C, 1.Ordnung aliphatische OH und Ether
880, 822, 768, 672	Aromaten Substitutionsmuster	856, 823	Aromaten Substitutionsmuster
-	-	856	δ_{op} Ar C-H, Guaiacyl
822	δ_{op} Ar C-H, Syringyl	823	δ_{op} Ar C-H, Syringyl

mit

st: Streckschwingung

δ_{ip} : In-plane Deformationsschwingung

δ_{op} : Out-of-plane Deformationsschwingung

Diskussion

Die charakteristischen Banden von Lignin können im Spektrum der Schwarzlauge (siehe Abbildung 14) detektiert werden (OH-, Ether-, Carbonyl-, Aromaten-Banden).

Das Spektrum der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe L2 (siehe Abbildung 15) stimmt mit dem der Schwarzlauge allerdings nicht vollkommen überein. Man kann davon ausgehen, dass durch die Präzipitation strukturelle Veränderungen in der Probe hervorgerufen werden. So ist im Spektrum der unmodifizierten Ligninproben L2 nach der charakteristischen OH-Bande bei 3403cm⁻¹ eine Bande bei 2974cm⁻¹ vorzufinden, welche im Spektrum der Schwarzlauge

fehlt. Diese Bande stammt von Alkylschwingungen (-CH₃) im unmodifizierten Kraft-Ligninpräparat. Da sich auch der pH Wert der Schwarzlauge von 12,4 sehr von dem der neutralen Kraft-Ligninproben L2 unterscheidet, liegen in der Schwarzlauge COO⁻ Salze vor, was die Bande bei 1588cm⁻¹ verrät.

Wie schon der Geruch der Schwarzlauge zeigt, befinden sich Banden im Spektrum der Schwarzlauge BL-ZP und auch im präzipitierten Kraft-Lignin L2, die Schwefel zuzuordnen sind. Es treten C=S-, CH₃-S- sowie -CH₂-S-Banden auf.

ATR-IR-Spektren:

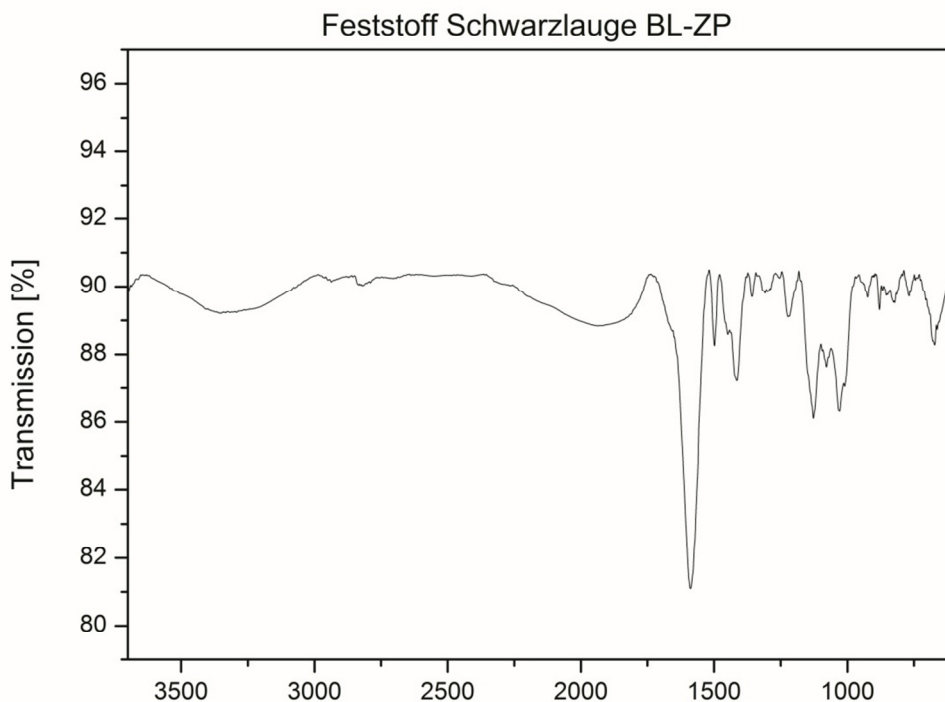


Abbildung 14: ATR-IR-Spektrum von Feststoff Schwarzlauge BL-ZP

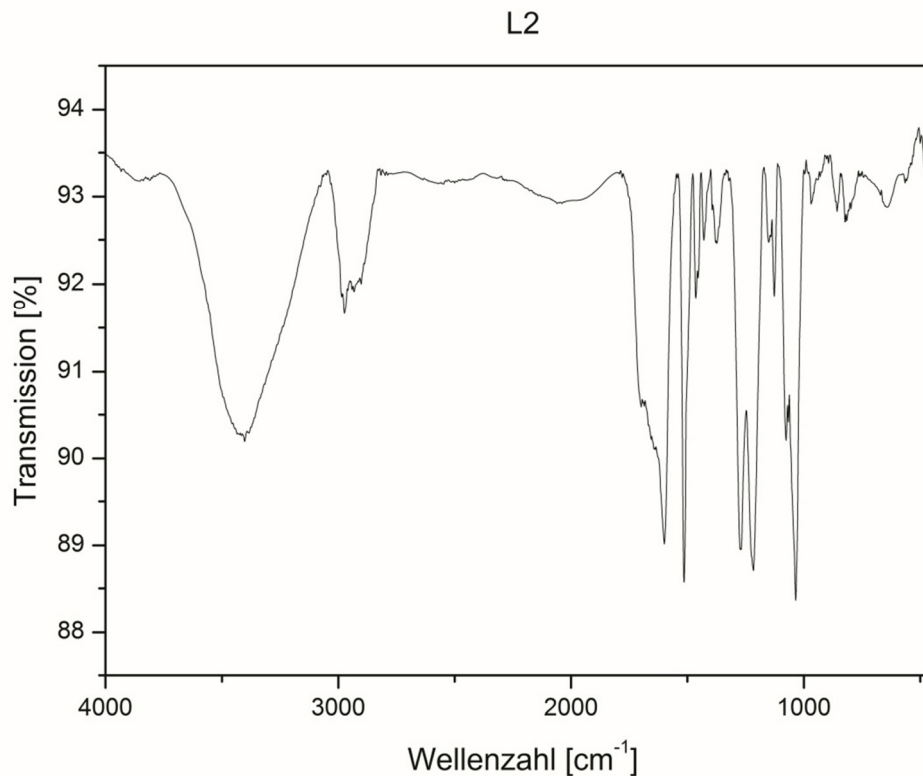


Abbildung 15: ATR-IR-Spektrum von L2

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR

Die Auswertung erfolgt nach der Methode von A. Gregorova (64) und A.R. Goncalves et al. (68). Dabei werden Integrale über gewisse ppm Bereiche (siehe Tabelle 10) der aufgenommenen Spektren gebildet. Durch Normierung des Integrals des aromatischen Bereichs zwischen 7,9 und 6,25ppm auf den Wert 1, können die Regionen prozentuell angegeben werden. Diese Art der Auswertung soll lediglich die Größenordnungen der Bereiche der Ligninpräparate darstellen und dient zum Vergleich der Ligninpräparate untereinander. Die dargestellten Prozentwerte sind keinesfalls als Absolutwerte zu verstehen.

Die Konzentration der Acetylgruppen entspricht der Konzentration der Hydroxylgruppen, da die Proben vor der NMR Messung acetyliert werden (10). Acetylierte Ligninpräparate zeigen deutliche Signale in ppm Bereichen, welche nicht mit anderen Wasserstoff-Signalen überlagern. Aromatische und aliphatische Acetylgruppen sind zu verschiedenen ppm Bereichen verschoben (2,3ppm und 2,1ppm) und zeigen im Spektrum separate Peaks. Damit ergibt das Spektrum der acetylierten Ligninpräparate den totalen Gehalt an

Acetylgruppen (proportional zum Hydroxylgruppengehalt) (80). Die acetylierten Proben werden mit Probenbezeichnung_AC bezeichnet.

Die prozentuale Verteilung der Regionen des Feststoffgehaltes der Schwarzlauge BL-ZP sowie des Kraft-Ligninpräparates L2 zum Vergleich sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Abbildungen 16 und 17 zeigen die aufgenommenen ¹H-NMR-Spektren der beiden Proben.

Tabelle 10: prozentuale Verteilung der Regionen der Schwarzlauge BL-ZP sowie des Kraft-Ligninpräparates L2 nach der ¹H-NMR Auswertung

Probe	Feststoff Schwarzlauge BL-ZP_AC	L2_AC
Regionen [Chemischer Shift in ppm]	Anteil [%]	Anteil [%]
Aromatische Region [7,9-6,25]	22	22
Nicht zyklisch benzyliche Region [6,25-5,75]	2	3
Zyklisch benzyliche Region [5,75-5,2]	2	3
Methoxyl Region [4,2-3,55]	21	22
Aromatische acetyl Region [2,42-2,12]	16	16
Aliphatische acetyl Region [2,12-1,6]	26	24
Sauerstofffreie aliphatische Region [1,6-0]	11	11

Da das verwendete Lösungsmittel DMSO_d6 Feuchtigkeit aus der Luft aufnimmt, tritt bei 3,4ppm ein Peak in den aufgenommenen Spektren auf, welcher Wasser zuzuordnen ist. Weiters erfolgt die Aufarbeitung der Ligninpräparate im wässrigen Medium und die Ligninpräparate werden anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Ein Restwassergehalt kann in den Ligninpräparaten ebenfalls enthalten sein.

Diskussion

Vergleich des NMR Spektrums des Feststoffes der acetylierten Schwarzlauge BL-ZP (siehe Abbildung 16) mit dem NMR Spektrum der acetylierten Kraft-Ligninprobe L2 (siehe Abbildung 17):

Vergleicht man das Spektrum der acetylierten Schwarzlauge mit jenem der acetylierten Ligninprobe, so weisen die Spektren nur minimale Unterschiede auf. Diese Unterschiede in den ausgewerteten Regionen sind zu gering, um Aussagen über die strukturellen Veränderungen des Materials während der Präzipitation zu treffen.

^1H Spektren:

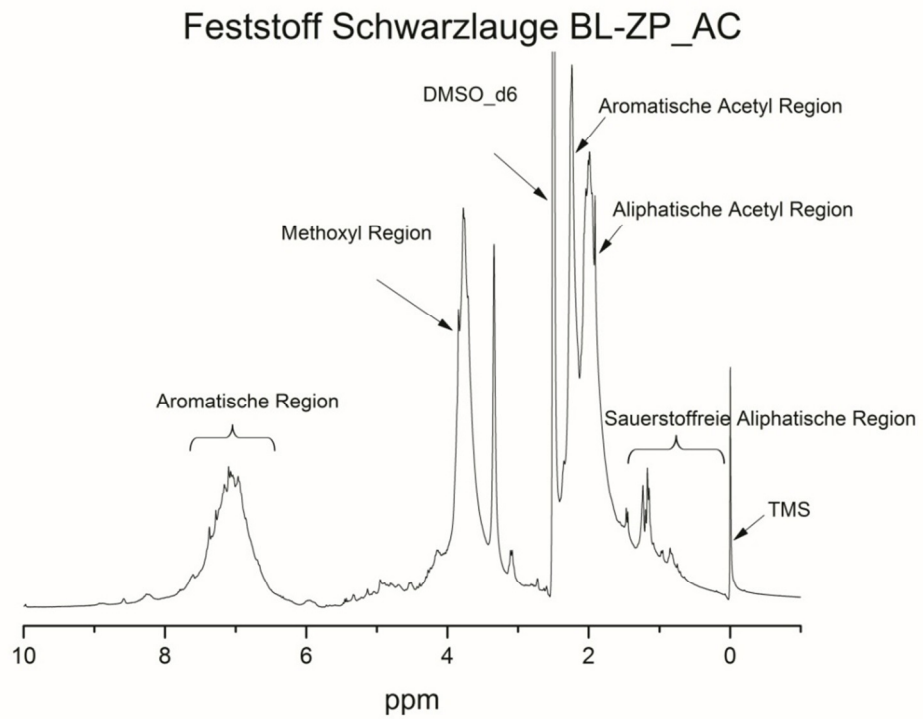


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum von Feststoff Schwarzlaugle BL-ZP

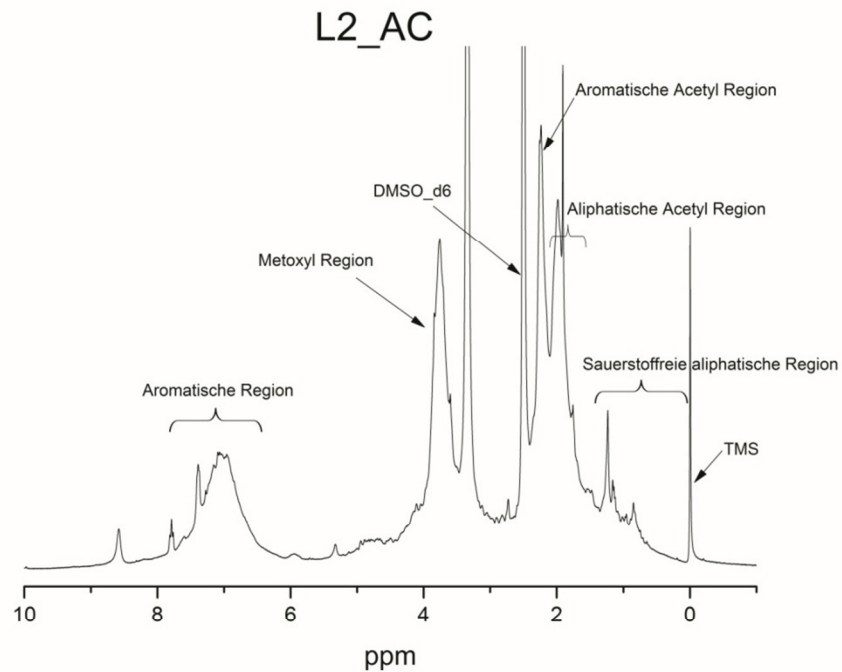


Abbildung 17: ^1H -NMR-Spektrum von L2_AC

4.1.3. Klason Lignin- und Aschegehalt

Der Klason Lignin Gehalt der Schwarzlauge BL-ZP beträgt $25,1\% \pm 0,9$.

Der Aschegehalt der Schwarzlauge BL-ZP beträgt $63,8 \pm 0,3 \%$.

Diskussion

Die maximale Ausbeute an Kraft-Lignin aus der Schwarzlauge BL-ZP beträgt 25,1% des Trockengewichtes. Der sehr hohe Aschegehalt von über 60% im Trockengewicht der Schwarzlauge BL-ZP passt mit einem Lignin-Gehalt von ca. 25% zusammen. Der Feststoff der Schwarzlauge BL-ZP besteht zu über 60% aus Nicht-Ligninkomponenten, wie z.B. Cellulose und Hemicellulose.

4.1.4. Resümee

Die Schwarzlauge BL-ZP ist eine stark alkalische Lauge. Aus der ATR-IR-Messung geht hervor, dass Lignin in Schwarzlauge enthalten ist, das Spektrum weist alle dafür nötigen Banden auf. Im Vergleich zum Kraft-Lignin L2 ATR-IR-Spektrum zeigen sich allerdings Unterschiede. Im Feststoff der Schwarzlauge BL-ZP liegen COO^- Salze vor, welche während der Präzipitation verschwinden und im ATR-IR-Spektrum von Kraft-Lignin L2 nicht mehr vorhanden sind. Die Präzipitation führt zu strukturellen Veränderungen und auch der stark unterschiedliche pH-Wert der alkalischen Schwarzlauge und der neutralen Kraft-Lignin L2 Probe trägt zu den unterschiedlichen Spektren bei. Die Bestimmung des Gehaltes an Klason-Lignin und Asche im Feststoff der Schwarzlauge BL-ZP zeigt deutlich die Anwesenheit von Nicht-Ligninkomponenten wie Cellulose oder Hemicellulose im Feststoff der Schwarzlauge an, welche im Kraft-Lignin L2 entfernt werden.

4.2. Charakterisierung der Ligninpräparate der Reihe L2

4.2.1. Molekulargewichtsbestimmung

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Ergebnisse (Zahlenmittel (M_n), Massenmittel (M_w), Polydispersitätsindex (PDI)) der Ligninproben (L2-Reihe) werden in Tabelle 11 zusammengefasst. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen sind in den Abbildungen 19 und 20 die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt.

Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der Probe L2acet beispielhaft für alle Ligninpräparate. Die zwei Negativpeaks nach dem Hauptpeak stammen vom Detektor.

Tabelle 11: Ergebnisse der GPC für die Proben der L2-Reihe

Probe	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	PDI (Mw/Mn)
L2	950	1560	1,6
L2acet	1520	4860	3,2
L2met	1250	3150	2,5
L2red_acet*	910	1260	1,4

*nicht vollständig gelöst

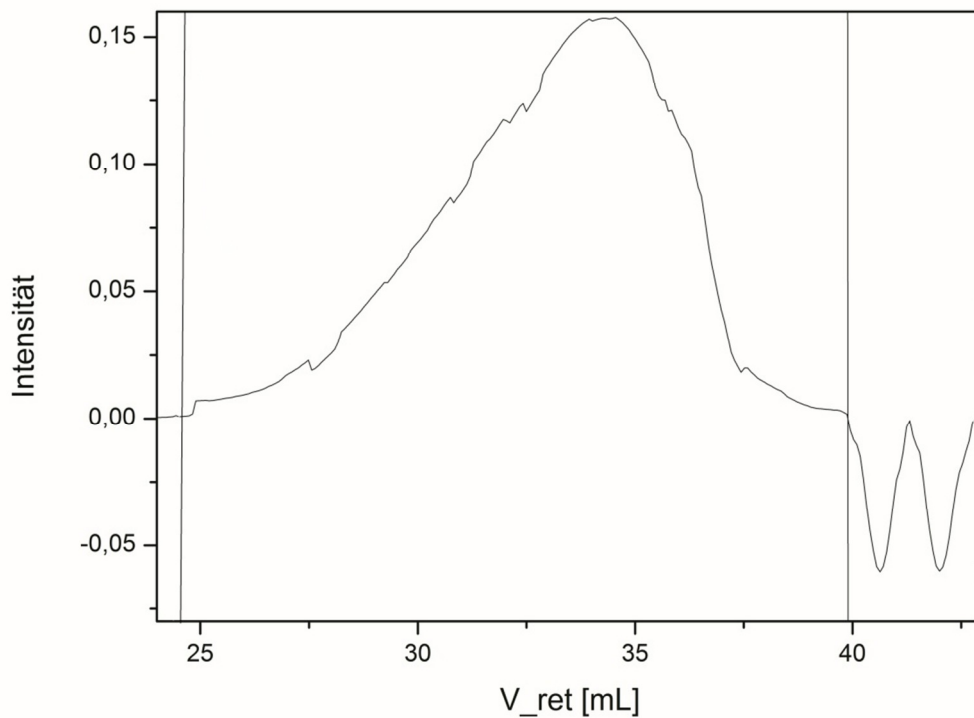


Abbildung 18: Chromatogramm von L2acet

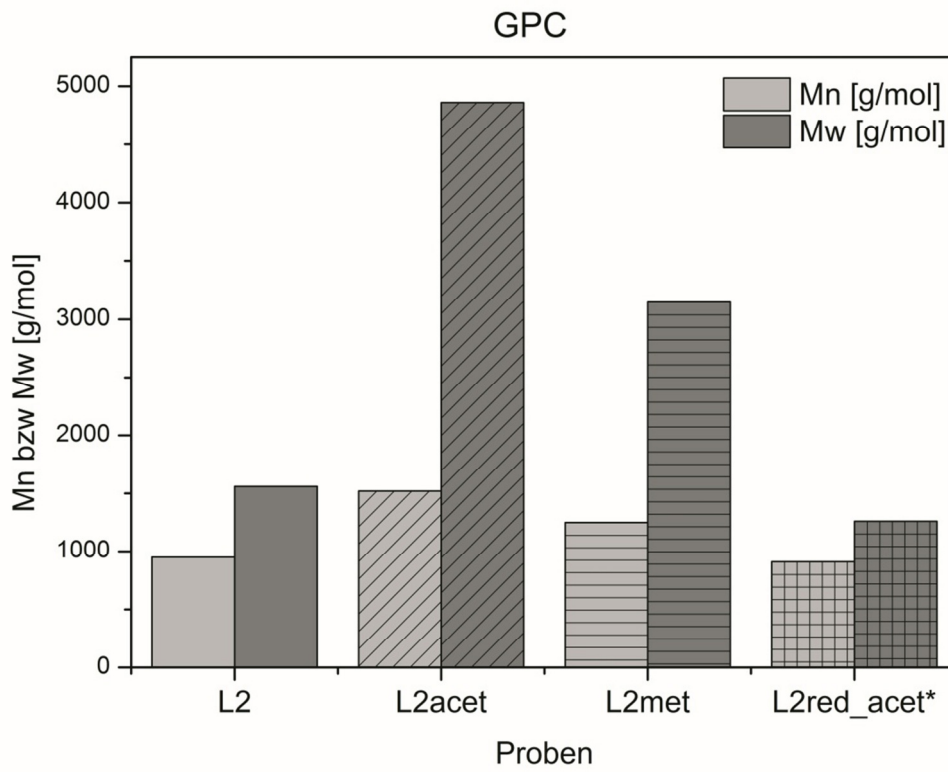


Abbildung 19: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte (L2-Reihe)

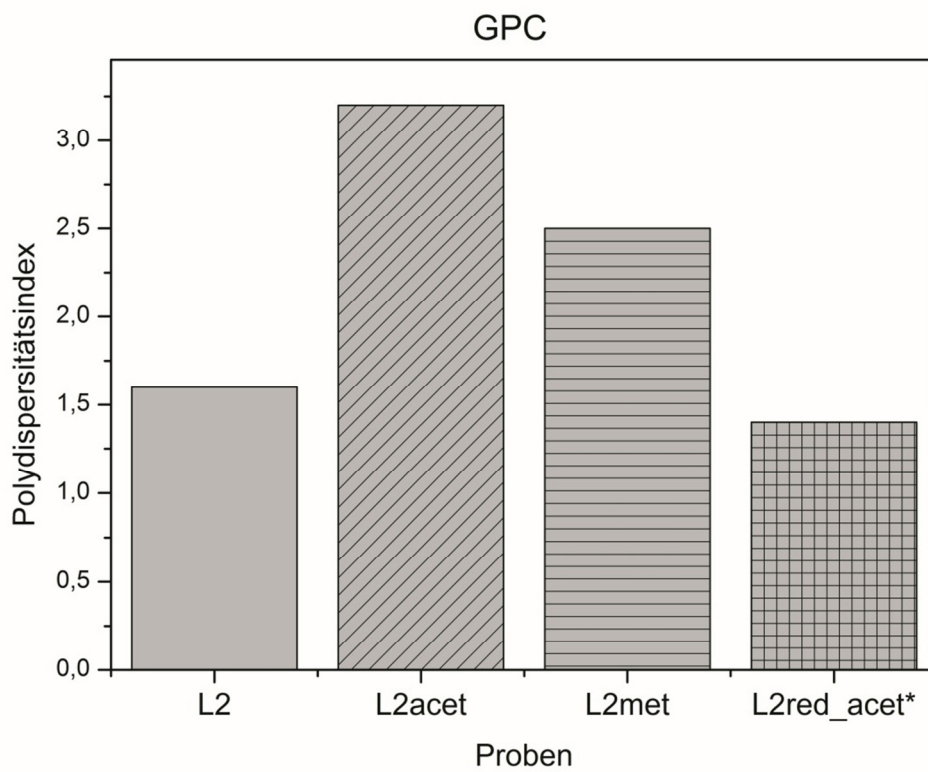


Abbildung 20: Balkendiagramm der PDI Werte (L2-Reihe)

Diskussion

Durch die die Acetylierung und die Methylierung von L2 erhöht sich das Zahlenmittel. Das Massenmittel und der Polydispersitätsindex dieser Proben steigen im Vergleich zur unmodifizierten Kraft-Ligninprobe deutlich an. Diese Charakteristika lassen auf Kondensationsreaktionen, die während der Modifizierungen stattfinden, schließen.

Da die reduzierte-acetylierte Probe (L2red_acet) nicht vollständig in THF gelöst werden kann, kann die GPC kein Ergebnis liefern. Von dieser Probe, sowie von der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe L2 werden eine Viskositätsmessung durchgeführt.

Viskositätsmessung

Da die Ligninpräparate L2 und L2red_acet in Dioxan/Wasser (1:1) löslich sind, kann eine Viskositätsmessung durchgeführt werden. In Tabelle 12 sind die Werte des Staudinger Index $[\eta]$ der Proben L2 und L2red_acet zusammengefasst.

Tabelle 12: Staudinger Index der gemessenen Proben der L2-Reihe

Probe	Staudinger Index $[\eta]$
L2	0,034
L2red_acet	0,059

Diskussion

Der Staudinger Index der reduzierten-acetylierten Probe L2red_acet liegt über dem Staudinger Index der unmodifizierten L2 Probe. Da der Staudinger Index proportional zum Molekulargewicht ist, ist auch das Molekulargewicht der Probe L2red_acet größer als das von L2.

Alle durchgeführten Modifizierungen von Kraft-Lignin (L2) erhöhen das Molekulargewicht und den Polydispersitätsindex.

4.2.2. Physikalische Charakterisierung

Partikelgrößenanalyse

Die ermittelten Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse der Ligninpräparate (L2-Reihe) werden in Tabelle 13 zusammengefasst. Die durchschnittlichen Durchmesser sowie die Anzahl der

Fraktionen werden durch eine Volumsverteilung der Partikel erhalten. Einen graphischen Vergleich der mittleren Durchmesser der Proben zeigt das Balkendiagramm der Abbildung 21.

Tabelle 13: Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse (L2-Reihe)

Volums Verteilung				
Probe	Durchmesser 10% [μm]	Durchmesser 50% [μm]	Durchmesser 90% [μm]	Anzahl der Fraktionen
L2	2,68	15,48	35,97	3
L2acet	1,70	16,57	45,21	3
L2met	0,97	6,67	16,96	3
L2red_acet	2,18	13,54	32,09	2

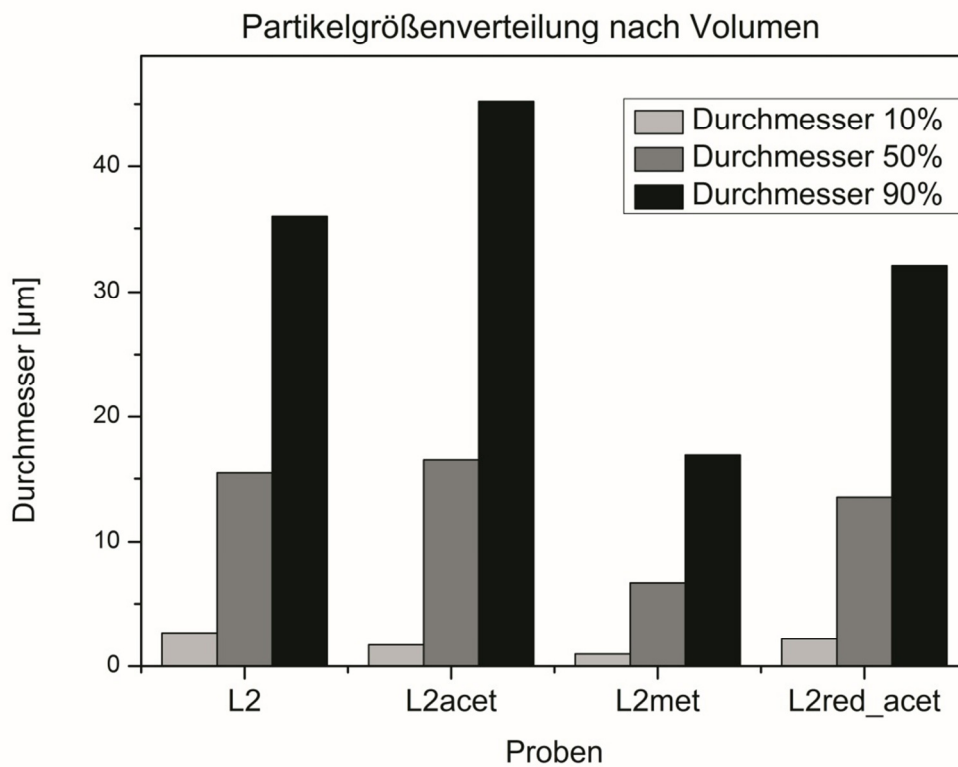


Abbildung 21: Balkendiagramm der mittleren Partikeldurchmesser (L2-Reihe)

Diskussion

Die Methylierung sowie die Reduktion-Acetylierung von Kraft-Lignin führen zu einer Verringerung der Partikelgrößen.

Die Acetylierung führt in den Bereichen 50% und 90% zu einer Vergrößerung der Partikel, im Bereich 10% hingegen zu einer Verkleinerung der Partikel.

Thermogravimetrie (Thermogravimetrische Analyse (TG) und DTG)

Die Ergebnisse des thermischen Abbaus der Ligninproben (L2-Reihe) sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Wichtige Kenngrößen sind die Onset-Temperatur (T_{onset}), die den Beginn des thermischen Abbaus der Proben signalisiert und die Zersetzungstemperatur (T_{end}), die das Ende des thermischen Abbaus der Proben signalisiert, sowie die Maximal-Temperatur (T_{max}), die Temperatur bei der maximalen Zersetzungsgeschwindigkeit und der Gewichtsverlust der Proben nach der thermischen Behandlung.

Abbildung 22 zeigt die Auswertung der Thermogravimetrie der Probe L2acet beispielhaft für alle Ligninpräparate.

Tabelle 14: Ergebnisse der Thermogravimetrie der L2-Reihe

TG				DTG	
Probe	T(onset) [°C]	Gewichtsverlust [%]	T(end) [°C]	T(max) [°C]	T(max) [%/min]
L2	278	50	415	372	3,02
L2acet	310	58	440	395	3,77
L2met	332	58	440	403	4,54
L2red_acet	99	53	141	121	4,22

Diskussion

Die unmodifizierte Kraft-Ligninprobe L2 beginnt sich bei einer Temperatur von 278°C zu zersetzen. Der thermische Abbau der Probe endet bei 415°C mit einem Gewichtsverlust der Probe von 50%.

Durch die Acetylierung und die Methylierung verschiebt sich der thermische Abbau zu höheren Temperaturen. Der Gewichtsverlust der Probe nach der thermischen

Behandlung hingegen steigt etwas. Das beste thermische Verhalten zeigt die methylierte Probe mit einer Onset-Temperatur von 332°C und einer Zersetzungstemperatur von 440°C.

Nach der Publikation von Sun et al. (81) geht die thermische Stabilität von Ligninpräparaten mit ihrem Molekulargewicht einher. Je höher das Molekulargewicht desto besser die thermische Stabilität der Probe. Das trifft auf das Ligninpräparat L2acet zu.

Die reduzierte-acetylierte Probe weist gegenüber der unmodifizierten Ligninprobe ein schlechteres thermisches Verhalten auf. Die Zersetzung startet bei einer Temperatur von 99°C und endet bei einer Temperatur von 141°C (L2red_acet) mit einem Gewichtsverlust von 53% (L2red_acet).

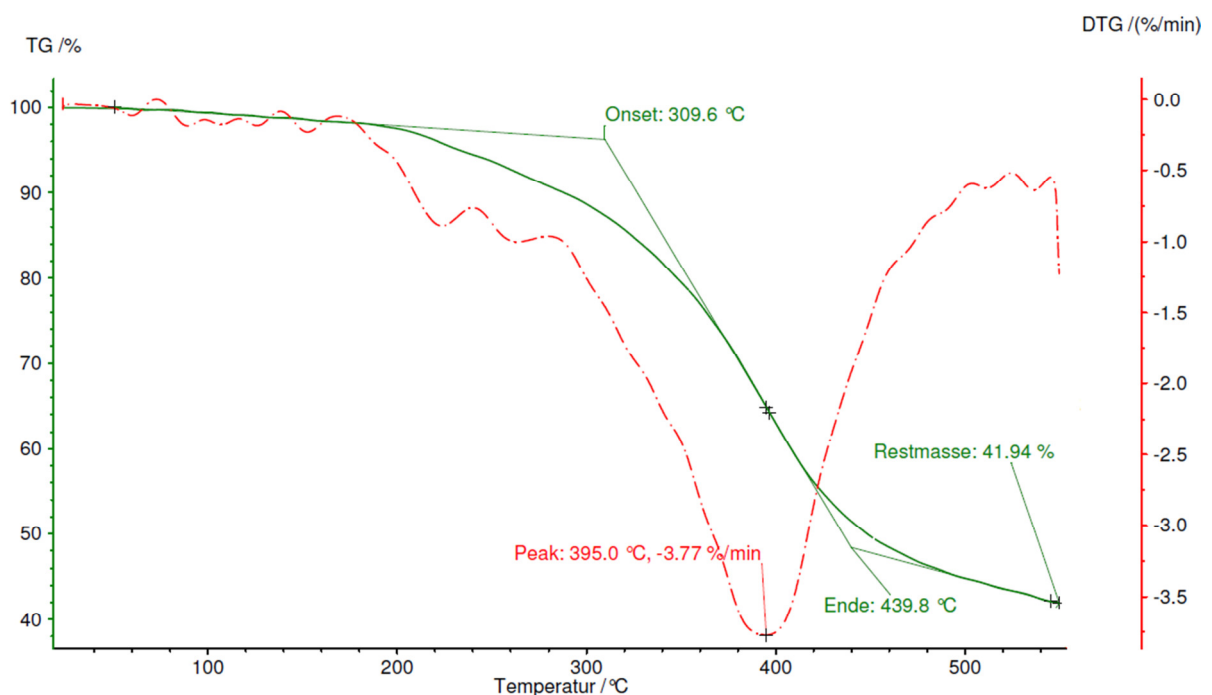


Abbildung 22: Thermogravimetrie von L2acet

4.2.3. Spektroskopische Charakterisierung

Abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie (ATR-IR)

Die Zuordnung der Banden erfolgt durch Vergleich der gemessenen ATR-IR-Banden mit jenen aus einigen Veröffentlichungen (10) (30) (65) (74) (75) (76) (77), sowie aus zwei Büchern (78) (79).

In Tabelle 15 sind die Wellenzahlen der gemessenen ATR-IR-Banden den funktionellen Gruppen zugeordnet. Die Abbildungen 23-26 zeigen die gemessenen ATR-IR-Spektren der Ligninpräparate (L2-Reihe).

Tabelle 15: Zuordnung der ATR-IR-Banden der L2-Reihe

Zuordnung	L2	L2acet	L2met	L2red_acet
st O-H, phenolische und aliphatische OH	3403	3545	3488	3665, 3623
COO-H	3403	-	-	-
st C-H, CH ₃ und CH ₂	2974	2973, 2945	2934	2988
OCH ₃	-	-	2834	-
st C=O, unkonjugierte CO	1698	1763, 1739	1732, 1695	1759, 1711
st C=C, Aromat, st C=O, st C=C-OH	1599, 1514	1594, 1509	1584, 1513	1579, 1511
st C-C, Aromat	1514	1509	1513	1511
$\delta_{\text{asymmetrisch}}$ C-H, CH ₃ und CH ₂	1464	1466	1464	-
st C-C, Aromat, CH von Methyl	1429	1420	1419	-
CH ₃ -S- , -CH ₂ -S-	1429	1420	1419	1407
C-C-H aus Alkanen	-	-	-	1407
Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	-	-	-	1407
δ_{ip} O-H, phenolische OH	1374	-	-	1375
Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	1374	1369	-	1375
st C-O, Guaiacyl	1269	-	1262	1268
Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	1269	-	1262	1268
st C-O(H) + C-O(Ar), phenolische OH und Ether	1216	-	-	-
R-CO-OR'	-	1196	-	-
C-O-C	-	-	1141	-
δ_{ip} Ar C-H, Guaiacyl	1127	-	-	-
C-O-C	1105	-	-	-

C=S, C-O-C	1076	-	1088	-
st C-O(H) + C-O-C, 1.Ordnung aliphatische OH und Ether	1035	1033	1026	1029
Aromaten Substitutionsmuster	856, 823	904, 824, 618	858, 807, 765, 639	923, 892, 874, 704, 639, 541, 457
δ_{op} Ar C-H, Guaiacyl	856	-	858, 807	-
δ_{op} Ar C-H, Syringyl	823	824	-	-
CS	-	618	639	-

mit

st: Streckschwingung

δ_{ip} : In-plane Deformationsschwingung

δ_{op} : Out-of-plane Deformationsschwingung

Diskussion

Die unmodifizierte Ligninprobe L2 stimmt ziemlich genau mit den Banden der Publikation von A. Tejado et al. (10) für Kraftlignin überein. Das Spektrum (siehe Abbildung 23) zeigt deutliche OH-, Carbonyl- und Ether-Banden. Die breite Bande bei 3403cm^{-1} lässt aber auch auf Anwesenheit von Säure schließen. Die Bereiche zwischen 900 und 700cm^{-1} zeigen ein ausgeprägtes Aromaten Substitutionsmuster. Das Spektrum weist auch aliphatische Banden auf. Die komplexe Struktur von Lignin wird durch das aufgenommene ATR-IR-Spektrum deutlich. Die Banden bei 1429cm^{-1} und 1076cm^{-1} könnten Schwefelbanden sein. Der Schwefel könnte einerseits schon aus dem Kraftprozess stammen, er könnte allerdings auch durch die Präzipitation des Lignins mit Schwefelsäure in die Probe eingebracht worden sein.

Acetylierung:

Das Spektrum der acetylierten Probe (siehe Abbildung 24) zeigt nur eine sehr abgeschwächte OH-Bande bei 3545cm^{-1} . Im Vergleich zur unmodifizierten Ligninprobe ist diese Bande deutlich schwächer geworden. Dieser Effekt spricht für eine erfolgreiche Acetylierung der Probe. Bei der Acetylierung mit Acetanhydrid werden Hydroxylgruppen in

Acetylgruppen umgewandelt, dadurch verringert sich die Konzentration der Hydroxylgruppen. Deutliche Banden erkennt man bei 1763cm^{-1} , 1739cm^{-1} und 1196cm^{-1} . Die ersten beiden Banden sind charakteristische C=O-Banden und die Bande bei ca. 1200cm^{-1} ist eine charakteristische Ester-Bande. Auch dieses Ergebnis spricht für eine erfolgreiche Acetylierung, da die Acetylgruppe durch diese Banden wiedergespiegelt wird. Weitere Banden sind charakteristisch für eine Ligninprobe (Ether, aromatische und aliphatische Region).

Methylierung:

Die methylierte Probe zeigt im IR-Spektrum (siehe Abbildung 25) eine abgeschwächte OH-Bande. Im Vergleich zur unmodifizierten Ligninprobe ist diese Bande deutlich schwächer geworden. Da bei der Methylierungsreaktion Hydroxylgruppen in Methoxygruppen umgewandelt werden, spricht dieses Ergebnis für eine erfolgreiche Reaktion. Die gebildeten Methoxygruppen zeigen sich in der Bande bei 2834cm^{-1} , welche im Spektrum der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe nicht vorhanden ist und des Weiteren in den Absorptionsbanden bei 1141cm^{-1} , 1088cm^{-1} und 1026cm^{-1} . Zudem gibt das Spektrum Banden für eine typische Ligninprobe wieder (Carbonyl-, aliphatische- und aromatische-Banden).

Reduktion-Acetylierung:

Die reduzierte-acetylierte Ligninprobe weist ein sehr ähnliches ATR-IR-Spektrum (siehe Abbildung 26) wie die acetylierte Probe (L2acet) auf. Die OH-Bande bei 3662cm^{-1} ist im Vergleich zur OH-Bande der unmodifizierten Probe bei ca. 3400cm^{-1} nicht so ausgeprägt. Zwei Carbonylbanden (1759cm^{-1} und 1711cm^{-1}) treten im Spektrum auf. Diese Indizien sprechen für eine erfolgreiche Acetylierung. Des Weiteren zeigt das Spektrum der reduzierten acetylierten Probe alle charakteristischen Banden der funktionellen Gruppen von Lignin (Ether-, Aromaten-, Aliphaten-Banden).

ATR-IR-Spektren:

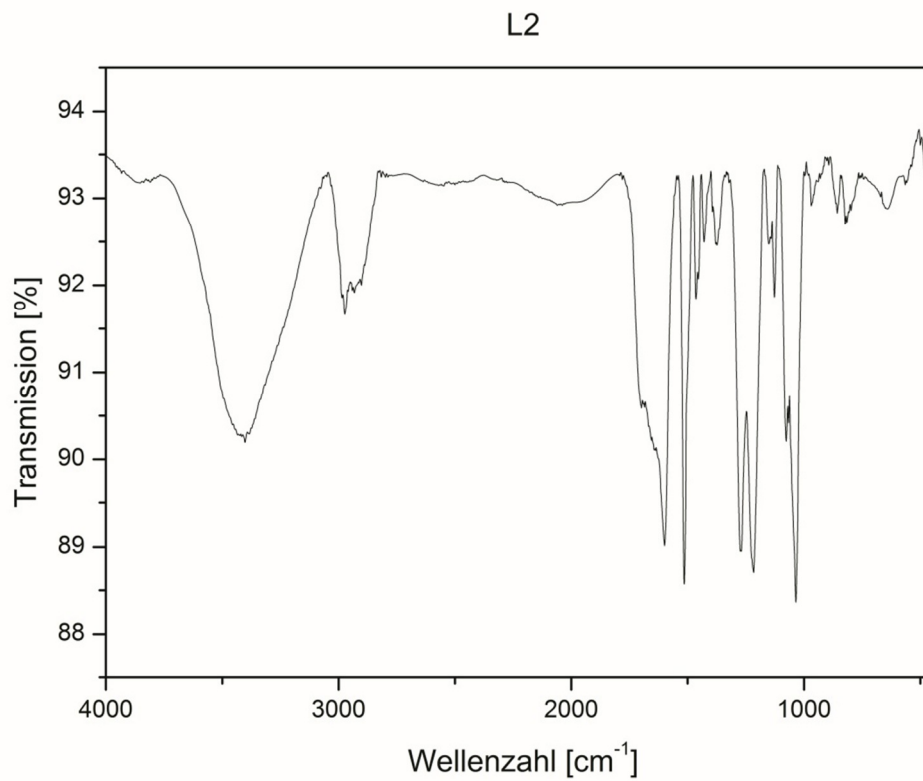


Abbildung 23: ATR-IR-Spektrum von L2

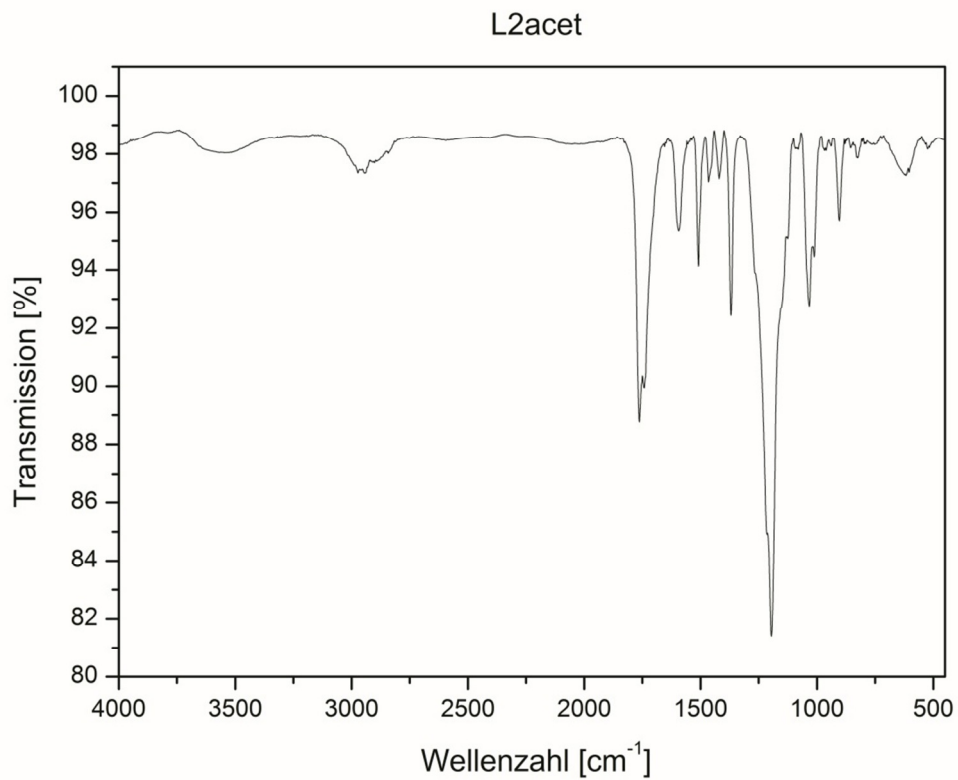


Abbildung 24: ATR-IR-Spektrum von L2acet

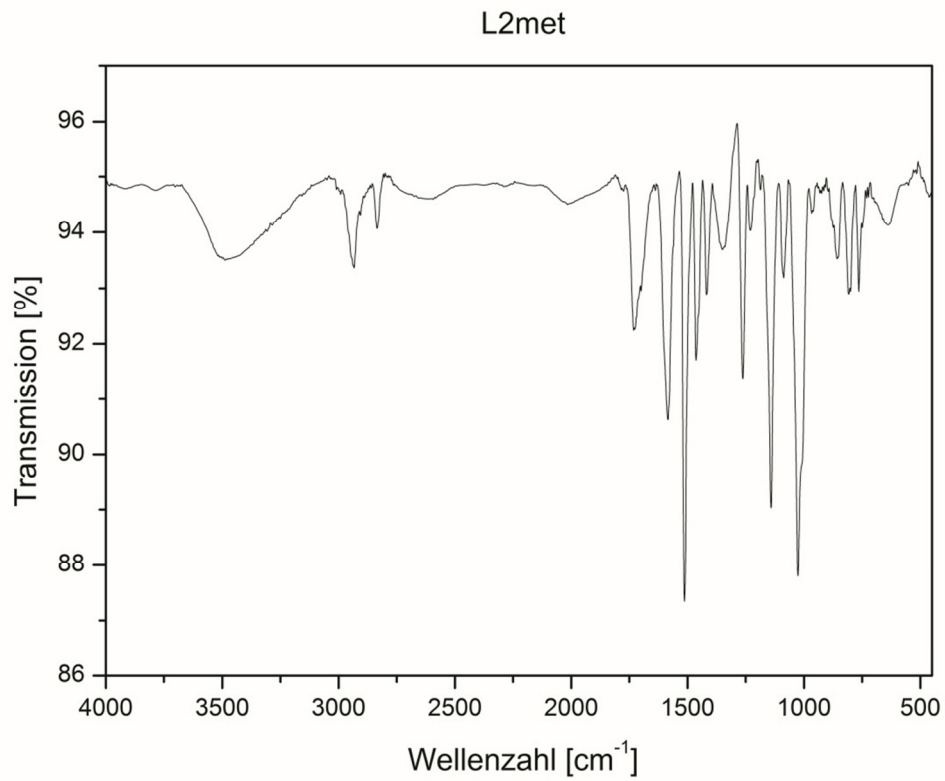


Abbildung 25: ATR-IR-Spektrum von L2met

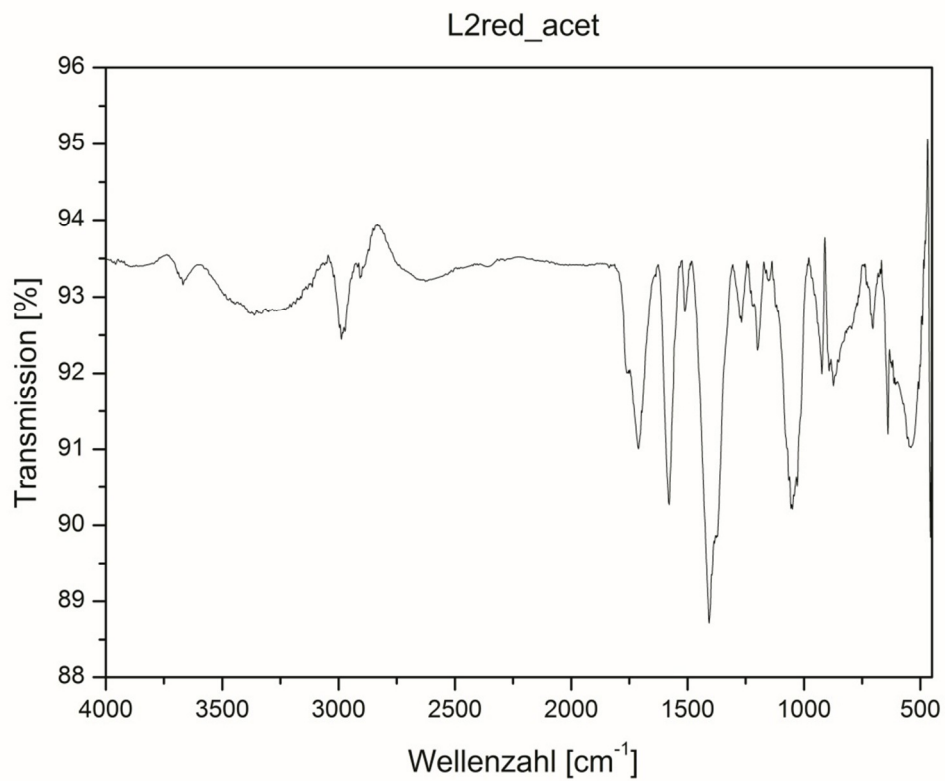


Abbildung 26: ATR-IR-Spektrum von L2red_acet

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR

Die Auswertung erfolgt nach der Methode von A. Gregorova (64) und A.R. Goncalves et al. (68). Dabei werden Integrale über gewisse ppm Bereiche (siehe Tabelle 16) der aufgenommenen Spektren gebildet. Durch Normierung des Integrals des aromatischen Bereichs zwischen 7,9 und 6,25ppm auf den Wert 1, können die Regionen prozentuell angegeben werden.

Die Konzentration der Acetylgruppen entspricht der Konzentration der Hydroxylgruppen, da die Proben vor der NMR Messung acetyliert werden (10). Acetylierte Ligninpräparate zeigen deutliche Signale in ppm Bereichen, welche nicht mit anderen Wasserstoff-Signalen überlagern. Aromatische und aliphatische Acetylgruppen sind zu verschiedenen ppm Bereichen verschoben (2,3ppm und 2,1ppm) und zeigen im Spektrum separate Peaks. Damit ergibt das Spektrum der acetylierten Ligninpräparate den totalen Gehalt an Acetylgruppen (proportional zum Hydroxylgruppengehalt) (80). Die acetylierten Proben werden mit Probenbezeichnung_AC bezeichnet.

Die prozentuale Verteilung der Regionen der acetylierten Ligninpräparate (L2-Reihe) ist in Tabelle 16 zusammengefasst. Die Abbildungen 27-33 zeigen die gemessenen ¹H-NMR-Spektren der acetylierten Ligninproben (L2-Reihe).

Tabelle 16: prozentuale Verteilung der Regionen der acetylierten Ligninproben (L2-Reihe) nach der ¹H-NMR Auswertung

Probe	L2_AC	L2acet_AC	L2met_AC	L2red_acet_AC
Regionen [Chemischer Shift in ppm]	Anteil [%]	Anteil [%]	Anteil [%]	Anteil [%]
Aromatische Region [7,9-6,25]	22	23	20	21
Nicht zyklisch benzyliche Region [6,25-5,75]	3	2	2	2
Zyklisch benzyliche Region [5,75-5,2]	3	3	4	2
Methoxyl Region [4,2-3,55]	22	22	51	23
Aromatische acetyl Region [2,42-2,12]	16	16	4	17
Aliphatische acetyl Region [2,12-1,6]	24	24	11	25

Sauerstofffreie aliphatische Region [1,6-0]	11	10	8	9
--	----	----	---	---

Da das verwendete Lösungsmittel DMSO_d6 Feuchtigkeit aus der Luft aufnimmt, tritt bei 3,4ppm ein Peak in den aufgenommenen Spektren auf, welcher Wasser zuzuordnen ist. Weiters erfolgt die Aufarbeitung der Ligninpräparate im wässrigen Medium und die Ligninpräparate werden anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Ein Restwassergehalt kann in den Ligninpräparaten ebenfalls enthalten sein.

Diskussion

Abbildung 27 zeigt die ¹H-NMR-Spektren von Kraft-Lignin vor und nach der Acetylierung. Hydroxyl-Gruppen werden durch die Reaktion in Acetyl-Gruppen umgewandelt. Das Spektrum der unmodifizierten Ligninprobe L2 zeigt im Bereich von 8,2ppm bis 9,5ppm noch deutliche Hydroxyl-Signale, welche im Spektrum der acetylierten Probe L2_AC nicht mehr aufscheinen. Die gebildeten Acetylgruppen führen im Spektrum der acetylierten Ligninprobe zu den Peaks zwischen 2,4ppm bis 1,6ppm, welche im Spektrum der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe noch nicht vorhanden sind.

Acetylierung:

Das Spektrum der doppelt acetylierten Ligninprobe (L2acet_AC) (siehe Abbildung 29) unterscheidet sich kaum von jenem der einfach acetylierten Probe (L2_AC) (siehe Abbildung 28). Auch die prozentuelle Auswertung der Bereiche zeigt keine Unterschiede zwischen diesen Ligninpräparaten.

Methylierung:

Die Methoxyl Region in der Probe L2met_AC steigt von 22% (L2_AC) auf 51%. Gleichzeitig sinkt die Konzentration der Acetylgruppen in der methylierten Probe im Vergleich zur Kraft-Ligninprobe L2_AC („Aromatische acetyl Region“ von 16% auf 4% und die „Aliphatische acetyl Region“ von 24% auf 11%). Abbildung 31 zeigt die Spektren von Kraft-Lignin_AC vor und nach der Methylierung. Deutlich zu erkennen ist der Anstieg der Methoxylregion und das Verschwinden des aromatischen Acetylpeaks im Spektrum der methylierten Probe L2met_AC. Da die Konzentration der Acetylgruppen der aufgenommenen Spektren der Konzentration der Hydroxylgruppen in den Ligninpräparaten entspricht, sind die Veränderungen der Konzentrationen der oben erwähnten Bereiche verständlich. Durch die

Methylierung der Kraft-Ligninprobe werden Hydroxylgruppen in Methoxygruppen umgewandelt. Die restlichen Bereiche der methylierten Probe unterscheiden sich kaum von den Bereichen der unmodifizierten Probe. Das Ergebnis spiegelt eine erfolgreiche Methylierung der Probe wieder.

Reduktion-Acetylierung:

Das Spektrum der reduzierten acetylierten Ligninprobe (siehe Abbildung 32) unterscheidet sich kaum von jenem der acetylierten Probe (siehe Abbildung 28). Die erfolgreiche Acetylierung erkennt man an den beiden Acetylpeaks (im Bereich von 2,4ppm bis 1,6ppm) und dem Fernbleiben von Hydroxylpeaks (im Bereich von 8,2ppm bis 9,5ppm) im Spektrum der reduzierten acetylierten Ligninprobe. Durch die Reduzierung mit anschließender Acetylierung der Kraft-Ligninprobe konnten Verunreinigungen entfernt werden. (siehe Abbildung 33) Im Spektrum der Kraft-Ligninpräparate L2_AC und L2acet_AC treten bei ca. 8,6ppm und 1,9ppm Peaks auf, welche nicht der Ligninstruktur zuzuordnen sind. Das Signal bei ca. 8,6ppm stammt mit großer Wahrscheinlichkeit von freien Säuren in den Ligninpräparaten. Der scharfe Peak bei ca. 1,9ppm ist Essigsäureanhydrid, welche zur Acetylierung der Proben verwendet wird, zuzuordnen. Diese Verunreinigungen werden durch die Modifizierung Reduktion/Acetylierung entfernt.

^1H Spektren:

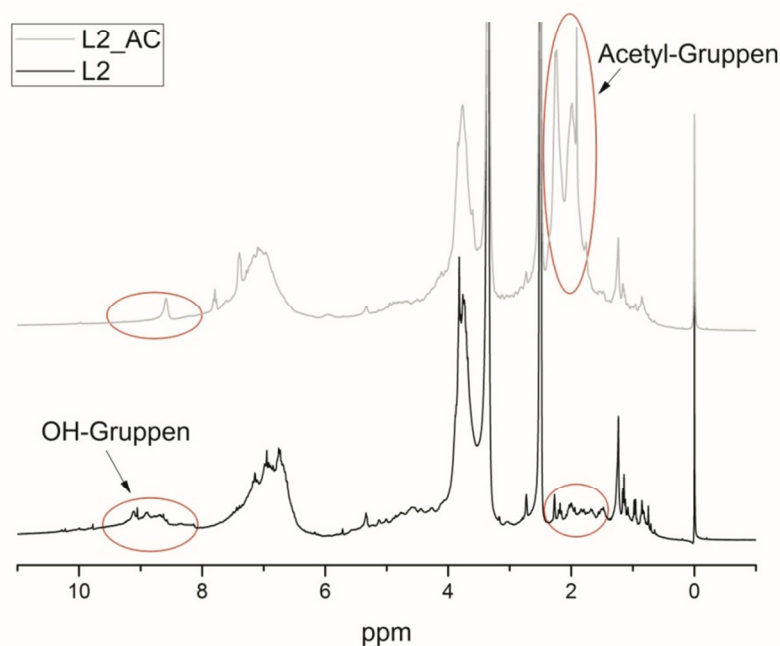


Abbildung 27: ^1H -NMR-Spektren L2 vor und nach der Acetylierung

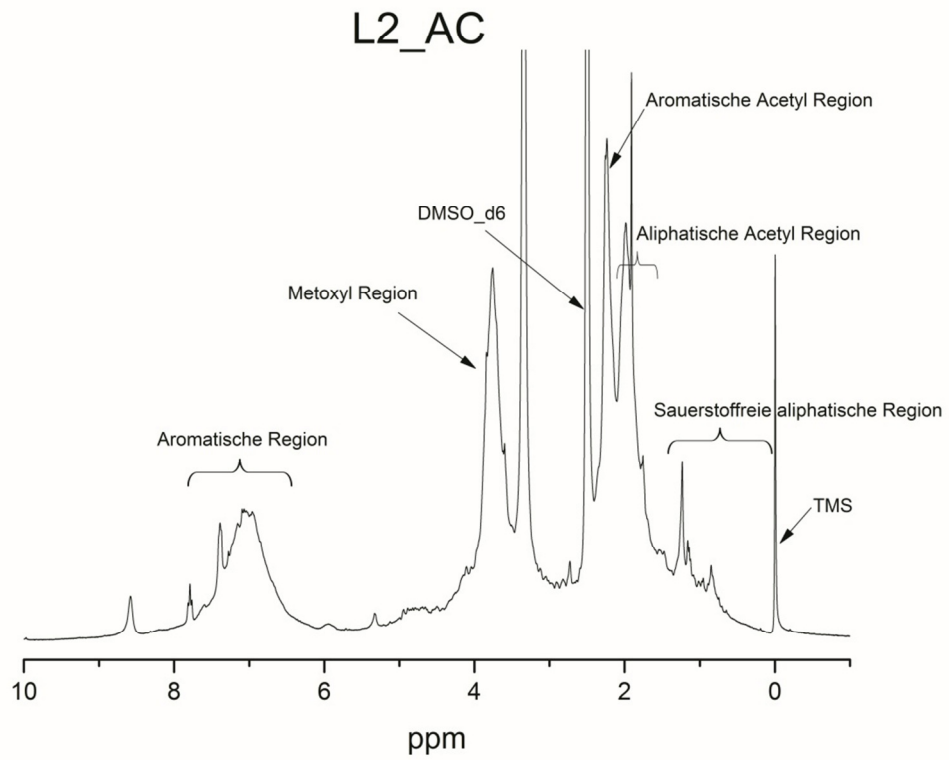


Abbildung 28: ^1H -NMR-Spektrum von L2_AC

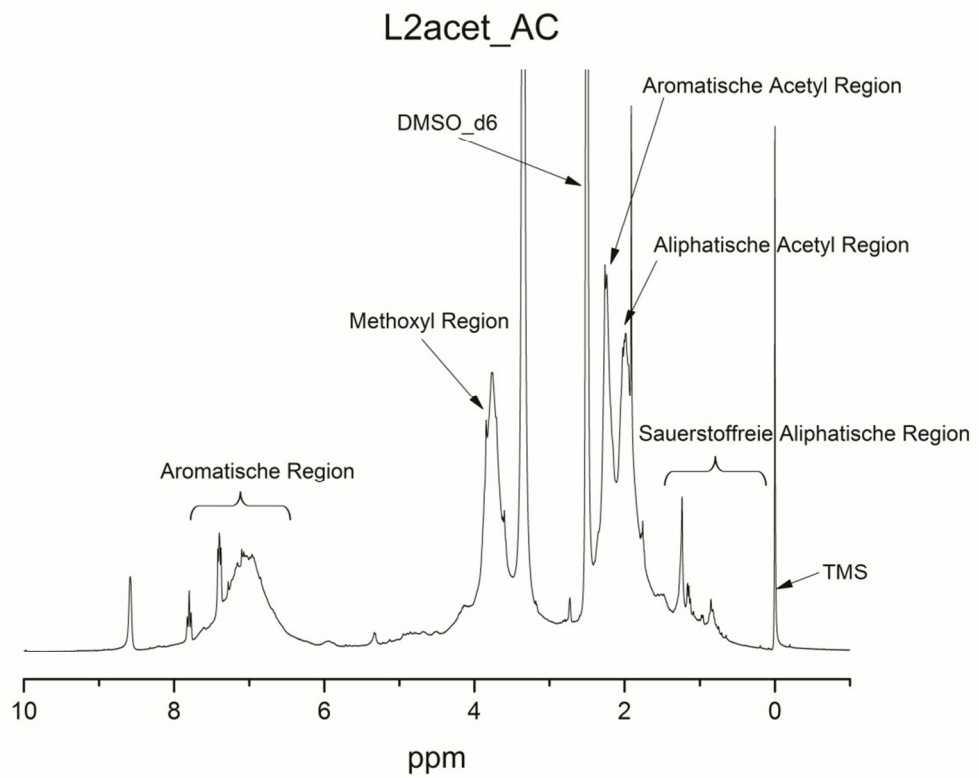


Abbildung 29: ^1H -NMR-Spektrum von L2acet_AC

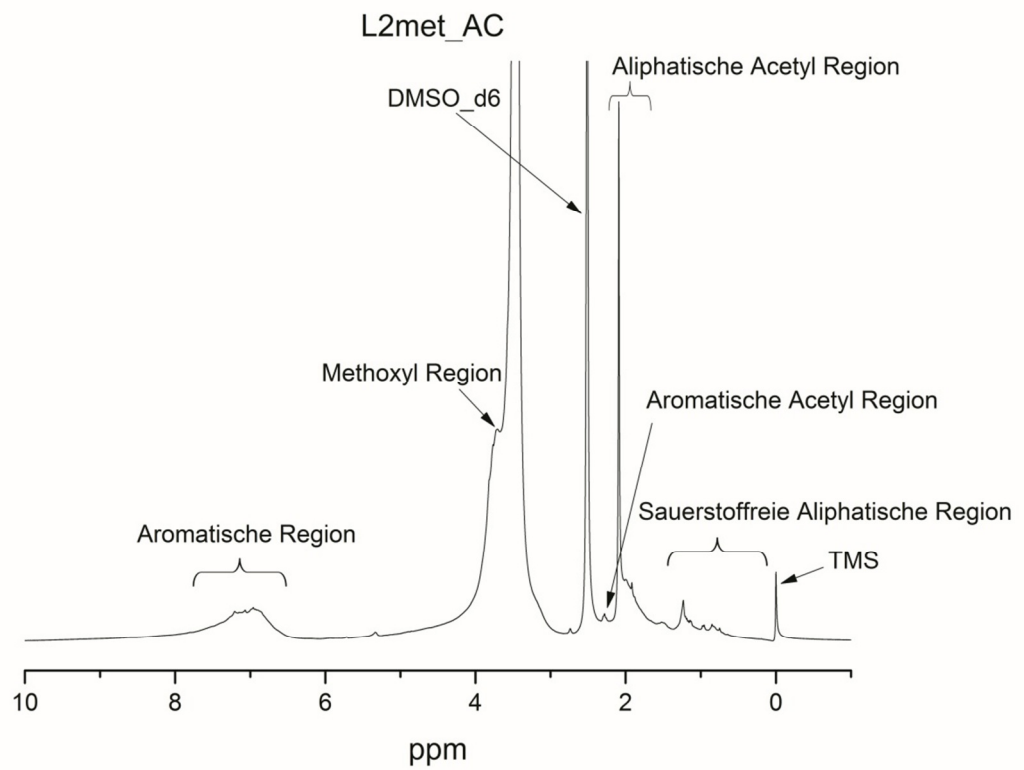


Abbildung 30: ^1H -NMR-Spektrum von L2met_AC

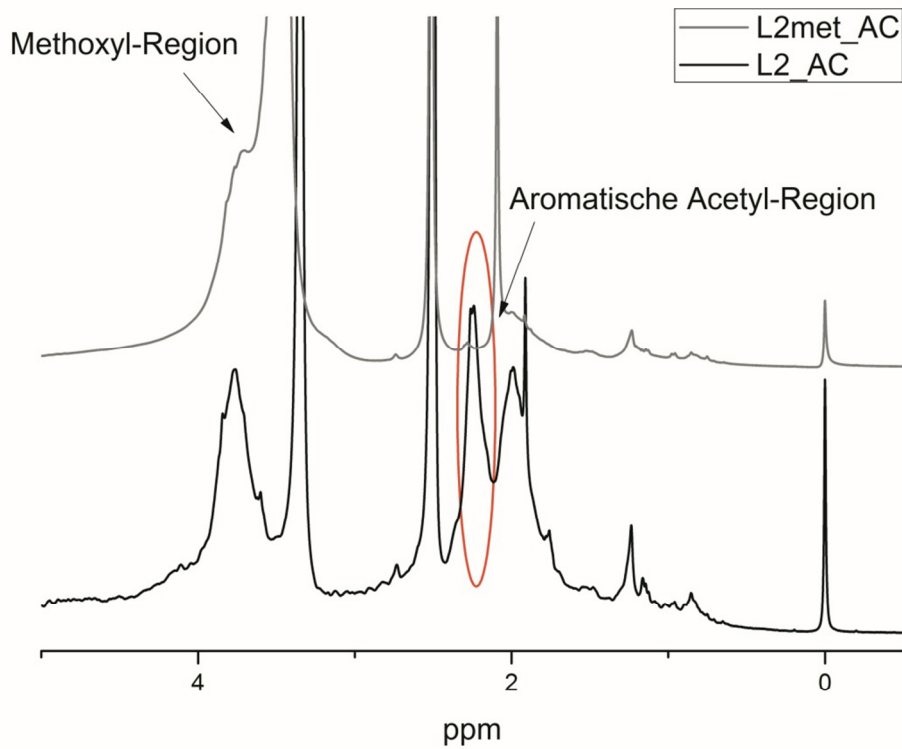


Abbildung 31: ^1H -NMR-Spektren L2 vor und nach der Methylierung

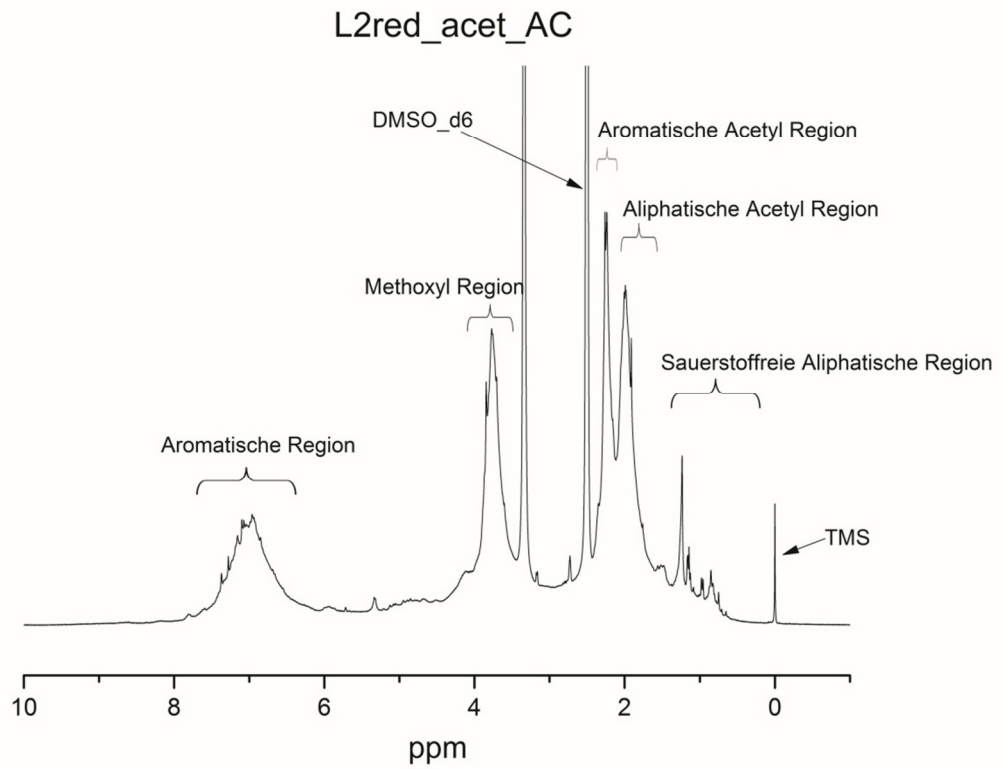


Abbildung 32: ^1H -NMR-Spektrum von L2red_acet_AC

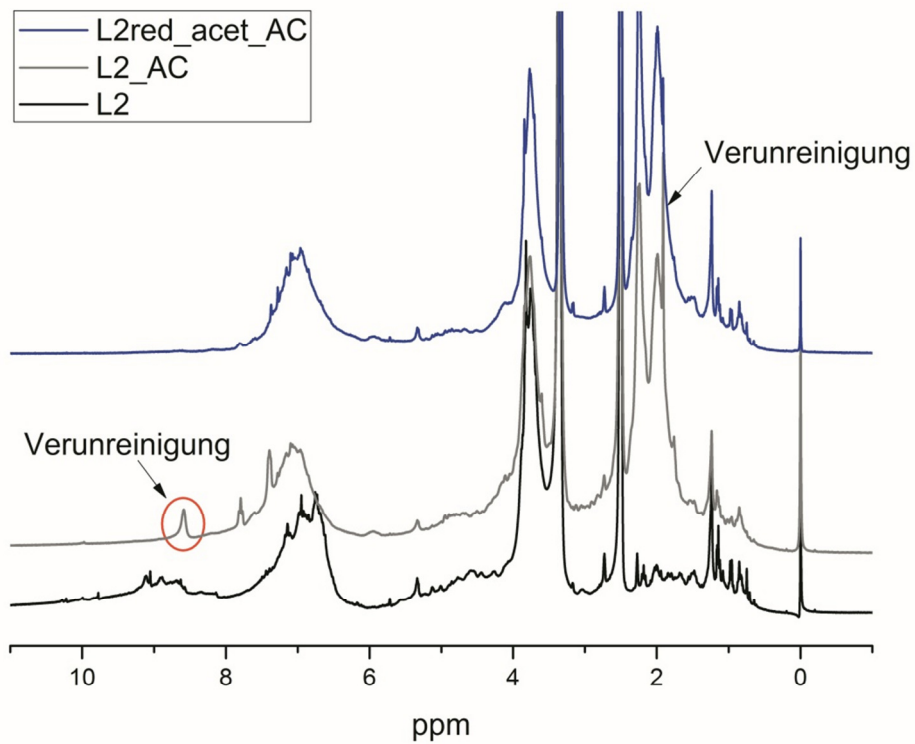


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektren L2, L2_AC und L2red_acet_AC

4.2.4. Zusammensetzung der L2-Ligninpräparate

Klason Ligningehalt

Die Klason Ligningehalte der Ligninpräparate (L2-Reihe) sind in Tabelle 17 aufgelistet und in Abbildung 34 graphisch als Balkendiagramm dargestellt.

Tabelle 17: Klason Lignin Gehalt der L2-Reihe

Probe	Klason Lignin [%]	Standardabweichung
L2	89,9	0,2
L2acet	69,4	0,8
L2met	93,6	1,1
L2red_acet	39,5	4,5

Diskussion

Der Klason Ligningehalt der unmodifizierten Probe L2 beträgt ca. 90%. Durch die Modifizierungen verringert sich der Klason Ligningehalt der Proben. Besonders drastisch ist die Verringerung nach der der Reduktion-Acetylierung von L2. Der Klason Ligningehalt dieser Probe sinkt auf ca. 40%. Eine Ausnahme stellt die Probe L2met dar. Der Klason Ligningehalt steigt hier auf 94%.

Bestimmung des säurelöslichen Lignins von L2red_acet

Der sehr niedrige Klason Ligningehalt der Probe L2red_acet ist der Anlass zur Bestimmung des Gehaltes an säurelöslichem Lignin in dieser Probe.

Der Gehalt an säurelöslichem Lignin in der Probe L2red_acet beträgt 30,4%.

Diskussion

Addiert man die beiden ermittelten Ligningehalte (säureunlösliches und säurelösliches Lignin) der Probe, so erhält man einen totalen Ligningehalt von 69,9%. Dieser Wert liegt im Bereich der restlichen modifizierten Ligninpräparate.

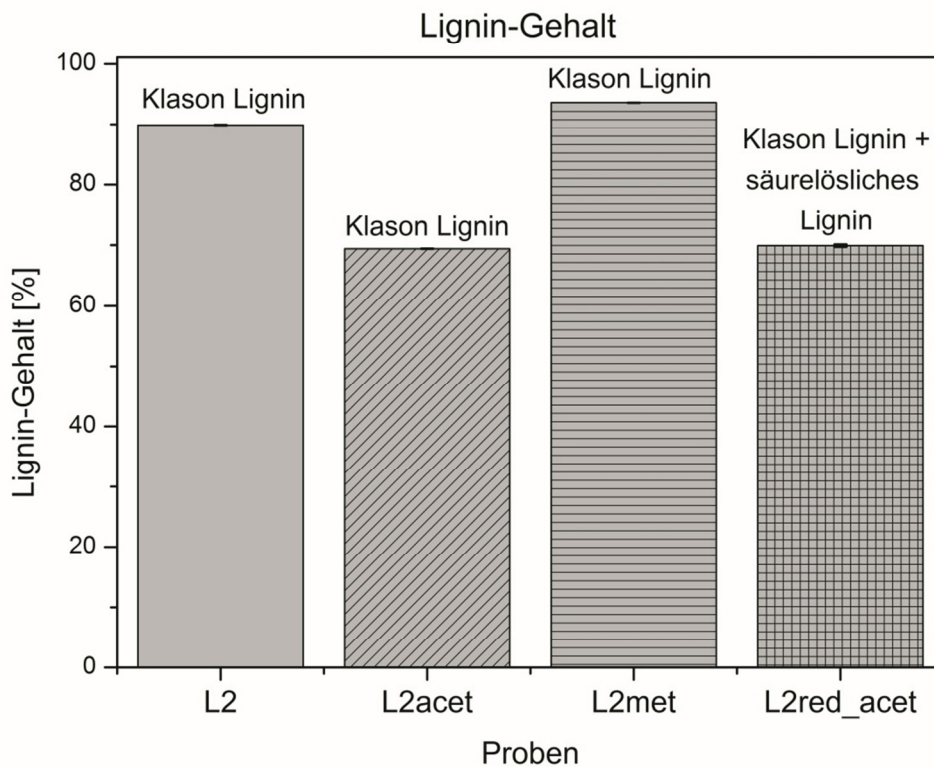


Abbildung 34: Ligningehalt der L2-Reihe

Elementaranalyse und Sauerstoff-Bestimmung

Die Ergebnisse der Elementaranalyse (C-, H-, N-, S-Gehalt) sowie des berechneten Sauerstoffgehaltes der Ligninpräparate (L2-Reihe) sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Berechnung der empirischen Formel der Phenylpropaneinheit, Mw der Phenylpropaneinheit und des Methoxylgruppen-Gehaltes

Mit Hilfe der Daten der Elementaranalyse und $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie der acetylierten Proben kann eine empirische Formel für die Ligninpräparate vorgeschlagen werden. Außerdem kann das Massenmittel (M_w) der Phenylpropaneinheit und der Methoxylgruppen-Gehalt berechnet werden (Tabelle 18) (82).

Tabelle 18: Elementaranalyse, Empirische Formel und Mw der Phenylpropaneinheit und Methoxyl-Gehalt der Proben der L2-Reihe

Probe	Elementarzusammensetzung				Empirische Formel der Phenylpropan-Einheit	Mw der Phenylpropan-Einheit [g/mol]	OCH ₃ [%]
	C [%]	H [%]	S [%]	O*[%]			
L2	62,31	5,04	2,83	29,6	C ₉ H _{7,22} S _{0,17} O _{2,75} (OCH ₃) _{0,66}	185	12
L2met	66,91	6,60	1,75	24,6	C ₉ H _{6,44} S _{0,10} O _{0,84} (OCH ₃) _{1,81}	187	35
L2acet	58,21	5,14	1,62	34,7	C ₉ H _{8,11} S _{0,10} O _{3,64} (OCH ₃) _{0,64}	198	11
L2red_acet	38,61	4,60	0,83	27,2	C ₉ H _{11,27} S _{0,09} O _{4,31} (OCH ₃) _{0,87}	218	10

*berechnet mit Hilfe des Aschegehaltes und der Elementarkonzentrationen

Diskussion

Die methylierte Probe (L2met) weist den höchsten Gehalt an Methoxylgruppen auf (35%). Dieses Ergebnis zeigt auch die empirisch berechnete Formel der Phenylpropan-Einheit.

Durch die Acetylierung und die Reduktion-Acetylierung steigt der Sauerstoffgehalt der empirischen Formel der Phenylpropan-Einheit in den Proben.

Alle Modifizierungen zeigen eine Reduktion des Schwefelgehalts. Das beste Ergebnis erzielt die reduzierte-acetylierte Probe. Der Schwefelgehalt sinkt von 2,83% in der unmodifizierten Probe auf 0,83% in der reduzierten-acetylierten Probe.

Die Molekulargewichte der Phenylpropan-Einheit steigen durch die Modifizierungen. Das Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmungen der Proben mittels GPC und Viskosimetrie wird dadurch gestärkt.

4.2.5. Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften

DPPH-Test: Bestimmung der radikalfangenden Eigenschaften

Die antioxidative Aktivität der Ligninpräparate wird an deren Fähigkeit DPPH Radikale zu reduzieren gemessen. Zusätzlich wird die ermittelte Aktivität mit Irganox 1010, einem

kommerziell erwerblichen Antioxidans hauptsächlich verwendet in der Polymerchemie, verglichen.

Die gemessenen Absorptionswerte bei 518nm ergeben mit Hilfe des Lambert-Beerschem Gesetz (9) die Restkonzentration an DPPH Radikalen in den Lösungen.

$$c(DPPH) = \frac{A(Absorption)}{b(Schichtdicke) \cdot a(Absorptionskoeffizient)} \quad (9)$$

Die erstellte Kalibrationskurve mit Irganox 1010 zur Aufklärung der Stöchiometrie der Reaktion ist in Abbildung 35 dargestellt.

Gleichung 10 gibt das Molenverhältnis an verbrauchtem Irganox 1010 pro reduziertem DPPH Radikal an.

$$c(Irganox\ 1010) = c(DPPH) \cdot \frac{\gamma(Irganox\ 1010)}{\gamma(DPPH)} \quad (10)$$

Gleichung 10 sowie die Kalibrationskurve (Abbildung 35) ergeben ein Verhältnis von 0,2 Mol Irganox 1010 zu 1 Mol DPPH. Das bedeutet 1 Mol Irganox 1010 ist fähig 4 Mol DPPH zu reduzieren. Da in einem Mol Irganox 1010 4 Hydroxylgruppen vorhanden sind, kann man davon ausgehen, dass eine Hydroxylgruppe die Fähigkeit besitzt eine Mol DPPH zu reduzieren.

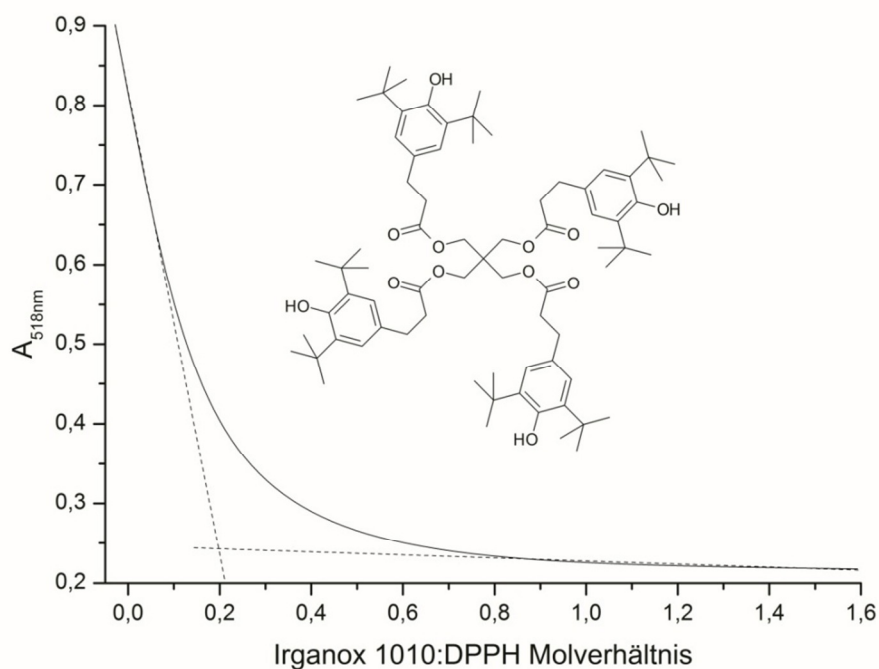


Abbildung 35: Kalibrationskurve des DPPH-Tests

Abbildung 36 zeigt die gemessene Absorption (518nm) während der Reaktion einer 56 µM DPPH Lösung mit einer Irganox 1010 Lösung (11,6 mg/L, blaue Kurve), einer Kraft-Lignin L2 Lösung (12,8 mg/L, rote Kurve) und einer Blank Lösung (reines DMSO, schwarze Kurve) nach der Zeit [min].

Die antioxidative Aktivität der Ligninpräparate ist in Tabelle 19 als Irganox 1010 equivalent antioxidant capacity (IEAC) angegeben, um die Ligninpräparate mit einem kommerziell erwerblichen Antioxidans zu vergleichen. Dieser Wert entspricht der Menge an Irganox 1010 dessen antioxidative Aktivität äquivalent zu 1g Ligninpräparat ist.

Tabelle 19: IEAC Werte der Ligninpräparate der L2-Reihe

Probe	IEAC [g(Irganox 1010)/g(Probe)]
L2	0,81
L2acet	0,06
L2met	0,09
L2red_acet	0,04

Diskussion

Unmodifiziertes Kraft-Lignin L2 zeigt antioxidative Eigenschaften im DPPH Test. Verglichen mit der antioxidativen Aktivität von Irganox 1010, schneidet Kraft-Lignin L2 nach 4 Stunden nur etwas schlechter ab (0,81g Irganox 1010 zeigen die äquivalente antioxidative Aktivität wie 1g Kraft-Lignin L2). Wie aus Abbildung 36 hervor geht, zeigen die Irganox 1010- und die Kraft-Lignin L2- Lösungen verschiedene Kinetiken. Während Irganox 1010 in den ersten 60 Minuten einer starke antioxidative Aktivität zeigt, die sich in den darauffolgenden Minuten verringert, aber doch eine konstante Abnahme der Absorption bewirkt, weist die Kraft-Ligninprobe L2 eine über den gesamten Zeitbereich konstante Verringerung der Absorption auf.

Durch die Modifizierungen von Kraft-Lignin L2 und damit einhergehend den strukturellen Veränderungen in der Probe verlieren die Präparate die antioxidative Wirkung. Da durch die Modifizierungen Hydroxylgruppen umgewandelt und verringert werden, wird die antioxidative Aktivität der Kraft-Lignin L2 Probe auf diese funktionelle Gruppe zurückgeführt.

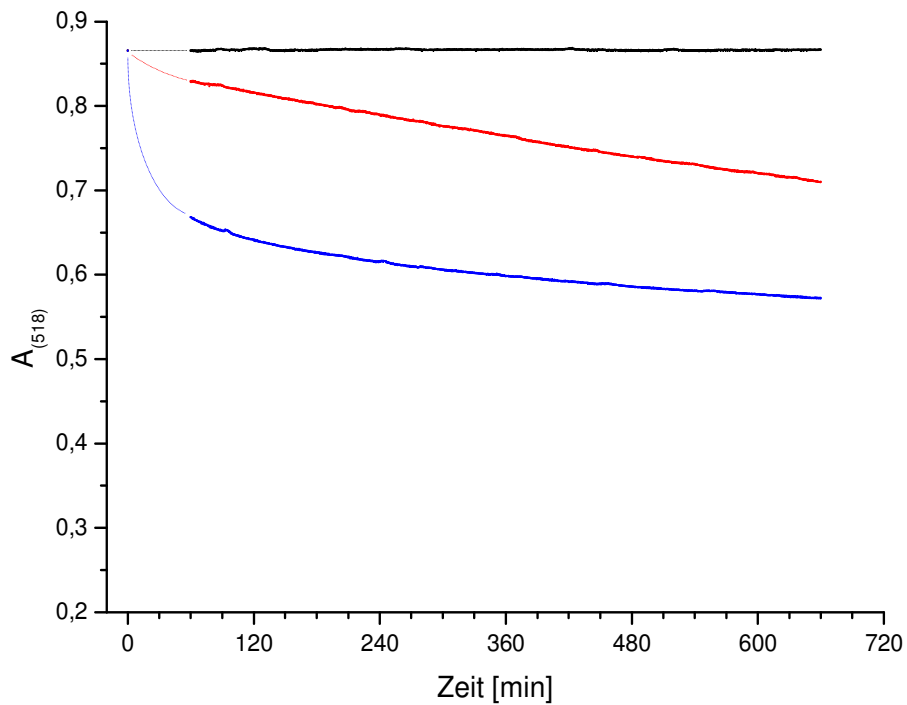


Abbildung 36: Absorption (518nm) - Zeit Kurve einer Iragnox 1010- (blau), Kraft-Lignin L2- (rot) und Blank- (schwarz) DPPH Lösung

4.2.6. Charakterisierung der antibakteriellen Eigenschaften

Bouillondilutionstest

Durch die Absorptionsmessung der Proben-Bakterien-Lösungen und einer Bakterienlösung ohne Probe (Blank) bei 600nm kann die Reduktion des Bakterienwachstums der Ligninproben (L2-Reihe) bestimmt werden. Die berechneten Reduktionswerte der Ligninpräparate sind für die Bakterienstämme Escherichia coli und Staphylococcus aureus in Tabelle 20 zusammengefasst und graphisch als Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 37).

Tabelle 20: berechnete Reduktion des Bakterienwachstums

Probe	Reduktion [%]	Standardabweichung	Reduktion [%]	Standardabweichung
	St. aureus		E. coli	
Blank	-	-	-	-
L2	-	-	-	-
L2acet	70,6	0,04	-	-
L2met	-	-	-	-
L2red_acet	92,9	0,02	23,6	0,009

Diskussion

Die unmodifizierte Ligninprobe (L2) zeigt weder gegen den Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* (grampositiv) noch gegen den Bakterienstamm *Escherichia coli* (gramnegativ) antibakterielle Wirkung.

Auch die methylierte Kraft-Ligninprobe (L2met) weist keine Reduktion des Bakterienwachstumes der beiden Bakterienstämme auf.

Die acetylierte Ligninprobe (L2acet) sowie die reduzierte-acetylierte Ligninprobe (L2red_acet) reduzieren das Bakterienwachstum von *Staphylococcus aureus* in den Probenlösungen (L2acet:72% Reduktion und L2red_acet: 93% Reduktion).

Die Bakterien des Typs *Escherichia coli* (gramnegativ) sind gegenüber den Ligninproben sehr resistent. Antibakterielle Wirkung zeigt hier einzig die Probe L2red_acet (24% Reduktion).



Abbildung 37: Reduktion des Bakterienwachstums der Ligninpräparate der L2-Reihe im Bouillondilutionstest

4.2.7. Resümee

Folgende Modifizierungen von Kraft-Lignin isoliert aus Schwarzlaugelösung können dargestellt werden:

Die Methylierung von Kraft-Lignin wandelt mit Hilfe von Dimethylsulfat Hydroxyl- in Methoxygruppen um. Die erfolgreich abgelaufene Reaktion wird durch die Ergebnisse der ATR-IR-, der $^1\text{H-NMR}$ -Messung sowie der Daten der Elementaranalyse gezeigt. Das Spektrum der ATR-IR-Messung zeigt deutliche Absorptionsbanden, die Methoxylschwingungen zuzuordnen sind. Zudem wird die Absorptionsbande der OH-Schwingung im Vergleich zum Spektrum der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe deutlich schwächer. Die Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ Daten untermauert dieses Ergebnis. Die Konzentration der Methoxygruppen in der methylierten Probe steigt und die Konzentration an Hydroxylgruppen sinkt im Vergleich zu jener der unmodifizierten Ligninprobe. Die Berechnungen an Hand der Ergebnisse der Elementaranalyse weisen für die methylierte Ligninprobe eine erhöhte Konzentration an Methoxygruppen im Vergleich zu Kraft-Lignin L2 auf.

Die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid von Kraft-Lignin wandelt Hydroxyl- in Acetylgruppen um. Die erfolgreich abgelaufene Reaktion wird durch die Ergebnisse der ATR-IR-Messung, der $^1\text{H-NMR}$ -Messung sowie der Daten der Elementaranalyse gezeigt. Das Spektrum der IR-Messung zeigt, im Vergleich zur unmodifizierten Kraft-Ligninprobe, eine sehr schwache OH-Absorption und stark ausgeprägte Carbonyl- und Esterbanden. Die Elementaranalyse zeigt für die acetylierte Ligninprobe, im Vergleich zur unmodifizierten Ligninprobe, einen erhöhten Gehalt an Sauerstoff in der Probe. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der unmodifizierten Ligninprobe L2 zeigt deutliche Hydroxyl-Signale, welche im Spektrum der acetylierten Probe nicht mehr aufscheinen. Die gebildeten Acetylgruppen führen im Spektrum der acetylierten Ligninprobe zu den Peaks zwischen 2,4ppm bis 1,6ppm, welche im Spektrum der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe noch nicht vorhanden sind.

Die an die Reduktion mit Natriumborhydrid anschließende Acetylierung der Kraft-Ligninprobe L2 zeigt annähernd dieselben Ergebnisse wie die acetylierte Ligninprobe. Verunreinigungen (freie Säuren und Essigsäureanhydrid von der Acetylierung) können aber durch diese Modifizierung aus der Ligninprobe entfernt werden (siehe $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von L2red_acet_AC).

Durch die Modifizierungen des Kraft-Lignins werden funktionelle Gruppen in die Ligninstruktur eingebaut und das Molekulargewicht der Präparate steigt. Die Erhöhung des Molekulargewichtes der modifizierten Proben im Vergleich zum unmodifizierten Kraft-Lignin

L2 bestätigen die Gelpermeationschromatographie, die Viskositätsmessung sowie die Berechnung mit Hilfe der Daten der Elementaranalyse.

Antioxidative Eigenschaften im DPPH-Test zeigt einzig die unmodifizierte Kraft-Ligninprobe. Laut Literatur (55) (47) (56) sind phenolische Hydroxylgruppen für die radikalfangende Eigenschaft einer Substanz verantwortlich. Da durch die Modifizierungsreaktionen diese phenolischen Hydroxylgruppen umgewandelt werden, erklärt sich die fehlende antioxidative Wirkung der modifizierten Ligninpräparate. Das niedrige Molekulargewicht der Kraft-Ligninprobe L2 spielt ebenfalls eine Rolle für die antioxidative Aktivität (47).

Antibakterielle Eigenschaften hingegen weisen modifizierte Ligninpräparate auf. Ligninpräparate nach der Acetylierung sowie der Reduktion/Acetylierung zeigen eine Reduktion des Bakterienwachstumes gegenüber dem grampositiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus*. Das Wachstum des sehr resistenten gramnegativen Bakterienstammes *Escherichia coli* kann nur von der reduzierten-acetylierten Ligninprobe reduziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Einbringen von Acetylgruppen in Kraft-Lignin die antibakteriellen Eigenschaften verbessert.

4.3. Modifizierung der molekularen Eigenschaften von Kraft-Lignin und Kombination mit Modifizierungen

Um die molekularen Eigenschaften von Kraft-Lignin präzipitiert aus Schwarzlauge zu verändern, erfolgt eine Extraktion des Kraft-Lignins in verschiedenen Lösungsmitteln. Durch die Extraktion werden unterschiedliche Lignin-Fractionen erhalten (siehe 4.3.1.). Eine weitere Möglichkeit, die molekularen Eigenschaften des Kraft-Lignins zu verändern ist die Modifizierung mit dem Enzym Laccase (siehe 4.3.2.).

4.3.1. Lösungsmittlextraktion

Die Ausbeuten von Kraft-Lignin nach der Extraktion in den Lösungsmitteln sind in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21: Ausbeuten der Proben (L2-Reihe) nach der Lösungsmittlextraktion

Verwendete Lösungsmittel	Polaritätsindex	Hildebrand Löslichkeits Parameter [MPa] ^{1/2}	Ausbeute [%] L2
Aceton	5,1	19,7	41
Dichlormethan	3,1	20,2	4
1,4-Dioxan	4,8	20,5	48
Methanol	5,1	29,7	46
Tetrahydrofuran	4	18,5	72

4.3.1.1. Charakterisierung der extrahierten Ligninpräparate

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Ergebnisse (Zahlenmittel (Mn), Massenmittel (Mw), Polydispersitätsindex (PDI)) der extrahierten Ligninproben (L2_LM-Reihe) werden in Tabelle 22 zusammengefasst. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen sind in den Abbildungen 38 und 39 die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt.

Tabelle 22: Ergebnisse der GPC für die extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)

Probe	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	PDI (Mw/Mn)
L2	950	1560	1,6
L2_Aceton	1030	1800	1,7
L2_DCM	750	940	1,3
L2_Dioxan	1150	3070	2,7
L2_MeOH	910	1300	1,4
L2_THF	1170	3150	2,7

Diskussion

Die Extraktion von Kraft-Lignin in verschiedenen Lösungsmitteln führt zu einer Veränderung der Molekül-Architektur. Hyperverzweigungen und Vernetzungen können hervorgerufen werden und führen zu einer Veränderung der molekularen Struktur von Kraft-Lignin. Die durchgeführten Extraktionen mit den verschiedenen Lösungsmitteln (Tabelle 22) führen größten Teils zur Verschiebung des Molekulargewichts und des PDIs zu höheren Werten (bei Aceton, Dioxan und Tetrahydrofuran). Die Extraktionen in Dichlormethan und Methanol hingegen zeigen ein entgegengesetztes Ergebnis. Die Molekulargewichte (Zahlen- und Massenmittel) und der PDI können durch die Extraktionen in den beiden Lösungsmitteln gesenkt werden. Da die Ausbeute an extrahiertem Kraft-Lignin in Dichlormethan nur bei 4% liegt, wird für die weiteren Durchführungen Methanol ausgewählt. Die Ausbeute an extrahiertem Kraft-Lignin in Methanol beträgt 46% und ist damit ausreichend für weitere Untersuchungen.

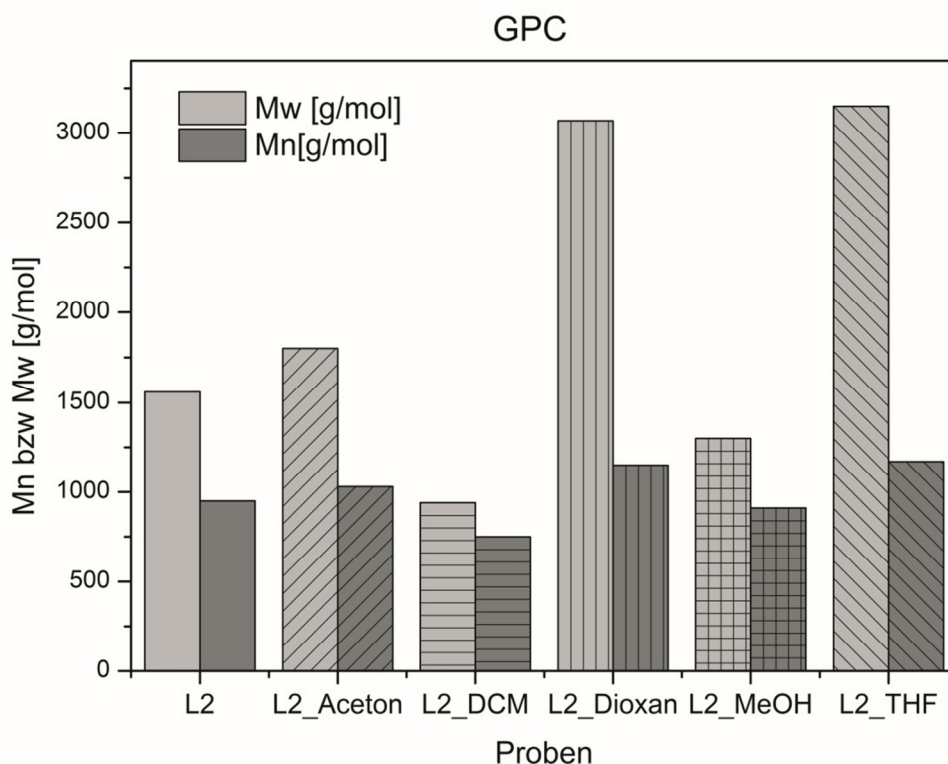


Abbildung 38: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte der extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)

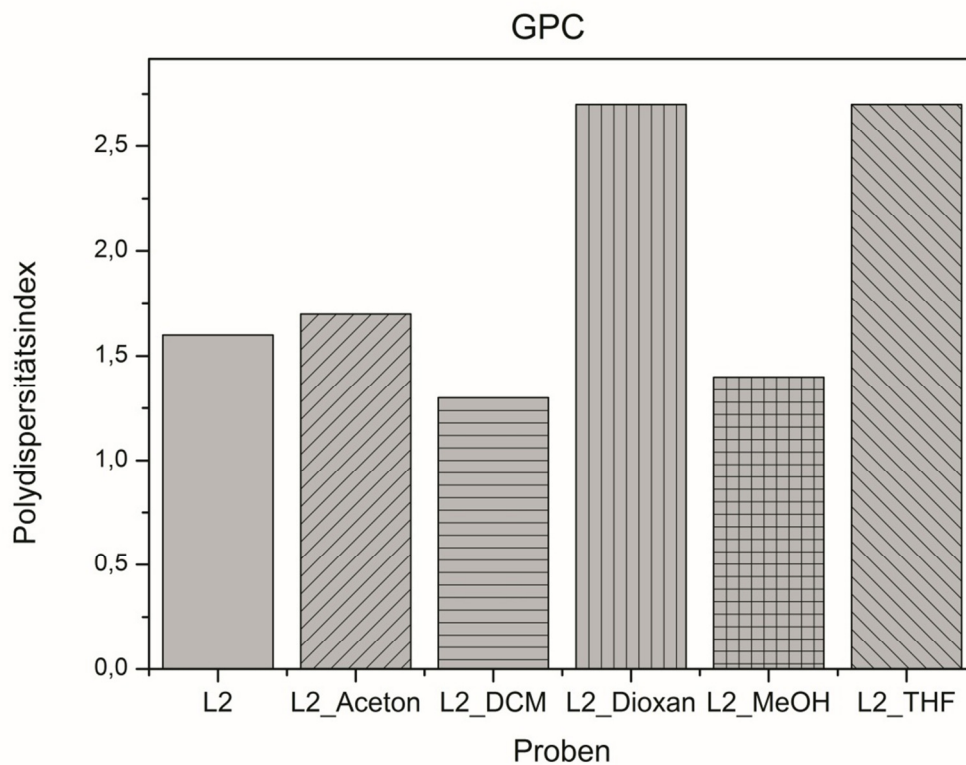


Abbildung 39: Balkendiagramm der PDI Werte der extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)

Thermogravimetrie (Thermogravimetrische Analyse (TG) und DTG)

Die Ergebnisse des thermischen Abbaus der extrahierten Ligninproben (L2_LM-Reihe) sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse der extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)

Probe	TG			DTG	
	T(onset) [°C]	Gewichtsverlust [%]	T(end) [°C]	T(max) [°C]	T(max) [%/min]
L2	278	50	415	372	3,02
L2_Aceton	296	55	425	386	3,57
L2_DCM	249	78	431	387	4,32
L2_Dioxan	128	5	180	149	0,24
L2_MeOH	285	52	422	380	3,39
L2_THF	254	55	426	378	2,88

Diskussion

Die thermischen Eigenschaften von Kraft-Lignin können durch zwei Lösungsmittelextraktionen verbessert werden. Die Extraktion von Kraft-Lignin in Aceton führt zu einer Erhöhung der Onset-Temperatur auf 296°C und der Zersetzungstemperatur auf 425°C gegenüber dem unmodifizierten Kraft-Lignin. Auch die Extraktion von Kraft-Lignin in Methanol führt zu einer Steigerung der thermischen Eigenschaften. Der thermische Abbau der extrahierten Kraft-Ligninprobe L2_MeOH startet bei einer Temperatur von 285° und endet bei einer Zersetzungstemperatur von 422°C.

Alle anderen Lösungsmittelextraktionen verschlechtern die thermischen Eigenschaften des Kraft-Ligninpräparates und verschieben den thermischen Abbau der Probe zu niedrigeren Temperaturen.

4.3.2. Enzymatische Modifizierung von Kraft-Lignin mit Laccase

Die Ausbeuten von Kraft-Lignin L2 nach der enzymatischen Modifizierung sind in Tabelle 24 aufgelistet.

Tabelle 24: Ausbeuten von Kraft-Lignin L2 nach der enzymatischen Modifizierung

Probe	Ausbeute [%]
L2_B	92,5
L2_1	73,7
L2_2	81,0
L2_3	85,8
L2_4	92,7

4.3.2.1. Charakterisierung der enzymatisch modifizierten Ligninpräparate

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Ergebnisse (Zahlenmittel (Mn), Massenmittel (Mw), Polydispersitätsindex (PDI)) der enzymatisch modifizierten Ligninproben werden in Tabelle 25 zusammengefasst. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen sind in den Abbildungen 40 und 41 die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt.

Tabelle 25: Ergebnisse der GPC für die enzymatisch modifizierten Ligninpräparate

Probe	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	PDI (Mw/Mn)
L2_Blank	1070	1970	1,8
L2_1	1130	2420	2,1
L2_2	1130	2340	2,1
L2_3	1170	2440	2,1
L2_4	1270	2930	2,3

Diskussion

Durch die Reaktion des Kraft-Ligninpräparates L2 mit dem Enzym Laccase wird sowohl das Molekulargewicht als auch der PDI vergrößert. Je länger das Enzym in der Probe aktiv ist, desto größer werden das Molekulargewicht und der PDI. Dieses Ergebnis wird durch die Ausbeuten (Tabelle 24) der Ligninpräparate nach der enzymatischen Modifizierung bestätigt. Je länger die Reaktionszeit des Enzymes mit der Probe, desto größer wird die Ausbeute in Gramm.

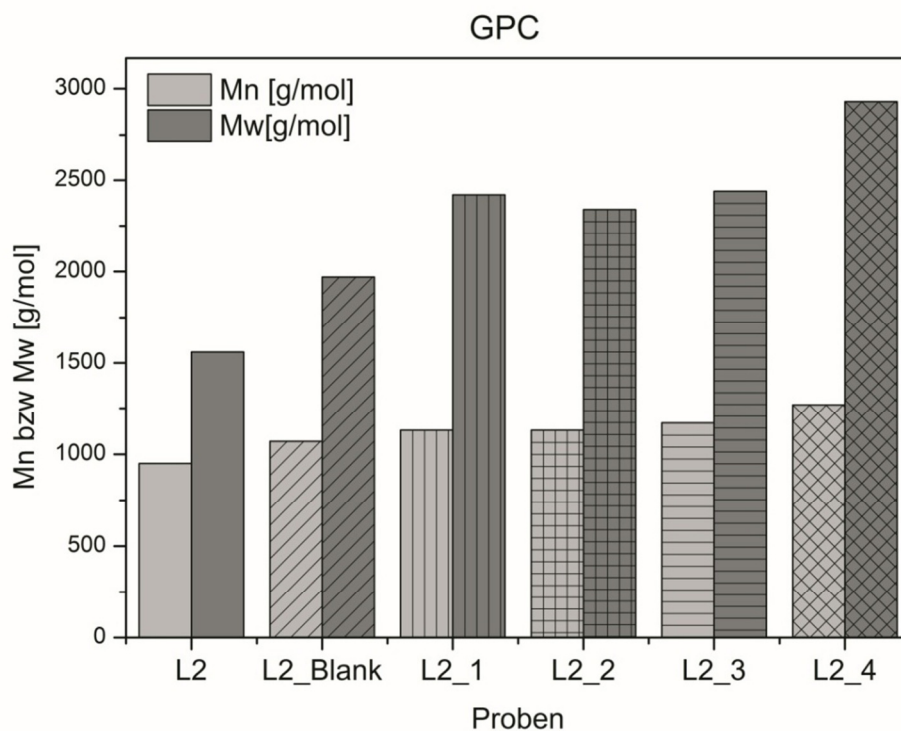


Abbildung 40: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte der enzymatisch modifizierten Ligninpräparate

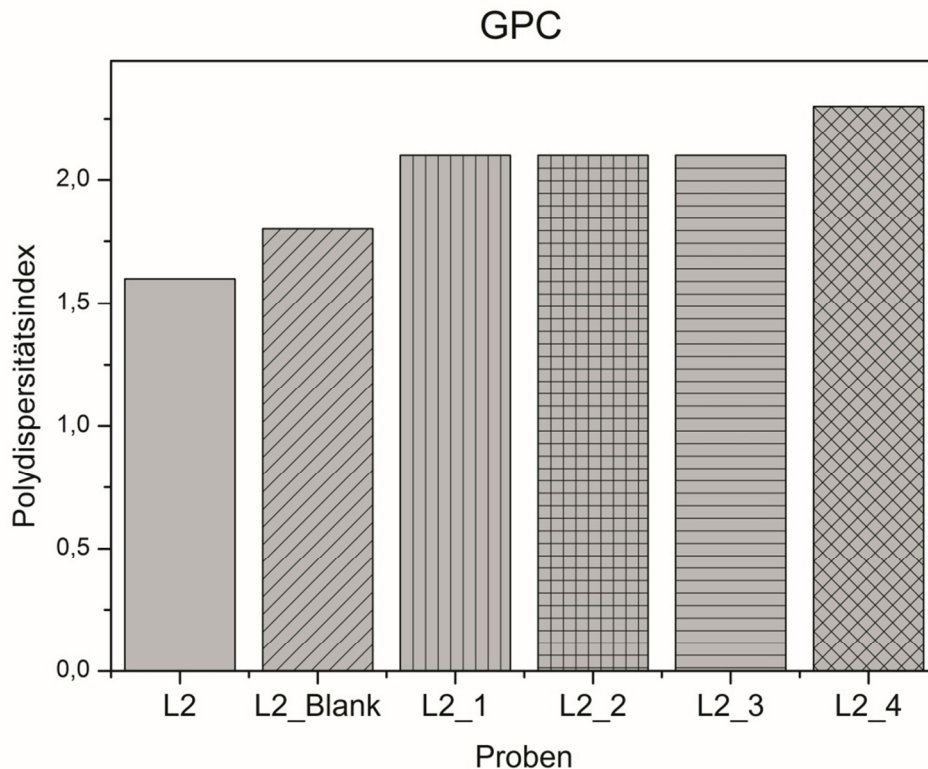


Abbildung 41: Balkendiagramm der PDI Werte der enzymatisch modifizierten Ligninpräparate

4.3.3. Kombination der Modifizierungen

Kombination der Reduktion-Acetylierung mit der Extraktion in Methanol

Durch Kombination der durchgeführten Modifizierungen soll antibakterielles Kraft-Lignin mit einem niedrigen Molekulargewicht und einer engen Molekulargewichtsverteilung dargestellt werden.

Die antibakteriellen Testungen der Ligninpräparate der L2 Reihe zeigen für die reduzierte-acetylierte Ligninprobe L2red_acet die besten Ergebnisse. Dieses Ligninpräparat zeigt eine Reduktion des Bakterienwachstumes von *Staphylococcus aureus* von 93% und als einziges getestetes Ligninpräparat eine Reduktion des Bakterienwachstumes von *Escherichia coli* von 24%. Molekulargewichtsbestimmungen der Probe L2red_acet weisen aber auch eine deutliche Steigerung des Molekulargewichts der Probe im Vergleich zur unmodifizierten Kraft-Ligninprobe L2 auf.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Extraktion von Kraft-Lignin in Methanol zu einer Verringerung des Molekulargewichtes und des PDI im Vergleich zur Kraft-Ligninprobe L2 mit einer ausreichenden Ausbeute führt.

Die Kombination der Reduktion-Acetylierung mit der Extraktion in Methanol soll zu einem antibakteriellen Kraft-Lignin mit einem niedrigen Molekulargewicht und einer engen Molekulargewichtsverteilung führen. Die Kombination der Reduktion-Acetylierung mit anschließender Extraktion in Methanol ergibt das Ligninpräparat L2red_acet_MeOH

4.3.3.1. Charakterisierung des Ligninpräparates L2red_acet_MeOH

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Ergebnisse (Zahlenmittel (Mn), Massenmittel (Mw), Polydispersitätsindex (PDI)) der reduzierten-acetylierten und extrahierten Ligninprobe L2red_acet_MeOH und zum Vergleich die Ergebnisse der Proben L2, L2red_acet und L2_MeOH werden in Tabelle 26 zusammengefasst. Um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen sind in den Abbildungen 42 und 43 die Ergebnisse als Balkendiagramm dargestellt.

Tabelle 26: Ergebnisse der GPC für die Probe L2red_acet_MeOH und Vergleichsproben

Probe	Mn [g/mol]	Mw [g/mol]	PDI (Mw/Mn)
L2	950	1560	1,6
L2_MeOH	910	1300	1,4
L2red_acet*	910	1260	1,4
L2red_acet_MeOH	520	1010	1,9

*nicht vollständig gelöst

Diskussion

Das ursprüngliche Molekulargewicht der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe L2 konnte durch die Kombination der Modifizierungen deutlich verringert werden. Das niedrigste Molekulargewicht zeigt die Probe L2red_acet_MeOH mit einem Zahlenmittel von 520g/mol und einem Massenmittel von 1010g/mol.

Die PDI-Werte der reduzierten-acetylierten Probe L2red_acet sowie der Methanol-extrahierten Probe L2_MeOH liegen bei 1,4. Dieser Wert ist sehr nahe bei 1 und kann auch durch weitere Modifizierungen der Proben nicht mehr verringert werden. Im Gegenteil,

anschließende Reduktion-Acetylierung bzw. Methanol-Extraktion führt zu einem höheren PDI-Wert. Die unmodifizierte Kraft-Ligninprobe L2 weist einen PDI-Wert von 1,6 auf.

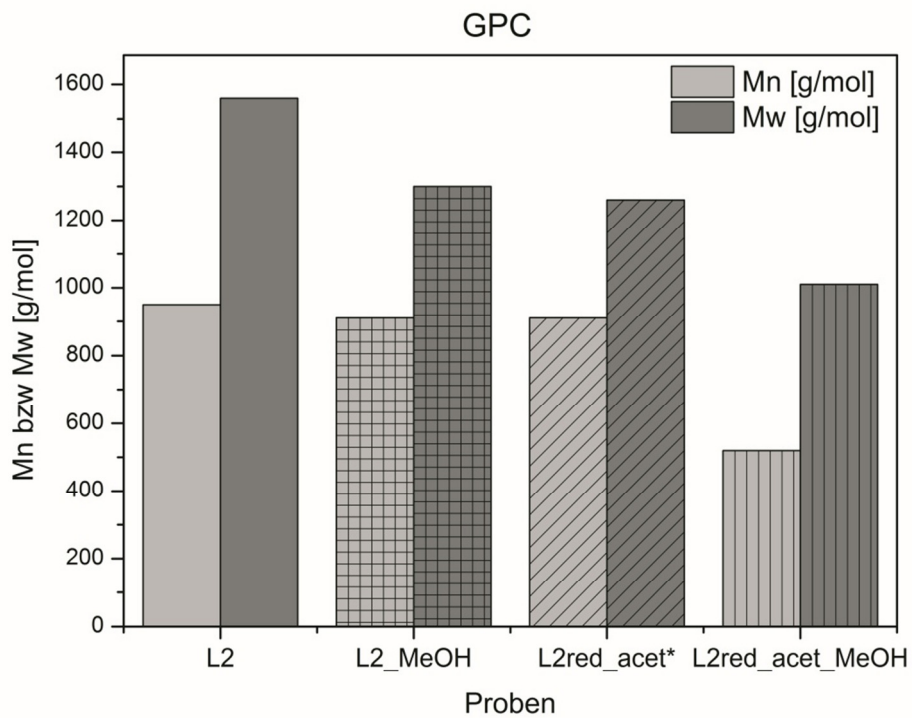


Abbildung 42: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte der Probe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben

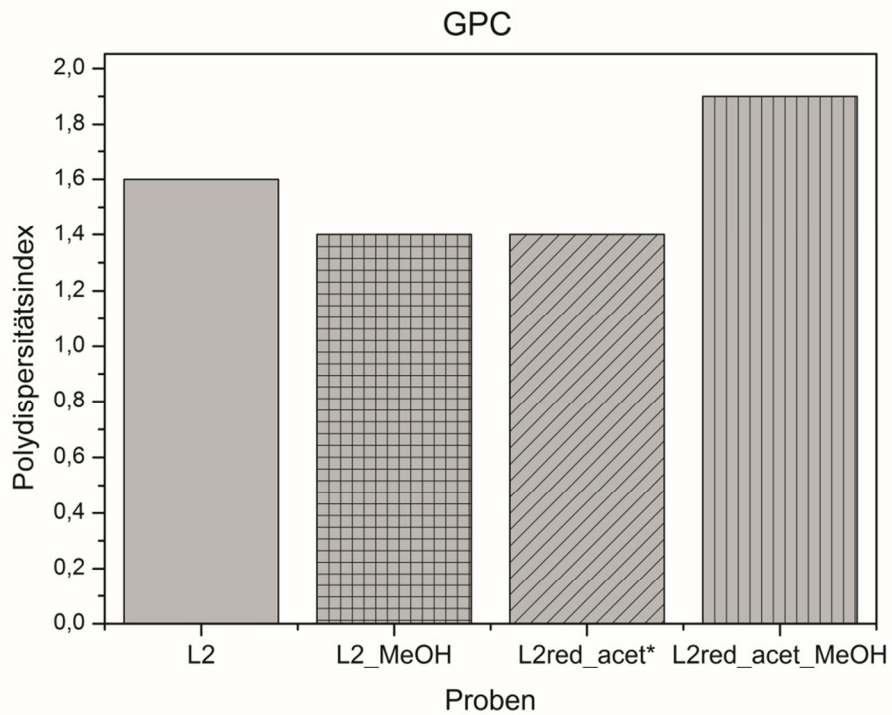


Abbildung 43: Balkendiagramm der PDI Werte der Probe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben

Thermogravimetrie (Thermogravimetrische Analyse (TG) und DTG)

Die Ergebnisse des thermischen Abbaus der Ligninprobe L2red_acet_MeOH und zum Vergleich die Ergebnisse der Proben L2, L2red_acet und L2_MeOH sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse der Probe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben

Probe	TG			DTG	
	T(onset) [°C]	Gewichtsverlust [%]	T(end) [°C]	T(max) [°C]	T(max) [%/min]
L2	278	50	415	372	3,02
L2red_acet	99	53	141	121	4,21
L2_MeOH	285	52	422	380	3,39
L2red_acet_MeOH	122	48	170	135	2,71

Diskussion

Die Kombination der Modifizierungen führt zu einer Verschlechterung der thermischen Eigenschaften des Ligninpräparates im Vergleich zum unmodifizierten Kraft-Lignin L2.

Abgeschwächte Totalreflexion-Infrarotspektroskopie (ATR-IR)

In Tabelle 28 sind die Wellenzahlen der gemessenen ATR-IR-Banden funktionellen Gruppen zugeordnet. Die Abbildungen 44-47 zeigen die gemessenen ATR-IR-Spektren der Ligninprobe L2red_acet_MeOH und zum Vergleich die Spektren der Proben L2, L2red_acet und L2_MeOH.

Tabelle 28: Zuordnung der ATR-IR-Banden von L2red_acet_MeOH und den Vergleichsproben

Zuordnung	L2	L2red_acet	L2_MeOH	L2red_acet_MeOH
st O-H, phenolische und aliphatische OH	3403	3665, 3623	3663, 3454	3214
COO-H	3403	-	-	-
st C-H, CH ₃ und CH ₂ , Methylgruppe –O-CH ₃ (Ether)	2974	2988	2988, 2901	-

st C=O, unkonjugierte CO	1698	1759, 1711	1707	1701
st C=C, Aromat	1599	1579, 1511	1595	1584, 1513
st C-C, Aromat	1514	1511	1514	1513
$\bar{\delta}_{\text{asymmetrisch}}$ C-H, CH ₃ und CH ₂	1464	-	1452	1464
st C-C, Aromat	1429	-	-	1419
CH von Methyl	1429	-	-	1419
CH ₃ -S- , -CH ₂ -S-	1429	1407	-	1419
C-C-H aus Alkanen	-	1407	1394	-
Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	-	1407	1394	-
$\bar{\delta}_{\text{ip}}$ O-H, phenolische OH	1374	1375	-	1368
Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	1374	1375	-	1368
st C-O, Guaiacyl	1269	1268	-	1362
Syringyl-Ring Schwingung mit CO Streckung	1269	1268	-	-
st C-O(H) + C-O(Ar), phenolische OH und Ether	1216	-	1230	-
st O-H, sekundärer Alkohol	-	1200	-	1193
C-O-C, Ether	1105	-	-	-
$\bar{\delta}_{\text{ip}}$ Ar C-H, Guaiacyl	1127	-	-	-
C-O-C	1076	-	1066	-
st C-O(H) + C-O-C, 1.Ordnung aliphatische OH und Ether	1035	1029	1057	1027
Aromaten Substitutionsmuster	856, 823	923, 892, 874, 704, 639, 541	880	927, 897, 858
$\bar{\delta}_{\text{op}}$ Ar C-H, Guaiacyl	856	-	880	858, 807
$\bar{\delta}_{\text{op}}$ Ar C-H, Syringyl	823	-	-	-
CS	-	-	623	640

mit

st: Streckschwingung

$\bar{\delta}_{\text{ip}}$: In-plane Deformationsschwingung

$\bar{\delta}_{\text{op}}$: Out-of-plane Deformationsschwingung

Diskussion

Die unmodifizierte Kraft-Ligninprobe L2 zeigt als einziges Ligninpräparat im ATR-IR-Spektrum (siehe Abbildung 44) eine breite Absorptionsbande bei 3403cm^{-1} , welche einer Carbonsäure zuzuordnen ist. Durch die Modifizierungen des Kraft-Ligninpräparates verschwindet diese Bande und damit ist anzunehmen, dass in den modifizierten Ligninpräparaten keine Säure enthalten ist.

In allen Spektren der Ligninpräparate (siehe Abbildung 44-47) treten folgende Molekülschwingungen auf: phenolische OH Schwingungen ($3670\text{-}3213\text{cm}^{-1}$), Carbonyl Schwingungen ($\text{ca. } 1700\text{cm}^{-1}$) und ein Aromaten Substitutionsmuster (ab $\text{ca. } 900\text{cm}^{-1}$).

Das ATR-IR-Spektrum des Ligninpräparates L2_MeOH (siehe Abbildung 45) zeigt eine, im Vergleich zum Spektrum der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe, abgeschwächte OH-Absorptionsbande, eine sehr starke Absorptionsbande bei $2988\text{-}2901\text{cm}^{-1}$ von aliphatische Gruppen und $-\text{O}-\text{CH}_3$ (Ether) -Gruppen und eine weitere sehr starke Ether-Schwingungsbande bei 1066cm^{-1} .

Das Spektrum der Ligninprobe L2red_acet_MeOH (siehe Abbildung 47) weist wie auch die anderen Präparate eine abgeschwächte OH-Absorptionsbande im Vergleich zur unmodifizierten Ligninprobe auf. Weiters zeigt sich in diesem Spektrum keine Schwingungsbande im Bereich von $\text{ca. } 2990\text{cm}^{-1}$, was den aliphatischen Bereich anzeigt.

ATR-IR-Spektren:

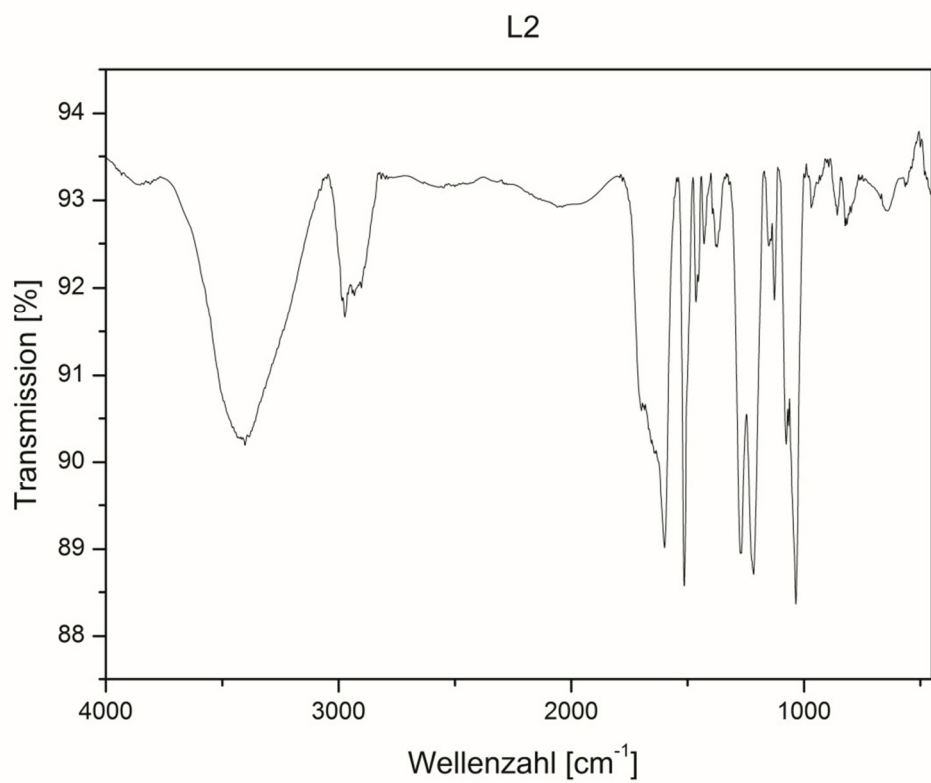


Abbildung 44: ATR-IR-Spektrum von L2

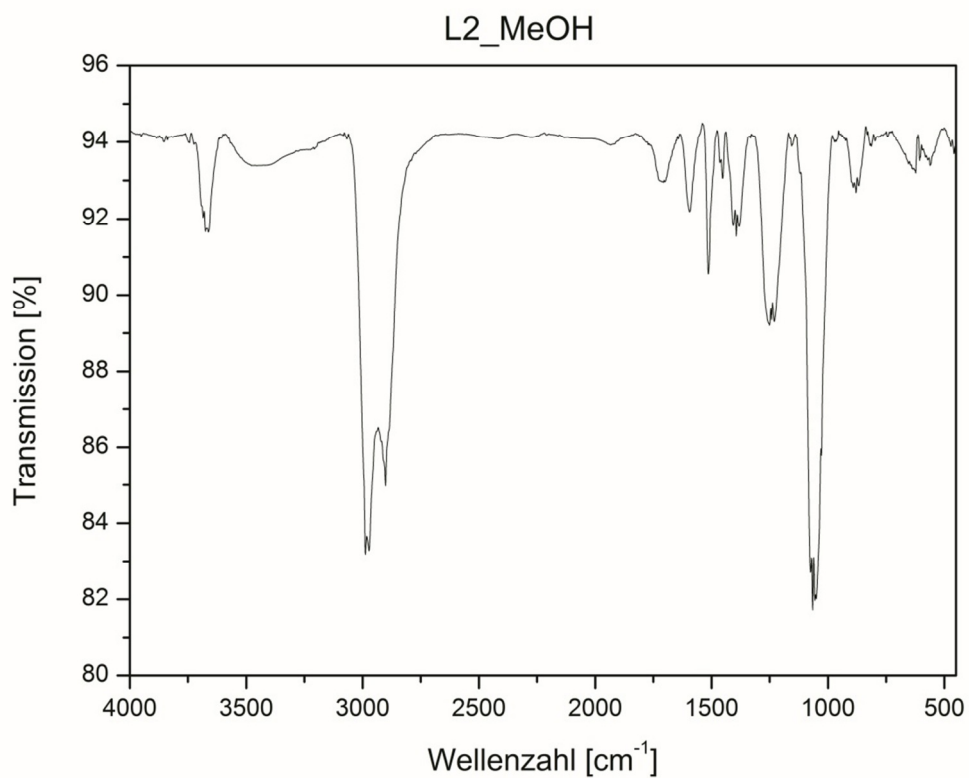


Abbildung 45: ATR-IR-Spektrum von L2_MeOH

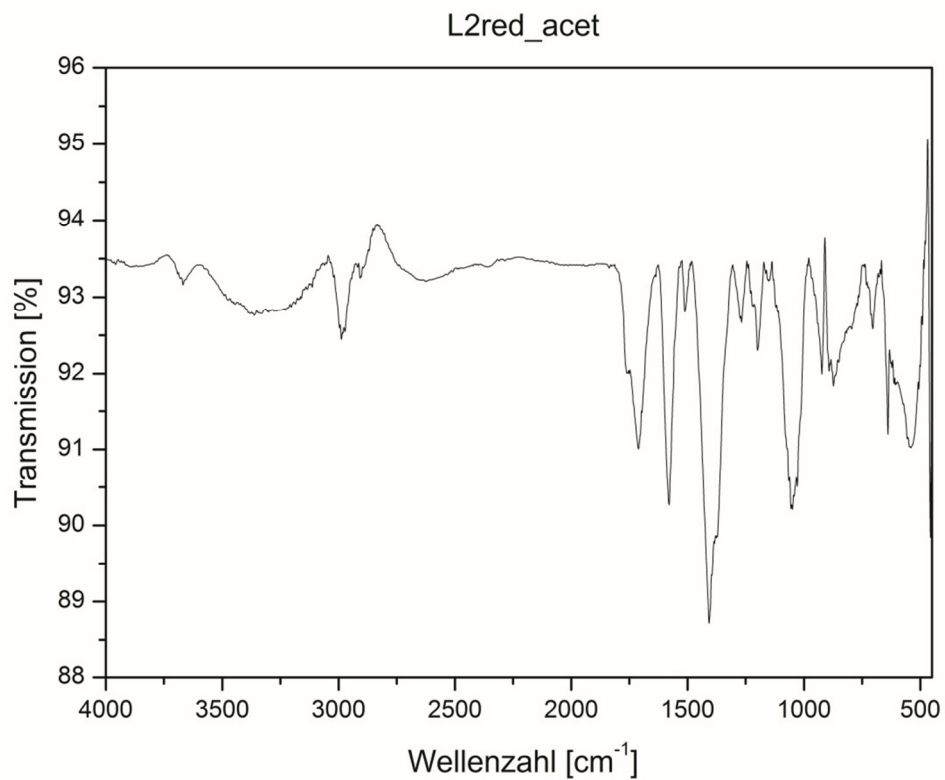


Abbildung 46: ATR-IR-Spektrum von L2red_acet

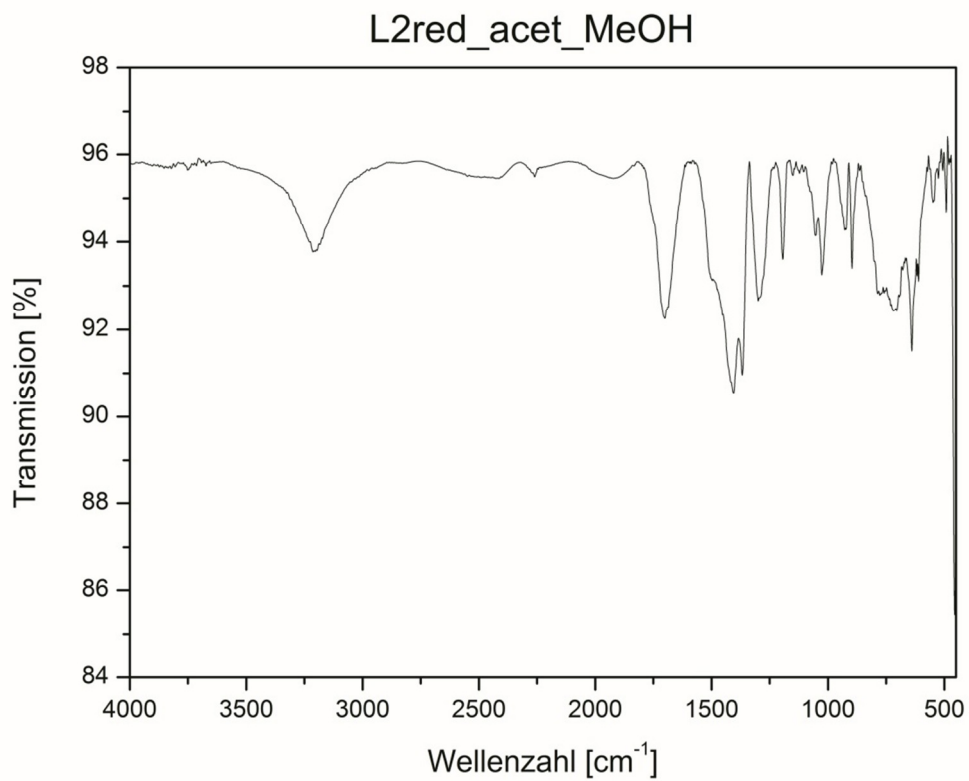


Abbildung 47: ATR-IR-Spektrum von L2red_acet_MeOH

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR

Die prozentuale Verteilung der Regionen der Ligninprobe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben sind in Tabelle 29 zusammengefasst. Die Abbildungen 48-53 zeigen die gemessenen ¹H-NMR-Spektren der Ligninpräparate.

Tabelle 29: Prozentuale Verteilung der Regionen der Probe L2red_acet_MeOH_AC und der Vergleichsproben

Probe	L2_AC	L2red_acet_AC	L2_MeOH_AC	L2red_acet_MeOH_AC
Regionen [Chemischer Shift in ppm]	Anteil [%]	Anteil [%]	Anteil [%]	Anteil [%]
Aromatische Region [7,9-6,25]	22	22	20	22
Nicht zyklisch benzyliche Region [6,25-5,75]	3	2	2	2
Zyklisch benzyliche Region [5,75-5,2]	3	2	1	2
Methoxyl Region [4,2-3,55]	22	19	21	19
Aromatische acetyl Region [2,42-2,12]	16	16	21	17
Aliphatische acetyl Region [2,12-1,6]	24	26	25	23
Sauerstofffreie aliphatische Region [1,6-0]	11	13	11	14

Da das verwendete Lösungsmittel DMSO-d₆ Feuchtigkeit aus der Luft aufnimmt, tritt bei 3,4ppm ein Peak in den aufgenommenen Spektren auf, welcher Wasser zuzuordnen ist. Weiters erfolgt die Aufarbeitung der Ligninpräparate im wässrigen Medium und die Ligninpräparate werden anschließend mittels Gefriertrocknung getrocknet. Ein Restwassergehalt kann in den Ligninpräparaten ebenfalls enthalten sein.

Diskussion

Die in Methanol extrahierte Ligninprobe L2_MeOH_AC zeigt keine signifikanten Veränderungen gegenüber der unmodifizierten Kraft-Ligninprobe L2_AC, allein der Bereich der aromatischen acetyl Region steigt gegenüber der Kraft-Ligninprobe L2 um ca. 5%. Wie die Abbildung 50 verdeutlicht, verschwinden die Verunreinigungen (freie Säuren bei ca. 8,6ppm und Essigsäureanhydrid bei ca. 1,9ppm) durch den Extraktionsschritt in Methanol.

Auch das Spektrum des Kombinations-Präparat L2red_acet_MeOH_AC (siehe Abbildung 52) unterscheidet sich kaum vom Spektrum des Kraft-Lignins L2_AC (siehe Abbildung 48). Wie die Abbildung 53 verdeutlicht, sind auch im Spektrum der Ligninprobe L2red_acet_MeOH_AC die Verunreinigungen (freie Säuren bei ca. 8,6ppm und Essigsäureanhydrid bei ca. 1,9ppm) nicht mehr enthalten.

¹H Spektren:

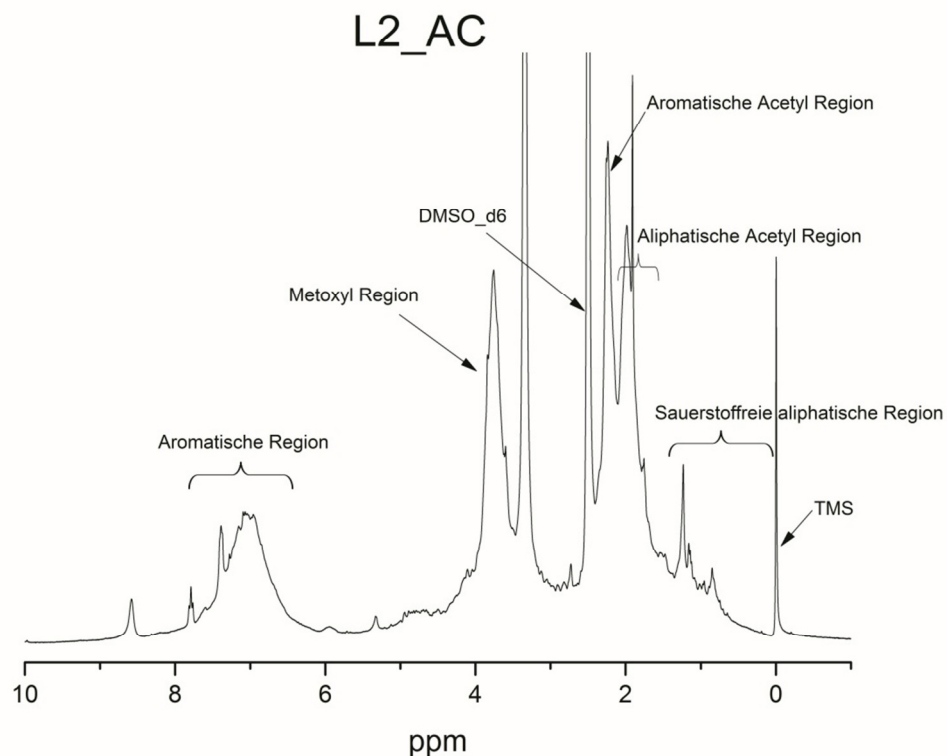


Abbildung 48: ¹H-NMR-Spektrum von L2_AC

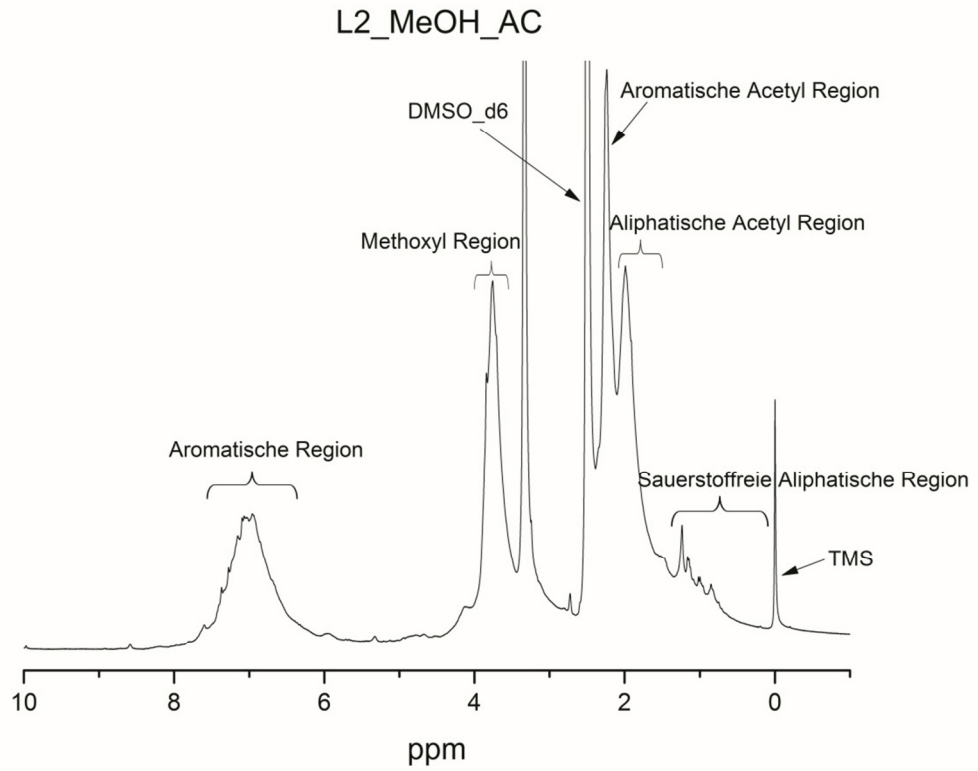


Abbildung 49: ^1H -NMR-Spektrum von L2_MeOH_AC

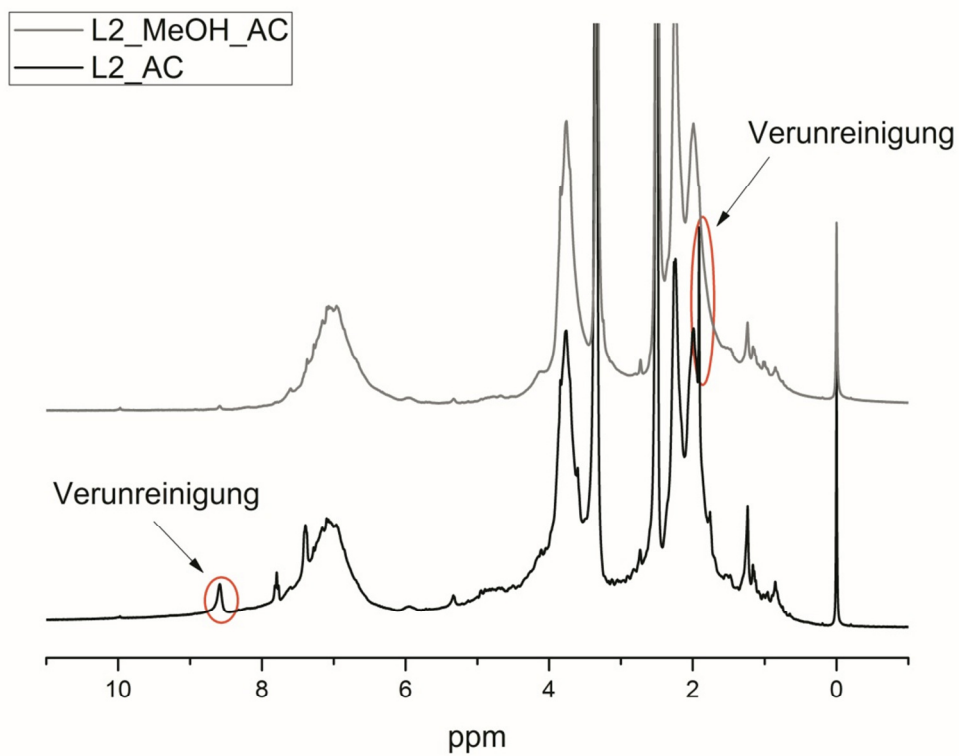


Abbildung 50: ^1H -NMR-Spektrum von L2_AC vor und nach der Extraktion in Methanol

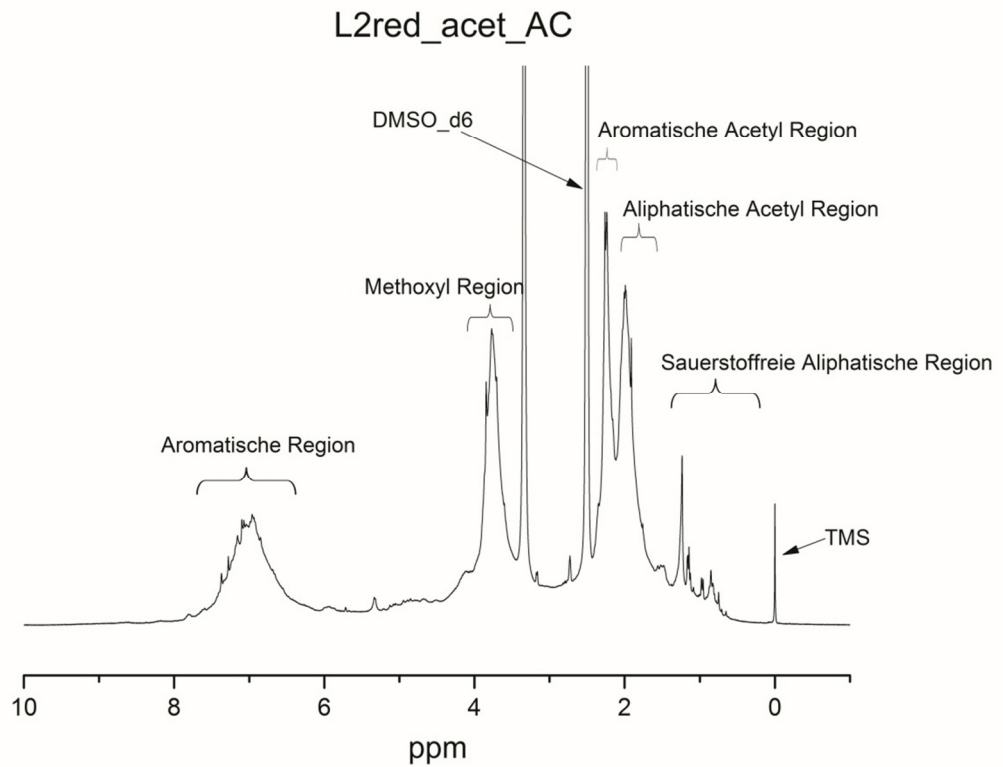


Abbildung 51: ^1H -NMR-Spektrum von L2red_acet_AC

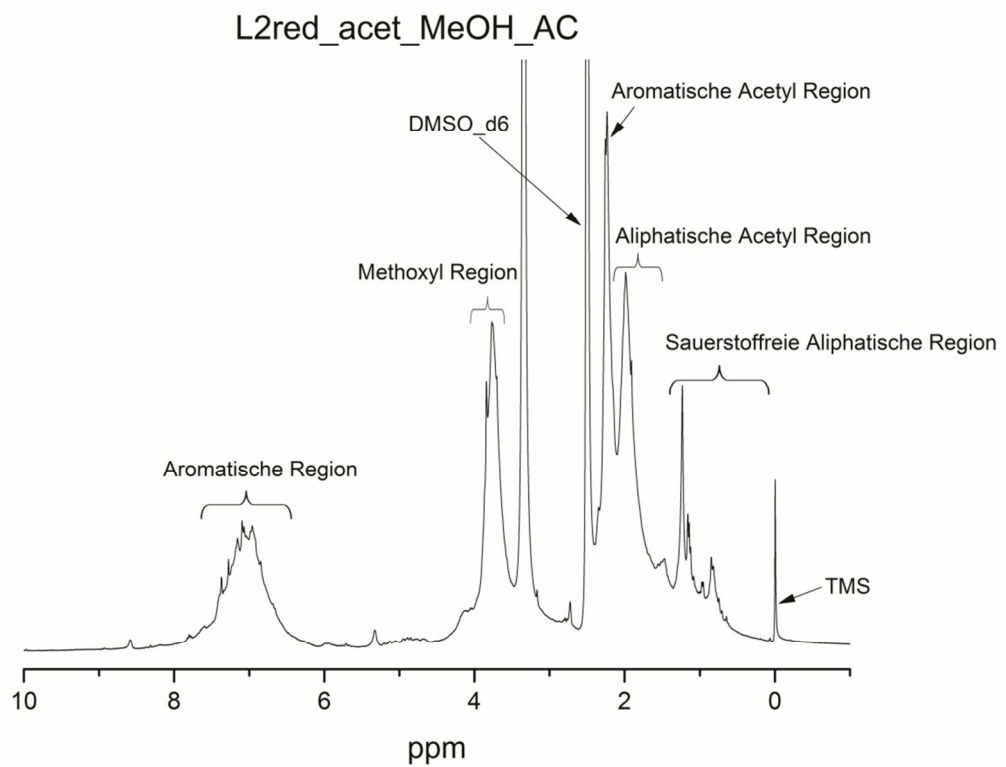


Abbildung 52: ^1H -NMR-Spektrum von L2red_acet_MeOH_AC

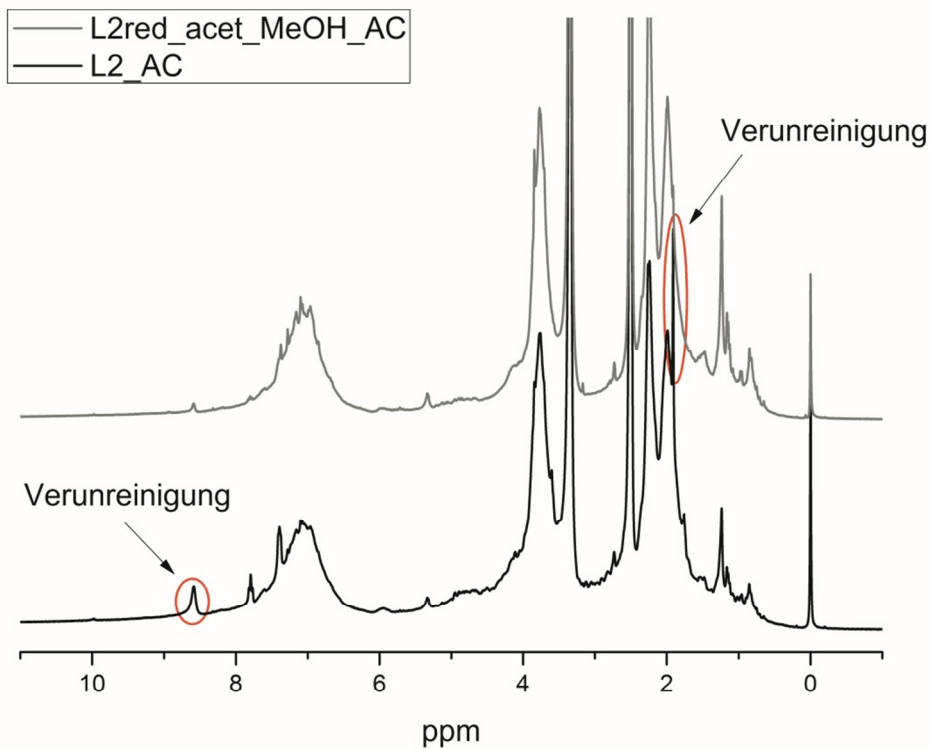


Abbildung 53: ^1H -NMR-Spektrum von L2_AC und L2red_acet_MeOH_AC

Charakterisierung der antibakteriellen Eigenschaften

Plattendiffusionstest (Vortest)

Die Fotos der Petrischalen sind in den Abbildungen 54 und 55 (für den Bakterienstamm *Staphylococcus aureus*) und in den Abbildungen 56 und 57 (für den Bakterienstamm *Escherichia coli*) dargestellt.

Diskussion

Das Kombinations-Ligninpräparat L2red_acet_MeOH zeigt im Vortest antibakterielle Wirkung gegen die Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. Um das Ligninpräparat wachsen keine Bakterien, es bilden sich sogenannte Hemmhöfe.

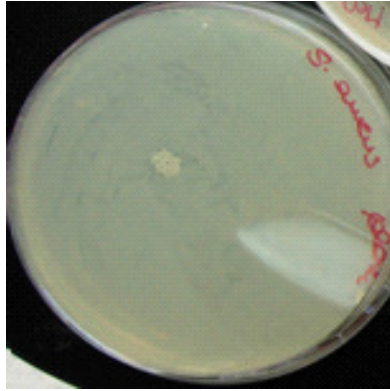


Abbildung 54: Petrischale *Staphylococcus aureus* von Blank

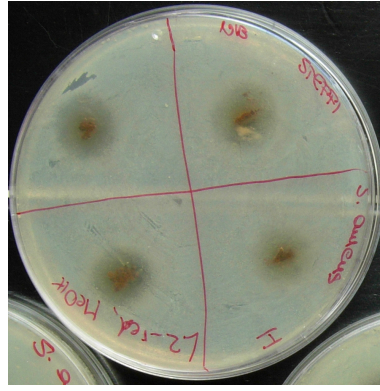


Abbildung 55: Petrischale *Staphylococcus aureus* von L2red_acet_MeOH

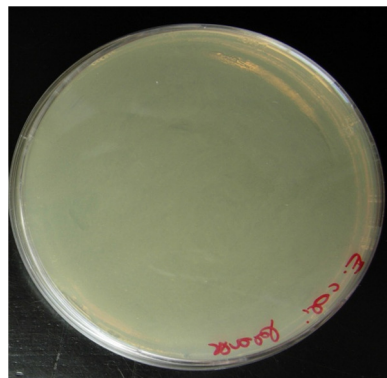


Abbildung 56: Petrischale *Escherichia coli* von Blank

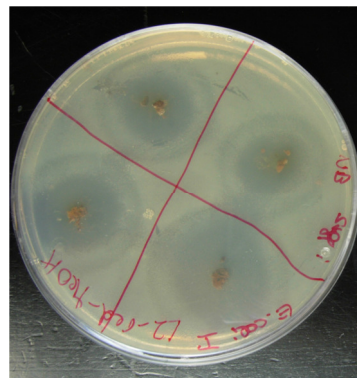


Abbildung 57: Petrischale *Escherichia coli* von L2red_acet_MeOH

Bouillondilutionstest

Die berechnete Reduktion des Bakterienwachstums (Reduktion) der Ligninprobe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben L2 und L2red_acet sind in Tabelle 30 zusammengefasst. Die Werte der Reduktion sind in Abbildung 58 graphisch als Balkendiagramm dargestellt.

Tabelle 30: Ergebnisse des Bouillondilutionstest der Proben L2, MeOH_red_acet und L2red_acet_MeOH

Probe	Reduktion [%]	Standardabweichung	Reduktion [%]	Standardabweichung
	St. aureus		E. coli	
L2	-	-	-	-
L2red_acet	92,9	0,02	23,6	0,009
L2red_acet_MeOH	91,6	0,02	64,3	0,009

Diskussion

Durch die Kombination der Modifizierungen (Reduktion-Acetylierung und Extraktion in Methanol) kann ein Ligninpräparat dargestellt werden, das gegen die Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* antibakterielle Wirkung zeigt. Die antibakterielle Wirkung gegen den gramnegativen Bakterienstamm *Escherichia coli* kann gegenüber dem Ligninpräparat L2red_acet sogar noch gesteigert werden.

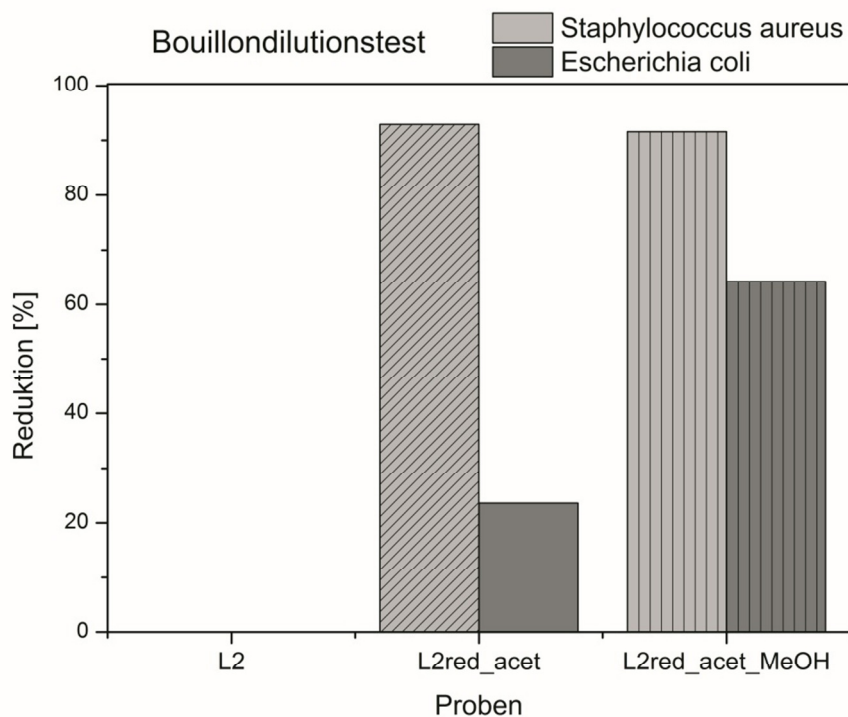


Abbildung 58: Reduktion des Bakterienwachstums der Ligninpräparate L2, L2red_acet und L2red_acet_MeOH im Bouillondilutionstest

4.3.4. Resümee

Durch Modifizierung von Kraft-Lignin lässt sich antibakterielles Lignin darstellen. Die Reduktion und anschließende Acetylierung liefert dabei die besten Resultate. Allerdings führt diese Modifizierung zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes der Probe (Kapitel 4.2.1.). In diesem Kapitel wird das Molekulargewicht durch die Extraktion in Dichlormethan und Methanol reduziert. Da die Extraktion in Dichlormethan mit einer Ausbeute von nur 4% verläuft, wird für weitere Untersuchungen Methanol als Extraktionslösungsmittel gewählt. Mit Hilfe der Kombination von der Modifizierungsreaktion Reduktion-Acetylierung und der

Extraktion des Präparates in Methanol wird niedermolekulares Lignin mit antibakteriellen Eigenschaften dargestellt. Der Bouillondilutionstest dieses Präparates zeigt eine deutliche Verbesserung der antibakteriellen Eigenschaften gegenüber dem nicht extrahierten Ligninpräparat. Das Bakterienwachstum des Bakterienstammes *Staphylococcus aureus* kann um über 90% reduziert werden. Zusätzlich zeigt die Probe L2red_acet_MeOH eine Reduktion des Bakterienwachstumes von *Escherichia coli* um 64%. Die ATR-IR-Messung ergibt für die Ligninprobe L2red_acet_MeOH eine abgeschwächte OH-Bande, hingegen einen starken aliphatischen Bereich und starke Ether-Banden im Vergleich zum unmodifizierten Ligninpräparat.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte aus dem Nebenprodukt des Sulfatverfahrens aus der Papier- und Zellstoffindustrie Kraft-Lignin durch saure Präzipitation erhalten werden. Das isolierte Lignin aus der Schwarzlaug zeigt im DPPH-Test antioxidative Eigenschaften vergleichbar mit Irganox 1010, welches in der Industrie häufig als Antioxidans Polymeren zugesetzt wird. Durch die Modifizierungen Acetylierung, Methylierung und Reduktion mit anschließender Acetylierung wurden die chemischen Eigenschaften des Kraft-Lignins verändert. Weiters wurden die antibakteriellen Eigenschaften des unmodifizierten Kraft-Lignins so wie der modifizierten Ligninpräparate getestet. Die Reduktion mit anschließender Acetylierung des Kraft-Lignins ergibt ein Ligninpräparat, welches gegen den grampositiven Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* als auch gegen den gramnegativen Bakterienstamm *Escherichia coli* antibakterielle Wirkung zeigt. Die eingebrachten funktionellen Gruppen durch die Modifizierungsreaktionen führten allerdings auch zu einer Erhöhung des Molekulargewichtes der Proben. Durch Extraktion der Ligninpräparate in Methanol konnte dieses reduziert werden. Die Kombination der Reduktion mit anschließender Acetylierung und der Extraktion in Methanol von Kraft-Lignin führte zum angestrebten Ergebnis. Dieses Ligninpräparat reduzierte nicht nur das Bakterienwachstum von *Staphylococcus aureus* um 92%, sondern führte auch zu einer 64%igen Reduktion des sehr resistenten gramnegativen Bakterienstammes *Escherichia coli*. Dieses Ergebnis eines Ligninpräparates konnte in der Literatur bis jetzt noch nicht gezeigt werden.

Publikationsliste von Stefanie Redik

- (1) Gregorova A, Redik S., Sedlarik V., Stelzer F. Lignin-Containing Polyethylene Films with Antibacterial Activity. NANOCON 2011, 3rd International Conference 21-23 September 2011, Brno Czech Republic, Conference Proceedings ISBN 978-80-87294-23-9, p. 49-50, CD Proceedings – Full paper Nr. 1366, p.1-6, Oral presentation.

Abkürzungen

L2	Lignin mit Schwefelsäure präzipitiert
acet	acetylierte Probe
met	methylierte Probe
red_acet	reduzierte acetylierte Probe
_AC	acetylierte Probe für NMR-Messung
L_MeOH	Probe extrahiert in Methanol
L_Dioxan	Probe extrahiert in Dioxan
L_DCM	Probe extrahiert in Dichlormethan
L_THF	Probe extrahiert in Tetrahydrofuran
L_Aceton	Probe extrahiert in Aceton
TMS	Tetramethylsilan
DMSO	Dimethylsulfoxid
GPC	Gelpermeationschromatographie
Mn	Zahlenmittel
Mw	Massenmittel
PDI	Polydispersitätsindex
TG	Thermogravimetrische Analyse
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Monolignole	9
Abbildung 2: Lignin-Baueinheiten	10
Abbildung 3: Lignin Verknüpfungen	11
Abbildung 4: Ligninstruktur von Adler (13).....	12
Abbildung 5: chemische Reaktionen beim Sulfatverfahren (23).....	15
Abbildung 6: vereinfachtes Schema der Struktur von Schwarzlauge (32)	18
Abbildung 7: radikalfangen und -stabilisieren von Lignin (55)	22
Abbildung 8: Acetylierung von Lignin.....	27
Abbildung 9: Methylierung von Lignin	28
Abbildung 10: Reduktion-Acetylierung von Lignin.....	28
Abbildung 11: Reaktion von Laccase mit Lignin (66)	30
Abbildung 12: Temperaturprogramm des Muffelofens während der Veraschung.....	35
Abbildung 13: Reaktion des DPPH Radikals mit Antioxidans (73)	37
Abbildung 14: ATR-IR-Spektrum von Feststoff Schwarzlauge BL-ZP	41
Abbildung 15: ATR-IR-Spektrum von L2.....	42
Abbildung 16: ¹ H-NMR-Spektrum von Feststoff Schwarzlauge BL-ZP.....	44
Abbildung 17: ¹ H-NMR-Spektrum von L2_AC.....	44
Abbildung 18: Chromatogramm von L2acet.....	46
Abbildung 19: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte (L2-Reihe).....	47
Abbildung 20: Balkendiagramm der PDI Werte (L2-Reihe)	47
Abbildung 21: Balkendiagramm der mittleren Partikeldurchmesser (L2-Reihe).....	49
Abbildung 22: Thermogravimetrie von L2acet	51
Abbildung 23: ATR-IR-Spektrum von L2.....	55
Abbildung 24: ATR-IR-Spektrum von L2acet.....	55
Abbildung 25: ATR-IR-Spektrum von L2met.....	56
Abbildung 26: ATR-IR-Spektrum von L2red_acet.....	56
Abbildung 27: ¹ H-NMR-Spektren L2 vor und nach der Acetylierung	59
Abbildung 28: ¹ H-NMR-Spektrum von L2_AC.....	60
Abbildung 29: ¹ H-NMR-Spektrum von L2acet_AC.....	60
Abbildung 30: ¹ H-NMR-Spektrum von L2met_AC.....	61
Abbildung 31: ¹ H-NMR-Spektren L2 vor und nach der Metylierung	61
Abbildung 32: ¹ H-NMR-Spektrum von L2red_acet_AC.....	62
Abbildung 33: ¹ H-NMR-Spektren L2, L2_AC und L2red_acet_AC	62
Abbildung 34: Ligningehalt der L2-Reihe.....	64
Abbildung 35: Kalibrationskurve des DPPH-Tests	66

Abbildung 36: Absorption (518nm) - Zeit Kurve einer Iragnox 1010- (blau), Kraft-Lignin L2- (rot) und Blank- (schwarz) DPPH Lösung	68
Abbildung 37: Reduktion des Bakterienwachstums der Ligninpräparate der L2-Reihe im Bouillondilutionstest.....	69
Abbildung 38: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte der extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)	73
Abbildung 39: Balkendiagramm der PDI Werte der extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)	74
Abbildung 40: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte der enzymatisch modifizierten Ligninpräparate	76
Abbildung 41: Balkendiagramm der PDI Werte der enzymatisch modifizierten Ligninpräparate	77
Abbildung 42: Balkendiagramm der Mn und Mw Werte der Probe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben	79
Abbildung 43: Balkendiagramm der PDI Werte der Probe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben	79
Abbildung 44: ATR-IR-Spektrum von L2.....	83
Abbildung 45: ATR-IR-Spektrum von L2_MeOH.....	83
Abbildung 46: ATR-IR-Spektrum von L2red_acet.....	84
Abbildung 47: ATR-IR-Spektrum von L2red_acet_MeOH.....	84
Abbildung 48: ¹ H-NMR-Spektrum von L2_AC.....	86
Abbildung 49: ¹ H-NMR-Spektrum von L2_MeOH_AC	87
Abbildung 50: ¹ H-NMR-Spektrum von L2_AC vor und nach der Extraktion in Methanol	87
Abbildung 51: ¹ H-NMR-Spektrum von L2red_acet_AC.....	88
Abbildung 52: ¹ H-NMR-Spektrum von L2red_acet_MeOH_AC.....	88
Abbildung 53: ¹ H-NMR-Spektrum von L2_AC und L2red_acet_MeOH_AC	89
Abbildung 54: Petrischale Staphylococcus aureus von Blank.....	90
Abbildung 55: Petrischale Staphylococcus aureus von L2red_acet_MeOH	90
Abbildung 56: Petrischale Escherichia coli von Blank.....	90
Abbildung 57: Petrischale Escherichia coli von L2red_acet_MeOH.....	90
Abbildung 58: Reduktion des Bakterienwachstums der Ligninpräparate L2, L2red_acet und L2red_acet_MeOH im Bouillondilutionstest	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Monolignolgehalt verschiedener Lignine	10
Tabelle 2: Gegenüberstellung des Sulfat- und des Sulfitverfahrens.....	16
Tabelle 3: Ligninprodukte aus verschiedenen Aufschlussverfahren (5)	16
Tabelle 4: Verwendungszwecke Lignosulfonate und Kraft-Lignin (5).....	20
Tabelle 5: Chemikalienliste mit Eigenschaften.....	25
Tabelle 6: extrahierte Ligninproben L2	29
Tabelle 7: enzymatisch modifizierte L2 Proben tabelliert nach Reaktionszeit mit Laccase....	29
Tabelle 8: Temperaturprogramm für die Veraschung.....	35
Tabelle 9: Zuordnung der ATR-IR-Banden des Feststoffes der Schwarzlauge und zum Vergleich der Kraft-Ligninprobe L2	39
Tabelle 10: prozentuale Verteilung der Regionen der Schwarzlauge BL-ZP sowie des Kraft-Ligninpräparates L2 nach der ¹ H-NMR Auswertung	43
Tabelle 11: Ergebnisse der GPC für die Proben der L2-Reihe.....	46
Tabelle 12: Staudinger Index der gemessenen Proben der L2-Reihe.....	48
Tabelle 13: Ergebnisse der Partikelgrößenanalyse (L2-Reihe)	49
Tabelle 14: Ergebnisse der Thermogravimetrie der L2-Reihe.....	50
Tabelle 15: Zuordnung der ATR-IR-Banden der L2-Reihe.....	52
Tabelle 16: prozentuale Verteilung der Regionen der acetylierten Ligninproben (L2-Reihe) nach der ¹ H-NMR Auswertung.....	57
Tabelle 17: Klason Lignin Gehalt der L2-Reihe	63
Tabelle 18: Elementaranalyse, Empirische Formel und Mw der Phenylpropaneinheit und Methoxyl-Gehalt der Proben der L2-Reihe	65
Tabelle 19: IEAC Werte der Ligninpräparate der L2-Reihe.....	67
Tabelle 20: berechnete Reduktion des Bakterienwachstums.....	68
Tabelle 21: Ausbeuten der Proben (L2-Reihe) nach der Lösungsmittelextraktion.....	72
Tabelle 22: Ergebnisse der GPC für die extrahierten Proben (L2_LM-Reihe).....	72
Tabelle 23: Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse der extrahierten Proben (L2_LM-Reihe)	74
Tabelle 24: Ausbeuten von Kraft-Lignin L2 nach der enzymatischen Modifizierung.....	75
Tabelle 25: Ergebnisse der GPC für die enzymatisch modifizierten Ligninpräparate	76
Tabelle 26: Ergebnisse der GPC für die Probe L2red_acet_MeOH und Vergleichsproben...78	
Tabelle 27: Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse der Probe L2red_acet_MeOH und der Vergleichsproben	80
Tabelle 28: Zuordnung der ATR-IR-Banden von L2red_acet_MeOH und den Vergleichsproben	80

Tabelle 29: Prozentuale Verteilung der Regionen der Probe L2red_acet_MeOH_AC und der Vergleichsproben	85
Tabelle 30: Ergebnisse des Bouillondilutionstest der Proben L2_MeOH_red_acet und L2red_acet_MeOH	90

Literaturverzeichnis

1. Pearl, I. Lignin chemistry. *Chem. and Eng. News* **1964**, *42*, 81-93.
2. Schulze, F.F. Beiträge zur Kenntnis des Lignins. *Chem. Zent.* **1857**, *2*, 321-325.
3. Sandermann, W. Grundlagen der Chemie und chemischen Technologie des Holzes, Akademische Verlagsgesellschaft: Leipzig, **1956**; pp147.
4. Dignum, M.J. W., Kerler, J. und Verpoorte, R. Vanilla Production: Technological, Chemical and Biosynthetic Aspects. *Food Rev. Intern.* **2001**, *17*, 199-219.
5. Kamm, B.; Gruber, P.R.; Kamm, M. Biorefineries - Industrial Processes and Products - Status Quo and Future Directions, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA: Weinheim, **2006**; Vol. 2, pp 60-200.
6. Heinzl Pulp Home Page. www.zellstoff-poels.at (accessed Jun 25, 2012).
7. Glasser, W.G.; Kelley, S.S. Encyclopedia of polymer science and engineering, Wiley: New York, **1987**; pp 795.
8. Kutscha, N. P.; Gray, J. R. The potential of lignin research. *Technical Bulletin* **1970**, *41*.
9. Hirth, T.; Busch, R. Stoffliche Nutzung von Lignin Rohstoffe, Prozesse und Produkte. DECHEMA. Frankfurt. 18-19.02.2008.
10. Tejado, A., Pena, C.; Labidi, J.; Echevarria, J.M.; Mondragon, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresour Technol.* **2007**, *98*, 1655–1663.
11. Boeriu, C.G., Bravo, D.; Go, R.J.A. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products* **2004**, *20*, 205-218.
12. <http://www.chem.vt.edu/chem-dept/helm/3434WOOD/notes1/lignin.html>. (accessed Feb 10, 2009).
13. Adler, E. Lignin chemistry: past, present and futures. *Wood Sci. Technol.* **1977**, *11*, 168-218.
14. Gosselink, R.J.A.; de Jong, E.; Guran, B.; Abäch, A. Co-ordination network for lignin—standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). *Industrial Crops and Products* **2004**, *20*, 121–129.
15. Gonzalez, M.; Tejado, A.; Blanco, M.; Mondragon, I.; Labid, J. Agricultural palm oil tree residues as raw material for cellulose, lignin and hemicelluloses production by ethylene glycol pulping process. *Chem Eng J.* **2009**, *148*, 106–114.
16. Garcia, A.; Toledano, A.; Serrano, L.; Egues, I.; Gonzalez, M. Characterization of lignins obtained by selective precipitation. *Sep Purif Technol.* **2009**, *68*, 193–8.

17. Donga, X.; Donga, M.; Lua, Y.; Turleya, A.; Jin, T.; Wu, C. Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops and Products* **2011**, *34*.
18. Timell, T. *Wood Chemistry—A Brief Outline*, New York State College of Forestry : Syracuse, New York, pp **1968**.
19. Panshin, A., deZeeuw, C. und Brown, H. *Textbook of Wood Technology*, McGraw Hill Book Company: New York, **1964**, Vol. I.
20. Libby, E. *Pulp and Paper Science and Technology*, McGraw Hill Book Company: New York, **1962**, Vol. I.
21. Goring, D. *Lignin. Trend* **1964**, *3*, 9-15.
22. Smook, G.A. *Handbook for Pulp and Paper Technologists*, Joint Textbook Committee of the Paper Industry: Atlanta, USA, **1989**; pp 1-74.
23. Fengel, D.; Wegener, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter* **1984**, *305*, 132-181.
24. Pye, E. K.; Lora, J. H. *Tappi J.* **1991**, *74*, 113-118.
25. Ugartondo, V., Mitjans, M. und Pilar, M. Applicability of lignins from different sources as antioxidants based on the protective effects on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Industrial Crops and Products* **2009**, *30*, 184–187.
26. Kollmann, F.; Cote, W. *Wood Science and Technology, Solid Wood*. Springer-Verlag: Berlin, **1966**; Vol. I.
27. Glasser, W.G. Potential role of lignin in tomorrow's wood utilization technologies. *For. Prod. J* **1981**, *31*, 24–29.
28. Garcia, A.; Toledano, A.; Andres, M.A.; J. Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry* **2010**, 935-940.
29. Lora, J.H.; Glasser, W.G. Recent industrial applications of lignins: a sustainable alternative to nonrenewable materials. *J Polym Environ.* **2002**, *10*.
30. Yang, Q.; XiuLi, Y.; ChuangZhi, W.; ShuBin, W.; DaLiang, G. Thermogravimetric-Fourier transform infrared spectrometric analysis of CO₂ gasification of reed (*Phragmites australis*) kraft black liquor. *Bioresource Technology* **2012**, *107*, 512–516.
31. Soderhjelm, L. Factors affecting the viscosity of strong black liquor. *Appita J.* **1988**, *41*, 389–392.
32. Cardoso, M.; Domingos de Oliveira, É.; Passos, M.L. Chemical composition and physical properties of black liquors and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills. *Brazil Fuel* **2009**, *88*, 756–763.
33. Košíková B.; Alexy P.; Gregorová A. Use of lignin products derived from wood pulping as environmentally desirable component of composite rubber materials. *Wood Research* **2003**, *48 (1/2)*, 62-67.

34. Košíková B.; Gregorová A. Sulfur-free lignin as reinforcing component of styrene-butadiene rubber. *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, *97*, 924-929.
35. Gregorová A.; Košíková B.; Moravčík R. Stabilization effect of lignin in natural rubber. *Polymer Degradation and Stability* **2006**, *91*, 229-233.
36. Kosikova, B.; Labaj, J.; Gregorova, A.; Slamenova, D. Lignin antioxidants for preventing oxidation damage of DNA and for stabilizing polymeric composites. *Holzforschung* **2006**, *60*, 166-170.
37. Košíková B.; Gregorová A.; Osvald A., Krajčovičová J. The role of lignin filler in stabilization of natural rubber based composites. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *103*, 1226-1231.
38. Kramarova Z.; Alexy P.; Chodak I.; Spirk E.; Hudec I.; Kosikova B.; Gregorova A.; Suri P.; Feranc J.; Bugaj P.; Duracka M. Biopolymers as fillers for rubber blends. *Polymers for advanced technologies* **2007**, *18* (2), 135-140.
39. Lora, J. H.; Wu, C. F.; Pye, E. K.; Balatinecz, J.J. Lignin Properties and Materials, American Chemical Society Symposium Series: Washington, DC, USA, **1989**; 397, pp 312-324.
40. Johnson, D. K.; Bozell, J.; Holladay, J. E.; White, J. F. Use of lignin in the biorefinery. Proceedings of the International Lignin Institute, 7th Forum. Barcelona. **2005**.
41. El Mansouri, N.E.; Salvado, J. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: application to liginosulfonate, kraft, sodaanthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Ind Crops Prod* **2006**, *24*, 8–16.
42. Sena-Martins, G.; Almeida-Vara, E.; Duarte, J.C. Eco-friendly new products from enzymatically modified industrial lignins. *Ind Crops Prod* **2008**, *27*, 189–195.
43. Gargulak, J. D.; Lebo, S. E. Lignin: Historical, Biological and Materials Perspectives. ACS Symposium Series 742. Washington, DC. **2000**; pp 304.
44. Kosikova, B.; Demianova, V.; Mikulasova, M. Effect of lignin on degradation of polyolefins with Phanerochaete chrysosporium. *Wood Res.* **1994**, *3*, 15-23.
45. Gregorova, A. Cibulkova, Z.; Kosikova, B.; Simon, P. Stabilization effect of lignin in polypropylene and recycled polypropylene. *Polymer Degradation and Stability* **2005**, *89*, 553-558.
46. Pouteau, C.; Dole, P.; Cathala, B.; Averous, L.; Boquillon, N. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polym Degrad Stab* **2003**, *81*, 9-18.
47. Dizhbite, T.; Telysheva, G.; Jurkjane, V.; Viesturs, U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins – natural antioxidants. *Bioresour. Technol.* **2004**, *95*, 309-317.
48. Hamid, S. H. Handbook of Polymer Degradation, Marcel Dekker: New York, **2000**.
49. Zweifel, H. Plastics Additives Handbook, Hanser: München, **2001**.

50. Gregorova, A.; Kosikova, B.; Stasko, A. Radical scavenging capacity of lignin and its effect on processing stabilization of virgin and recycled polypropylene. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *106*, 1626-1631.
51. Gregorová A.; Košíková B.; Osvald A. The study of lignin influence on properties of polypropylene composites. *Wood Research* **2005**, *50* (2), 41-48.
52. Košíková B.; Labaj J.; Slameňová D.; Sláviková E.; Gregorová. A. 7. Chapter Novel environmentally friendly use of lignin biomass component. In Biomass and Bioenergy, Brenes M.D., Eds.; NOVA Science Publishers NY: New York, **2006**; pp 169-200.
53. Catignani, G. L.; Carter, M. E. Antioxidant properties of lignin. *J. Food Sci.* **1982**, *47*, 1745-1748.
54. Dizhbite, T.; Telysheva, G.; Bikova, T.; Rossinska Soda-Lignins from agricultural plants: interconnection of functionality and structural characteristics with antioxidant properties. Proceedings of the 8th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Utilization of Lignocellulosics and By-products of Pulping. Riga.August22-25, **2004**; 127-130.
55. Barclay, L. R. C.; Xi, F.; Norris, J. Q. Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds. *J. Wood Chem. Technol.* **1997**, *17*, 73-90.
56. Kratzl, K.; Schaefer, W.; Claus, P.; Gratzl, J. Oxidation of ¹⁴C-labelled phenols (lignin models) with oxygen in aqueous alkaline solution. *Monatshefte für Chemie* **1967**, *98*, 891-904.
57. Pan, X.; Kadla, J. F.; Ehara, K.; Gilkes, N. Organosolv Ethanol Lignin from Hybrid Poplar as a Radical Scavenger: Relationship between Lignin Structure, Extraction Conditions, and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5806-5813.
58. Faustino, H.; Gil, N.; Baptista, C.; Duarte, A.P. Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Molecules* **2010**, *15*, 9308-9322.
59. Fleming, A. *Brit. J. Exptl. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
60. Gräfe, U. Biochemie der Antibiotika, Struktur-Biosynthese-Wirkmechanismus, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg; Berlin; New York, **1992**.
61. Nada, A.M.A.; El-Diwanya, A.I.; Elshafei, A.M. Infrared and antimicrobial studies on different lignins. *Acta Biotechnol.* **1989**, *9*, 295-298.
62. Slavikova, E.; Kosikova, B. Current awareness on yeast. *Yeast* **1994**, *11*, 293-300.
63. Lin, S.Y.; Dence, C.W. Commercial Spent Pulping Liquors, In: Methods in Lignin Chemistry, Springer Verlag: Berlin, **1992**; pp 77-80.
64. Gregorova, A. unpublished results. Internal methods. **2011**.
65. Pawadee, M.; Weerawatsophon, U.; Thainthongdee, M.; Lekpittaya, P. Optimum Conditions for Selective Separation of Kraft-Lignin. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **2010**, *44*, 680-690.

66. Hahn, V.; Schauer, F. Mikrobielle Laccasen zur Synthese organischer Substanzen. *BIOspektrum* **2009**, *15.Jhrg.*, 526-528.
67. Rheotest Messgeräte Medingen GmbH Home Page.
<http://www.rheotest.de/html/polymere.html> (accessed May 3,2012). [Online]
68. Goncalves, A. R.; Curvelo, A.A.S.; Biscolla, F.C.; Peres, L.O. Piassava Fibers (*Attalea funifera*): NMR Spectroscopy of their Lignin. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 491-494.
69. TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) -13m-54.
70. TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) Method UM-250,1985b .
71. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C. Determination of Ash in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP) **2008**.
72. Staško, A.; Brezová, V.; Biskupič, S.; Mišík, V. *Free Radical Research* **2007**, *41*, 379.
73. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology / Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* **1995**, *28*, 25-30.
74. Shen, D.K.; Gu, S.; Bridgwater, A.V. Study on the pyrolytic behaviour of xylan based hemicellulose using TG–FTIR and Py–GC–FTIR. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **2010**, *87*, 199–206.
75. Shen, D.K.; Gu, S.; Luo, K.H.; Wang, S.R.; Fang, M.X. The pyrolytic degradation of wood-derived lignin from pulping process. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 6136–6146.
76. Yang, Q.; Wu, S.; Lou, R.; Lv, G. Structural characterization of lignin from wheat straw. *Wood Sci. Technol.* **2011**, *45*, 419–431.
77. Ph.D. Dissertation, Yang, Q. , South China University of Technology, Guangzhou, **2010**.
78. Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; G. Thieme Vlg.: Stuttgart, **1997**; 8.Auflage.
79. Socrates, G. Infrared Characteristic Group Frequencies, Wiley Verlag: Chichester, **1998**; 2. Auflage.
80. Glasser, W. G.; Jain, R. K. Lignin derivatives. *Holzforschung* **1993**, *47*, 225-233.
81. Sun, R. C.; Tomkinson, J.; Jones, G. L. Fractional Characterization of ash-AQ lignin by successive extraction with organic solvents from oil palm EFB fibre. *Polym. Dergrad. Stabil* **2000**, *68*, 111-119.
82. Diaganova, R.; Nenkova, S.; Kumanova, B. Zur chemischen Struktur von Ligninpräparaten aus technischem Hydrolyselignin. *Holzforschung* **1983**, *37*, 79-86.