



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2018 30 stp

Fakultet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap

SEC-MALS-undersøkelse av MWL- isolerte hydrolyseprodukter fra norsk gran (*Picea abies*).

SEC-MALS analysis of MWL-isolated hydrolysis products from Norway spruce
(*Picea abies*).

Ida Karoline Olavesen

Siv.ing. kjemi og bioteknologi: organisk analyse

KBM

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført på Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), ved Fakultetet for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (KBM). Oppgaven gir 30 av de 300 sp. som kreves for å fullføre en mastergrad i teknologi (siv.ing) innen kjemi og bioteknologi. Arbeidet ble utført i perioden august 2017 til mars 2018.

Det praktiske arbeidet ble gjennomført i gruppen for naturstoffkjemi og organisk analyse ved KBM. Det har vært et spennende og utfordrende prosjekt som har gitt meg ny erfaring med SEC-MALS. Ikke minst har dette gitt meg stor glede og erfaring over å både få jobbe i en gruppe, og å få utvikle meg selvstendig på lab.

Jeg vil takke alle som har bidratt i dette prosjektet. En spesiell takk til hovedveileder, Professor Yngve H. Stenstrøm, som ga meg muligheten til å delta i dette prosjektet, for god veiledning og råd underveis. Tusen takk til biveiledere, Professor Dag Ekeberg og Senioringeniør Hanne M. Devle, for all hjelp og gode råd. En spesielt stor takk til Stipendiat Ida S. Aarum, for uvurderlig veiledning og hjelp underveis. En stor takk rettes også til Post. Doc. Magnus Ø. Arntzen, for råd og all hjelp med de instrumentelle problemene jeg møtte på underveis i prosjektet.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtte og oppmuntring under masterstudiene. En stor takk rettes også til mine medstudenter på lab; takk for alle kaffepauser og oppmuntring i denne perioden!

Ås, mars 2018.

Ida Karoline Olavesen

Sammendrag

De siste tiårenes økte fokus på miljøutfordringer har ført til en voksende interesse for *grønt karbon* og bioøkonomi. Karbon fra biomasse er sett på som et bærekraftig alternativ til petroleumbasert karbon. Det er stort potensiale for utvikling og forskning på dette området. Videre utvikling og forskning på biomasse vil gi bedre forståelse og utnyttelse av biopolymerene cellulose, hemicellulose og lignin.

I dette prosjektet var det ønskelig å undersøke hydrolyse av lignin ved dampekspløsning. Åtte prøver av biomasse fra norsk gran (*Picea abies*) ble dampeksplodert i henholdsvis 5 og 10 minutter under 180, 190, 200 og 210°C. Lignin fra disse prøvene ble videre isolert som ballmøll lignin (MWL). Sammen med en ubehandlet prøve ble ligninet analysert på HP-SEC-MALS for å bestemme molekylvekt og molekylmassefordeling.

Det ble observert endring i molekylvekt og molekylmassefordeling med behandlingstid og temperatur. Særlig tydelig var det at molekylvekten til prøver dampeksplodert i 10 minutter sank drastisk. Molekylmassefordelingen til ligninprøvene sank med økt dampekspløsnings-tid og -temperatur. Det ble også påvist at dampekspløsning fører til nedbrytning av karbohydrater som videre isoleres med MWL. Disse karbohydratene må tas i betraktning når estimatene av molekylvekt og molekylmassefordeling vurderes.

Abstract

In the last decades an increased focus on environmental challenges has led to a growing interest for *green carbon* and bioeconomy. Carbon from biomass is seen as a sustainable alternative to petroleum-based carbon. There is a large potential for development and research in this area. Further development and research on biomass will lead to better understanding and utilization of the biopolymers cellulose, hemicellulose and lignin.

The purpose of this project was to analyse the hydrolysis of lignin after steam explosion. Eight samples of biomass from Norway spruce (*Picea abies*) was pretreated with steam explosion at 5 and 10 minutes under 180, 190, 200 and 210°C. Lignin from the samples was then isolated as milled wood lignin (MWL). The samples was analysed at SEC-MALS and compared with an untreated sample. The weigh average molecular mass (M_w), number average molecular mass (M_n) and the polydispersity (\mathcal{D}_M) was determined by analysing the refractive index (RI) and multi angle light scattering (MALS) of the samples.

Changes in molecular weight and molecular mass distribution were observed with increasing steam explosion time and temperature. There is observed a drastically decrease in the molecular weight of samples treated for 10 minutes. The molar mass dispersity of the samples decreased with the steam explosion time and temperature. It was also shown that steam explosion leads to the decomposition of carbohydrates, most likely from hemicellulose. These are isolated with the lignin in MWL. This must be taken into consideration when analysing the estimated molecular weight.

Forkortelser

Tabell 1. Oversikt over forkortelser benyttet i oppgaven.

Forkortelse	Norsk forklaring	Engelsk forklaring
MWL	Ballmøllet lignin	Milled wood lignin
SEC-MALS	Størrelseseksklusjons-kromatografi	Size exclusion chromatography
M_w	Massegjennomsnittlig molekylmasse	Mass average molar mass
M_n	Nummergjennomsnittlig molekylmasse	Numer average molar mass
D_M	Molekylmassefordeling	Molar mass dispersity
RI	Brytningsindeks	Refractive index
MALS	Multivinkellysbrytning	Multi angle light scattering
PAL	Fenylalanin amoniakk lyase	Phenylalanine ammonia lyase
TAL	Tyrosin amoniakk lyase	Tyrosine ammonia lyase
PD	Polymeringsgrad	Degree of polymerization
LP	Lignin peroksidase	Lignin peroxidase
MnP	Mn-avhengig peroksidase	Mn-dependent peroxidase
DE	Dampeksplasjon	Steam explosion
SEC	Størrelseseksklusjons-kromatografi	Size exclusion chromatography
CEL	Cellulotisk enzym lignin	Cellulotic enzyme lignin
EMAL	Enzymatisk mild syrehydrolysert lignin	Enzymatic mild acidolysis
FTIR	Fouriertransformering infrarød spektroskopi	Fourier transform infrared spectroscopy
FT-Raman	Fouriertransformering Raman spektroskopi	Fourier transform Raman spectroscopy
NMR	Kjernemagnetisk resonans	Nuclear magnetic resonance

SEC	Størrelsesekklusjons- kromatografi	Size exclusion chromatography
UV	Ultraviolet-synlig spektroskopi	Ultraviolet-visible spectroscopy
dn/dc	Endring i stoffmengde med konsentrasjon	Refractive index increment
LiBr	Litiumbromid	Lithium bromide
DMF	Dimetylformamid	Dimethylformamide
HSQC	Heteronukleær korrelasjon over én binding	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
Innholdsfortegnelse	VI
1. Introduksjon	1
1.1 Biomasse fra trær	2
1.1.1 Cellulose	2
1.1.2 Hemicellulose	3
1.1.3 Lignin	1
1.2 Forbehandling av biomasse	3
1.2.1 Fysisk forbehandling	4
1.2.2 Kjemisk forbehandling	4
1.2.3 Biologisk forbehandling	5
1.2.4 Dampekspløsjon (DE)	5
1.3 Isolering av lignin	7
1.4 Analyse av lignin	8
1.4.2 Multivinkel lysspredning (MALS)	9
1.4.3 Brytningsindeks (RI)	11
1.5 Mål med oppgave	12
2. Eksperimentelt	13
2.1 Materialer, utstyr og kjemikalier på laboratoriet	13
2.2 Standarder og løsemidler brukt i prosjektet	14
2.4 Analyse med SEC-MALS	16
2.4.1 Mobilfase	16
2.4.2 Standard	16
2.4.3 Ligninprøver	17
2.4.4 Analysering med HP-SEC-MALS	17
3. Resultater og diskusjon	18

3.1 Resultater brytningsindeks (RI)	18
3.1.1 Standarder	18
3.1.2 Ligninprøver	23
3.1.3 Bestemmelse av endringen i stoffmengde med hensyn på konsentrasjon (dn/dc)	29
3.2.1 Standard 1	30
3.2.2 Ligninprøver	33
4. Konklusjon og videre arbeid	41
4.1 Konklusjon	41
4.2 Videre arbeid	41
5. Referanser	43
6. Vedlegg	49
6.1 Brytningsindeks	49
6.2 MALS	50

1. Introduksjon

I en tid med fokus på fornybare karbonkilder, er interessen for bruk av biomasse økende. Den begrensede tilgangen på fossile karbonkilder, i kombinasjon med problematikk rundt klima og energiøkonomi som drivhusgasser og et økt behov for energi på verdensbasis, har ført til en stigende interesse for å finne bærekraftige karbonkilder.^{1,2} Verdens fremtidige energiregnskap vil høyst sannsynlig baseres på alternativer til petroleumbasert energi, som vind, vann, sol, kjernekraft, men også biomasse. Et skifte i samfunnets ressursavhengighet fra petroleumbasert til biomassebasert blir generelt sett på som nøkkelen til utviklingen av et fornybart industrielt samfunn, og en effektiv måte å redusere av utslipp av drivhusgasser.³

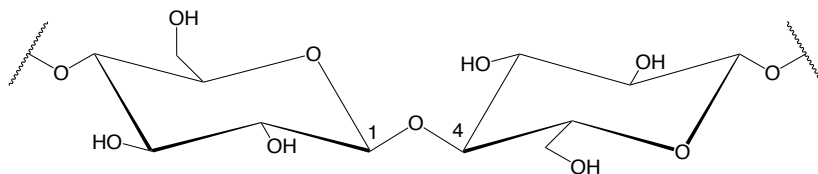
Biomasse er fellesbetegnelsen på alt tilgjengelig organisk materiale. Dette omfatter produkter fra trær, planter, skogavfall og matavfall som kan videre kan prosesseres til utallige produkter og energikilder.⁴ Tradisjonelt har biomasse blitt brukt som energikilde til varmeproduksjon, strøm og som drivstoff.⁵ Denne bruken av biomasse gir ikke et stort økonomisk utbytte. Dette har ført til en satsing på det som nå går under begrepet bioøkonomi. Bioøkonomi omfatter en økonomi hvor grunnlaget for materialer, kjemikalier og energi kommer fra fornybare biologiske ressurser.⁶ Fokuset på bioøkonomi og fornybart karbon har i de senere år skapt et stort marked for andre produkter enn de tradisjonelle biomasseproduktene. Industrielle biobaserte produkter har et enormt potensiale i kjemisk- og material-industri. Diversiteten i biomasseråstoff, kombinert med mange ulike biokjemiske og termokjemiske metoder kan gi et enormt spekter av produkter. Lignin, som tradisjonelt har blitt sett på som et avfallsprodukt, gir opphav til en rekke spesialprodukter med betraktelig høyere økonomisk utbytte enn ved bruk som brensel.⁷ Av spesialprodukter fra biomasse kan nevnes karbohydratbaserte produkter som etanol og cellulosepolymerer som celluloseacetat, og ligninbaserte produkter som adhesiver og vanillin.⁸⁻¹¹

1.1 Biomasse fra trær

Den kjemiske strukturen til trær varierer med tretype og vekstforhold. Det er store forskjeller på sammensetningen i bartrær og løvtrær. Hovedbestanddelene er cellulose, hemicellulose og lignin. Sammensetningen i biomasse fra trær er omtrentlig 40-50% cellulose, 25-35% hemicellulose og 15-20% lignin, i tillegg til små mengder andre komponenter.¹²

1.1.1 Cellulose

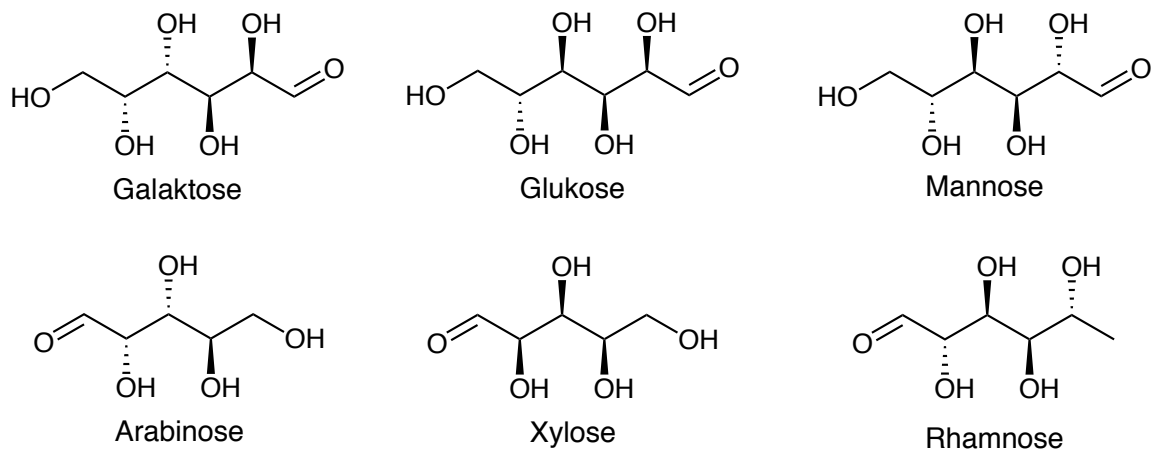
Cellulose er det organiske materialet det finnes mest av på jorden, og er hovedkomponenten i celleveggen til planter. Det er et lineært polysakkarid bygget opp av glukopyranoseenheter i β -(1-4) glykosidbindinger (β -D-glucan). Polymeringsgraden til cellulose varierer fra 10000 til 15000 glukopyranoseenheter. I biomasse forekommer cellulose både i krystallinsk og amorf form, hvorav den amorf formen lettest undergår kjemisk og enzymatisk degradering. Den robuste krystallinske strukturen oppstår grunnet nettverk av hydrogenbindinger mellom cellulosekjedene.¹³⁻¹⁵ For å minske den krystallinske strukturen, og gjøre cellulose mer mottakelig for hydrolyse, benyttes det en rekke forbehandlingsmetoder. Når det kommer til enzymatisk hydrolyse viste Grethlein¹⁶ at økningen i porestørrelse etter forbehandling fører til økt overflateareal for cellulase. Det ble samtidig påvist en liten økning i krystallinitet, noe som tilsier at overflateareal har større effekt på enzymatisk hydrolyse enn krystallinitet. Dette ble også bekreftet av Bertran *et al.*¹⁷ som så rekrystallisering under enzymatisk hydrolyse.



Figur 1. Cellulose er bygget opp av glukopyranoseenheter i β -(1-4) glykosidbindinger. Figur etter Dewick.¹⁸

1.1.2 Hemicellulose

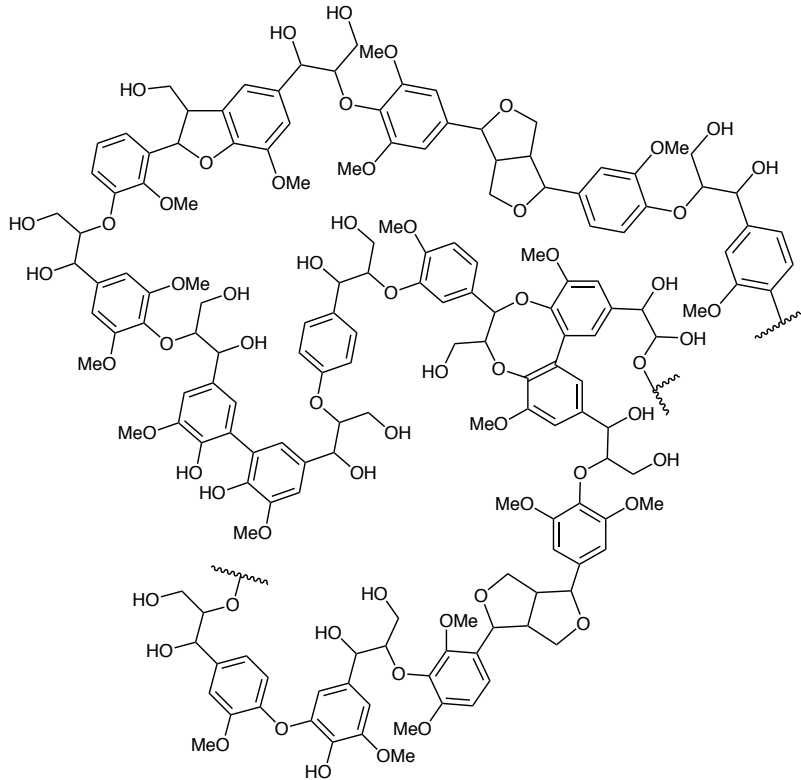
Hemicellulose er betegnelsen på amorf heterogene polysakkarider som forekommer sammen med cellulose i planters cellevegg.¹⁹ De skiller seg fra cellulose med sin kompleksitet og har korte kjedede forgreninger bestående av ulike typer karbohydrater. Hovedbestanddelene i hemicellulose er presentert i Figur 2, og er pentosene xylose, arabinose og rhamnose og heksosene mannose, glukose og galaktose, samt ulike uronsyrer.^{14, 20} Disse pentosene og heksosene gir opphav til en rekke ulike polysakkarider. Et eksempel er mannan, bestående av β -(1-4)-bundede mannoser, som er en av de største bestanddelene i hemicellulose i bartrær.²¹ Mannan kan sammen med glukose danne glukomannan, og med galaktose danne galaktomannan. Det finnes også små mengder L-sukkere i hemicellulose, som L-arabinose. L-arabinose danner sammen med galaktose polysakkaridet arabinogalactan.²² Strukturen til hemicellulose varierer stort i ulike plante- og celletyper, men de har alltid et β -(1-4)-bundet nettverk av glukose, mannose og xylose.²³



Figur 2. Pentosene og heksosene som er hovedbestanddelene i hemicellulose

1.1.3 Lignin

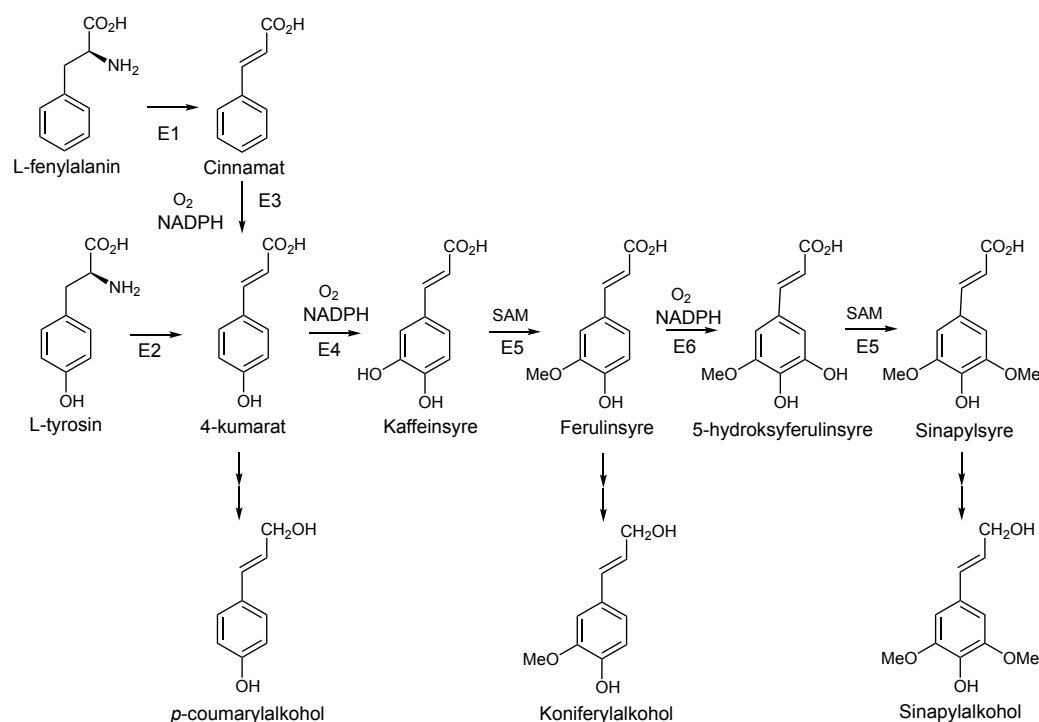
Lignin er komplekse aromatiske heteropolymerer, som gir celleveggen motstand mot mikrobielt angrep og oksidativt stress.¹⁴ Et eksempel på hvordan et ligninmolekyl kan se ut er vist i Figur 3.



Figur 3. Eksempel på ligninstruktur etter Leisola et al.²⁴

Lignin er i hovedsak bygget opp av tre hydroxycinnamylalkohol-monomerer, kalt monolignolene. Monolignolene *p*-coumarylalkohol, sinapylalkohol og coniferylalkohol, blir syntetisert fra L-fenylalanin og L-tyrosin i ulike steg. Biosyntesen av de tre monolignolene vises i Skjema 1. Fenylalanin ammoniakk lyase (PAL) danner kanelsyre, og tyrosin ammoniakk lyase (TAL) danner 4-kumarat, som videre i flere enzymatiske steg danner monolignolene.²⁵ Lignin blir dannet ved fenolisk oksidativ kobling av disse monolignolene.¹⁹ Når monolignolene går inn i ligninpolymeren danner de fenylpropanoidene *p*-hydroksyfenyl (H), guaiakyl (G) og syringyl (S). Bestanddelen av disse i biomasse fra trær avhenger av om massen kommer fra bartrær eller løvtrær. Lignin fra løvtrær består av mest G-lignin mens

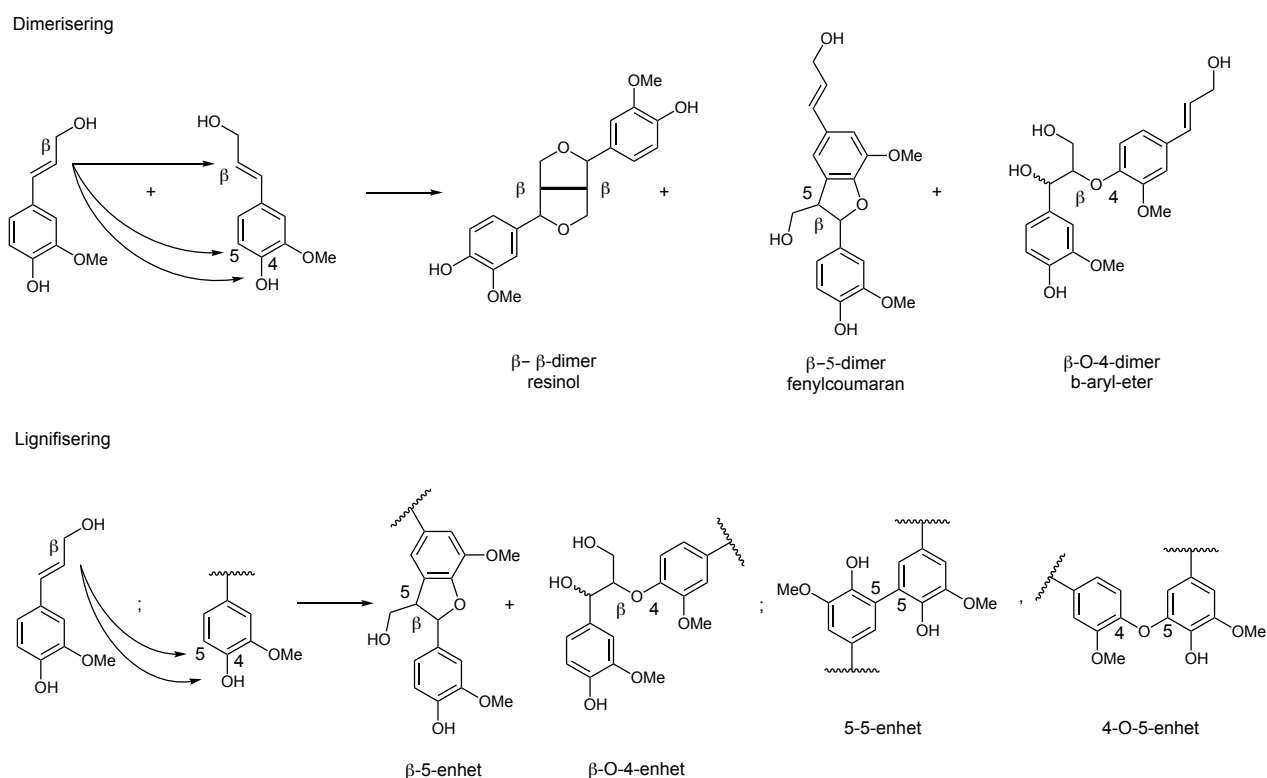
bartrær består av mye S-lignin.²² Til tross for mye forskning på lignins struktur, er den enda ikke fullstendig forstått.²⁶



Skjema 1. Syntese av lignin fra L-fenylalanin og L-tyrosin. E1: fenylalanin ammoniakk lyase (PAL), E2: tyrosin ammoniakk lyase (TAL), E3: cinnamat 4-hydroksylase, E4: p-coumarat 3-hydroksylase, E5: kaffeinsyre O-metyltransferase. Figur etter Dewick²⁵.

Monolignoler favoriserer binding i β -posisjon, dette gir hovedsakelig opphav til dimere bundet sammen i β - β , β -O-4, β -5-posisjon. Lignifisering er prosessen hvor enhetene blir bundet sammen. Mekanismene bak lignifisering er fortsatt ukjent, og det finnes flere hypoteser for dette. I en såkalt tilfeldig koblingsmodell foreslås det at forekommer tilfeldig oksidativ kobling. Dette kan forklare kompleksiteten i forhold til bindingsmønstre og type og antall monolignoler. Andre hypoteser foreslår at det finnes proteiner som dirigerer lignifiseringsprosessen.²² Under lignifisering dannes også bindinger fra dimere i 5-5, 5-O-4 og β -1 posisjon. Dimeriserings- og

lignifiseringsreaksjonene er illustrert i Skjema 2. β -O-4-bindingen er den mest forekommende bindingen i lignin, den er også kjemisk enklest å bryte.^{26, 24}



Skjema 2. Dimerisering og lignifisering etter Boerjan et al.²⁶ Ved dimerisering dannes dimerer med bindingene β - β , β -O-4, β -5. Videre dannes enheter ved lignifisering med danning av β -O-4, β -5, 5-5 og 4-O-5-bindinger.

1.2 Forbehandling av biomasse

Biomassens struktur gjør at den må gjennom forbehandling for at komponentene skal kunne utnyttes. Det benyttes en rekke ulike behandlingsmetoder for biomasse og disse deles typisk inn i fysiske, kjemiske og biologiske forbehandlingsmetoder. Målet med forbehandlingen er å dekomponere lignin og hemicellulose, redusere krystalliniteten hos cellulose, og øke porøsiteten til materialene.^{4,27,28} Valg av type forbehandling avhenger av hvordan komponentene i biomassen skal utnyttes senere. For eksempel vil forbehandling i konsentrert syre føre til nedbrytning av hemicellulose til

monosakkarider, mens bruk av base skiller hemicellulosen fra de resterende komponentene uten å bryte den ned.²⁹ Biomasse består av 50%-80% karbohydrater i polymerer av pyranose- og furanose-strukturer.³⁰ Lignin er svært motstandsdyktig mot enzymatisk og mikrobiell hydrolyse, grunnet sin tette kobling til cellulosemikrofibriller. Grunnet denne tette koblingen er forbehandling nødvendig for at karbohydratene skal bli tilgjengelig for hydrolyse.^{14, 31}

Forbehandling er et kritisk trinn for å øke effektiviteten på utbyttet fra utnyttelsen av biomasse. Det finnes ingen metode som blir sett på som den beste metoden for forbehandling. Generelt bør forbehandlingen eliminere uønsket biomasse kostnadseffektivt, miljøvennlig og tidseffektivt.⁴

1.2.1 Fysisk forbehandling

Fysisk forbehandling omhandler størrelsesreduksjon av biomassen. Dette oppnås ved metoder som flising, kverning og oppmaling eller en kombinasjon av disse. Målet er å redusere størrelsen på biomassen. Denne reduksjonen i partikkelstørrelse fører til økt overflate, og reduserer polymeringsgraden (PD) til materialet^{27, 32}. Hartman *et al.*³³ konkluderte med at oppmaling av biomasse førte til et økt utbytte i biogassproduksjon med opp til 25%.

En annen metode innen fysisk forbehandling er pyrolyse. Her blir biomassen behandlet med temperaturer på mer over 300 °C i en inert atmosfære. Dette fører til dekomponering av cellulose, som produserer H₂ og CO i gassfase og restkarbon.³⁴

1.2.2 Kjemisk forbehandling

I kjemisk forbehandling benyttes reaksjoner for å endre strukturen i biomassen, som for eksempel syrehydrolyse. Det skiller mellom å bruke konsentrerte syrer som H₂SO₄ og HCl ved lave temperaturer, og å bruke fortynnede syrer ved høyere temperaturer. Bruk av konsentrerte syrer kan effektivt skille lignin og cellulose fra

hemicellulose. Dette gir også noe hydrolyse av cellulose til glukose. Store mengder syre er nødvendig for denne prosessen, noe som gjør denne typen forbehandling lite økonomisk gunstig.⁴ Forbehandling med fortynnet syre er en av de mest effektive forbehandlingene for biomasse, den er også ansett som en metode som er både effektiv og økonomisk fordelaktig.^{4,35}

Baser som NaOH og Ca(OH)₂ kan også benyttes for hydrolyse av biomasse. Dette er den mest brukte kjemiske forbehandlingsmetoden, og skiller primært lignin og noe hemicellulose ut fra cellulosen. Forbehandling med baser fører til forsåpning av esterbindinger som finnes som kryssbindinger mellom xylan hemicellulose og andre komponenter som lignin. Dette fører til delignifisering.²⁷ Basisk hydrolyse fører til svelling, som gir økt overflateareal og brudd i ligninstruktur.¹⁴

1.2.3 Biologisk forbehandling

Ved biologisk forbehandling benyttes mikroorganismer som ulike typer sopp og bakterier til nedbrytning av biomassen. Lignin er svært resistent mot kjemisk og enzymatisk nedbrytning, men noen sopp, som hvitråtesopp, kan delignifisere lignocellulose. Mikroorganismene produserer enzymer som lignin peroxidase (LP) og mangan-peroxidase (MnP) som kløyver ulike kjemiske bindinger hos lignin.³⁶ Et eksempel på en hvitråtesopp er *Rigidoporous lignosus*, som skiller ut laccase og mangan-peroxidase som sammen bryter ned lignin.³⁷

1.2.4 Dampekspløsjon (DE)

Dampekspløsjon (DE) er en forbehandling som kombinerer fysiske og kjemiske metoder. Her frigjøres komponentene i biomasse, slik at cellulose blir mer tilgjengelig for enzymer og løsemidler.³⁸ Under dampekspløsjon blir flis av biomasse behandlet med damp ved økende trykk og temperatur under en viss tidsperiode etterfulgt av en hurtig dekompresjon. Dekompresjonen fører til adiabatisk ekspansjon av vann i

porene i trestrukturen. Dette gir defibrering som gjør cellulose mindre krystallinsk. Det vil også forekomme autohydrolyse av komponentene i celleveggen.³⁸

Dampekspløsjon foregår som regel på temperaturer mellom 160-260 °C, med trykk på 0,69-4,83 MPa i opptil flere minutter, før materialet eksponeres for atmosfærisk trykk. Behandlingen fører til reduksjon i partikkelstørrelse og dermed økning i overflateareal og porevolum. Den høye temperaturen fører til degradering av hemicellulose og kjemisk endring i lignin, som også gir kløyving av båndene mellom disse komponentene. Dette fører til økt løselighet for lignin i organiske løsemidler og for hemicellulose i vandige løsemidler.^{19, 27, 39} Zuang og Vidal^{40, 41} har i sin forskning vist at hemicellulose fra osp kan isoleres direkte fra den vandige fraksjonen etter dampekspløsjon.

Effektiviteten til dampekspløsjon påvirkes av flere faktorer; behandlingstid i reaktoren, temperatur, størrelse på flisa og fuktighet.⁴² Bartrær er generelt vanskeligere å defibrere ved dampekspløsjon enn løvtrær.⁴³ Bruk av syrekatalyse med fortynnede syrer, som H₂SO₃ og H₂SO₄, i forkant av dampekspløsjon øker effekten av forbehandlingen. Syrekatalyse gjør det også mulig å benytte lavere dampekspløsjonstid og -temperatur. Det er også vist at syrekatalyse fører til reduksjon av degradering av karbohydrater.^{44, 45} Eklund *et al.*⁴⁶ sammenliknet effekten av SO₂ og H₂SO₄ på selje, og kom frem til at H₂SO₄ ga et godt utbytte av xylose. Det var derimot SO₂ som ga best utbytte av glukose etter hydrolyse. Overend og Chornet⁴⁷ utviklet i 1987 en alvorlighetsindeks for dampekspløsjon på biomasse, R₀. Grunnet bred variasjon av R₀ er det vanlig å bruke den logaritmiske formen av R₀, log R₀.⁴⁸ Denne er vist i Likning 1 (L1), hvor t er tid (min) og T er temperatur (°C).

$$\log R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{(T-100)}{14,75}\right) dt \quad (\text{L1})$$

Nedbrytning av biomasse starter ved en log R₀ på rundt 2.⁴⁹ Flere studier har vist at økt temperatur og tid på dampekspløsjon, som også gir høyere log R₀, gir høyere utbytte av cellulose og lignin. Samtidig gir det også økt destruering og degradering av hemicellulose.^{50, 51}

1.3 Isolering av lignin

Ved isolering av lignin fra resten av biomassen er det ønskelig at ligninets struktur undergår minimalt med strukturelle endringer. Lignin kan isoleres fra ”extractive-free wood” som et uløselig restprodukt etter hydrolytisk fjerning av polysakkaridene. Det kan så hydrolyseres og ekstraheres fra tremassen, eller alternativt blir konvertert til et løselig derivat.⁵² Det finnes flere metoder for isolering av lignin, blant annet Klason lignin⁵³, cellulotisk enzym lignin (CEL)^{54, 55}, enzymatisk mild syrehydrolysert lignin (EMAL)⁵⁶ og de industrielt mye brukte sulfat (kraft)- og sulfittlignin.^{57, 58} I dette prosjektet benyttes ballmøllet lignin (MWL).^{59, 60}

Ved bruk av Klason lignin blir ligninet isolert etter fjerning av polysakkaridene fra ekstrahert tremasse ved hydrolyse i 72 % svovelsyre. For å få en fullstendig hydrolyse starter metoden med kald svovelsyre, som så blir fortynnet til 3,0% og kokt opp.⁶¹ Ulempen med denne typen isolering er at det fører til stor endring i ligninets struktur under hydrolysen.⁵²

Ballmøllet lignin (MWL) er mye brukt i strukturelle studier av lignin. Denne isoleringsmetoden gir liten endring i lignins struktur. Her blir tremassen ballmøllet, enten i en roterende ballmølle, eller i en vibratorisk ballmølle. Dette foregår i tørr tilstand, eller med løsemidler som ikke gir svelling, som for eksempel toluen. Dette fører til at cellestrukturen i tremassen ødelegges, slik at lignin kan ekstraheres fra suspensjonen under røring i en dioksan-vannløsning (96:4, v:v). Etter et døgn blir massen sentrifugert, før den settes til røring i nok en dag. Dette gir et utbytte av MWL på 20-30%, men vil også alltid inneholde rundt 10% karbohydrater.^{52, 58}

Cellulotisk enzym lignin (CEL) er en metode som er tilnærmet lik MWL. Men ved CEL blir polysakkaridene i tillegg separert enzymatisk fra finmalt biomasse ved å tilsette cellulaseenzymer. Dette gir en tilnærmet uendret struktur i ligninet.^{52, 58}

Enzymatisk mild syrehydrolysert lignin (EMAL) er en nyere metode, som kombinerer enzymatisk og mild syrehydrolyse. Denne kombinasjonen gir høyt utbytte og renhet, og ikke store strukturelle endringer.⁶²

Sulfat- og sulfittlignin kalles også kjemisk lignin. Ved produksjon av sulfatlignin blir massen løst i en basisk natriumsulfidløsning i et 4:1-forhold. Masse fra nåletrær kokes ved 170-180°C i ønsket tidsperiode. Produksjon av sulfittlignin foregår ved å behandle massen med vandig natriumsulfitt i 3:1-forhold ved temperaturer over 175°C.⁵⁸

1.4 Analyse av lignin

Lignins kompleksitet gjør det vanskelig å bestemme polymerens struktur. Analyse av lignin er vanligvis tidkrevende med kjemisk degradering og isolering. Dessuten vil strukturen på ligninet endres etter hvilken isoleringsmetode som benyttes. Grunnet lignins komplekse oppbygging, varierende polaritet og løselighet, er det en utfordring å bestemme dens molare masse⁶³. Det er derfor vanlig å karakterisere lignin etter hyppigheten av de ulike monomerenhetene og bindingstypene⁶⁴.

Det er flere teknikker som kan brukes til analyse av lignin. Noen av disse er destruktive, som permanganatoksidasjon, der man kun kan se fragmenter av ligninet.⁶⁴ Spektroskopiske metoder er ikke destruktive, og analyserer hele ligninstrukturen.⁶⁵ Metoder som Fouriertransformasjon infrarød spektroskopi (FTIR) og Fouriertransformasjon Raman spektroskopi (FT-Raman) gir informasjon om funksjonelle grupper og intermolekylære interaksjoner i polymerene. Kubo *et al.*⁴² brukte FTIR til å undersøke dannelsen av hydrogenbindinger i lignin.

En annen spektroskopisk metode er kjernemagnetisk resonans (NMR). Ved bruk av ulike NMR-teknikker kan ulike strukturer i lignin undersøkes. En fordel med NMR i forhold til de andre spektroskopiske teknikkene er høyere oppløsning.⁶⁵ NMR gir informasjon om hyppigheten til de ulike gruppene i lignin, og deres bindingsmønstre.⁶⁴

Kromatografiske metoder som SEC er brukt innen karakterisering av forgrenede polymerer, også på lignin og lignosulfonater. SEC kombinert med detektorer som brytningsindeks (RI), ultrafiolett lysabsorpsjon (UV) og multivinkel lysspredning (MALS), kan gi informasjon om molekylvektfordelingen til polymerer i løsning. Dette gjør det mulig å følge med på lignins oppførsel under ulike forhold, og i ulike løsninger.^{66,67}

1.4.1 Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC)

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) er en separasjonsmetode som separerer molekyler i en løsning med hensyn på molekylene størrelse. I SEC er det ønskelig med høy kromatografisk oppløsning og et bredt separasjonsområde, HPLC tilfører større hastighet, oppløsning, sensitivitet og nøyaktighet til analysen. Dessuten er behovet for elueringsvolum mye mindre enn ved tradisjonell SEC.^{67,68} En SEC-kolonne har et pakkemateriale som, i motsetning til pakkemateriale i andre HPLC-teknikker, er inert, men består av porer i ulike størrelser. Størrelsen på disse porene er nøye kontrollert, og tilpasset kolonnens separasjonsområde. Prinsippet i SEC er at molekyler med minskende størrelse vil diffundere inn i pakkematerialets porer i økende grad. Dette fører til at molekyler med større hydrodynamisk volum vil eluere tidligere enn mindre molekyler. En SEC-kolonne vil kun separere innenfor et gitt område. Molekyler som er for store for diffusjon inn i pakkematerialet elueres helt først, mens molekyler som er så små at de ikke separerer elueres helt sist.^{69,68}

SEC kombinert med en RI-detektor er en mye brukt teknikk for å bestemme gjennomsnittsantall av molekylvekt, M_n , til polymerer.⁷⁰ Denne kan beregnes ved å benytte Likning 2.⁶⁸ Hvor n_i er antall mol polymer av molekylvekt M_i .

Gjennomsnittsantall, M_n :

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (\text{L2})$$

1.4.2 Multivinkel lysspredning (MALS)

Multivinkel lysspredning (MALS) er en ofte brukt teknikk for karakterisering av den molare massen og molekylær radius hos polymere. Sammen med metoder som SEC kan den vektgjennomsnittlige molekylvekten, M_w , bestemmes.² MALS er en teknikk basert på intensiteten til lysspredningen som forekommer når en laserstråle passerer en prøve. Intensiteten til lyset som blir spredt i nullvinkelen er direkte proporsjonal til konsentrasjonen av polymeren som blir analysert.⁷¹

Prinsippet for bestemmelse av molekylvekt ved lysspredning bygger på at intensiteten til lys som blir spredt ved en viss vinkel, θ , er en funksjon av størrelsen på partikkelen som sprer lyset. Koeffisienten som vanligvis brukes til å beskrive lysspredningsegenskapene til materialer er Rayleigh faktor, $R(\theta)$.⁶¹ Rayleigh faktor settes i sammenheng med beregningen av gjennomsnitt av molekylvekt, M_w , etter Likning 3, som videre kan settes i sammenheng med Likning 4.⁷²

$$Kc/R_\theta = 1/M_w + 2A_2c \quad (\text{L3})$$

A_2 er andre virialkoeffisient, som er et mål på svake ikke-spesifikke partikkelinteraksjoner og c er konsentrasjonen.

K i likning (L2) kan utledes til:

$$K = 4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 N_A^{-1} \lambda_0^{-4} \quad (\text{L4})$$

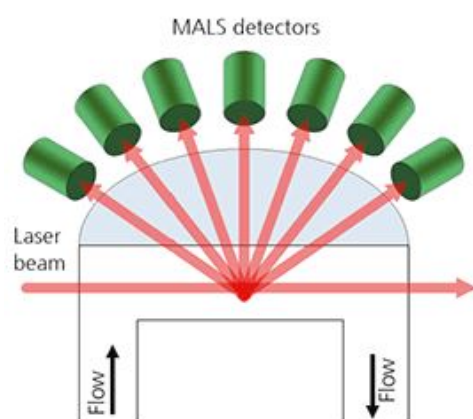
Hvor dn/dc er den gradvise endringen i stoffmengde med konsentrasjon, N_A er Avogadros tall, n_0 er brytningsindeksen til løsemiddelet og λ_0 er bølgelengden til lysstrålen i vakuum.

Når både M_n og M_w er kjent kan man finne molekylmassefordelingen til toppen. Molekylmassefordelingen, \mathfrak{D}_M , finner man ved å dividere M_w på M_n . \mathfrak{D}_M beskriver molekylmassefordelingen i en topp.⁷³

Den enkleste måten å finne M_w med lysspredning ville vært å bruke intensiteten til det spredte lyset ved 0° . Her er forholdet mellom molar masse, konsentrasjon og intensiteten til det spredte lyset enklest. Men siden laserstrålen treffer en partikkel i 180° , vil lyset i denne vinkelen direkte reflekteres tilbake til lyskilden. Det vil derfor ikke være noen lysspredning ved 0° . Med MALS blir det diffunderte lyset målt ved

flere andre vinkler, slik at intensiteten ved 0° blir estimert ved ekstrapolering av data fra høyere vinkler. Zimm plot⁷⁴, Debye plot⁷⁵ og Berry plot⁷⁶ er forskjellige metoder som er utviklet for ekstrapolering av disse dataene.²

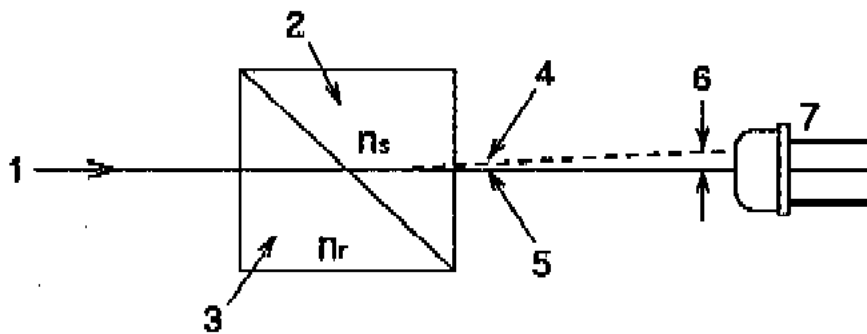
Den generelle oppbyggingen av en MALS-detektor er vist i Figur 4. I denne oppgaven er det benyttet et instrument med 20 detektorer som er satt ulike posisjoner fra 12° til 164° . Laserstrålen går gjennom løsningen, som sprer lyset, som videre blir detektert av de forskjellige detektorene. Signalene disse mottar brukes så videre i estimeringen av molekylstørrelsen ved beregning via Zimm, Debye eller Berry plot.



Figur 4. Figur fra Malvern Panalytical som gir en oversikt over en MALS-detektor. Laserstrålen treffer løsningen i flowcellen. Løsningen vil spre laserstrålen i ulike retninger, som blir detektert av detektorer i ulike vinkler rundt cellen.⁷⁷

1.4.3 Brytningsindeks (RI)

Brytningsindeksen til et optisk medium defineres som ratioen mellom lysets hastighet i vakuum, og lysets hastighet i mediet⁷⁸. Prinsippet til en RI-detektor er å bøye lysstrålen som passerer gjennom en dobbel flytcelle, jamfør Figur 5. Avbøyningen av lysstrålen (1) blir målt av fotodioder i forskjellige kretser (7). Den ene siden i flytcellen er referansecellen, n_r , (3), og inneholder referanseløsning, mens den andre siden inneholder prøveløsningen, n_s , (2). I Figur 5 er (4) og (5) de ulike vinklene lyset reflekteres i, og 6 viser avstanden mellom de når lyset når detektoren.



Figur 5. Oversiktsfigur over flytcellen i en RI-detektor av typen RefraktoMax521. 1: lysstrålen, 2: celle for prøveløsning, 3: celle for referanseløsning, 4 og 5: vinklene lyset reflekteres i, 6: avstanden mellom lysstrålene når de treffer detektoren, 7: fotodioder. Figur hentet fra manual til RefraktoMax521.⁷⁹

Brytningsindeksen er proporsjonal til stoffmengden til prøven som analyseres. I likning 3 (L3) nevnes dn/dc -verdien til en løsning. Denne parameteren er målet på den optiske kontrasten mellom molekylene i løsningen og løsemiddelet. Ved å måle endringen i brytningsindeks med endringen i konsentrasjon på en prøve kan dn/dc bestemmes. dn/dc er et nødvendig parameter for å karakterisere størrelsen, formen, M_w og virialkoeffisienten til polymere og makromolekyler.⁸⁰

1.5 Mål med oppgave

Målet med denne oppgaven er å undersøke molekylvektfordelingen ved hydrolyse av lignin ved forskjellig dampekspløsjons-tid og -temperatur. Analysene skal gjøres ved bruk av HP-SEC koblet til brytningsindeks- og multivinkel lyssprednings-detektorer.

2. Eksperimentelt

2.1 Materialer, utstyr og kjemikalier på laboratoriet

Materialer brukt i prosjektet er vist i Tabell 2.

Tabell 2. Laboratoriematerialer brukt i prosjektet

Laboratoriematerialer	Produsent
Pasteurpipette	VWR
Plastsprøyte 1 mL	BD Plastipak
Plastsprøyte 5 mL	BD Plastipak
Plastsprøyte 10 mL	BD Plastipak
Sprøytefilter 0,20 µm	VWR
HPLC rør 1,5 mL	VWR
11 mm snap ring cap silic.white/PTFE	VWR
Stericup Vakuumfilter 0,22 µm	Millipore
Glassprøyte 500 µL	SGE
Glassprøyte 10 µL	Hamilton

Laboratorieutstyr brukt i prosjektet er vist i Tabell 3.

Tabell 3. Laboratorieutstyr brukt i prosjektet

Laboratorieutstyr	Spesifikasjon	Produsent
Analysevekt	CP2P	Sartorius
Sentrifuge	5430 R, 160mm	Eppendorf

Kjemikalier brukt i prosjektet er vist i Tabell 4.

Tabell 4. Kjemikalier brukt i prosjektet

Kjemikalie	Renhet	Kvalitet	Produsent	CAS-nr.
Milli-Q vann		Type 2	Millipore	
Acetonitril (ACN)	≥ 99,9 %	HPLC grade	Honeywell	75-05-8
Dimetylsulfoksid (DMSO)	≥ 99,7 %	HPLC grade	Sigma-Aldrich	67-68-5
Etanol	≥ 99,8 %	Normapur	VWR	64-17-5
Metanol	≥ 99,8 %	Analytisk standard	Sigma-Aldrich	67-56-1
Tetrahydrofuran	≥ 99,9 %	HPLC grade	Sigma-Aldrich	109-99-9
Etylacetat	≥ 99,7 %	HPLC grade	Sigma-Aldrich	141-78-6
Toluen	≥ 99,8 %	HPLC grade	VWR	108-88-3

2.2 Standarder og løsemidler brukt i prosjektet

Standarder brukt i prosjektet er vist i Tabell 5.

Tabell 5. Standarder brukt i prosjektet

Standard	Renhet	Produsent	CAS-nr.
Natriumpolystyrensulfonat 4300 Da	> 90 %	Sigma-Aldrich	9080-79-9
Natriumpolystyrensulfonat 32000 Da	> 90 %	Sigma-Aldrich	9080-79-9
Polystyren 4000 Da		Sigma-Aldrich	9003-53-6
Polystyren 30000 Da		Sigma-Aldrich	9003-53-6
2-metoksy-4-propylfenol	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich	2785-87-7

Det ble forsøkt flere ulike typer eluentsystemer i dette prosjektet. Disse er presentert i Tabell 6.

Tabell 6. Eluentsystemer benyttet i prosjektet

Løsemiddel	Forhold
H ₂ O, dimetylsulfoksid	75/25, 50/50, 25/75
H ₂ O, Etanol	75/25, 50/50, 25/75
Acetonitril, dimetylsulfoksid, tetrahydrofuran	40/30/30
Etanol, dimetylsulfoksid, acetonitril	30/30/40
Etylacetat, acetonitril, dimetylsulfoksid	40/30/30
Toluen, acetonitril, dimetylsulfoksid	40/30/30
H ₂ O, dimetylsulfoksid, acetunitril	30/30/30
Dimetylsulfoksid, acetonitril	30/70

2.3 Forbehandling, isolering og rensing av ligninprøver

Treverk fra norsk gran (*Picea abies*) uten bark ble fliset til 20-30 mm flis, deretter pakket og sendt til Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU) på Ås, Norge. Materialet ble videre tørket i trommeltørker ved romtemperatur, før det ble møllet og lagret ved romtemperatur.

Dampekspløsjon med utstyr fra Cambi, AS, Asker, Norge ble utført på NMBU, Ås, Norge, etter metode beskrevet av Horn *et al.*⁸¹ Før dampekspløsjon ble prøvene syrekatalysert med fortynnet svovelsyre ved milde forhold. Åtte prøver ble dampeksplodert ved temperatur på 180, 190, 200 og 210°C, i 5 og 10 minutter.

Videre ekstrahering og opprensning av DE prøver og isolering av lignin ble gjennomført av masterstudent Hörður Gunnarson ved NMBU, Ås, Norge. Isolering av lignin ble gjennomført etter metoden for MWL, i to paralleller for hver av de åtte prøvene. Det ble også isolert lignin fra en ubehandlet prøve, slik at denne kunne brukes til sammenligning med de DE-prøvene. Prøvene, med unntak av den

ubehandlede, ble videre tørket, og deretter ballmøllet. Til slutt ble ligninet ekstrahert og rensset. Nøyaktig prosedyre for dette er beskrevet av Gunnarson (2017).⁶²

2.4 Analyse med SEC-MALS

2.4.1 Mobilfase

Det ble laget mobilfase av blanding av milli-q H₂O, dimetylsulfoksid (DMSO) og acetonitril (ACN) i et 1:1:1-forhold (se Tabell 6). Dette ble filtrert gjennom et 0,22 µm Stericup-filter, og overført til glassflaske.

2.4.2 Standard

Det ble laget en standard med komponent vist i Tabell 2.4. Grunnet utprøving av ulike løsemidler, ble det først forsøkt å bruke polystyrenstandarder i helorganiske løsemidler. Da det etterhvert ble bestemt å bruke løsemiddel med H₂O ble det isteden benyttet natriumpolystyrensulfonat.

Det ble laget en stamløsning på 5,0 mg/mL ved at det ble veid inn $25,0 \pm 0,1$ mg av natriumpolystyrensulfonat som videre ble løst i 5 mL løsemiddel. Denne løsningen ble videre filtrert gjennom 0,20 µm sprøytefilter over i rene 5 mL eppendorfrør. Ut i fra stamløsningen ble det laget en fortykning på 2,5 mg/mL ved å ta ut 500 µL av løsningen og fortynne den i 500 µL løsemiddel.

Det ble også laget en standard på 10,0 mg/mL. Denne ble laget etter samme metode som over, ved at $10,0 \pm 0,1$ mg av natriumpolystyrensulfonat ble veid ut, og videre fortynnet i 1 mL løsemiddel.

En standard av 2-metoksy-4-propylfenol ble også veid ut i en konsentrasjon på 10 mg/ml. Dette ble gjort ved å veie ut $10,0 \pm 0,1$ mg med 2-metoksy-4-propylfenol som ble fortynnet i 1 mL løsemiddel.

1-2 mL av standardene ble overført til HPLC-rør av glass. Det ble benyttet «snap»-lokk av typen beskrevet i Tabell 2.1.

2.4.3 Ligninprøver

Det ble laget ligninprøver med konsentrasjon 10,0 mg/mL ved å veie ut $50,0 \pm 0,1$ mg av de ulike ligninprøvene, som videre ble løst i 20 mL løsemiddel i 5 mL eppendorfrør. Videre ble prøvene filtrert over i 5 mL eppendorfrør gjennom sprøytefilter på 0,20 μm . 2 mL av prøvene ble overført til HPLC-vialer.

I prøver behandlet ved 200 og 210 °C var ikke alt materialet løselig. Disse fikk sedimentere, og ble videre sentrifugert ved 6000 rpm i 10 min ved 21 °C på en Eppendorfsentrifuge. Supernatanten ble overført til et nytt 5 mL eppendorfrør, før det videre ble overført 2 mL prøve til en HPLC-vial. Det ble benyttet «snap»-lokk av typen beskrevet i Tabell 2.1.

2.4.4 Analysering med HP-SEC-MALS

Analysen ble utført med et UHPLC-system (UltiMate 3000, Thermo Scientific), koblet til en RI-detektor (RefractoMax521, Thermo Scientific) og en MALS-detektor (SEC-MALS 20, Malvern). Instrumenttemperaturen var satt til 30 °C. Flytcellen til RI-detektoren rommet 8 μL . Laserbølglengde på MALS-detektoren var på 660 nm, med en flytcelle på 63 μL . Det ble benyttet forkolonne Shodex Asahipak GS-2G 7B og SEC-kolonne Shodex Asahipak GS-320 HQ, med en dimensjon på 75x300 mm.

Mobilfasen besto av H₂O, dimetylsulfoksid og acetonitril i et 1:1:1-forhold. Det var 60 minutter lange programmer ved analysering av prøver, med en hastighet på 0,4 mL/min og et injeksjonsvolum på 20 μL . Mellom hver analyse av prøve ble det injisert blanke prøver med 20 μL løsemiddel i 40 minutter lange programmer. Hver prøve ble analysert tre ganger.

3. Resultater og diskusjon

Dette kapitlet er delt inn i to seksjoner etter resultater fra brytningsindeks (RI) og resultater fra multivinkel lysspredning (SEC-MALS).

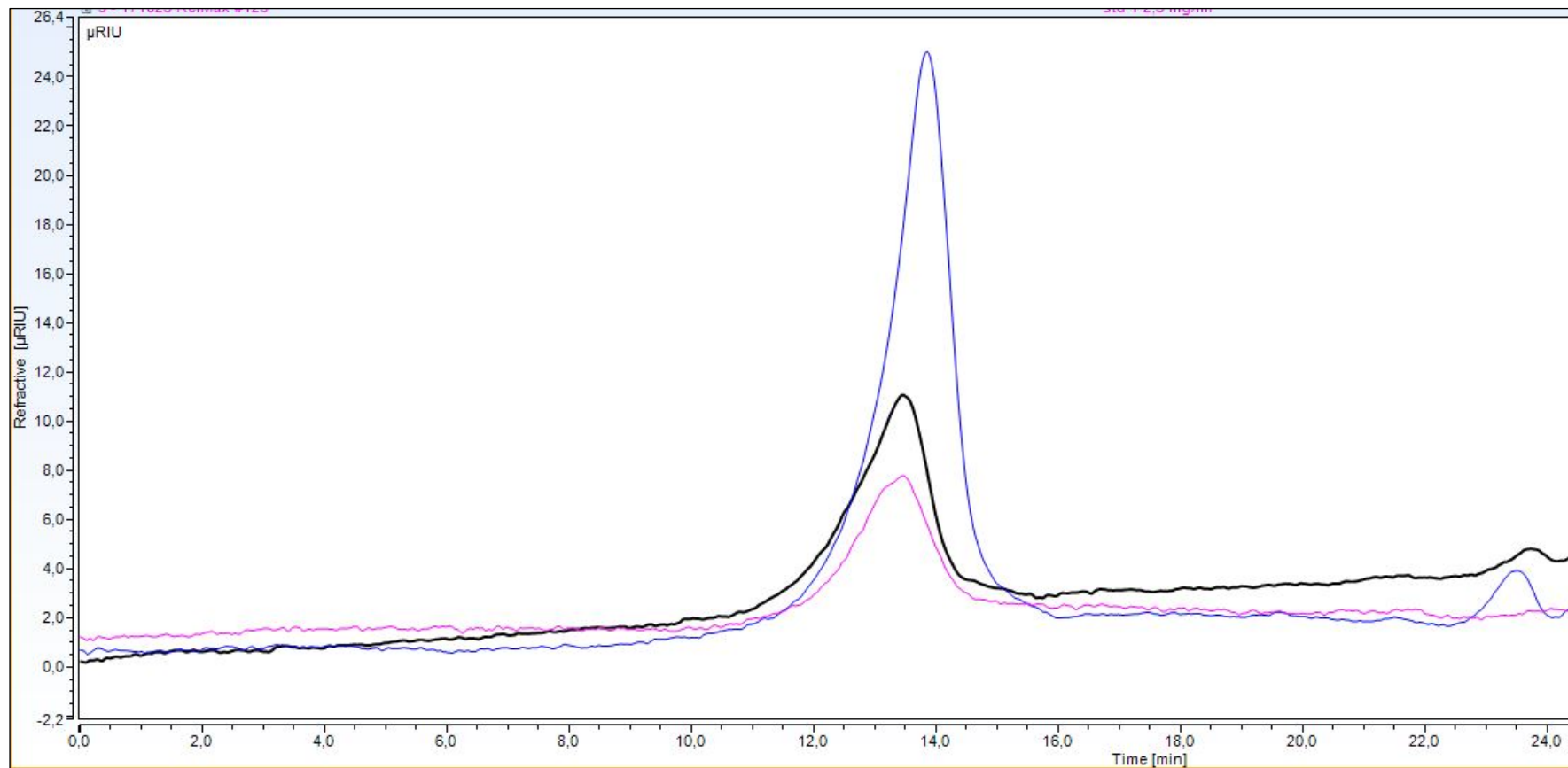
3.1 Resultater brytningsindeks (RI)

Under analysen av brytningsindeks ble to ukjente topper i kromatogrammet eluert (se vedlegg 1). Toppene blir videre kalt Ukjent topp 1 og 2. Disse toppene oppstod både ved injeksjon av prøve og ved injeksjon av løsemiddel, og eluerte ved 25 og 33 minutter. Årsaken til disse er ukjent, men Ukjent topp 2 kan være en eluenttopp. Ut i fra beregninger skal det totale kolonnevolumet være eluert etter omtrent 33 minutter med en mobilfasehastighet på 0,4 mL/min. Dette stemmer godt med elueringstiden til den andre ukjente toppen. Et annet fenomen som er sett hos eluenter bestående av flere komponenter er såkalte «ghost peaks», eller tomme topper.⁸²⁻⁸⁴ Toppene har grunn i lokale endringer i komposisjonen til eluenten, og blir oftest detektert på detektorer av typen refraktometere. En annen forklaring kan være forurensinger i HPLC-systemet. Eventuelle forurensninger som har sedimentert et sted i systemet kan løses opp for hver injeksjon og gi utslag på detektoren. Sprøyte, injeksjons-loop og -ventil ble forsøkt rensed ved flere anledninger. Dette ga ikke endringer i de ukjente toppene. Hvis det er forurensninger som er årsak til dette må det derfor sitte et annet sted i systemet.

3.1.1 Standarder

I dette prosjektet ble det forsøkt å analysere to standarder. Disse blir kalt Standard 1 og Standard 2, på henholdsvis 32000 Da og 4300 Da. Da Standard 2 ikke fikk synlig utslag på hverken brytningsindeks eller MALS, er kun Standard 1 analysert videre. En årsak til at Standard 2 ikke ble detektert, kan være at den har koeluert med en av de ukjente toppene. Kromatogram fra én parallell av hver konsentrasjon er samlet i Figur 6. Analysene ga fine, men små utslag på brytningsindeks. Disse ble brukt i videre beregninger. En av utfordringene med analysemetoden er drift av grunnlinje hvilket illustreres godt i Figur 6. For kromatogrammet til analysen av 5 mg/mL er det en tydelig drift på omtrent 5 μ RIU over 24 minutter. I tillegg til problemet med drift var det også en del trykkproblemer i dette prosjektet. Blant annet var det ikke mulig å

analysere flere prøver rett etter hverandre, da dette førte til ustabilitet. Dette ble løst ved å injisere en blank prøve mellom hver analyse. Et gjentakende problem var stor drift i positiv eller negativ retning utenfor brytningsindeksdetektorens deteksjonsområde. I disse tilfellene fikk instrumentet stå et døgn med lav elueringshastighet for å stabiliseres.



Figur 6. Kromatogram for Standard 1 på 32000Da. Kromatogramets farger tilsvarer følgende konsentrasjoner: ● 2,5 mg/mL, ● 5 mg/mL, ● 10 mg/mL.

Gjennomsnittlig data fra brytningsindeksanalysen av Standard 1 er presentert i Tabell 7. Det er beregnet gjennomsnitt av de tre analysene fra hver prøve for å beregne areal og retensjonstid med tilhørende standardavvik (SD). Retensjonstiden til Standard 1 er rundt 14 minutter. Arealet øker ikke proporsjonalt mellom 2,5 og 5 mg/mL, i motsetning til mellom 5 og 10 mg/mL.

Tabell 7. Viser gjennomsnittsareal, standardavvik (SD) og gjennomsnittlig retensjonstid for tre repetisjoner av standard på 32000 Da.

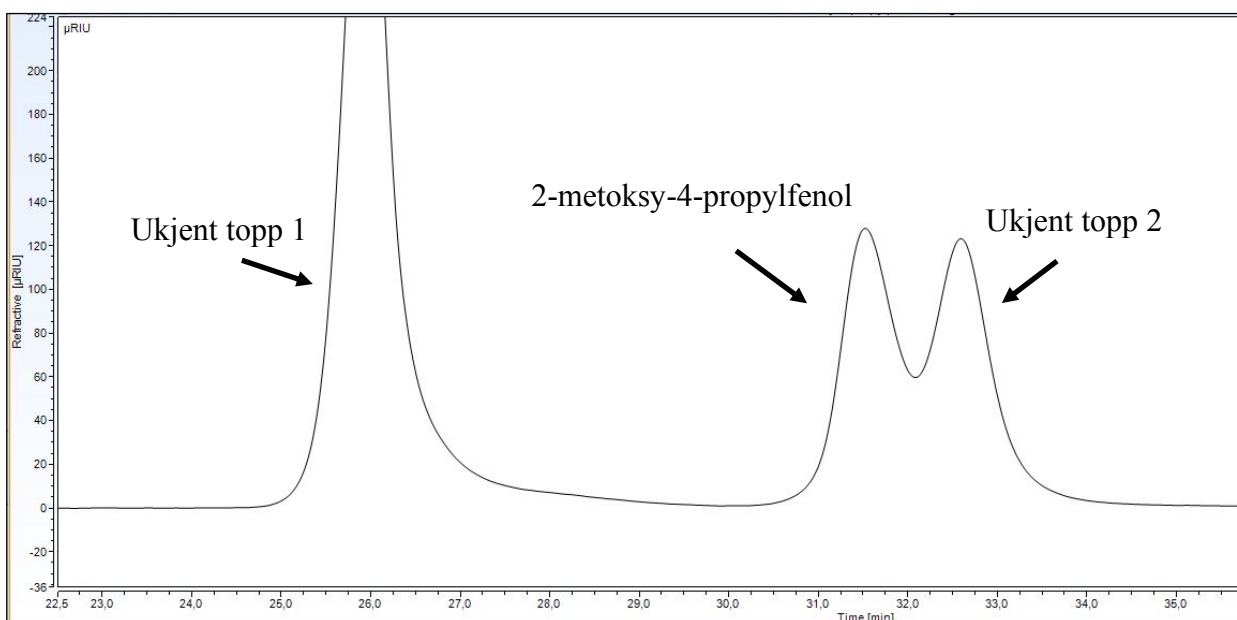
Konsentrasjon [mg/mL]	Gjennomsnittlig areal [μ RIU*min]	SD areal	Gjennomsnittlig retensjonstid [min]	SD retensjonstid
2,5	10,75	1,02	13,49	0,08
5	16,70	2,79	13,72	0,23
10	33,01	2,78	14,56	0,40

Da det ikke var mulig å analysere Standard 2, ble det i stedet analysert en monomer, 2-metoksy-4-propylfenol med molekylmasse på 166,22 g mol⁻¹. Denne ble kun analysert i en konsentrasjon på 10 mg/mL. Data for denne analysen er presentert i Tabell 8. Retensjonstiden er på rundt 31,5 minutter. Dette resultatet, sammen med resultatet til Standard 1, gir en indikasjon på størrelsesfordelingen i forhold til retensjonstiden i kromatogrammet.

Tabell 8. Areal og retensjonstid for analyse av 2-metoksy-4-propylfenol.

Areal [μ RIU*min]	Retensjonstid [min]
94,37	31,59
94,93	31,46
95,17	31,52

Figur 7 viser kromatogrammet til monomeren 2-metoksy-4-propylfenol. De andre toppene med retensjonstid på 25 og 33 minutter er Ukjent topp 1 og 2. Deler av toppen til monomeren elueres dessverre samtidig som Ukjent topp 2, og gir derfor ikke en fullstendig separert kromatografisk topp. I motsetning til toppene for Standard 1 har denne toppen et høyt utslag. Årsaken til dette er den lave molekylvekten til toppen. Lav molekylvekt gir et helt annet konsentrasjon per 10 gram utveid prøve enn det en standard på 32000 Da vil gi. Brytningsindeksen er konsentrasjonsavhengig og blir derfor tilsvarende høyt.

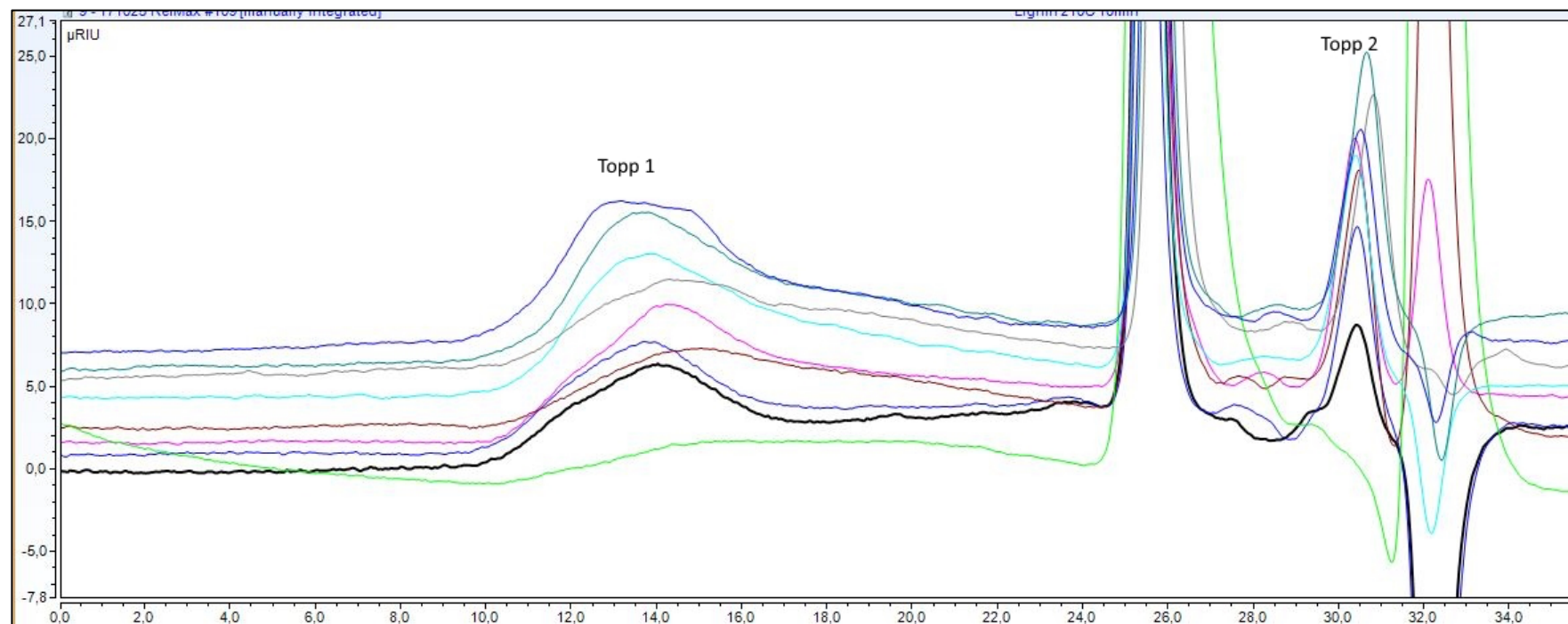


Figur 7. Kromatogram fra analyse av 2-metoksy-4-propylfenol med retensjonstid etter 31,5 minutter.

3.1.2 Ligninprøver

Data for analyser av ligninprøver finnes i vedlegg 7.1. Et kromatogram fra hver av prøvene som ble analysert er presentert i Figur 8. Det er rettet fokus mot to topper i kromatogrammet, heretter kalt Topp 1 og Topp 2. Topp 1 har retensjonstid på 14 minutter, og Topp 2 har retensjonstid på 30 minutter. Topp 1 hos ubehandlet lignin har et lite areal, og elueres ut over 14 minutter. Hos de dampeksploderte (DE) prøvene har Topp 1 like lang elueringstid, men større areal. Med høyere DE-temperatur blir Topp 1 smalere, noe som tyder på at det blir en mer uniform molekylstørrelse i toppen. Den lange elueringstiden til Topp 1 kan være resultatet av aggregering av ligninmolekyler med ulik størrelse. Flere studier viser at dette kan forekomme mellom ligninmolekyler løst i organiske og vandige løsemidler.^{85, 86, 87} Cathala *et al.*¹⁰ undersøkte MWL løst i dimethylformamid (DMF). Studiet viste at MWL ga bimodale topper på RI, grunnet aggregering. Selv om det ikke er typiske bimodale topper i kromatogrammet (Figur 8), kan det tenkes at de lange toppene har grunn i aggregering av lignin. For å forhindre dette, er det mulig å tilsette salter, slik som litiumbromid (LiBr). Gidh *et al.*⁸⁸ brukte LiBr ved sin studie av lignin på HP-SEC. Dette ga bedre separasjon. Men det er også vist at tilsetting av salt kan øke interaksjonen mellom prøven og SEC-kolonnen, og derfor gi endret elueringstid.⁸⁹

Topp 2 oppstår først etter DE. Denne toppen har høyt utslag med kort elueringstid, altså kan det forventes at molekylstørrelsen er tilnærmet uniform. Toppen har derimot en liten forflytning med DE-tid og -temperatur. Dette tyder på at molekylmassen kan variere noe. I kromatogrammet i Figur 8 har Topp 2 et sterkt økende areal mellom DE i 180°C i 5 og 10 minutter. I de andre temperaturene holder arealet seg ganske stabilt. Dette tyder på at mengden av komponenter som elueres i Topp 2 ikke har stor endring ved økt DE-tid og -temperatur etter 190°C. Det må altså også dannes molekyler av andre størrelser. Ved nærmere studie av Figur 8, er det små topper i grunnlinjen i kromatogrammet. Særlig tydelig er disse mellom Ukjent topp 1 og Topp 2. Mest sannsynlig er det at toppene uttrykker små mengder nedbrutte molekyler av forskjellig størrelse. Det er også sannsynlig at aggregering er en av årsakene til at disse ikke gir gode utslag på brytningsindeks.



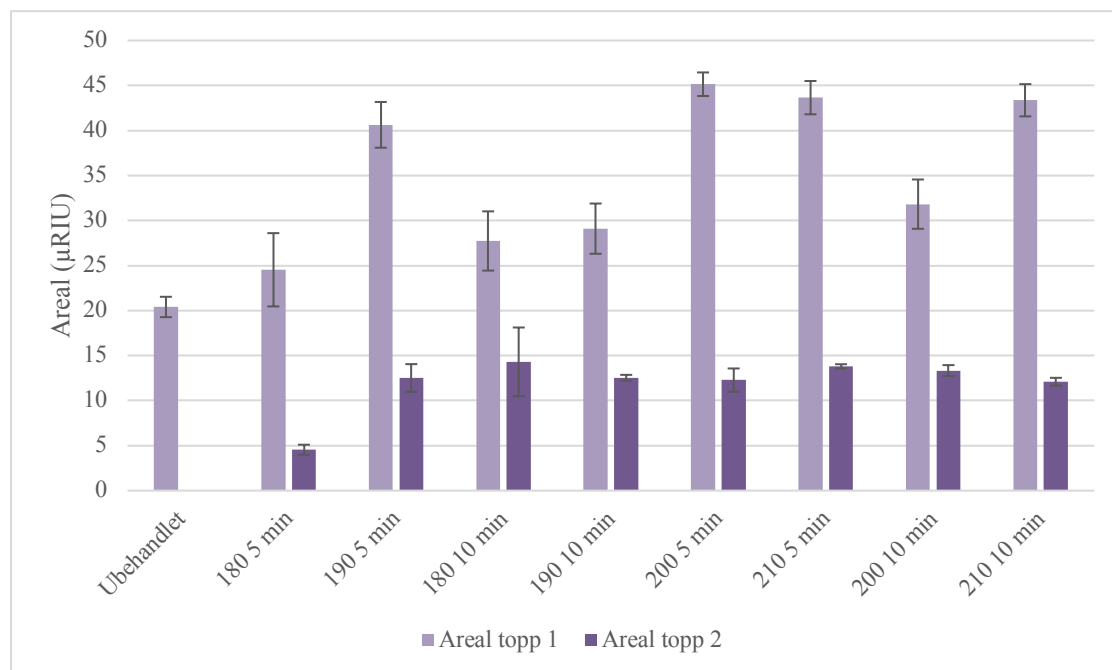
Figur 8. Kromatogram for ligninprøver med konsentrasjon 10 mg/mL. Topp 1 med retensjonstid etter 14 minutter, Topp 2 med retensjonstid etter 30 minutter.

● Ubehandlet lignin, ● 180°C 5 min, ● 180°C 10 min, ● 190°C 5 min, ● 190°C 10 min, ● 200°C 5 min, ● 200°C 10 min, ● 210°C 5 min, ● 210°C 10 min.

Arealet til Topp 1 og 2 er presentert i Figur 9 etter økende betingelser under dampekspløsjon ($\log R_0$), som er beregnet etter L1. Resultatene av denne beregningen finnes i Tabell 9, og stiger med økt DE-tid og -temperatur.

Tabell 9. Viser alvorlighetsfaktor ($\log R_0$) for dampekspløsjons-temperatur og -tid.

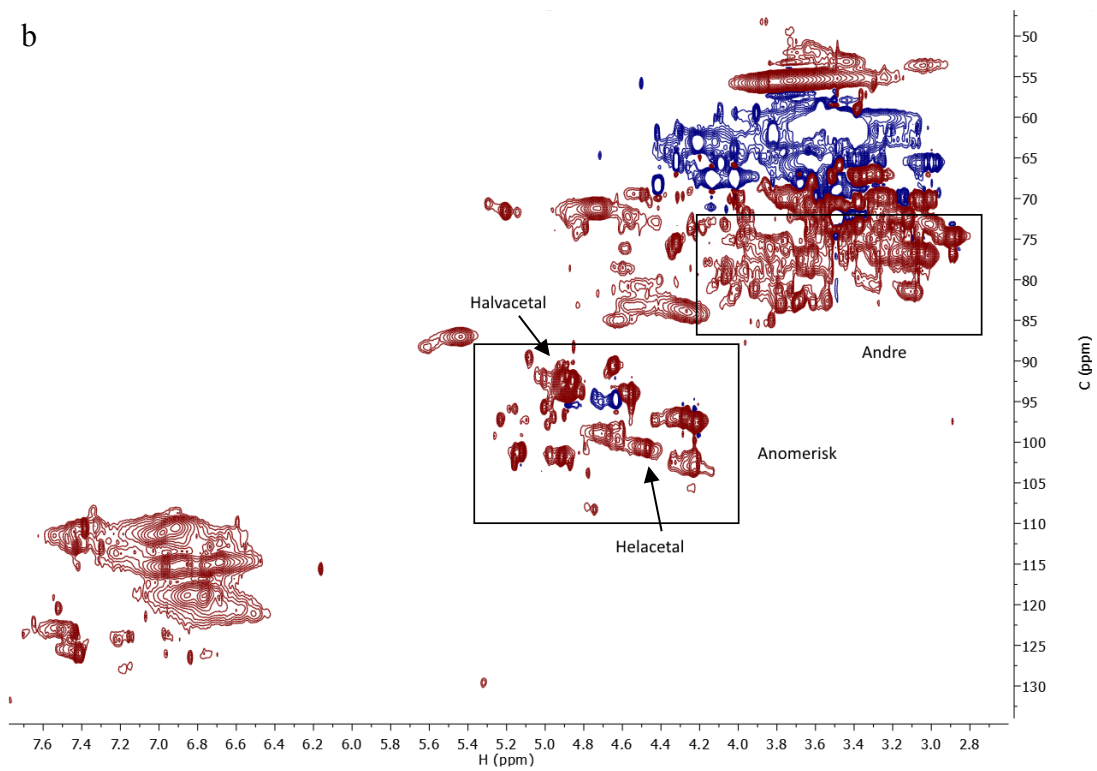
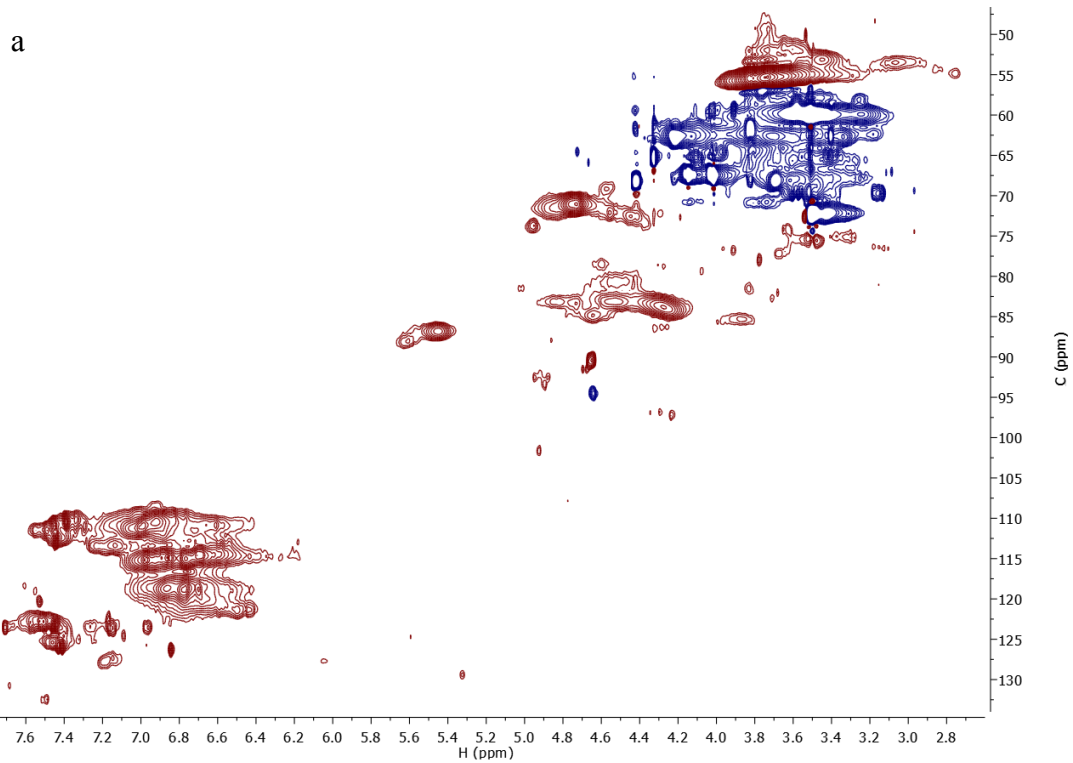
Dampekspløsjons-temperatur [°C] og -tid [min]	Økende betingelser under dampekspløsjon [$\log R_0$]
180 °C 5 min	3,1
190 °C 5 min	3,3
180 °C 10 min	3,4
190 °C 10 min	3,6
200°C 5 min	3,6
210 °C 5 min	3,9
200 °C 10 min	3,9
210 °C 10 min	4,2

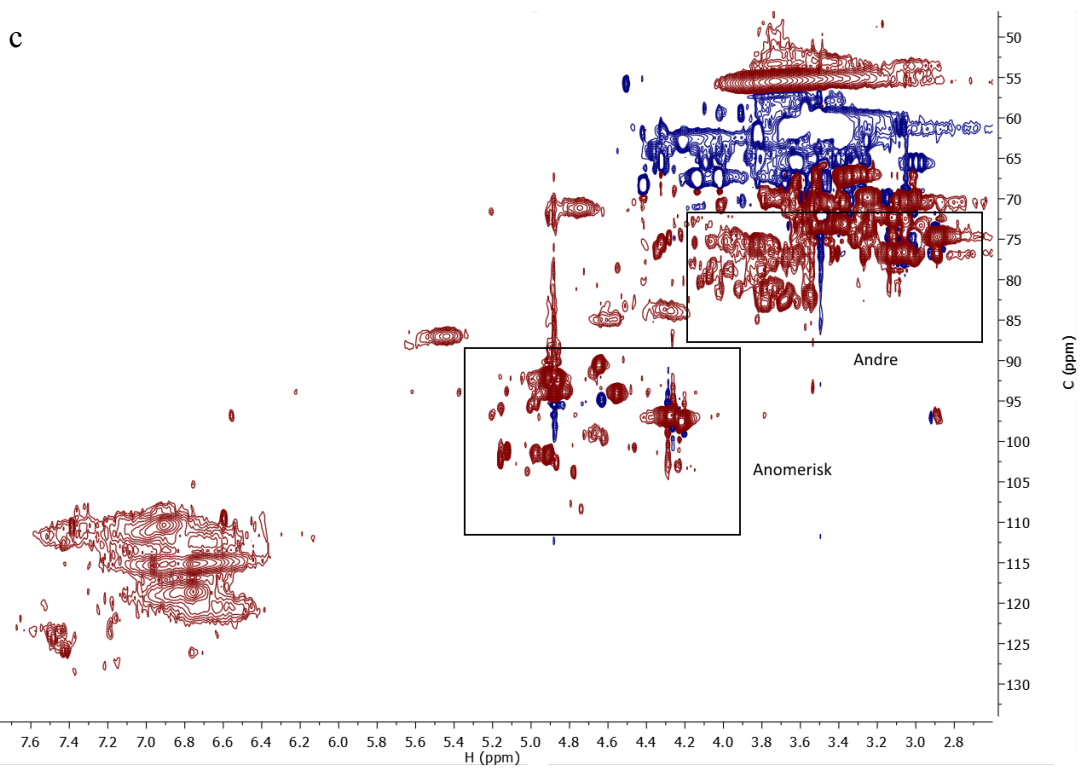


Figur 9. Viser gjennomsnittlig brytningsindeksareal (μRIU) for tre repetisjoner av ligninprøver 10 mg/mL.

Topp 1 for ubehandlet lignin har et ganske lite areal. Ved DE 180 °C i 5 minutter øker arealet noe, før det ved behandling i 190 °C i 5 minutter øker drastisk. Det er uventet at Topp 1 øker ved DE, når det er forventet hydrolyse av lignin. Dette indikerer at DE gir en nedbrytning som fører til at andre komponenter i biomassen kommer med under isoleringen av MWL. Flere studier har vist at nedbrytning av cellulose ikke forekommer før ved høy log R₀, noe det ikke er ved 180°C i 5 minutter (Tabell 9).^{47, 90-92} Det er derfor sannsynlig at det er hemicellulose som isoleres med ligninet i prøvene. Gunnarson *et al.*⁶² analyserte de samme ligninprøvene som er benyttet i dette prosjektet på NMR. HSQC-spektrum hentet fra deres prosjekt er presentert i Figur 10 a, b, og c. Sammenliknes ubehandlet lignin (Fig. 10a) og lignin DE i 180 °C i 5 minutter (Fig. 10b) er det tydelig at det skjer en endring ved behandling. De markerte områdene på Figur 10b viser områder med karbohydrater som ikke er synlige i den ubehandlede prøven. Dette kan være store polymere eller oligomere karbohydrater med høy molekylvekt. Med en kolonnekapasitet på 40000 Da, er det sannsynlig at karbohydratene elueres fra kolonnen på samme tidspunkt som den første toppen i kromatogrammet, og fører til økning i toppens areal.

I HSQC av ligninprøve DE i 210 °C i 10 minutter (Fig. 10c) er toppene med karbohydrater tydelig redusert. Dampekspløsjon ved så høy tid og temperatur har høy log R₀, og fører til videre nedbrytning av karbohydratene i prøvene. Dette bekreftes av Overend og Chornet⁴⁷ som skriver at øktende betingelser ved dampekspløsjon fører til minskning av hemicellulose, som brytes ned til mindre komponenter som f.eks. furfural. Jakobsons *et al.*⁹³ karakteriserte baseløselige komponenter fra DE av bjørk i sin studie. De kunne vise at bestanddelen av polysakkarider sank fra 50% til kun sporbart fra log R₀ på 3,0 til 4,2. Denne nedbrytningen er årsaken til at arealet til Topp 2 synker ved behandling i 10 minutter.





Figur 10(a,b,c). HSQC av ligninprøver. (a) Ubehandlet lignin, (b) 180 °C 5 minutter, (c) 210 °C 10 minutter. Anomeriske karbohydrater er markert i ruten nederst til venstre. Ruten til høyre markerer andre anomeriske karbohydrater, men de er ikke fra de samme karbohydratene som ruten nederst til venstre.

3.1.3 Bestemmelse av endringen i stoffmengde med hensyn på konsentrasjon (dn/dc)

Standard 1 og ligninprøvens endring i masse med konsentrasjon, dn/dc, ble bestemt ut i fra brytningsareal og prøvekonsentrasjon. Disse verdiene er presentert i Tabell 10 og 11. Verdiene ble brukt ved kalibrering av metode og ved bestemmelse av molekylmasse fra MALS-signaler.

Tabell 10. Viser beregnet dn/dc for Standard 1 med tilhørende (SD). dn/dc er beregnet på gjennomsnittet av tre repetisjoner av tre konsentrasjoner.

Prøve	dn/dc	SD
Standard 1	0,27	0,05

Tabell 11. Viser beregnet dn/dc for ligninprøver med tilhørende SD. dn/dc er beregnet på gjennomsnittet av tre repetisjoner av to konsentrasjoner. * Ubehandlet lignin er beregnet på tre repetisjoner av tre konsentrasjoner. Det var ikke mulig å beregne dn/dc for Topp 2 ved 180 °C.

Prøve	dn/dc Topp 1	SD	dn/dc Topp 2	SD
Ubehandlet*	0,36	0,13		
180°C 5	0,36	0,026		
180°C 10	0,38	0,0042		
190°C 5	0,25	0,013	0,73	0,094
190°C 10	0,33	0,016	0,74	0,079
200°C 5	0,20	0,18	0,72	0,13
200°C 10	0,29	0,029	0,68	0,10
210°C 5	0,25	0,030	0,67	0,084
210°C 10	0,21	0,028	0,79	0,057

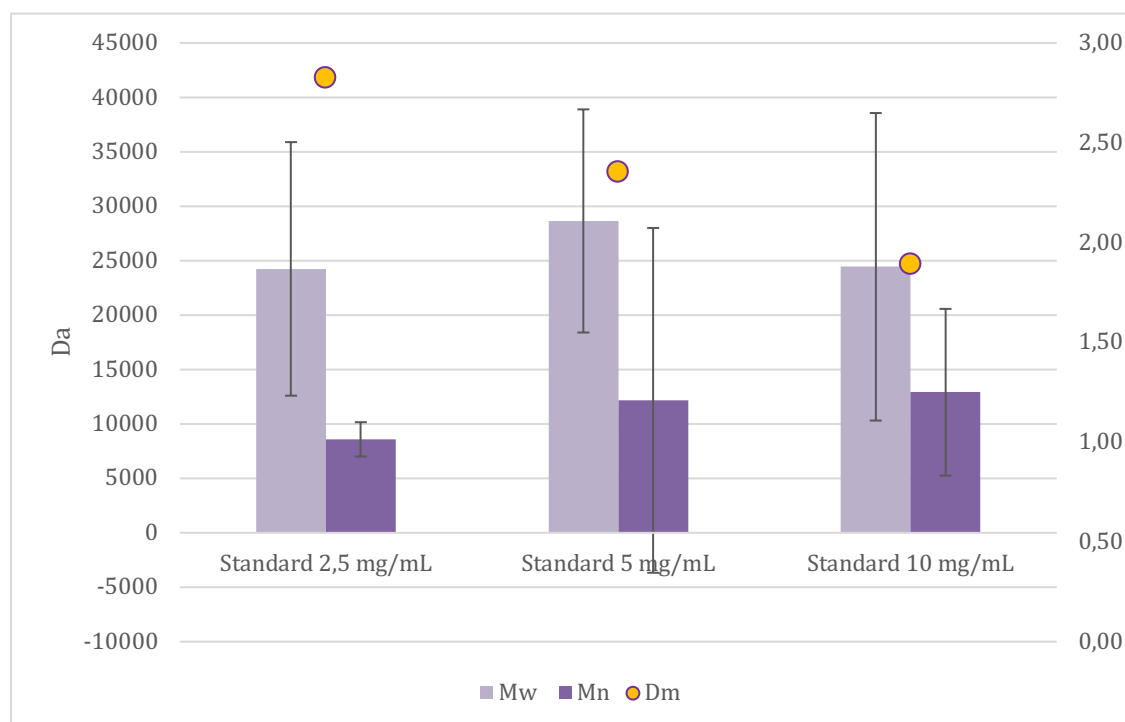
Grunnet problemer med analyse av en tredje konsentrasjon på de dampeksploderte prøvene, er dn/dc-verdiene her basert på to konsentrasjoner på 5 og 10 mg/mL. Verdiene ble bestemt ved å finne endringen av brytningsindeks ved hver av de ulike konsentrasjonene, og så beregne gjennomsnittet av disse. Det hadde vært bedre å basere beregningen av dn/dc på en større fortynningsrekke for å få et mer nøyaktig resultat.

3.2 Resultater multivinkel lysspredning (SEC-MALS)

All data fra analyser på MALS finnes i vedlegg 7.2. Resultatdelen er delt inn etter analyser på Standard 1 og ligninprøver.

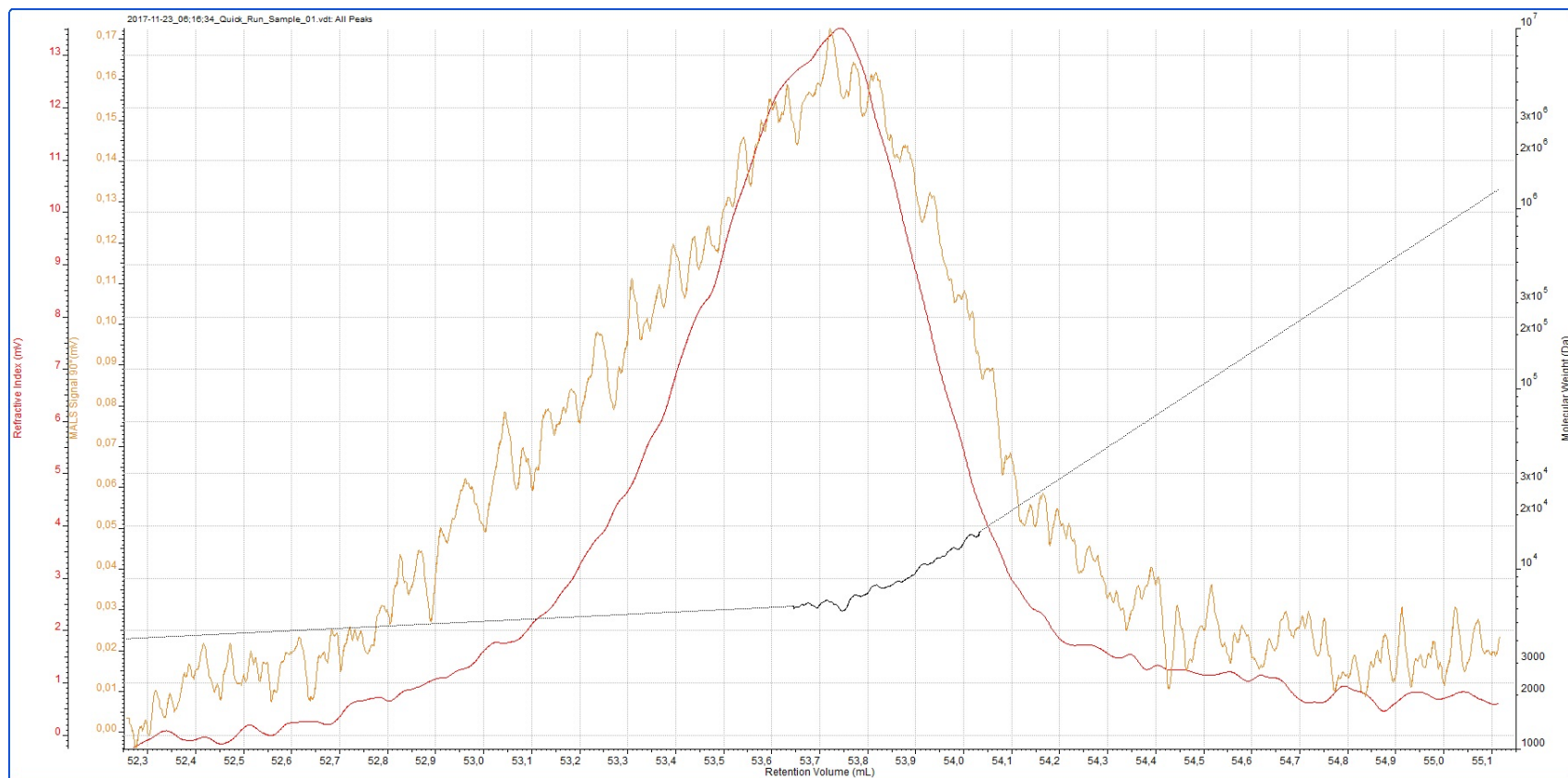
3.2.1 Standard 1

Gjennomsnittlig M_w og M_n , og molekylmassefordeling (\overline{D}_M) fra MALS for tre konsentrasjoner av Standard 1 er presentert i Figur 11. Resultatene fra MALS ga et lavere estimat av M_w enn den faktiske molekylmassen til standarden. Det er stor variasjon mellom repetisjonene til de ulike konsentrasjonene, som resulterer i store standardavvik. 5 mg/mL er den konsentrasjonen som har gitt estimater nærmest 32000 Da. Da grunnlinjestøy har vært et gjentakende problem under analyseopptakene, særlig ved de lavere konsentrasjonene, er det overraskende at det er 5 mg/mL som gir estimater nærmest 32000 Da. Sammenliknes estimatene av M_w for de ulike konsentrasjonene, finner man mindre variasjoner. Tas støy og lave signaler i betraktning er dette resultater som tilsier at det er mulig å beregne omtrentlig lik M_w med ulike konsentrasjoner.



Figur 11. Viser \overline{D}_M og gjennomsnittlig M_w og M_n med tilhørende SD for tre repetisjoner av konsentrasjonene 2,5, 5 og 10 mg/mL for Standard 1. \overline{D}_M for de ulike konsentrasjonene er markert i oransje.

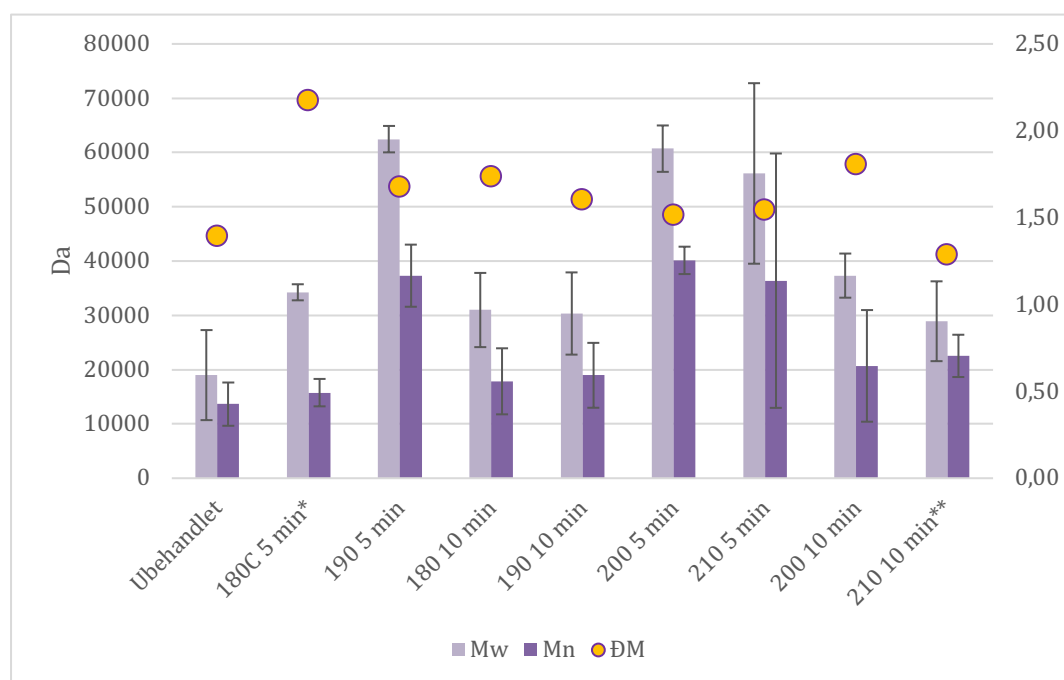
Beregnet \bar{D}_M er også vist i Figur 11. I en uniform prøve forventes \bar{D}_M å være tilnærmet 1.⁷³ På Standard 1, som er en sertifisert standard, er det også oppgitt en $\bar{D}_M < 1,2$. Estimaterne for Standard 1 er derfor høyere enn forventet. Økende konsentrasjon, og dermed større utslag på MALS, gir \bar{D}_M nærmere 1. Dette bekrefter at grunnlinjestøy og lave MALS-signaler er avgjørende for gode estimater. Problemet med lave utslag og støy på MALS er illustrert i Figur 12. Denne figuren er fra en av analysene på Standard 1 med konsentrasjon på 2,5 mg/mL. Her er utslaget fra grunnlinjen på omtrent 0,17 mV, og det er mye støy. Det er erfart, etter mange forsøk, at dette har innvirkning på estimert M_w og M_n , og dermed også \bar{D}_M . Et annet element som skal legges merke til i Figur 12, er molekylfordelingen i toppen, som er markert i sort i kromatogrammet. Molekylfordelingen er sentrert mot høyre. Det er forventet at den skal ha en fordeling gjennom hele toppen. Derfor er det tenkelig at det ikke har vært godt nok utslag til å beregne molekylvekt i det resterende området av toppen.



Figur 12. Eksempel på kromatogram fra Standard 1, dette fra en prøve med konsentrasjon på 2,5 mg/mL. MALS-signal i gult, molekylfordeling i svart, og brytningsindeks i rødt.

3.2.2 Ligninprøver

M_w og M_n , og beregnet \bar{D}_M for Topp 1 til ligninprøver med konsentrasjon 10 mg/mL er presentert i Figur 13. Resultatene er, som tidligere, vist etter økende betingelser under dampeksplasjon (Tabell 9). Ubehandlet lignin har en estimert M_w rett i underkant av 19000 Da. Tolbert og medarbeidere⁵² har samlet resultater fra flere studier av molekylmasse og molekylmassefordeling hos MWL i sin artikkel. Der kommer det frem at vibratorisk ballmøllet MWL fra norsk gran har en estimert M_w på 23500 g mol⁻¹. Overend og Chornet⁴⁷ oppgir også en M_w på rundt 20000 g mol⁻¹ for «naturlig» lignin. Altså stemmer estimatet av M_w til den ubehandlede prøven overens med M_w funnet i litteraturen. M_w og M_n for DE prøver er mye høyere enn for den ubehandlede prøven. Karbohydratene nevnt i avsnitt 3.1.2 er antatt årsak til dette. Store hemicelluloseenheter vil øke den estimerte molekylmassen for de behandlede prøvene. Det degraderes ved høyere log R_0 , dermed synker molekylmassen med behandling i 10 minutter. Prøve DE i 180°C i 5 minutter har lavere molekylvekt enn de andre prøvene behandlet i 5 minutter. Årsaken til dette er at behandlingsforholdene (lav log R_0) ikke fører til like stor degradering av karbohydratene i biomassen. Det blir derfor isolert mindre karbohydrater med MWL ved denne DE-betingelsene.

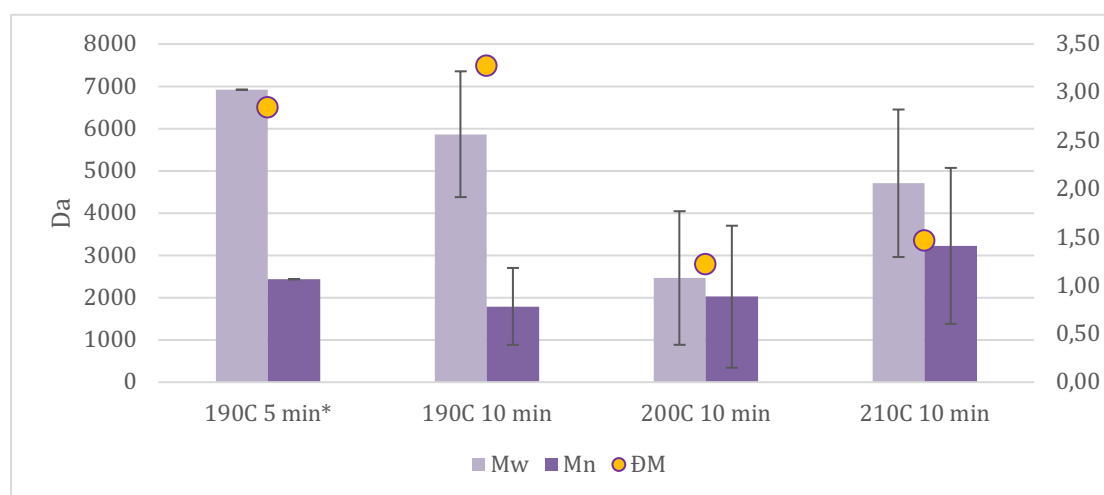


Figur 13. Viser \bar{D}_M og gjennomsnittlig M_w og M_n for Topp 1 med tilhørende SD. Denne dataen er beregnet på tre repetisjoner av analyser av lignin 10 mg/mL. *,** 180C og 210C er beregnet på to repetisjoner. Beregnet \bar{D}_M for prøvene er markert i oransje.

For alle de dampeksploderte prøvene, med unntak av prøver behandlet i 200°C, er molekylmassefordelingen (\bar{M}_M) synkende med økende betingelser. Dette indikerer at molekylmassen i Topp 1 blir mer uniform med økende behandling. Den ubehandlede prøvene har en forholdsvis lav \bar{M}_M på 1,4. Tolbert *et al.*⁵² har lagt frem en \bar{M}_M på 3,7 for MWL i sin artikkel. At \bar{M}_M øker fra ubehandlet lignin til DE lignin er forventet. Grunnet lignin sin komplekse oppbygging er det grunn til å tro at hydrolyse under DE vil føre til høyere \bar{M}_M . Li og medarbeidere³⁹ har studert depolymerings og repolymerings-reaksjoner hos lignin fra bjørk under syrekatalyse og DE. De kunne konkludere med at det gir økt heterogenitet i ligninmaterialet, og dermed forhøyet \bar{M}_M . Økt heterogenitet og hemicellulosen som elueres samtidig forklarer økningen i \bar{M}_M fra ubehandlet til 180°C 5 minutter. Gunnarson *et al.*²⁵ har identifisert mange strukturelle enheter i lignin under dampeksplasjon. Det ble i det studiet bekreftet spaltning av β -O-4-bindinger, som ga redusert antall β -O-4 med økt behandlingstemperatur. Denne reduserte mengden av β -O-4 er også dokumentert i flere andre studier.^{39, 94, 95} I det samme studiet ble det også sett på innvirkningen av tid på effekten av dampeksplasjon på bindingsbrytning og -danning. Det er dokumentert færre β -O-4-bindinger hos prøver behandlet i 10 minutter enn hos prøver behandlet i 5 minutter. Hvis dette tolkes i sammenheng med resultatene til ligninprøvene, kan det gi en indikasjon på at det er flere mindre molekyler i prøver behandlet i 10 minutter grunnet færre β -O-4-bindinger. Dette bekrefter den minkende M_w ved 10 minutters behandling.

I Figur 7 var det en tydelig Topp 2 i kromatogrammet. Ikke alle disse toppene hadde gode utslag på MALS. Det var derfor kun mulig å integrere utslag fra 190°C 5 og 10 min., 200°C 10 min. og 210°C 10 min. Gjennomsnittsverdiene basert på disse dataene vises i Figur 14. Uten estimer for DE i 5 minutter på alle prøvene, er det vanskelig å si om trenden er det samme for Topp 2 som for Topp 1. Men prøvene DE i 190°C viser en reduksjon i M_w og M_n med økende DE-tid. Mellom 200°C 10 min. og 210°C 10 min. skjer det en økning i M_w med økt temperatur, dette er motsatt av hva som skjer med Topp 1. Årsaken til at M_w er lavere i 200°C kan være at denne toppen har en litt senere retensjonstid enn 210°C 5 minutter. Det er ikke stor forskjell med retensjonstid på 30,7 mot 30,5 minutter, men med tanke på fordelingen i kromatogrammet kan dette få et utslag. Senere eluering skyldes lavere molekylmasse,

og kan forklare den lavere estimeringen av M_w . Det er gjort flere studier på DE av osp og andre løvtrær. M_w estimert på disse viser stor depolymerisering, med estimert M_w i et område mellom 2000 og 3000 g mol⁻¹.^{96,97} Dette er lavere enn det som er observert i Topp 2. Det skal tas i betraktning at dette er løvtrær, og at ligninets sammensetning skiller seg noe fra bartrær.

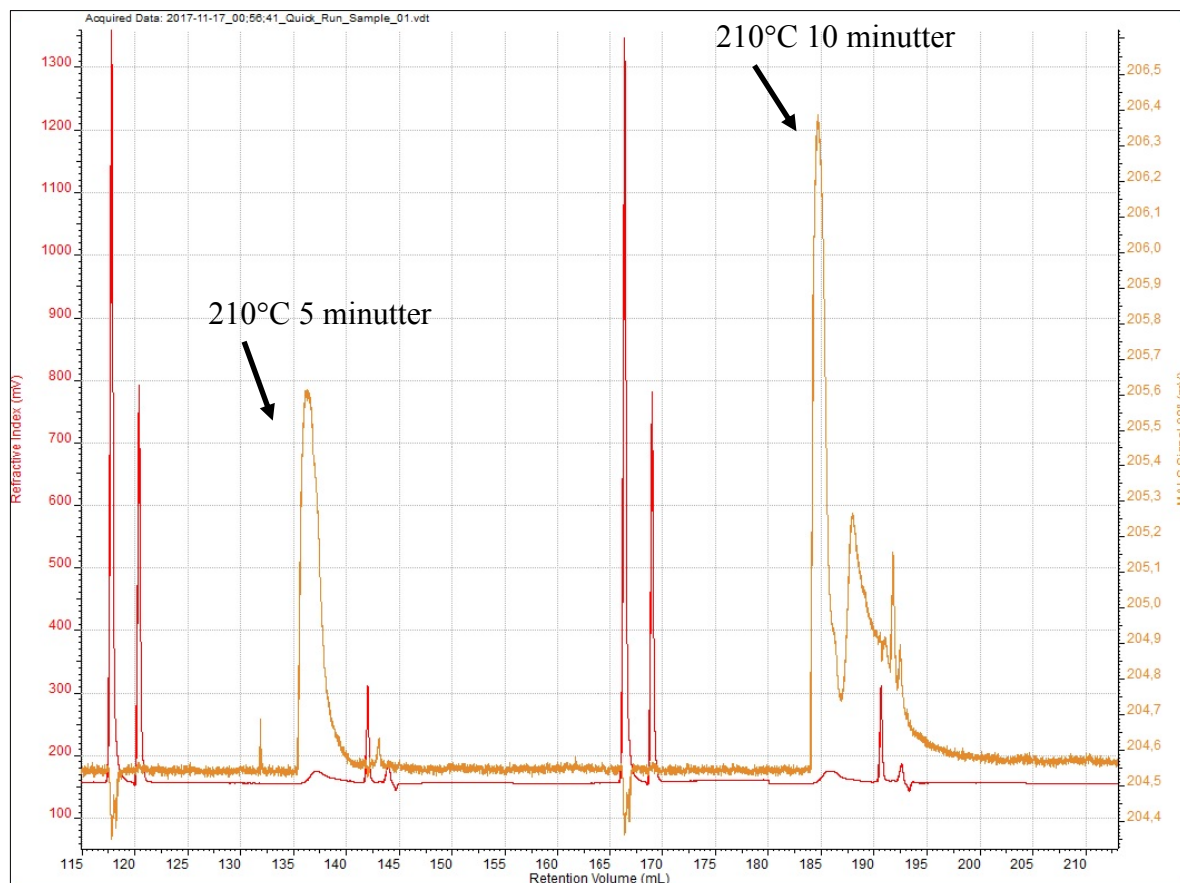


Figur 14. Viser \bar{M}_w og gjennomsnittlig M_w og M_n , med SD av tre repetisjoner for Topp 2. * 190 C 5 minutter er kun basert på én analyse og er ikke gjennomsnittlig M_w .

\bar{M}_w/\bar{M}_n for Topp 2 er for prøver behandlet i 190°C forholdsvis høy, og øker med økt behandlingstid. Det er sannsynlig at hydrolyseprodukter som dannes fra Topp 1 under DE i 10 minutter er opphavet til denne økningen i \bar{M}_w/\bar{M}_n . I de samme studiene som nevnt over er det oppgitt \bar{M}_w/\bar{M}_n på rundt 3.^{96,97} Dermed er \bar{M}_w/\bar{M}_n for 190°C ganske lik det som er funnet i tidligere studier på DE lignin. Ved 200°C og 210°C er \bar{M}_w/\bar{M}_n lavere, dette tyder på at hydrolyseproduktene som dannes ved disse temperaturene er mer uniforme enn ved 190°C.

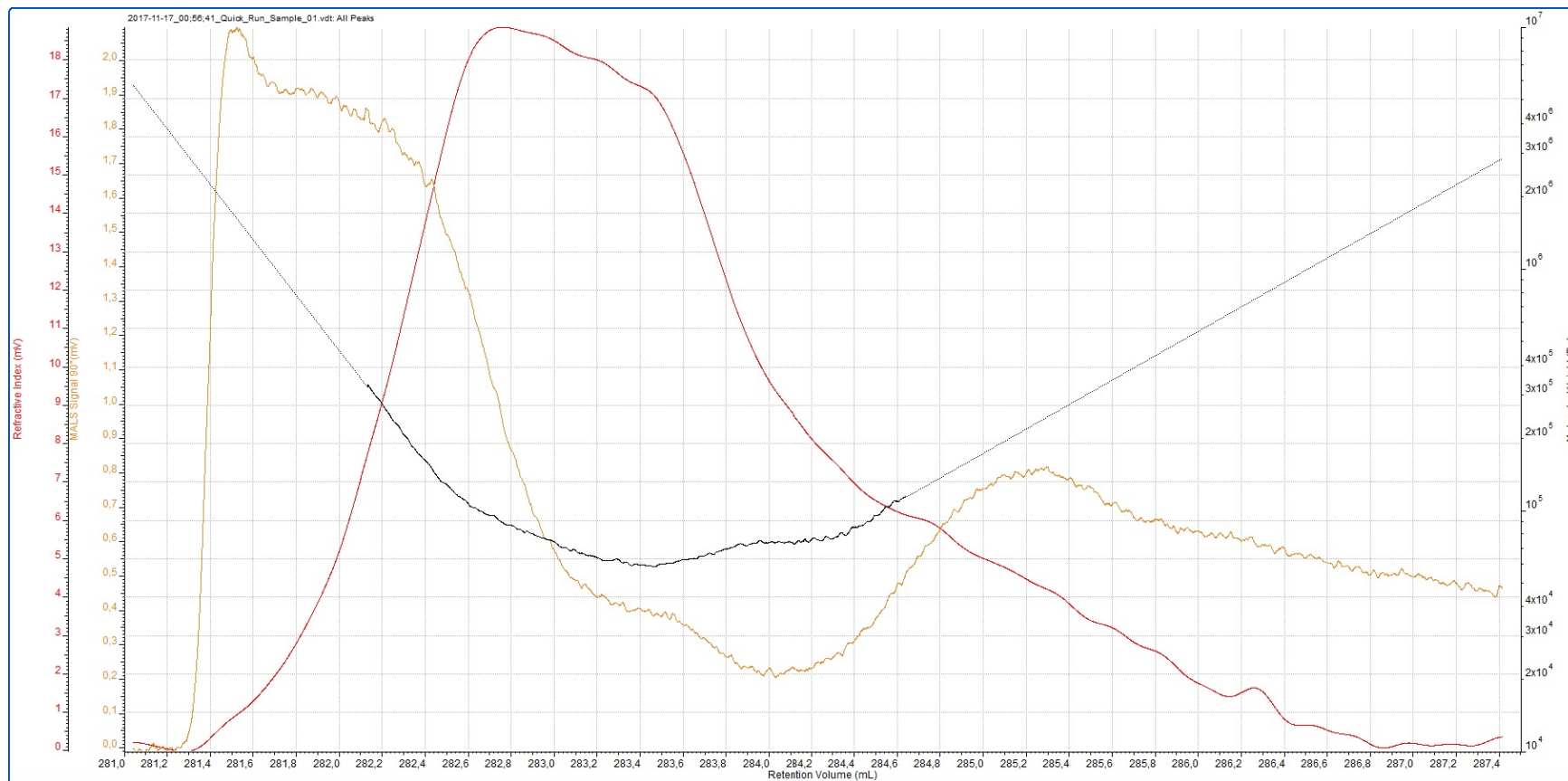
Hovedtrenden i analysene av ligninprøvene er at økt temperatur fører til økt hydrolyse, og dermed lavere M_w i Topp 1. MALS-signalene til prøver DE i 5 og 10 minutter illustrerer denne endringen godt, da de splittes ved DE i 10 minutter. Dette er spesielt tydelig i prøver DE i 200°C og 210°C. I Figur 15 vises 210°C, til høyre DE i 5 min. og til venstre DE i 10 min. MALS-signalet må ha sammenheng med eluerte

molekyler som fører til et bredt signal. Det er tidligere nevnt at det er synlige små toppe i grunnlinjen i Figur 8. Det er tenkelig at disse kan gi signaler på MALS, og at de derfor vil få synlige signaler ved økt hydrolyse.



Figur 15. Viser signaler fra MALS og brytningsindeks på ligninprøver 10 mg/mL, behandlet ved 210°C i 5 og 10 minutter.

Analysene av ligninprøver 10 mg/mL har i likhet med analysene av Standard 1 varierende standardavvik. Estimert av M_w til 210°C i 10 minutter (***) er basert på kun to repetisjoner. En av repetisjonene ga en svært høy estimering på over 100000 Da, og det virket derfor mer troverdig å utelukke denne. Det er mistenkt at årsaken til dette høye estimatet kommer av store partikler i prøven. Prøver behandlet i 200°C og 210°C felte ut over tid. Store partikler som passerer MALS-detektoren vil gi et stort utslag, og dermed høye estimeringer. En av analysene for prøve DE i 210°C i 10 minutter er vist i Figur 16. Det veldig rette og spisse utslaget på MALS kan tyde på at større partikler har passert cellen. Store partikler vil gi et mye sterkere utslag på MALS enn molekyler i løsning.



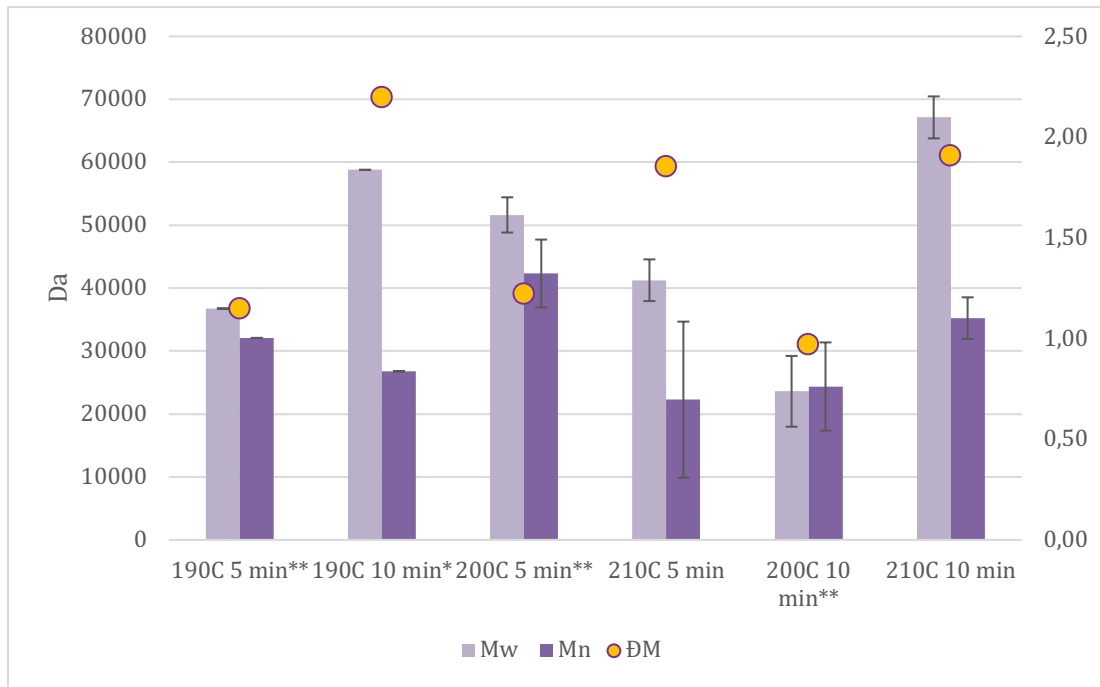
Figur 16. Viser brytningsindeks (rød), MALS-signal (gul) og molekylvektfordeling (svart) til ligninprøve med konsentrasjon 10 mg/mL dampeksplodert ved 210°C i 10 min.



Figur 17. Viser brytningsindeks (rød), MALS-signal (gul) og molekylvektfordeling (svart) til ligninprøve med konsentrasjon 10 mg/mL dampeksplodert ved 180 °C 5 min.

Som nevnt i avsnitt 3.2.1 er det flere faktorer som påvirker estimeringen av M_w og M_n , og dermed også \bar{M}_w . Små utslag og mye støy på MALS er mye diskutert i denne oppgaven. For å illustrere forskjellen på MALS-utslag, og usikkerheten rundt disse, kan Figur 16 sammenlignes med Figur 17. I Figur 17 vises en av analysene av prøve DE i 180°C i 5 minutter. Det er tydelige forskjeller i utslag på MALS i de to analysene. Signalet på 180°C er 0,30 mV, mens signalet på 210°C er på 2.1 mV. Prøver som ikke har hatt gode nok utslag på MALS er prøver med lav konsentrasjon, og prøver som har blitt dampeksplodert ved lavere log R_0 . Lysbrytning er konsentrasjonssensitivt, og det er derfor tydelig at det enten skulle vært injisert større prøvevolum, eller laget prøver med høyere konsentrasjon. I en prøve hvor molekylene har lavere molekylmasse vil det være et større antall molekyler per mg, enn det det vil være om molekylene har større molekylvekt. Dette er årsaken til at prøver DE ved høyere temperaturer gir større utslag på MALS. Det er forsøkt å anslå en deteksjonsgrense for å få beregnet estimat av molekylvekt. Etter å ha undersøkt analysene, er det kommet frem til at signalet må være over 0,13 mV for å gi utslag på MALS.

Det ble også analysert MALS-signaler fra ligninprøver med konsentrasjon 5 mg/mL. Disse analysene ga varierende resultater, det var blant annet ikke mulig å integrere signaler for Topp 2. Resultatene for Topp 1 5 mg/mL er vist i Figur 17. Disse resultatene er tatt med for å illustrere hvor viktig gode utslag og lite støy på MALS er for estimeringen av molekylvekt. Prøver behandlet ved 180°C hadde ikke gode nok signaler til integrasjon. Av de resterende ga kun prøver behandlet ved 210°C tre gode MALS-signaler. Trenden til resultatene fra Topp 1 5 mg/mL er i flere tilfeller fravikende fra Topp 1 10 mg/mL.



Figur 18. Viser \bar{M}_w og gjennomsnittlig M_w og M_n for Topp 1 med SD for tre repetisjoner av ligninprøver med konsentrasjon 5 mg/mL. *190°C 10 minutter er basert på kun en prøve og er derfor ikke et gjennomsnittstall. **190°C, 200°C 5 min og 200°C 10 minutter er basert på to repetisjoner.

4. Konklusjon og videre arbeid

4.1 Konklusjon

Ved undersøkelse av hydrolyseprodukter med SEC-MALS ble det funnet ut at det isoleres karbohydrater med MWL. Dette fører til økt areal i Topp 1 ved brytningsindeks og økt estimert M_w . Undersøkelsen viser at dampekspløsjon ved 10 minutter fører til større hydrolyse og dermed minskende brytningsindeksareal og M_w i Topp 1. D_M til Topp 1 synker med økende DE-tid og -temperatur, dette stemmer overens med hydrolyse ved at prøven blir mer uniform med økt behandling.

Dampekspløsjon fører også til hydrolyseprodukter som i hovedsak elueres i Topp 2. Arealet til Topp 2 er sterkt økende ved DE i 180°C i 10 minutter, før den er stabil ved økende DE-tid og -temperatur.

Resultatene i denne oppgaven har mye usikkerhet grunnet støy og lave utslag på MALS og brytningsindeks. Ved videre arbeid med dette er det nødvendig med utvikling av metoden. Forslag til endringer er lagt frem i 4.2.

4.2 Videre arbeid

Det første som burde undersøkes er årsaken til de ukjente toppene i kromatogrammet. Det er som nevnt en viss sannsynlighet for at den første toppen er en eluenttopp. For å få en tilstrekkelig analyse er det nødvendig å finne ut årsaken til, og fjerne disse. Ut i fra MALS-signalene er det tydelig at det finnes eluering av lignin i disse toppene, som derfor ikke gir synlige topper på kromatogrammet for brytningsindeks (Fig. 8).

Ved å endre injeksjonsloop fra den nåværende på 25 μL til en på 100 μL , kan man i stedet for å øke prøvekonsentrasjon, øke injeksjonsvolum. Det er mulig å prøve ut flere ulike kombinasjoner i forholdet mellom injeksjonsvolum og konsentrasjon for å komme frem til en kombinasjon som gir gode signaler på MALS.

En annen endring som kan gjøres i metoden er endring i forhold til kolonner. Det er mulig å prøve å analysere med to ulike SEC-kolonner i serie. Ved å bruke en kolonne som separerer på større molekyler, for eksempel Shodex Asahipak GS-520 med en eksklusjonsgrense på 300 kDa, kan de større molekylene som elueres samtidig med lignin separeres fra og identifiseres.

Til slutt kan bestemmelse av dn/dc nevnes. Ved bestemmelse av dn/dc er det ideelt å bruke en stor fortynningsrekke. Dette ble ikke gjort i dette prosjektet, men hadde ført til en mer nøyaktig beregning av dn/dc .

5. Referanser

1. Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C. & Murali, N. (2006). Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energy & Fuels*, 20 (4): 1727-1737.
2. Andersson, M., Wittgren, B. & Wahlund, K.-G. (2003). Accuracy in Multiangle Light Scattering Measurements for Molar Mass and Radius Estimations. Model Calculations and Experiments. *Analytical Chemistry*, 75 (16): 4279-4291.
3. Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C. A., Frederick, W. J., Jr., Hallett, J. P., Leak, D. J., Liotta, C. L., et al. (2006). The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 311 (5760): 484-489.
4. Clark, J. H. & Deswarte, F. (2014). *Introduction to Chemicals from Biomass*, b. 2: John Wiley & Sons Ltd. 60-66 s.
5. Bridgwater, A. V. (2003). Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass. *Chemical Engineering Journal*, 91 (2): 87-102.
6. Birch, K. & Tyfield, D. (2013). Theorizing the Bioeconomy: Biovalue, Biocapital, Bioeconomics or . . . What? *Science, Technology, & Human Values*, 38 (3): 299-327.
7. Stewart, D. (2008). Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*, 27 (2): 202-207.
8. Carole, T. M., Pellegrino, J. & Paster, M. D. (2004). *Opportunities in the industrial biobased products industry*. Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4-7, 2003, in Breckenridge, CO: Springer. 871-885 s.
9. Dale, B. E. (2003). 'Greening' the chemical industry: research and development priorities for biobased industrial products. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78 (10): 1093-1103.
10. Bozell, J. J. (2008). Feedstocks for the future—biorefinery production of chemicals from renewable carbon. *CLEAN—Soil, Air, Water*, 36 (8): 641-647.
11. Menon, V. & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 38 (4): 522-550.
12. Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R. & Lee, Y. Y. (2005). Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, 96 (18): 1959-1966.
13. Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, b. 2: Wiley.
14. Bajpai, P. (2016). *Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production*, b. 1. Singapore: Springer. 87 s.
15. Deguchi, S., Tsujii, K. & Horikoshi, K. (2008). Crystalline-to-amorphous transformation of cellulose in hot and compressed water and its implications for hydrothermal conversion. *Green Chemistry*, 10 (2): 191-196.
16. Grethlein, H. E. (1985). The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Nature Biotechnology*, 3 (2): 155.

17. Bertran, M. S. & Dale, B. E. (1985). Enzymatic hydrolysis and recrystallization behavior of initially amorphous cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 27 (2): 177-181.
18. Dewick, P. M. (2009). Carbohydrates. I: *Medicinal Natural Products*, s. 485-508: John Wiley & Sons, Ltd.
19. Klass, D. L. (1998). *Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals*. 1 utg.: Elsevier Science. 132-177 s.
20. Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30 (5): 279-291.
21. Moreira, L. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 79 (2): 165.
22. Chen, H. (2005). Biotechnology of lignocellulose. *sl: sn*: 73-141.
23. Scheller, H. V. & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol*, 61: 263-289.
24. Leisola, M., Pastinen, O. & Axe, D. D. (2012). Lignin--Designed Randomness. *Bio-complexity*, 2012.
25. Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*, b. 3: John Wiley & Sons Ltd. . 494 s.
26. Boerjan, W., Ralph, J. & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54 (1): 519-546.
27. Sun, Y. & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83 (1): 1-11.
28. Yat, S. C., Berger, A. & Shonnard, D. R. (2008). Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. *Bioresource Technology*, 99 (9): 3855-3863.
29. Carvalheiro, F., Duarte, L. C. & Gírio, F. M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*: 849-864.
30. Zheng, Y., Pan, Z. & Zhang, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International journal of agricultural and biological engineering*, 2 (3): 51-68.
31. Chang, V. S. & Holtzapple, M. T. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84 (1): 5-37.
32. Palmowski, L. M. & Müller, J. A. (2000). Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, 41 (3): 155-162.
33. Hartmann, H., Angelidaki, I. & Ahring, B. K. (2000). Increase of anaerobic degradation of particulate organic matter in full-scale biogas plants by mechanical maceration. *Water Science and Technology*, 41 (3): 145-153.
34. Kilzer, F. J. & Broido, A. (1965). Speculations on the nature of cellulose pyrolysis. *Pyrolytics*. 2: 151-163, 2: 151-163.
35. Harmsen, P. (2010). *Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass*: Wageningen UR, Food & Biobased Research. 54 s.
36. Lee, J. (1997). Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of biotechnology*, 56 (1): 1-24.

37. Galliano, H., Gas, G., Seris, J. & Boudet, A. (1991). Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme and microbial technology*, 13 (6): 478-482.
38. Tanahashi, M. (1990). Characterization and degradation mechanisms of wood components by steam explosion and utilization of exploded wood. *Wood Research*.
39. Li, J., Henriksson, G. & Gellerstedt, G. (2007). Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource technology*, 98 (16): 3061-3068.
40. Zhuang, Q. & Vidal, P. (1996). Hemicelluloses solubilization from *Populus tremuloides* via steam explosion and characterization of the water-soluble fraction. I. Autocatalytic processes. *Cellulose chemistry and technology*, 30 (5-6): 371-384.
41. Zhuang, Q. & Vidal, P. (1997). Hemicelluloses solubilization from *Populus tremuloides* via steam explosion and characterization of the water-soluble fraction. II. Alkali-catalytic process. *Cellulose chemistry and technology*, 31 (1-2): 37-49.
42. Duff, S. J. & Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 55 (1): 1-33.
43. Li, J., Gellerstedt, G. & Toven, K. (2009). Steam explosion lignins; their extraction, structure and potential as feedstock for biodiesel and chemicals. *Bioresource technology*, 100 (9): 2556-2561.
44. Brownell, H., Yu, E. & Saddler, J. (1986). Steam - explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnology and bioengineering*, 28 (6): 792-801.
45. Mackie, K., Brownell, H., West, K. & Saddler, J. (1985). Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 5 (3): 405-425.
46. Eklund, R., Galbe, M. & Zacchi, G. (1995). The influence of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresource Technology*, 52 (3): 225-229.
47. Overend, R. P. & Chornet, E. (1987). Fractionation of lignocellulose by steam-aqueous pretreatments. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 321 (1561): 523-536.
48. Chornet, E. & Overend, R. P. (2017). How the Severity Factor in Biomass Hydrolysis Came About. I: Ruiz, H. A., Hedegaard Thomsen, M. & Trajano, H. L. (red.) *Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of Bioethanol and High Added-Value Compounds of Second and Third Generation Biomass*, s. 1-3. Cham: Springer International Publishing.
49. Stelte, W. (2013). Steam explosion for biomass pre-treatment. *Danish Technological Institute*.
50. Toussaint, B., Excoffier, G. & Vignon, M. R. (1991). Effect of steam explosion treatment on the physico-chemical characteristics and enzymic hydrolysis of poplar cell wall components. *Animal Feed Science and Technology*, 32 (1): 235-242.
51. Heitz, M., Capek-Ménard, E., Koeberle, P. G., Gagné, J., Chornet, E., Overend, R. P., Taylor, J. D. & Yu, E. (1991). Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource Technology*, 35 (1): 23-32.

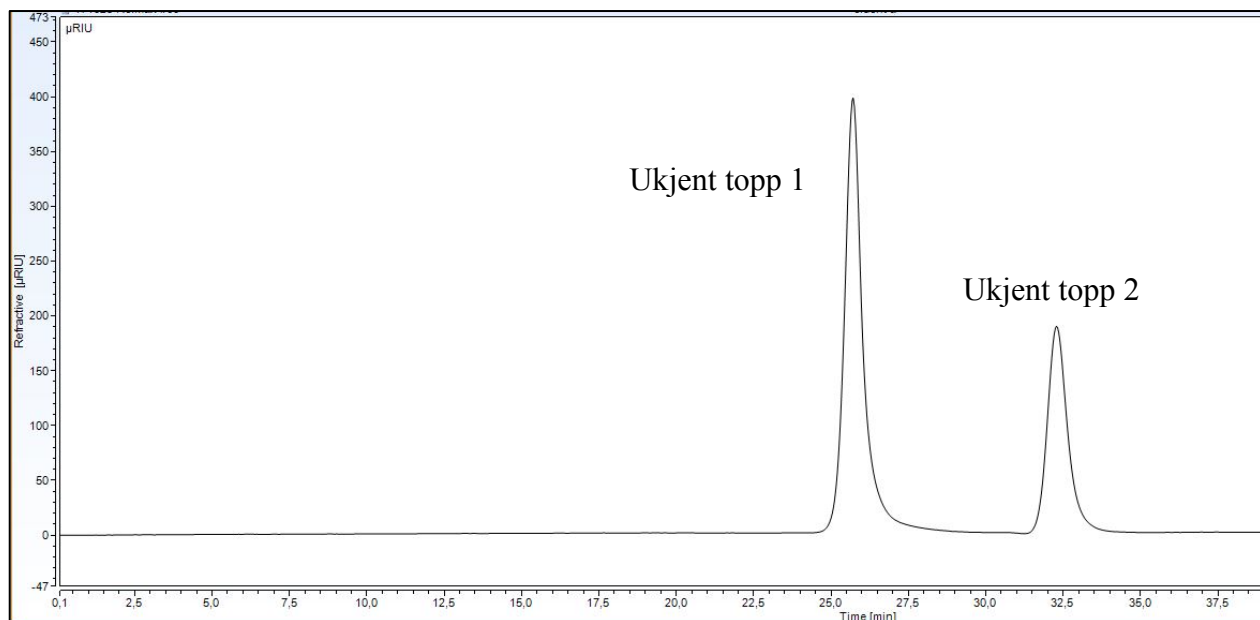
52. Sjoström, E. (2013). *Wood chemistry: fundamentals and applications*: Elsevier. 72 s.
53. Kirk, T. K. & Obst, J. R. (1988). Lignin determination. I: b. 161 *Methods in enzymology*, s. 87-101: Elsevier.
54. Pew, J. C. (1957). Properties of powdered wood and isolation of lignin by cellulytic enzymes. *Tappi*, 40 (7): 553-558.
55. Pew, J. & Weyna, P. (1962). Fine grinding, enzyme digestion, and the lignin-cellulose bond in wood. *Tappi*, 45 (3): 247-256.
56. Vvu, S. & Argyropoulos, D. (2003). An Improved Method for Isolating Lignin in High Yield and Purity. *Journal of pulp and paper science*, 29: 235-240.
57. Tolbert, A., Akinosho, H., Khunsupat, R., Naskar, A. K. & Ragauskas, A. J. (2014). Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8 (6): 836-856.
58. Obst, J. R. & Kirk, T. K. (1988). Isolation of lignin. I: b. 161 *Methods in enzymology*, s. 3-12: Elsevier.
59. Björkman, A. (1956). Studies on finely divided wood. Part 1. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk papperstidning*, 59 (13): 477-485.
60. Björkman, A. & Person, B. (1957). Studies on finely divided wood. Part 2. The properties of lignins extracted with neutral solvents from softwoods and hardwoods. *Svensk Papperstidn*, 60 (5): 158-169.
61. Lin, S. Y. & Dence, C. W. (1992). *Methods in Lignin Chemistry*: Springer Berlin Heidelberg. 34, 190, 499 s.
62. Gunnarson, H. (2017). *Impact of Steam Explosion on Spruce Lignin Structure and Pyrolyzates*. Masteroppgave. Ås, Norway: NMBU.
63. Asikkala, J., Tamminen, T. & Argyropoulos, D. S. (2012). Accurate and Reproducible Determination of Lignin Molar Mass by Acetobromination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (36): 8968-8973.
64. Sette, M., Wechselberger, R. & Crestini, C. (2011). Elucidation of lignin structure by quantitative 2D NMR. *Chemistry-A European Journal*, 17 (34): 9529-9535.
65. Capanema, E. A., Balakshin, M. Y. & Kadla, J. F. (2004). A Comprehensive Approach for Quantitative Lignin Characterization by NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (7): 1850-1860.
66. Contreras, S. a., Gaspar, A. R., Guerra, A., Lucia, L. A. & Argyropoulos, D. S. (2008). Propensity of lignin to associate: light scattering photometry study with native lignins. *Biomacromolecules*, 9 (12): 3362-3369.
67. Ringena, O., Lebioda, S., Lehnen, R. & Saake, B. (2006). Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. *Journal of Chromatography A*, 1102 (1-2): 154-163.
68. Miller, J. M. (2005). *Chromatography: concepts and contrasts*: John Wiley & Sons. 226-228 s.
69. Barth, H. G. & Greg, D. (2003). High-performance SEC column technology. *LC GC EUROPE*, 16 (6A): 46-50.
70. Tarazona, M. P. & Saiz, E. (2003). Combination of SEC/MALS experimental procedures and theoretical analysis for studying the solution properties of macromolecules. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 56 (1-3): 95-116.

71. Contreras, S., Gaspar, A. R., Guerra, A., Lucia, L. A. & Argyropoulos, D. S. (2008). Propensity of lignin to associate: light scattering photometry study with native lignins. *Biomacromolecules*, 9 (12): 3362-3369.
72. Zhang, L., Gellerstedt, G., Agarwal, U. P., Stenius, P., Koljonen, K., Chandra, R. P., Esteghlalian, A. R., Saddler, J. N., Seppänen, R. & Fardim, P. (2008). *Characterization of lignocellulosic materials*: Wiley Online Library. 190 s.
73. Gilbert, R., Hess, M., Jenkins, A., Jones, R., Kratochvil, P. & Stepto, R. (2009). Dispersity in polymer science (IUPAC recommendations 2009). *Pure and applied chemistry*, 81 (2): 351-353.
74. Zimm, B. H. (1948). The scattering of light and the radial distribution function of high polymer solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 16 (12): 1093-1099.
75. Debye, P. (1947). Molecular-weight determination by light scattering. *The Journal of Physical Chemistry*, 51 (1): 18-32.
76. Berry, G. (1966). Thermodynamic and Conformational Properties of Polystyrene. I. Light - Scattering Studies on Dilute Solutions of Linear Polystyrenes. *The Journal of Chemical Physics*, 44 (12): 4550-4564.
77. Malvern. (2014). I: <http://www.materials-talks.com/wp-content/uploads/2014/08/MALS-multi-angle-light-scattering-in-flow.jpg> (red.): Malvern Panalytical (lest 20.02.2018).
78. Jenkins, F. A. & White, H. E. (1958). Fundamentals of optics. *American Journal of Physics*, 26 (4): 272-272.
79. ERC. *RefractoMax521 RI Detector Operator's Manual*. Saitama, Japan: ERC Inc. 1-4 s.
80. Tumolo, T., Angnes, L. & Baptista, M. S. (2004). Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*, 333 (2): 273-279.
81. Horn, S. J., Nguyen, Q. D., Westereng, B., Nilsen, P. J. & Eijssink, V. G. H. (2011). Screening of steam explosion conditions for glucose production from non-impregnated wheat straw. *Biomass and Bioenergy*, 35 (12): 4879-4886.
82. Berek, D., Bleha, T. & Pevná, Z. (1976). Preferential Solvation of Solute as a Source of Ghost Peaks in Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 14 (12): 560-563.
83. Solms, D., Smuts, T. & Pretorius, V. (1971). Displacement peaks in liquid elution chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 9 (10): 600-603.
84. Šlais, K. & Krejčí, M. (1974). Vacant peaks in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 91: 161-166.
85. Cathala, B., Saake, B., Faix, O. & Monties, B. (2003). Association behaviour of lignins and lignin model compounds studied by multidetector size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1020 (2): 229-239.
86. Connors, W. J., Sarkanen, S. & McCarthy, J. L. (1980). Gel chromatography and association complexes of lignin. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 34 (3): 80-85.
87. Gidh, A. V., Decker, S. R., See, C. H., Himmel, M. E. & Williford, C. W. (2006). Characterization of lignin using multi-angle laser light scattering and atomic force microscopy. *Analytica chimica acta*, 555 (2): 250-258.
88. Gidh, A. V., Decker, S. R., Vinzant, T. B., Himmel, M. E. & Williford, C. (2006). Determination of lignin by size exclusion chromatography using multi angle laser light scattering. *Journal of Chromatography A*, 1114 (1): 102-110.

89. Karaca, F., Behrouzi, M., Morgan, T., Herod, A. & Kandiyoti, R. (2005). Effect of salts on the SEC profiles of heavy hydrocarbon liquids: New approach with salts dissolved in solvents used for planar chromatography. *Energy & fuels*, 19 (1): 187-199.
90. Garrote, G., Dominguez, H. & Parajo, J. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *European Journal of Wood and Wood Products*, 57 (3): 191-202.
91. Carrasco, J., Sáiz, M. C., Navarro, A., Soriano, P., Saez, F. & Martinez, J. (1994). Effects of dilute acid and steam explosion pretreatments on the cellulose structure and kinetics of cellulosic fraction hydrolysis by dilute acids in lignocellulosic materials. *Applied biochemistry and biotechnology*, 45 (1): 23-34.
92. Biermann, C. J., Schultz, T. P. & McGinnia, G. D. (1984). Rapid steam hydrolysis/extraction of mixed hardwoods as a biomass pretreatment. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 4 (1): 111-128.
93. Jakobsons, J., Hortling, B., Erins, P. & Sundquist, J. (1995). Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 49 (1): 51-59.
94. Li, S., Lundquist, K. & Westermarck, U. (2000). Cleavage of arylglycerol β -aryl ethers under neutral and acid conditions. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 15 (4): 292-299.
95. Heikkinen, H., Elder, T., Maaheimo, H., Rovio, S., Rahikainen, J., Kruus, K. & Tamminen, T. (2014). Impact of steam explosion on the wheat straw lignin structure studied by solution-state nuclear magnetic resonance and density functional methods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62 (43): 10437-10444.
96. Chum, H., Johnson, D., Ratcliff, M., Black, S., Schroeder, H. & Wallace, K. (1985). *Comparison between lignins produced by steam explosion and organosolv pretreatments*. International Symposium on Wood and Pulping Chemistry: Technical Papers: Swedish Paper Chem. Inst. 223-225 s.
97. Glasser, W. G., Barnett, C. A., Muller, P. C. & Sarkanen, K. V. (1983). The chemistry of several novel bioconversion lignins. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 31 (5): 921-930.

6. Vedlegg

6.1 Brytningsindeks



Figur 18. Ukjent topp 1 og 2 i kromatogram for brytningsindeks. Her fra injeksjon av eluent.

Tabell 12. Viser gjennomsnittlig areal og retensjonstid med SD for Topp 1 for ligninprøver 10 mg/mL, analysert i tre repetisjoner.

Prøve	Gj.snittsareal Topp 1 [µRIU*min]	SD areal	Gj.snittlig retensjonstid Topp 1 [min]	SD retensjonstid [min]
Ubeh.	20,40	1,13	18,71	2,27
180°C 5	24,53	4,07	15,97	3,52
180°C 10	27,73	3,29	13,85	0,12
190°C 5	40,63	2,54	14,66	0,78
190°C 10	29,10	2,79	15,11	0,084
200°C 5	45,14	1,31	13,91	0,025
200°C 10	31,82	2,74	14,48	0,044
210°C 5	43,65	1,85	13,64	0,19
210°C 10	43,46	1,79	13,09	0,085

Tabell 13. Viser gjennomsnittlig areal og retensjonstid med SD for Topp 2 for ligninprøver 10 mg/mL, analysert i tre repetisjoner.

Prøve	Gj.snittsareal Topp 2 [μ RIU*min]	SD areal	Gj.snittlig retensjonstid Topp 2 [min]	SD retensjonstid
180°C 5	4,54	0,56	30,56	0,23
180°C 10	14,30	3,82	30,42	0,022
190°C 5	12,51	1,54	30,42	0,058
190°C 10	12,53	0,33	30,46	0,019
200°C 5	12,28	1,29	30,52	0,096
200°C 10	13,33	0,61	30,67	0,24
210°C 5	13,81	0,23	30,62	0,048
210°C 10	12,09	0,44	30,53	0,023

6.2 MALS

Tabell 14. Viser gjennomsnittlig M_w , M_n og D_M for tre repetisjoner av Standard 1 med standardavvik (SD).

Prøve	Gj.snittlig M_w (Da)	SD M_w	Gj.snittlig M_n (Da)	SD M_n	D_M
2,5	24243,50	11646,76	8586,70	1577,04	2,82
5	28648,67	10249,08	12167,52	15837,49	2,35
10	24436,67	14124,94	12914,91	7655,23	1,89

Tabell 15. Gjennomsnittlig M_w , M_n og \bar{M}_n med tilhørende standardavvik (SD) for tre repetisjoner av Topp 1 til ligninprøver 10 mg/mL. * 210C 10 minutter er kun estimert på to analyser, ikke tre som de andre prøvene.

Prøve	Gj.snittlig M_w (Da)	SD M_w	Gj.snittlig M_n (Da)	SD M_n	\bar{M}_n
Ubehandlet	18995,67	8293,25	13644,46	3985,68	1,39
180C 5 min	34249,00	1479,27	15765,59	2524,91	2,17
180C 10 min	30982,67	6834,86	17850,49	6081,64	1,67
190C 5 min	62458,33	2434,26	37305,93	5723,00	1,74
190C 10 min	30340,33	7572,91	18956,62	5976,47	1,60
200C 5 min	60707	4272,04	40128,56	2522,12	1,51
200C 10 min	56139,33	16627,69	36388,51	23428,91	1,54
210C 5 min	37320	4065,47	20692,73	10282,4	1,80
210C 10 min	28917	7352,5	22535,66	3895	1,28

Tabell 16. Gjennomsnittlig M_w , M_n og \bar{M}_n med tilhørende SD for Topp 2 til ligninprøver 10 mg/mL. * 190 °C er kun basert på en verdi, og er derfor ikke gjennomsnittsverdien til toppen.

Prøve	Gj.snittlig M_w (Da)	SD M_w	Gj.snittlig M_n (Da)	SD M_n	\bar{M}_n
190C 5 min*	6920,00	0	2436,62	0	2,84
190C 10 min	5867,50	1488,46	1793,03	910,17	3,27
200C 10 min	2465,00	1580,51	2022,76	1679,99	1,22
210C 10 min	4707,00	1744,91	3225,96	1844,69	1,46

Tabell 17. Gjennomsnittlig M_w , M_n og \bar{M}_n med tilhørende SD basert på tre repetisjoner for Topp 1 til ligninprøver med konsentrasjon 5 mg/mL. * 190 °C er kun basert på én prøve og er derfor ikke et gjennomsnittstall. **190 °C, 200 °C 5 min og 200 °C 10 minutter er basert på to repetisjoner.

Prøve	Gj.snittli g M_w (Da)	SD M_w	Gj.snittlig M_n (Da)	SD M_n	\bar{M}_n
190C 5 min**	36753,00	4,24	32084,68	16,10	1,15
190C 10 min*	58798,00	0	26775,05	0	2,20
200C 5 min**	51631,50	2802,26	42328,39	5388,38	1,22
200C 10 min**	23604,00	5622,91	24363,96	7015,20	0,97
210C 5 min	41259,00	3311,94	22285,47	12393,84	1,85
210C 10 min	67130,33	3335,44	35232,89	3310,04	1,91



Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway