

Tim Alexander Jestel

Advanced Chromatographic Methods for Lignin Characterization

Advanced Chromatographic Methods for Lignin Characterization

Verbesserte chromatographische Methoden
zur Lignincharakterisierung

Von der Fakultät für Maschinenwesen der Rheinisch-Westfälischen Technischen
Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Tim Alexander Jestel

Berichter: Universitätsprofessorin Dr.-Ing. Antje Christine Spieß
Universitätsprofessor Dr.-Ing. Andreas Jupke
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Ulrich Schwaneberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2020

Berichte aus der Verfahrenstechnik

Tim Alexander Jestel

**Advanced Chromatographic Methods
for Lignin Characterization**

Shaker Verlag
Düren 2020

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Zugl.: D 82 (Diss. RWTH Aachen University, 2020)

Copyright Shaker Verlag 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-7676-9

ISSN 0945-1021

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Phone: 0049/2421/99011-0 • Telefax: 0049/2421/99011-9

Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2015 bis Dezember 2018 während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Enzymprozesstechnik (AVT.EPT) der RWTH Aachen University. Für die finanzielle Unterstützung meiner Promotion im Rahmen des Exzellenzclusters 236 “Tailor-Made Fuels from Biomass“ möchte ich mich herzlich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanken.

Die Anfertigung dieser Arbeit wäre ohne die gute Zusammenarbeit und Unterstützung durch eine Vielzahl von Personen nicht möglich gewesen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Antje C. Spieß. Vielen Dank Antje, für die Möglichkeit die Arbeit an Deinem Lehrstuhl anzufertigen, sowie die Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem möchte ich mich bei den Zweitgutachtern Prof. Dr.-Ing. Andreas Jupke und Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schwaneberg sowie dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr.-Ing. Herbert Olivier herzlich bedanken.

Einige Kooperationen, vorallem innerhalb der AVT, waren entscheidend für das Gelingen meiner Arbeit. So möchte ich mich besonders bei Davide Di Marino und Simon Roth für die produktive, abwechslungsreiche und spannende Zusammenarbeit bedanken.

Bei allen Mitarbeitern der EPT und BioVT bedanke ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Anne Lunze und Christin Cürten für die tolle Zeit, als letzte verbliebene EPTler. Vielen Dank für Euren Rat, die Korrekturen meiner Manuskripte und der Dissertation, sowie die fachlichen und manchmal auch weniger fachlichen Diskussionen während unserer ausgedehnten Kaffeepausen.

Einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit haben auch viele Studenten geleistet, die mich im Rahmen ihrer Abschlussarbeit, ihres Forschungspraktikums oder als HiWi unterstützt haben. Vielen Dank Anita Grochla, Darina Wittke, Florian Hollmann, Janosch Bär, Jasmin Collettere-Tremblay, Jiashuai Han, Katharina Miebach, Kathrin van Gaalen, Laura Herbst, Marcel Gallowy, Mohamed Marouan Kooli, Sahar Mili und Sekar Wahjudi für Euren Einsatz, Eure Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit, die mir immer viel Spaß gemacht hat.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich von Anfang an auf meinem Weg begleitet und unterstützt hat. Mein größter Dank geht an meine wundervolle Frau Nora, die immer hinter mir steht, mich vorallem im letzten Jahr motiviert hat und ohne die, meine Arbeit vermutlich noch nicht fertig geworden wäre.

Publications

This thesis was performed during my doctoral research at the chair AVT - Enzyme Process Technology, RWTH Aachen University as part of the Cluster of Excellence 236 “Tailor-Made Fuels from Biomass“, financed by the excellence initiative of the German federal and state governments to promote science and research at German universities.

Aspects of this thesis have been published previously or have been submitted for publication:

- Chapter 2

Nico Anders, Maike van Ohlen, Tim Jestel, Laura M. Herbst, Mohamed Amine Jmel, Issam Smaali, Antje C. Spieß; Uncover aldehydes in biomass hydrolyzates: disproportionation of aldehydes in alkaline solution and subsequent measurement using an automated HPAEC-PAD method; *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 412 (2020) 5593-5600.

- Chapter 3

Tim Jestel, Laura M. Herbst, Marcel Galowy, Nico Anders, Antje C. Spieß; Gel permeation chromatography of lignin with reduced secondary separation effects; submitted to *Journal of Chromatography A* (2020).

- Chapter 4

Tim Jestel, Simon Roth, Dirk Heesel, Anna Kress, Rainer Fischer, Antje C. Spieß; Laccase-induced HBT-grafting to milled beech wood reduces unspecific protein adsorption; *Bio-catalysis and Biotransformation*; 37:1 (2019) 66-76.

- Chapter 5

Davide Di Marino, Tim Jestel, Caroline Marks, Jörn Viell, Malte Blindert, Stefanie M. A. Kriescher, Antje C. Spieß, Matthias Wessling; Carboxylic acids production via electrochemical depolymerization of lignin; *ChemElectroChem*; 6:5 (2019) 1434-1442.

Kurzfassung

Moderne Bioraffinerien nutzen erneuerbare Rohstoffe, wie zum Beispiel lignocellulosehaltige Biomasse, für eine nachhaltige Produktion von Kraftstoffen und Chemikalien. Effiziente Lignocelluloseverwertungsprozesse beinhalten normalerweise einen thermischen- oder elektrochemischen Ligninabbauprozess. Neben komplexen Produktmischungen sowie geringen Ausbeuten der Zielprodukte, stellen fehlende geeignete analytische Methoden für eine qualitative und quantitative Beurteilung der Ligninabbauprozesse die größten Herausforderungen beim Ligninabbau dar. Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung und Entwicklung von chromatographischen Methoden für die Analyse von Lignin in Ligninverwertungsprozessen.

Um Lignin in unbehandelter Biomasse zu analysieren, wurde eine bereits existierende Methode basierend auf Hochdurchsatz Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion um die Möglichkeit zur Detektion von Fermentationsinhibitoren, wie z.B. Aldehyden und Alkoholen aus Lignin, erweitert. Größenausschlusschromatographie (GPC) ist die Standardtechnik, um das Molekulargewicht von Lignin während des Abtrenn- und Abbauprozesses zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden sekundäre Separierungseffekte, wie z.B. Säuleninteraktion oder Ligninassoziaton, durch Zugabe von Additiven zum GPC Eluenten verringert. Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Elektrosprayionisation-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie (LC-ESI-Q-ToF-MS) wurde genutzt um eine Modifikation der Ligninoberfläche als zugrundeliegenden Mechanismus der Lignocellulosebehandlung mit Laccasen in Kombination mit dem Mediator 1-Hydroxybenzotriazol zu identifizieren. Außerdem wurde Kraft-Lignin elektrochemisch depolymerisiert und resultierende Abbauprodukte, wie z.B. Carbonsäuren, wurden mittels LC-ESI-Q-ToF-MS detektiert und quantifiziert. Um eine einfachere Analyse von komplexen Ligninabbauprozessen zu ermöglichen, wurden GPC und LC-ESI-Q-ToF-MS gekoppelt. Mit Hilfe der neuen Methode konnte das Molekulargewicht von Lignin, sowie die Ligninabbauprodukte in einem einzigen Schritt untersucht werden, ohne arbeitsintensive Probenvorbereitungs- und Verdünnungsschritte.

Insgesamt wird die Wichtigkeit von effizienten und exakten analytischen Methoden für die Ligninanalyse während des gesamten Bioraffinerieprozesses in dieser Arbeit hervorgehoben. Durch die Verbesserung existierender Analytik sowie die Kopplung von Methoden konnten erste wichtige Schritte zu einer vereinfachten und umfangreicheren Ligninanalyse gemacht werden. Speziell die Kopplung von Methoden birgt großes Potenzial, um die Vorteile verschiedener Techniken zu verbinden und somit ein besseres Verständnis von Lignin zu generieren.

Abstract

Recent biorefineries employ renewable resources such as lignocellulosic biomass for sustainable production of fuels and chemicals. Efficient lignocellulose valorization processes usually include thermochemical or electrochemical lignin degradation. However, complex product mixtures and low yields of target products are challenges in lignin degradation. Furthermore, a qualitative and quantitative assessment of lignin degradation processes is often not possible, due to the lack of suitable analytical methods. This work aims at improving and developing new chromatographic methods for the analysis of lignin in biorefineries and lignin valorization processes.

For the analysis of lignin in raw lignocellulosic biomass, an existing method based on high performance anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection was extended by the ability to detect lignin derived aldehydes and alcohols that act as fermentation inhibitors. Gel permeation chromatography (GPC) is the standard technique to monitor the lignin molecular weight during lignin removal and degradation. Here, secondary separation effects such as column interactions and lignin association were reduced by the addition of additives to GPC eluents. Liquid chromatography electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-ESI-Q-ToF-MS) was used to elucidate the underlying mechanism of lignocellulose treatment with laccases in combination with the mediator 1-hydroxybenzotriazole (HBT). Lignin surface modification by HBT grafting led to reduced unspecific cellulase adsorption and thus, increased glucose yields. Furthermore, Kraft lignin was electrochemically depolymerized to produce valuable degradation products such as carboxylic acids that were detected and quantified by LC-ESI-Q-ToF-MS. To enable a more facilitated analysis of complex lignin degradation processes, GPC and LC-ESI-Q-ToF-MS were coupled. With the help of the new method, the lignin molecular weight as well as lignin degradation products could be determined in a single step without labor intensive sample preparation and dilution steps.

Overall, the importance of efficient and accurate analytical methods for lignin analysis during the whole biorefinery process chain was highlighted in this work. By refining existing analytical techniques and coupling of methods, first important steps were successfully taken for a facilitated and comprehensive lignin analysis. Especially, the coupling of different analytical methods has great potential to combine their respective advantages, thereby providing a better understanding of lignin chemistry.

Contents

1	Introduction	1
1.1	Lignin from Biorefineries	1
1.2	Biomass Fractionation	3
1.3	Lignin Chemistry	4
1.4	Lignin Analysis	5
1.5	Objectives	10
2	Detection of Lignin-Derived Aldehydes in Biorefinery Processes	13
2.1	Anion Exchange Chromatography	13
2.2	Materials and Methods	15
2.3	Results and Discussion	18
2.3.1	Investigation of the Cannizzaro Reaction	18
2.3.2	HPAEC-PAD Method Validation	23
2.3.3	Aldehyde Quantification in Biomass Hydrolyzates	23
2.4	Summary of Key Findings	28
3	Molecular Weight Determination of Lignin	29
3.1	Gel Permeation Chromatography	29
3.2	Materials and Methods	31
3.3	Results and Discussion	36
3.3.1	Lignin Composition and Solubility	36
3.3.2	Column Interaction in GPC	38
3.3.3	Alternative GPC Eluent Additives	43
3.4	Summary of Key Findings	45
4	Investigating the Laccase Pretreatment Mechanism	47
4.1	Laccases from <i>Trametes versicolor</i>	47

4.2	Materials and Methods	49
4.3	Results and Discussion	56
4.3.1	Effect of Mediators in LMS Treatment on Subsequent Cellulose Hydrolysis	56
4.3.2	Effects of LMS Treatment on Lignocellulosic Biomass	58
4.3.3	LMS Treatment Reduces Unspecific Protein Adsorption	61
4.4	Summary of Key Findings	64
5	Detection of Carboxylic Acids in Electrochemically Depolymerized Lignin	65
5.1	Electrochemical Lignin Depolymerization	65
5.2	Materials and Methods	67
5.3	Results and Discussion	70
5.3.1	Monitoring Lignin Depolymerization	70
5.3.2	Detection of Lignin Degradation Products	72
5.4	Summary of Key Findings	78
6	Coupling of Analytical Techniques for Lignin Analysis	81
6.1	Linking GPC and LC-MS	81
6.2	Materials and Methods	84
6.3	Results and Discussion	89
6.3.1	Method Development	89
6.3.2	GPC-LC-MS Method Validation	95
6.3.3	Investigating Lignin Degradation	97
6.4	Summary of Key Findings	98
7	Summary and Outlook	101
	Bibliography	106
A	Appendix Chapter 2	129
B	Appendix Chapter 3	135
C	Appendix Chapter 4	141
D	Appendix Chapter 5	145
E	Appendix Chapter 6	151