

Olli Byman

**Kuusen hemiselluloosan paineistettu kuumavesiuutto,
uutteen konsentrointi, hydrolysointi ja fermentointi
etanoliksi**

Insinööriyö 8.4.2010

Ohjaaja: tutkija Kaisu Leppänen
Ohjaava opettaja: yliopettaja Heikki Ojamo

Tekijä Otsikko	Olli Byman Kuusen hemiselluloosan paineistettu kuumavesiuutto, uutteen konsentrointi, hydrolysointi ja fermentointi etanoliksi
Sivumäärä Aika	49 sivua 13.4.2010
Koulutusohjelma	bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	insinööri (AMK)
Ohjaaja Ohjaava opettaja	tutkija Kaisu Leppänen yliopettaja Heikki Ojamo
<p>Työn tavoitteena oli tuottaa etanolia kuusen (<i>Picea abies</i>) hemiselluloosasta, jota eristettiin kuusenpurusta paineistetulla kuumavesiuutolla. Käytetyillä uuttoparametreilla liukseen uutui myös ligniiniä ja puun uuteaineita. Selluloosa jäi uuttumatta. Uuton jälkeen uute konsentrointiin ultrasuodatuksella cross-flow-periaattella, polysakkaridiketjut hydrolysoitiin kemiallisesti rikki- ja suolahapolla, liuos neutraloitiin NaOH:lla ja vapaat monosakkaridit fermentointiin <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -hiivoilla.</p> <p>Prosessin fraktioista analysoitiin kokonaissakkaridi- ja monosakkaridipitoisuuksia kaasukromatografialla, uuteaineita ja niiden pitoisuuksia massaspektrometrialla, liuenneen ligniinin pitoisuuksia UV-spektrofotometrialla sekä hiilipitoisuuksia TOC-analysaattorilla.</p> <p>Työssä tehdyt kokeet osoittivat, että hemiselluloosahydrolysaattia voidaan tehokkaasti fermentoida etanoliksi rajattuun uuteaine- ja ligniinipitoisuuteen asti. Kun fermentointikoikeissa fermentointia haittaavien inhibiittoreiden määrä oli liian korkea, eivät hiivat voineet käyttää aineenvaihdunnassaan kaikkia liuoksen sokereita. Työn fermentointikoikeita saattoi haitata huonosti valittu hydrolysaatin neutralointikemikaali.</p> <p>Tuloksista selviää joitakin olosuhteita, joissa hiiva <i>S. cerevisiae</i> pystyy tuottamaan hemiselluloosahydrolysaatista tehokkaasti etanolia. Kokeista saatiin jatkotutkimuksia varten tietoa ligniiniä ja uuteaineita sisältävän polysakkaridiliuoksen ultrasuodatuskonsentroidista sekä uuttolämpötilojen vaikutuksista tuotteisiin.</p>	
Hakusanat	etanoli, hemiselluloosa, kuumavesiuutto, suodatus, happohydrolyysi, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Author	Olli Byman
Title	Ethanol production of concentrated and hydrolyzed hemicelluloses extracted from spruce wood with pressurized hot water
Number of Pages	49 pages
Date	13.4.2010
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor	Researcher Kaisu Leppänen
Supervisor	Principal Lecturer Heikki Ojamo
<p>The goal of this project was to produce ethanol from the hemicelluloses of spruce (<i>Picea abies</i>) wood. The hemicelluloses were isolated from sawdust by pressurized hot water extraction. The extract also contained lignin and wood extractives, but not cellulose. The extract was concentrated by cross-flow ultrafiltration, the polysaccharides of concentrate were hydrolysed chemically into monomers by hydrochloric acid and sulphuric acid and the hydrolysate was neutralized by sodium hydroxide. The monosaccharides were fermented by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeasts.</p> <p>The saccharide concentrations of the fractions were determined by gas chromatography, extractives and their concentrations by mass spectrometry, dissolved lignin concentrations by UV-spectrofotometry and carbon concentrations with a TOC-analyzer.</p> <p>The results indicate that concentrated hemicellulose hydrolysate can be efficiently fermented to ethanol. Lignin and extractive compounds inhibited the yeast strains used. Fermentable sugars were partly or totally unconsumed if inhibitor concentrations were too high. The chemical used in neutralizing the hydrolysate might have decreased the ethanol yield of fermentations.</p> <p>The results anyhow show some conditions where <i>S. cerevisiae</i> can produce ethanol from hemicelluloses hydrolysate. For further studies the experiments yielded relevant data on how the extraction temperature affects the extracts and how to concentrate polysaccharide solutions with lignin and extractives by ultrafiltration.</p>	
Keywords	hemicellulose, filtration, ethanol, hot water extraction, acid hydrolysis, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Sisällys

Sisällys	4
1 Johdanto.....	6
Kirjallisuusosa	7
2 Puun koostumus	7
2.1 Hemiselluloosa.....	7
2.2 Havupuiden hemiselluloosa	8
3 Paineistettu kuumavesiuutto	10
4 Ultrasuodatus	11
5 Polysakkaridien happohydrolyysi	14
6 Hydrolysaatin neutralointi ja fermentoitavuuden parantaminen.....	14
7 Hydrolysaatin fermentointi.....	15
8 Tislaus	16
9 Käytetyt analyysimenetelmät.....	17
9.1 Kaasukromatografia.....	17
9.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria eli GC-MS	19
9.3 Orgaanisen hiilen määrä eli TOC	19
9.4 Spektrofotometria.....	20
Kokeellinen osa	21
10 Prosessi.....	21
10.1 Hemiselluloosan paineistettu kuumavesiuutto	21
10.2 Konsentroidi ultrasuodatuksella	23
10.2.1 Esisuodatus.....	23
10.2.2 Ultrasuodatus.....	23
10.4 Polysakkaridien happohydrolyysi ja neutralointi	24
10.5 Fermentointi	24
10.6 Tislaus.....	25

11 Tulokset	26
11.1 Esisuodatus Beco-KD-levyillä	27
11.2 Kuumavesiuutot.....	28
11.3 Konsentroidit ultrasuodattamalla.....	30
11.4 Hydrolyysit.....	32
11.5 Fermentointikokeet.....	34
12 Tulosten yhteenveto ja johtopäätökset	40
Viitteet.....	42
Liitteet	45

1 Johdanto

Hemiselluloosa on yksi merkittävimmistä polysakkarideja sisältävistä uusiutuvista luonnonvaroista, jota on mahdollista käyttää monipuolisesti raaka-aineena teollisuuden prosesseissa sekä tuotteissa. Viime vuosina hemiselluloosatutkimus on lisääntynyt useilla tieteenaloilla, muun muassa biotekniikassa ja lääketieteessä. Fossiilisten polttoainesten loppuessa ja ympäristökysymysten käydessä yhä tärkeämmiksi on alettu tutkia kestäviä sekä vaihtoehtoisia tapoja tuottaa polttoainetta. Etanolin tuottoon eri biomassojen hemiselluloosista kiinnitetään tulevaisuudessa huomiota niin metsäteollisuudessa kuin jätteiden käsittelyssäkin.

Hemiselluloosan hyödyntämisen ongelmana on sen eristäminen, puhdistaminen ja konsentroida. Hemiselluloosa on luonnossa poikkeuksetta kiinni muissa yhdisteissä. Sen eristämiseksi on monia keinoja, joista paineistetulla kuumavesiuutolla on saatu parhaita tuloksia sen ympäristöystävällisyyden ja edullisuuden ansiosta. Uutteen konsentroida voidaan myös suorittaa eri keinoin ja varsinkin konsentroida ultrasuodatuksella on ollut tutkimusten kohteena edullisena ja tehokkaana menetelmänä. Ennen etanoliksi fermentointia hemiselluloosan polysakkaridit on pilkottava monomeereiksi. Tämä voidaan tehdä kemiallisesti tai entsymaattisesti. Sopivinta hydrolyysimenetelmää valitessa täytyy ottaa huomioon kustannukset ja hydrolyysin saanto halutuiksi sokereiksi. Hydrolysaattien fermentointi etanoliksi ei ole ongelmatonta biomassojen luonnollisten hiivaa inhiboivien yhdisteiden takia. Varsinkin happohydrolyseissa, joissa kemialliset olosuhteet ovat pH:n kannalta äärimmäisiä, syntyy paljon inhibiittoriyhdisteitä.

Tämän insinööriyön tavoitteena oli tuottaa etanolia metsäkuusesta (*Picea abies*) kuumavesiuutolla uutetusta liuksesta, jonka pääkomponenttina oli GGM-sakkaridi. GGM-sakkaridit ovat havupuille tyypillistä hemiselluloosaa, joka sisältää galaktoosia, glukosia ja mannoosia. Työn pääpaino oli kuumavesiuuton tuotteen konsentroimisessa suodatuksella sekä hydrolysoidun konsentraatin fermentoinnissa. Työssä ei pyritty optimoimaan prosessia tarkasti, vaan selvitettiin prosessin toteuttamiseen liittyviä ongelmia.

Kirjallisuusosa

2 Puun koostumus

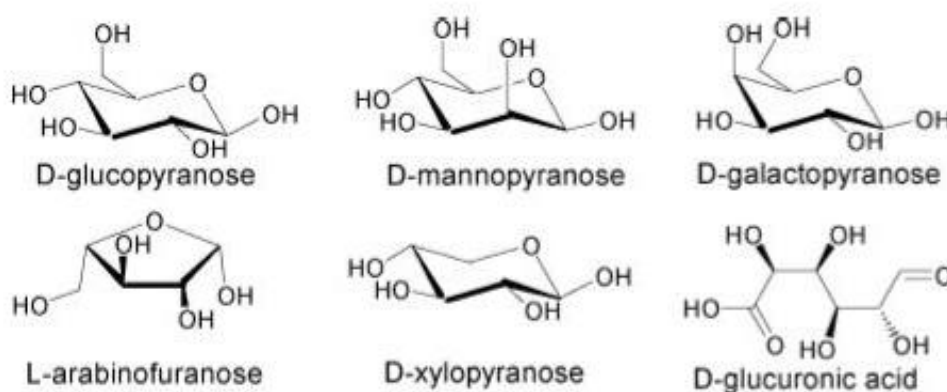
Suurin osa puun rakenteesta on orgaanisia hiiliyhdisteitä. Puun alkuainekoostumus painoprosentteina on 43–45 % happea, 38–41 % hiiltä, 5–6 % vetyä ja 0,26–0,40 % typpeä. Eri puulajien alkuainekoostumukset eroavat toisistaan, mistä johtuvat puiden erilaiset ominaisuudet ja käyttömahdollisuudet. [1, s. 9] Kemiallinen koostumus vaihtelee puun eri osissa, ja siihen vaikuttavat myös ulkoiset tekijät, kuten puun kasvupaikan ravinteet ja ilmasto [2, s. 58].

Puuaineksen tärkeimmät rakenteet ovat selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini. Selluloosan osuus puusoluista on 40 – 50 %, hemiselluloosan 20 – 35 % ja ligniinin 15 – 35 %. Selluloosa on glukoosista koostuva homopolysakkaridi [3, s. 245], ja se antaa puusoluille ominaisen jäykän rakenteen. Hemiselluloosat ovat heteropolysakkarideja, eli ne koostuvat eri sakkariidisyksiköistä, kuten glukoosista ja ksyloosista. Hemiselluloosa on selluloosaketjujen välejä täyttävä rakenneaine. Ligniini on haaroittunut polyfenoli, jossa on runsaasti hydroksyyli ryhmiä. Ligniini pitää selluloosan ja hemiselluloosan muodostamaa rakennetta kasassa vahvoilla sidoksilla. [1, s. 10] Rakenneaineiden lisäksi puu sisältää uuteaineita. Uuteaineet ovat pieniä orgaanisia yhdisteitä, joita on puussa rakenneaineita vähäisempiä määriä, jotka ovat uutettavissa puusta eri liuottimilla. Uuteaineita ovat polyfenoliset ligniinit ja lignaanit sekä lipofiiliset hartsit ja pihkat. Hartsit voidaan jakaa eri ryhmiin, jotka ovat rasvat ja rasvahapot, stearyyliesterit ja sterolit, terpenoidit ja vahat. Vahoja ovat pitkäketjuiset alkoholit ja niiden happoesterit. [13, s. vii]

2.1 Hemiselluloosa

Merkittävin hemiselluloosan lähde on puu. Hemiselluloosa on väritön ja vakaa yhdiste, joka koostuu eri sakkariidisyksiköistä, jotka ovat epäsäännöllisessä järjestyksessä. Sokeita on kuitenkin määrällisesti samassa suhteessa, ja puun eri osille on ominaista sakkariidisyksiköiden väliset suhteet. [5, s. 9] Hemiselluloosan pääsakkariidikomponentit ovat

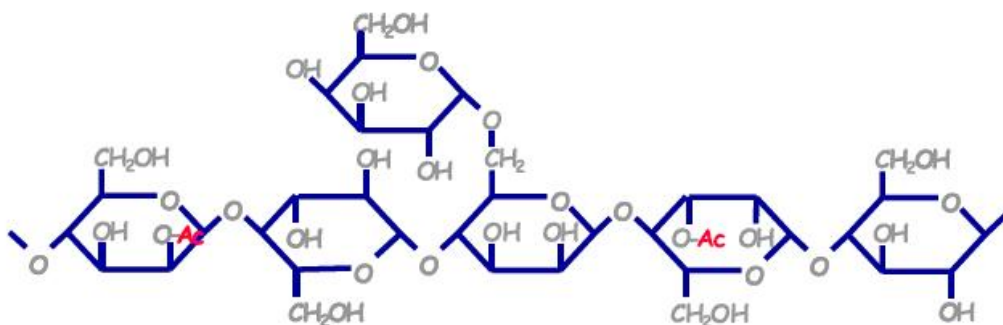
D-glukoosi, D-galaktoosi, D-mannoosi, D-ksyloosi, D-glukuronihappo, L-arabinoosi, D-galakturonihappo sekä 4-O-metyyli-D-glukuronihappo. Pääkomponentit ovat kuvassa 1. Pääkomponenttien lisäksi hemiselluloosassa on myös vähäisiä määriä deoksisokereita L-rhamnoosia, L-fukoosia sekä O-metyloituneita neutraaleita sokereita. [5, s. 9; 6, s. 4] D-etuliite sakkariidimonomeerin alussa kertoo, kumpi sakkariidin enantiomeereistä on kyseessä. Enantiomeerejä keskenään ovat yhdisteet, joissa yhteen keskushiileen ovat liittyneenä samat yhdisteet toistensa peilikuvana. Esimerkiksi glukoosimolekyyli ei luonnossa esiinny L-muodossa laisinkaan. [7, s. 446]



Kuva 1. Hemiselluloosan pääkomponentit [5, s. 4]. Suljetun ympyrän muodossa olevia heksooseja kutsutaan pyranooseiksi ja pentooseja furanooseiksi [7, s. 898].

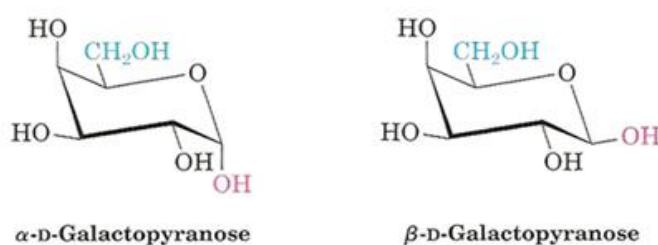
2.2 Havupuiden hemiselluloosa

Havupuiden yleisimmät hemiselluloosat ovat O-asetyyli-galaktoglukomannaani eli GGM (noin 20 p-% puun kuiva-aineesta) ja arabino-4-O-metyylyglukoroniksyylaani (5-10 p-% puun kuiva-aineesta) [8, s. 203]. Kuusen GGM:n rakenne on kuvattuna kuvassa 2.

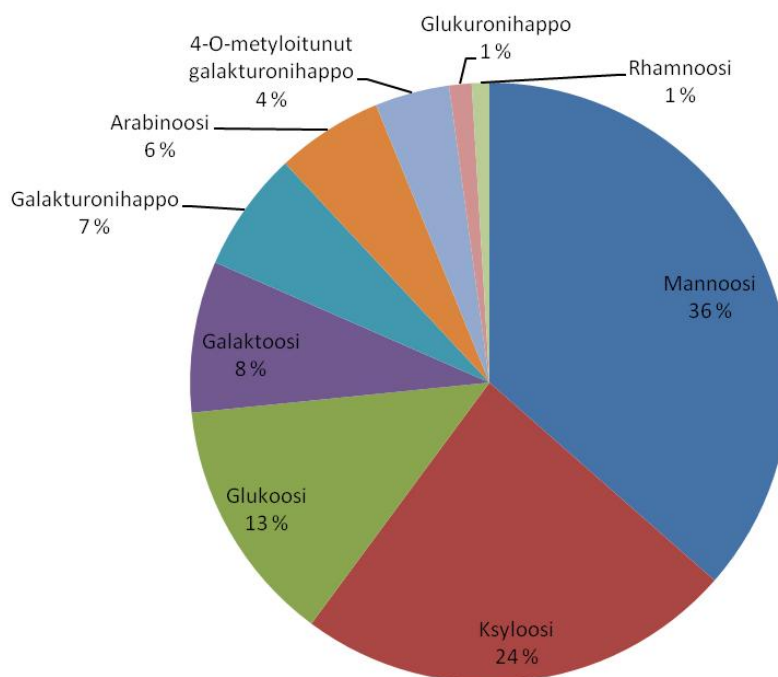


Kuva 2. GGM:n rakenne. Mannoosi, glukoosi ja galaktoosi esiintyvät yleensä suhteessa 4:1:0,5. Galaktoosi on yleensä kiinni mannoosiyksiköissä ketjun sivussa. [9, s. 202]

GGM:n rungon muodostavat sekalaisessa järjestyksessä olevat (1→4)-sitoutuneet β-D-glukopyranosyyliyksiköt ja (1→4)-sitoutuneet β-D-mannopyranosyyliyksiköt. (1→4)-sidoks tarkoittaa sidosta, jossa kuusihiiliset sakkariidisyksiköt ovat kiinni yhteisessä happiatomissa yksöissidoksella 1. ja 4. hiilestä. (1→6)-sidoksessa vastaavasti sakkariidit ovat kiinni toisissaan happisidoksella 1. ja 6. hiilestä. Näissä kahdessa voi olla (1→6)-sitoutuneena α- tai β-D-galaktopyranosyyliyksikkö, joka on pääosin kiinni β-D-mannopyranosyyliyksikössä. β-etuliite kertoo, miten monosakkaridin hiiliketjun ensimmäisen hiilen OH-ryhmä on verrattuna –CH₂OH-ryhmään. α- ja β-sokereiden ero on kuvassa 3. [6, s 6-7], [8, s. 1] Kuusen (*Picea abies*) hemiselluloosan sakkariidiosuudet ovat esitetty piirakkamallina kuvassa 4.



Kuva 3. α- ja β-D-galaktopyranoosi. α-muoto on sakkariidin cis-isomeeri ja β-muoto trans-isomeeri. [7, s. 453]



Kuva 4. Metsäkuusen (*Picea abies*) hemiselluloosan sakkariidit kuvattuina massaprosentteina [3]. Kuusen kuiva-aineesta hemiselluloosia on noin 25–30 %.

3 Paineistettu kuumavesiuutto

Paineistetussa kuumavesiuutossa uutetaan kiinteästä aineesta haluttuja yhdisteitä yli 100 celsius-asteisella vedellä ylipaineessa. Tärkeimmät kuumavesiuuton parametrit ovat lämpötila ja paine. Lämpötilalla on tärkein vaikutus veden ja uutettavien yhdisteiden fysiokemiallisiin ominaisuuksiin ja uuton selektiivisyyteen. Paineistetussa kuumavesiuutossa vesi diffuusioituu normaaliolosuhteita nopeammin, ja sen viskositeetti sekä pintajännitys pienenevät. Edellä mainitut ominaisuudet tehostavat yhdisteiden uuttumista. Liian korkealla lämpötilalla on kuitenkin haittavaikutuksia, kuten laitteiden kulumista ja yhdisteiden hajoamista. Lisäksi liian korkeissa lämpötiloissa saattaa uuttua yhdisteitä, joiden uuttumista ei tavoitella. Paineella on vain pieni merkitys yhdisteiden uuttumiseen, ja käytännössä paine pyritään pitämään arvossa, joka pitää veden nesteenä korkeasta lämpötilasta huolimatta. [34, s. 30 - 32]

4 Ultrasuodatus

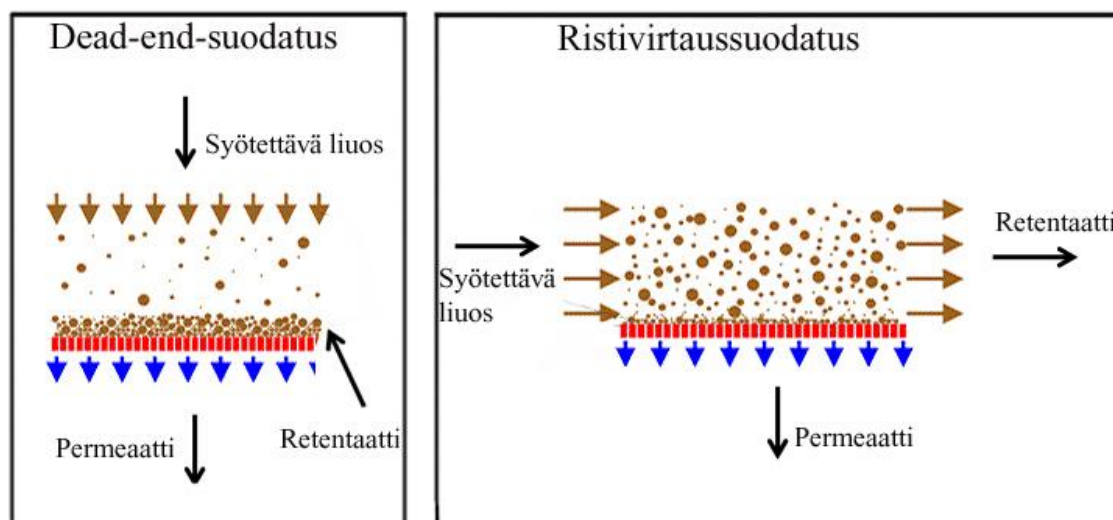
Ultrasuodatus valittiin konsentroitikeinoksi taloudellisuutensa ja oligomeerifraktion tuottamisen vuoksi. Ultrasuodattamalla voidaan pienentää liuoksen tilavuutta tehokkaasti ja täten kasvattaa sakkaridikonsentraatiota. Ultrasuodatus soveltuu hyvin teollisuuteen, jossa käytössä ovat suuret tilavuudet. [5, s. 2] Kalvoja läpäisemätöntä liuosta kutsutaan retentaatiksi ja kalvot läpäisevää permeaatiksi.

Kalvosuodatukset jaetaan yleisesti neljään luokkaan niiden erotuskyvyn perusteella. Luokat ovat pidättyvien komponenttien mukaisesti kasvavassa järjestyksessä käänteisosmoosi, nanosuodatus, ultrasuodatus ja mikrosuodatus. Käänteisosmoosi on nesteerotusmenetelmistä tiukoin: käytännössä pelkästään vesi läpäisee kalvot. Käänteisosmoosilla voidaan muun muassa poistaa suolat merivedestä. Nanosuodatuksella voidaan erottaa liuksesta pienen molaarisen massan orgaaniset yhdisteet ja suuremmat suolat. Ultrasuodatuksessa pienet orgaaniset yhdisteet ja lyhyet sakkaridiketjut pääsevät kalvon läpi, mutta raskaammat ja suuremmat yhdisteet eivät. Ultrasuodatusta käytetään laajalti proteiiniliuosten konsentroimiseen. Mikrosuodatuksessa huokoskoko on 0,2 – 4 μm , ja sitä käytetään yleensä kiintoaineksen poistamiseen. Taulukossa 1 on eri kalvosuodatuksen ominaisuuksia. [14, s. 6 - 7] [5, s. 57]

Taulukko 1. Kalvosuodatusten yleisiä ominaisuuksia. [muokattu lähteistä 14, s. 7; 15, s. 6]

	Käänteisosmoosi	Nanosuodatus	Ultrasuodatus	Mikrosuodatus
Huokos- koko	<0,002 µm	<0,002 µm	0,2 – 0,02 µm	5 – 0,02 µm
Ei päästä läpi	Kevyet ja raskaat yhdisteet, NaCl, glukoosi, proteiinit, virukset, yksiarvoiset ionit	Suuret yhdisteet, mono- ja disakkaridit, virukset, moniarvoiset ionit	Suuret yhdisteet, proteiinit, polysakkaridit, virukset	Bakteerit, partikkelit, savi
Käytetyimmät materiaalit	Selluloosa- asettaatti	Selluloosa- asettaatti	Polyeetterisulfo- foni, selluloosa- asettaatti, poly- vinyylidenefluori- ridi	Polyeetterisulfo- ni, polyvinyyli- denefluodi, ke- raamiset kalvot
Kalvon tuki ja olemus	Putkimainen, plate-and-frame, tukien väliin pu- ristetta kalvo	Putkimainen, plate-and-frame, tukien väliin puristetta kalvo	Putkimainen, plate-and-frame, tukien väliin puristetta kalvo	Putkimainen, plate-and-frame, tukien väliin puristetta kalvo

Ennen varsinaista ultrasuodatusta on liuosta yleensä esikäsiteltävä sopivalla tavalla. Yleisiä suodatusta helpottavia esikäsitteilyjä ovat pH:n säätö, hapettavien komponenttien poistaminen sekä saostumisen estäminen ja vähentäminen [14, s. 59 - 61]. Suodatusmenetelmiä on yleisesti kaksi: ristivirtaussuodatus ja dead-end-suodatus. Ristivirtaussuodatuksessa suodatettava liuos ohjataan suurehkolla nopeudella tangentiaalisesti kalvoja kohden, jolloin kalvoja läpäisemätön liuos ohjautuu ohi kalvoista eikä jää tukkimaan kalvon pintaa kuten dead-end-suodatuksessa. Ristivirtaussuodatuksen ja dead-end-suodatuksen ero on esitetty kuvassa 5.



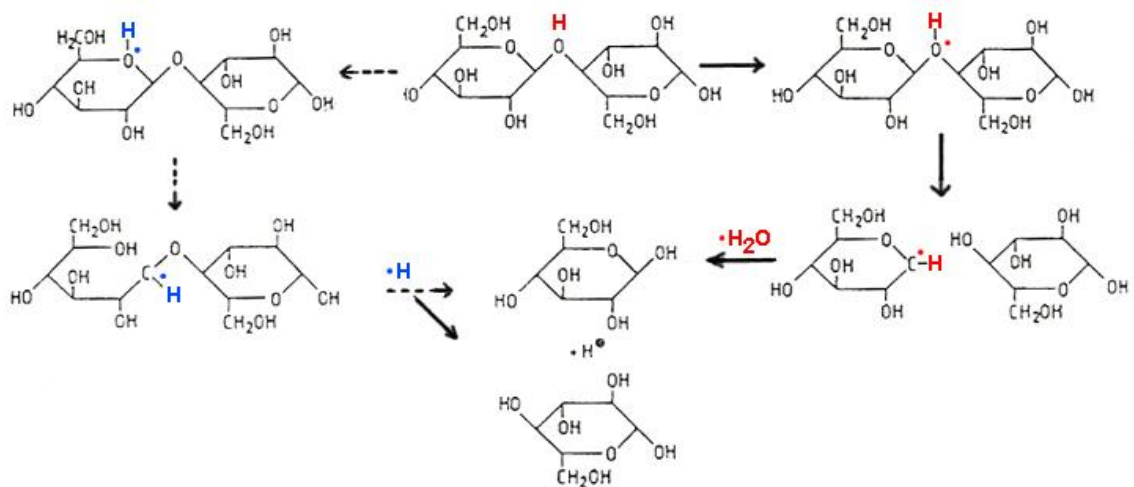
Kuva 5. Dead-end-suodatuksen ja ristivirtaussuodatuksen toimintaperiaate. Ristivirtaussuodatuksessa kalvojen tukkeutuminen on huomattavasti vähäisempää. [muokattu lähteestä 12]

Suodatuskalvot voidaan huokoskokoluokkia huomioimatta jakaa karkeasti kahteen ryhmään: hydrofiilisiin ja hydrofobisiin. Hydrofiilisillä kalvoilla saadaan suuri vesivuo ja ne päästävät hydrofiilisiä komponentteja hyvin läpi. Hydrofobisilla kalvoilla vesivuot ovat pienempiä, mutta niitä voidaan valmistaa kestävämmistä materiaaleista. Hydrofobiset kalvot myös tukkeutuvat hydrofiilisiä kalvoja herkemmin. [14, s. 10]

Suodatuskalvojen huokoskoosta puhuttaessa käytetään kalvojen cut-off-arvoa. Cut-off-arvo kuvaa sitä suodatettavien yhdisteiden moolimassaa, joka jää 90-prosenttisesti re-
tentaattiin. Cut-offin yleisin yksikkö on dalton. [17, s. 183.] 1 g/mol^{-1} moolimassa vastaa 1 daltonia [18, s. 9].

5 Polysakkaridien happohydrolyysi

Happohydrolyysissä hemiselluloosaketjut pilkotaan monomeereiksi, jotta esimerkiksi hiivat voisivat tuottaa niistä tehokkaammin etanolia [21, s. 422]. Happohydrolyysillä on eräässä tutkimuksessa saatu hemiselluloosaliuoksella 80 %:n monomeerisaanto. Happohydrolyysissä monomerisaation lisäksi voi tapahtua sakkariidien muuttumista furfuraaleiksi. [21, s. 427] Happohydrolyysin reaktioiden eteneminen on esitetty kuvassa 6.



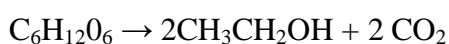
Kuva 6. Happohydrolyysin toimintamekanismi disakkarideille. Hydrolyysi toimii samalla periaatteella pidempienkin ketjujen ollessa kyseessä. Kuvassa punaisella on merkitty yleisempi reaktiopolku ja sinisellä harvinaisempi. Molempiin reaktioihin tarvitaan vapaan vedyn lisäksi vesimolekyyli. [muokattu lähteestä 31, s. 19].

6 Hydrolysaatin neutralointi ja fermentoitavuuden parantaminen

Hydrolysaatti ei fermentoidu sellaisenaan, vaan se vaatii pH:n neutralointia ja mahdollisesti muita käsittelyitä, jotta hiivat voivat käyttää sokereita tehokkaammin. Hiivojen toiminnan tehostamiseksi liuoksesta voidaan poistaa haihtuvia fermentointia haittaavia yhdisteitä höyrystämällä liuosta. Tällöin poistuu esimerkiksi fenoleita, furfuraaleja ja etikkahappoa. pH:n nostamiseksi voidaan käyttää emäksisiä kemikaaleja, kuten NaOH:a, KOH:a, CaO:a ja Ca(OH)₂:a. [37, s. 318 - 319]

7 Hydrolysaatin fermentointi

Etanolifermentoinnissa hydrolysaatin monosakkaridit muuttuvat hiivojen aineenvaihdunnan seurauksena alkoholiksi ja hiilidioksidiksi. Reaktioketjua kutsutaan käymiseksi, ja siihen kuuluu noin 30 eri reaktiota. Kaikista sakkariidimolekyyleistä ei muodostu alkoholeja, vaan hiiva käyttää osan muihin aineenvaihduntatuotteisiin ja kasvuunsa. Teoriassa hiivat pystyisivät tuottamaan sokereista noin 47 p-% alkoholia. Käymisen perustoikiometria on seuraava

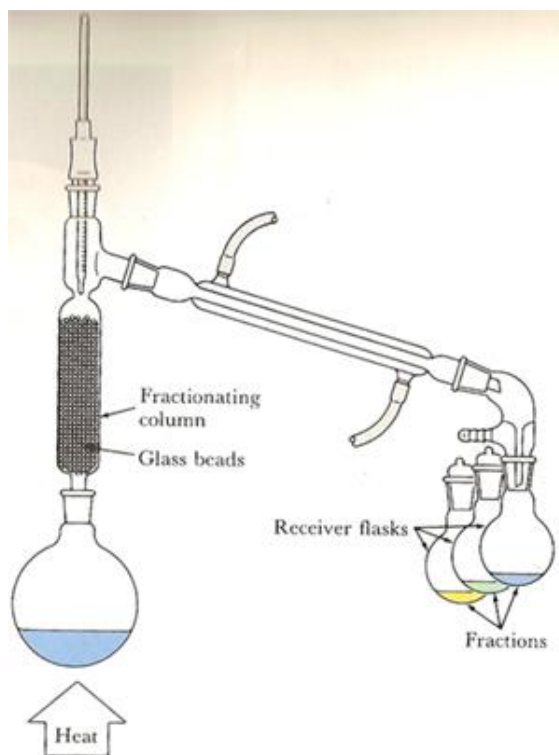


[30, s. 198]

Puusta ja muista biomateriaaleista valmistettujen hydrolysaattien fermentoiminen etanoliksi ei ole ongelmattonta. Fermentoituvien sakkariidien lisäksi hydrolysaatti sisältää lukuisia muita yhdisteitä, joista osa inhiboi hiivan toimintaa. Näin tapahtuu varsinkin suuremmissa konsentraatioissa. [20, s. 125] Lisäksi yksikään tunnettu hiiva ei kykene hyödyntämään kaikkia sakkariideja etanolin tuotossa. Tutkimusten kohteena onkin jo vuosia ollut hiivakantojen geneettinen muokkaaminen siten, että ne hyödyntäisivät paremmin erilaisia sakkariideja esimerkiksi etanolintuotossa. [35, s. 277]

8 Tislaus

Tislaus on yksikköoperaatio, jossa erotellaan toisiinsa liuenneita aineita höyrystämällä liuosta. Tislaus perustuu eri aineiden haihtuvuuteen. Kun tislattavaa liuosta lämmitetään, matalimman höyrönpaineen komponentti erottuu tislauksen tuotteena eli tisleenä ensin, ja loput komponentit jäävät tislauksjännökseksi. Kuvassa 7 on esitettyä tisluslaitteisto. [29, s. 9]



Kuva 7. Tisluslaitteisto [29 s. 9]. Fraktiointikolonne (kuvassa *fractionating column*) auttaa aineita erottumaan tehokkaammin kuin pelkkä suora lasiputki. Tisle on mahdollista kerätä fraktioihin vaihtamalla tislekolvia tislauksen aikana.

9 Käytetyt analyysimenetelmät

Analyysit ja analyysimenetelmät on esitetty taulukossa 2. Fraktiot analysoitiin mahdollisimman monipuolisesti, jotta niistä saatiin parempi kokonaiskuva.

Taulukko 2. Analyysit ja analyysimenetelmät.

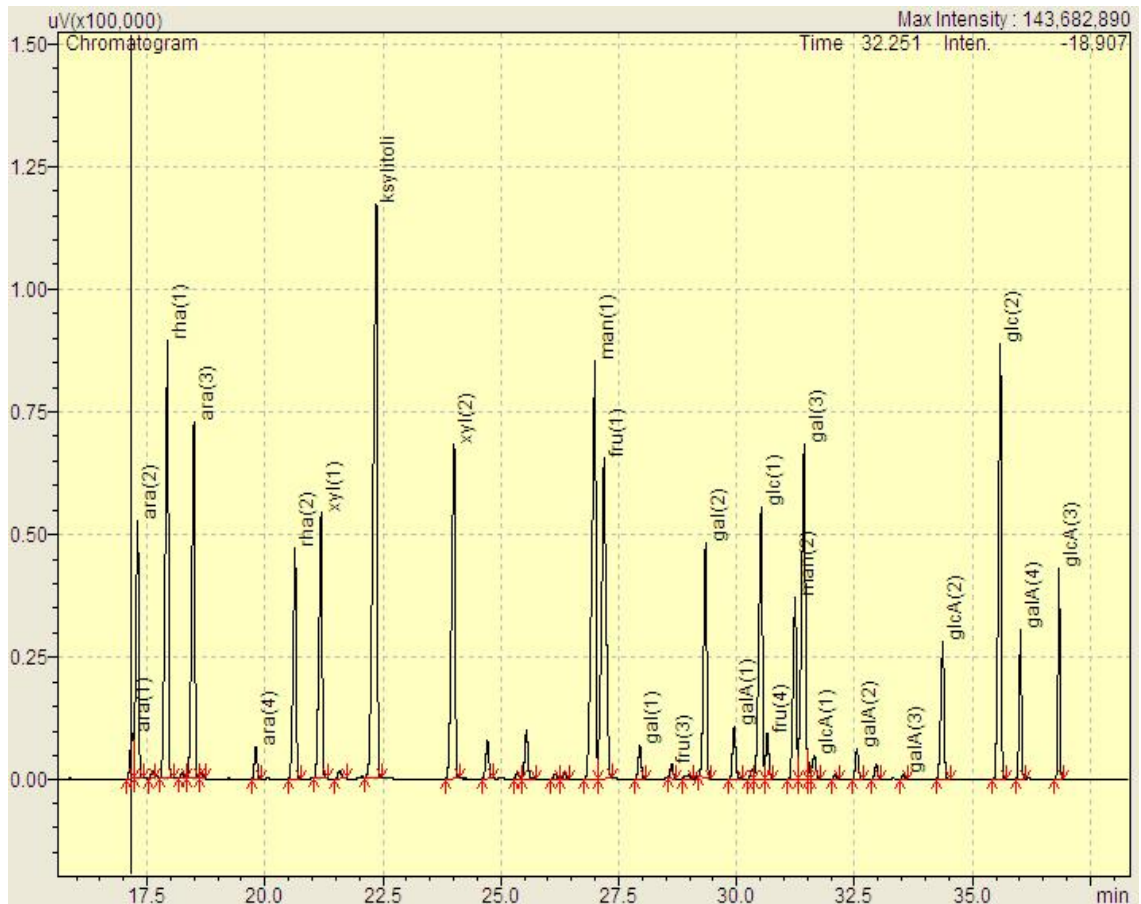
Analyysi	Menetelmä
Kokonaissakkaridipitoisuus	Kaasukromatografia
Monosakkaridipitoisuus	Kaasukromatografia
Liuennut ligniini	Spektrofotometria
Orgaaniset yhdisteet yhteensä	TOC-laite
Uuteaineet	Massaspektrometri

9.1 Kaasukromatografia

Kaasukromatografiassa eri yhdisteitä sisältävät näytteet kulkeutuvat höyrystyneessä olomuodossa kolonnin läpi. Heikosti haihtuvat yhdisteet saadaan haihtuvammiksi derivatisoimalla ne esimerkiksi silyylijohtannaisiksi ennen ajoa. Kolonni on yleensä useamman metrin mittainen ohut silikaputki, jonka sisäosa on päällystetty kiinteäksi faasiksi kutsutulla materiaalilla. Yhdisteiden erottuminen kolonnissa toisistaan perustuu kiinteän faasin kanssa tapahtuviin reaktioihin sekä höyrönpaine-eroihin. Liikkuvana faasina eli kantajakaasuna käytetään mahdollisimman inerttejä kaasuja, joiden tehtävänä on viedä näytteitä eteenpäin kolonnissa. Yleisimmän käytettyjä kantajakaasuja ovat typpi, happi, helium ja argon. Yhdisteet tunnistetaan niiden malliaineiden avulla. Retentioaika on aika, joka yhdisteiltä kuluu kolonnin läpi kulkemiseen. [19, s. 106]

Yhdisteiden kulkeuduttua kolonnin läpi niiden tunnistamiseen on erilaisia detektoreita, joista yleisimmät ovat liekki-ionisaatiodektori (FID), elektronisieppausdetektori (ECD) ja massaspektrometrinen (MS) detektori. Näistä laajimmin käytössä on FID-detektori, jonka etuja ovat luotettavuus, herkkyys, yksinkertaisuus ja helppokäyttöisyys. FID-detektori perustuu liekissä muodustuviin orgaanisiin kationeihin. Kationit vapauttavat elektroneja, jotka havaitaan detektorin kollektorielektrodilla. Detektorille tulevan hiilen määrä on verrannollinen muodostuneeseen virtamäärään ja siten eluoituneen yh-

disteen määrään. Tulokset saadaan tietokoneen kromatografiaohjelmalla, joka tunnistaa piikit ja laskee niiden pinta-alat suhteuttaen sisäiseen ja ulkoiseen standardiin ja saa selville kunkin yhdisteen pitoisuudet näytteessä. [19, s. 106 - 107] Kuvassa 8 on monosakkaridimäärityksiin käytetyn kalibrointiliuoksen kromatogrammi.



Kuva 8. Monosakkaridimenetelmän kalibrointiliuoksen kromatogrammi [32]. Piikkien yläpuolella lukee sakkariidin nimi lyhenteenä. Sakkariidin eri isomeerit on merkitty eri numeroilla. Nimettömät piikit ovat epäpuhtauksia ja menetelmän tunnistamattomia yhdisteitä. Menetelmässä käytetään ksylitolia sisäisenä standardina.

Menetelmän tunnistamat sakkariidit ovat taulukossa 3.

Taulukko 3. Käytetyn kaasukromatografisen analyysimenetelmän tunnistamat sakkariidit.

Heksoosit	Pentoosit	Uronihapot	Deoksiheksoosit
Mannoosi	Ksyloosi	Glukuronihappo	Ramnoosi
Glukoosi	Arabinoosi	Galakturonihappo	
Galaktoosi			
Fruktoosi			

9.2 Kaasukromatografia-massaspektrometria eli GC-MS

Kaasukromatografiin liitettyssä massaspektrometrissä yhdistyy kaasukromatografian hyvä erotuskyky ja massaspektrometrin herkkyys sekä spesifisyys. Massaspektrometrillä yhdisteet tunnistetaan ionisoimalla ne ja erottamalla ne niiden massa-varaus-suhteen mukaan. Erotus tapahtuu kiihdyttämällä ionit sähkökentässä, jolloin joka yhdisteelle syntyy ominainen lentorata yhdisteen massan ja varauksen mukaan. Kiihdytyksen jälkeen ionit iskeytyvät detektorille, minkä jälkeen tietokoneohjelma tarkastelee massaspekttriä massaspektrikirjastoa vasten tunnistuen yhdisteet varmuudella, joka riippuu näytteen epäpuhtauksista ja massaspektrikirjaston laadusta. [24, s. 116 - 117; 19, s. 110 - 111]

9.3 Orgaanisen hiilen määrä eli TOC

Hiilenmääritysmenetelmällä voidaan määrittää vesiliuoksen orgaanisen hiilen kokonaismäärä (TOC), liuoksen orgaanisen hiilen (DOC) määrä ja kokonaishiilen määrä (TC). Veden epäorgaaninen hiili on pääsääntöisesti hiilidioksidia, bikarbonaatteja ja karbonaatteja. Kokonaishiilimäärityksessä (TC) näyte poltetaan 680 °C:ssa hiilidioksidiksi platinakatalyytillä, jonka pinnalta syntyneen hiilidioksidin määrä mitataan infrapunakennolla. Kantajakaasuna käytetään synteettistä ilmaa. Epäorgaaninen hiili (IC) määritetään antamalla näytteen reagoida 25 % fosforihappoliuoksen kanssa, jolloin epäorgaaniset yhdisteet muuttuvat hiilidioksidiksi, jonka määrä mitataan infrapunakennolla. Orgaanisen hiilen (TOC) määrä saadaan vähentämällä epäorgaanisen hiilen määrä kokonaishiilen määrästä. [26, s. 1]

9.4 Spektrofotometria

Spektrofotometrillä mitataan näytteeseen absorboituvan valon määrää. Spektrofotometri perustuu Lambert-Beerin lakiin, jonka mukaan liuoksessa olevan yhdisteen pitoisuus on suoraan verrannollinen absorboituneen valon määrään. Laki voidaan kuvata yhtälöllä

$$A = abc = -\log T, \text{ jossa}$$

$$A = \text{molaarinen absorbanssi}$$

$$a = \text{yhdisteen absorptiokerroin} = \epsilon \text{ [l} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}\text{]}$$

$$b = \text{valon kulkema matka liuoksessa [cm]}$$

$$c = \text{yhdisteen pitoisuus [mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{]}$$

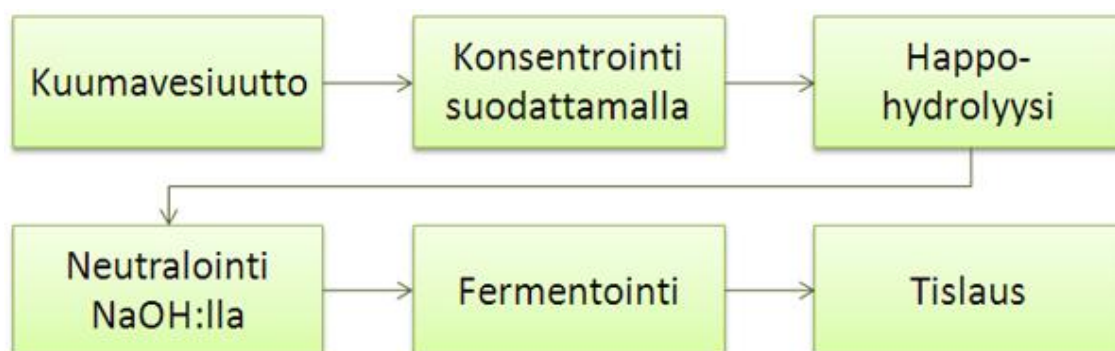
$$T = \text{läpäisseen valon intensiteetin suhde saapuvan valon intensiteettiin}$$

Laki on voimassa vain, jos säteilevä valo on yksiväristä, yhdisteen pitoisuus on lineaarisella mittausalueella, liuoksessa ei ole muita optisesti häiritseviä yhdisteitä eikä liuoksessa tapahdu kemiallisia reaktioita mittauksen aikana. Määritettävän yhdisteen pitoisuus lasketaan vertaamalla sen aiheuttamaa absorbanssia tunnetun standardin absorbanssiin.

Kokeellinen osa

10 Prosessi

Työn kokeellisessa osassa prosessi kuusenpurusta etanoliksi tehtiin kaksi kertaa. Ensin tuotettiin pienempi erä, jolla selvitettiin prosessin onnistuminen. Ensimmäisessä erässä uuttoiin käytettiin tuorepainoltaan noin 5 kg kuusenpurua. Tämän jälkeen tuotettiin suurempi erä, johon kuusenpurua kului tuorepainoltaan noin 13 kg. Ennen varsinaisia kokeita selvitettiin esisuodatuksen vaikutuksia liuokseen ja konsentroituihin. Käsiteltävä puuaines oli tutkimuskäyttöön valmistettua hienojauheista sahanpurua Metsäntutkimuslaitoksen Ruotsinkylän yksiköstä. Prosessin vuokaavio on kuvassa 9.



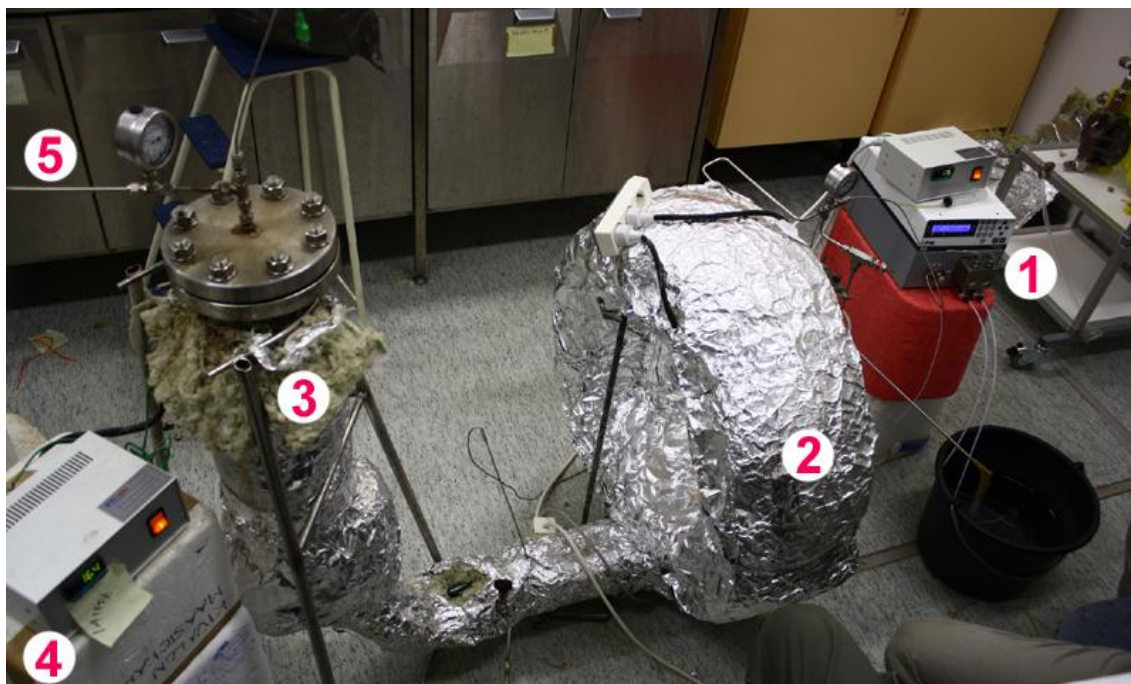
Kuva 9. Prosessin vuokaavio. Prosesissa on monta työvaihetta, joten prosessin optimointi on tuotteen saannon kannalta tärkeää.

10.1 Hemiselluloosan paineistettu kuumavesiuutto

Paineistetussa kuumavesiuutossa uutettiin puuaineksesta hemiselluloosat ja vapaat monosakkaridit, mutta mukana uuttui muitakin puun aineita. Muita uuttuvia aineita olivat uuteaineet, ligniini sekä sen hajoamistuotteet. Veden etuja muihin liuottimiin verrattuna olivat suuremmat hemiselluloosasaannot ja pienemmät ligniinisaannot [21, s. 2].

Uuttamiseen käytetty laite oli suunniteltu erityisesti kuumavesiuuttoa varten. Uuttolaitteen kolmen litran uuttosylinteri täytettiin kuusenpurulla painelemalla purua tasapaisella sauvalla. Uuttoihin punnitun kuusenpurun märkämässä vaihteli 888 ja 1154 gramman välillä, sillä uuttoiin laitetut purut punnittiin vasta, kun sylinteri oli pakattu täyteen.

Paineistuksessa ja uuttosylinterin lämmityksessä vesi lämmitettiin esilämmitysrenkaassa haluttuun lämpötilaan, minkä jälkeen se päästettiin uuttosylinteriin. Uuttosylinterin annettiin täyttyä vedellä ulostuloventtiili auki, jotta uuttosylinteriin jääneet kaasut tulivat ulos. Kun uuttosylinteri oli täyttynyt vedellä, ulostuloventtiili suljettiin, jolloin paine alkoi nousta. Uttolaite on kuvassa 10.



Kuva 10. Uttolaite. Oikealla on pumppu sekä veden esilämmitysrenkaan ohjauspaneeli (merkitty numerolla 1). Keskellä on veden esilämmitysrenkas (numero 2). Vasemmalla on uuttosylinteri (numero 3) ja sen lämmitysjärjestelmän ohjauspaneeli (numero 4). Uttosylinterin päältä uute poistuu pitkin putkea (numero 5), jossa on kartioventtiili paineen säätelyyn ja vesikierrolla toimiva jäähdytys.

Uuttoparametrit valittiin samalla laitteella tehtyjen aikaisempien tutkimusten perusteella [10, s. 3]. Uuttoparametrejä ei pystytty pitämään täysin samoina joka uutossa. Lopullisen uutteen tilavuuteen vaikutti myös, miten purut oli uuttosylinteriin pakattu. Lämpötila uutteen keräämisen alkaessa vaihteli sen mukaan, mikä oli kuusenpurujen alkulämpötila ja miten ne olivat sylinteriin pakkautuneet, eli osassa uutoista talteenoton alkaessa lämpötila vaihteli merkittävästi. Lämpötilan säätämisessä oli ongelmia, sillä lämmitysvastusten vaikutus tuli uuttoastiaan viiveellä, jolloin lämpötilaa ei pystytty pitämään täysin vakiona. Paine vaihteli uuton alkuminuuteilla, jolloin se saattoi hetkellisesti nousta paljon yli halutun. Paineen ansiosta vesi pysyi nesteinä korkeasta lämpötilasta huolimatta [18, s. 120]. Liian korkeissa lämpötiloissa uutteeseen uuttui liikaa liuksen jäl-

kikäsittelyä haittaavia uuteaineita ja ligniiniä, jolloin uute hylättiin [10, s. 9 - 10]. Selluloosa jäi käytetyillä parametreillä kokonaan uuttumatta, koska se alkaa hajota paineistuksessa vedessä noin 230 °C:ssa [28, s. 368]. Uuttolaitteella tehtiin työn aikana yli 20 uuttoa, joista osa hylättiin liian korkeaksi nousseen lämpötilan takia. Uuttolaitteen alkuperäinen pumppu hajosi kesken uuttojen, jolloin se vaihdettiin erikokoiseen pumppuun. Uudella pumpulla virtausta ei saatu samankaltaiseksi kuin alkuperäisellä pumpulla, sillä oli sakkaridisaantoihin alentava vaikutus.

10.2 Konsentroidi ultrasuodatuksella

10.2.1 Esisuodatus

Esisuodatuskokeet tehtiin ennen varsinaisia konsentrointeja ja niissä käytettiin pieniä liuostilavuuksia. Esisuodatuskokeissa käytettiin dead-end-suodatusta Begerowin Beco-KD-levyillä. Levyjen valmistaja ei ilmoita levyille tarkkaa huokoskokoa, mutta ne on tarkoitettu elintarvikeliuosten kirkastamiseen. Levyjen materiaalina on selluloosa. [32 s. 5 - 6] Esisuodatettava liuos ajettiin Keg-astiasta 18 levyn pakan läpi 1,5 baarin paineella. Liuoksen lämpötila esisuodatuskokeissa oli noin 7 °C.

10.2.2 Ultrasuodatus

Ultrasuodatuskokeita tehtäessä havaittiin, että kalvomateriaalilla on suuri merkitys suodatuksen permeaattivuohon, kalvojen tukkeutumiseen ja suodatuksen onnistumiseen. Varsinaisiksi suodatuskalvoiksi valittiin selluloosapohjaiset kalvot. Selluloosapohjaisten kalvojen tärkein ominaisuus on vahva hydrofiilisyytys. Huonoja ominaisuuksia ovat alhaiset lämpötilan ja paineen kestävyys. Kalvojen valmistaja ilmoitti kalvojen maksimilämpötilaksi 55 °C ja maksimipaineeksi 5,5 baaria. [16] Lisäksi jotkin mikrobit voivat hajottaa selluloosakalvoa entsyymaattisesti tai kasvaa kalvolla, jolloin kalvo tukkeutuu mikrobipesäkkeistä [14, s. 67 - 68]. Syöttöastiana oli noin 200 litran säiliö, jonka putkijärjestelmään oli yhdistetty 2,2 kW:n pumppu. Syötettävän liuoksen lämpötilan säätelyyn käytettiin syöttösäiliöön asetettuja metallikerukoita, joista toinen oli yhdistetty glykolilla täytettyyn lämpöhauteeseen ja toinen vesijohtoverkkoon. Suodatusta aloitettiin

taessa ja sen aikana liuosta lämmitettiin. Konsentraation noustessa liuos alkoi lämmitä kalvoille liian korkeisiin lämpötiloihin, jolloin sitä viilennettiin kierrättämällä putkistossa viileää vesijohtovettä. Suodatuksessa syöttöpaine pyrittiin pitämään 3 baarissa ja lämpötila mahdollisimman lähellä kalvojen maksimia 55 °C:a, koska korkeampi lämpötila kasvattaa permeaattivuota [33, s. 41 - 43]. Syöttöpaine saatiin aikaan säätämällä pumpun kierrosnopeus maksimiin ja kiristämällä sopivasti retentaattilinjan venttiiliä. Lämmönvaihtojärjestelmä ei ollut pienen lämmönvaihtopinta-alan takia riittävän tehokas suurelle liuostilavuudelle, joten lämpötila ei pysynyt tasaisena koko suodatuksen ajan.

10.4 Polysakkaridien happohydrolyysi ja neutralointi

Happohydrolyysi tehtiin Infors A6 CH4103 –fermentorissa. Hydrolyysi on mahdollista tehdä myös entsyymeillä, mutta hapot valittiin kustannustehokkuuden ja nopeuden vuoksi. Hydrolyysikinetiikan selvittämiseksi fermentorista otettiin näyte tunnin välein työajan puitteissa. Happamointiin käytettiin eri hydrolyyseissä 37 % suolahappoa (HCl) ja 72 % rikkihappoa (H₂SO₄). Kullakin hapolla tehtiin kaksi hydrolyysiä. Hydrolysaatit neutraloitiin pH-arvoon 5,5 käyttäen erivahvuisia NaOH-liuoksia. Käytetyt hydrolyysiparametrit ovat taulukossa 4.

Taulukko 4. Hydrolyysiparametrit.

pH	1
Aika	24 h
Lämpötila	90 °C
Sekoitus	350 rpm
Tip speed	1,6 m/s

10.5 Fermentointi

Hiivaksi työhön valittiin *Saccharomyces cerevisiae*, koska se tuottaa etanolia heksosisakkarideista poikkeuksellisen tehokkaasti. Lisäksi se sietää tavallisia hiivoja paremmin yleisiä biomassan hydrolysaattien inhibiittoreita. Ominaisuuksiensa takia kysei-

sestä hiivasta on yritetty jalostaa kantoja, jotka pystyisivät hyödyntämään anaerobisessa etanolintuotossa myös pentoosisakkarideja. [23, s. 13]

Fermentointi suoritettiin ravistelukasvatuksena 32 °C:ssa ja pH:ssa 5. Ravistelussa käytettiin nopeutta 100 – 120 rpm. Ennen suurempien tilavuuksien fermentointeja kokeita tehtiin 100 ml:n tilavuuksilla, jotta saatiin käsitystä, kuinka suurilla inhibiittoripitoisuuksilla fermentointi onnistuu. Hiivoina käytettiin *Saccharomyces cerevisiaen* Valtion teknillisen tutkimuskeskuksen kantoja C-79099 ja C-79093. Hiivat kasvatettiin puhtasviljelmistä 100 ml:ssa YPD-kasvatusliuosta. Ravistelunopeus oli 100 rpm ja lämpötila 32 °C. Vuorokauden kasvatuksen jälkeen liuos jaettiin kahteen 50 ml:n putkeen ja sentrifugoitiin 10 minuuttia kierrosnopeudella 2000 rpm. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja tilalle lisättiin 50 ml steriiliä fysiologista suolaliuosta, minkä jälkeen sentrifugoitiin uudestaan samoilla parametreillä. Supernatantti kaadettiin jälleen pois, ja pohjalle jäänyt hiiva suspendoitiin 10 ml:aan fysiologista suolaliuosta. Näin valmistettua hiivasuspensiota lisättiin fermentointeihin 1 ml / 100 ml fermentoitavaa liuosta. Tällä menetelmällä 1 ml hiivasuspensiota sisälsi noin 44,2 mg hiivaa eli noin $4,42 \cdot 10^9$ hiivasolua.

Ensimmäisen erän fermentoinnit tehtiin aseptisesti, ja liuokset autoklavoitiin ennen hiivan lisäämistä. Autoklavointi tehtiin 121 °C:ssa 15 minuutin ajan. Autoklavoinnin seurauksena sokerit ja muut liuoksen yhdisteet sakkautuivat, eivätkä enää liuenneet täydellisesti vaan muodostivat erisuuruisia partikkeleita. Ensimmäisten fermentointikokeiden jälkeen liuoksia ei sakkautumisen takia autoklavoitu ennen hiivan lisäämistä.

10.6 Tislaus

Työssä tislauksella pyrittiin eristämään etanoli fermentoidusta hydrolysaatista. Etanolin kiehumispiste on 78,5 °C [38, s. 594]. Tislauksessa lämpötilaa pidettiin kuitenkin selvästi korkeamana, sillä tarkoituksena ei ollut saada äärimmäisen puhtasta lopputuotetta.

11 Tulokset

Käytettyjen analyysimenetelmien analyysivirheitä ei ollut määritetty. Etenkin kokonais- ja monosakkaridimenetelmän tuloksissa oli ristiriitaisuuksia. Tämä johtuneee siitä, että menetelmässä oli monta tekijää, jotka vaikuttavat analyysitulokseen. Häiriötekijöitä olivat muun muassa pienet pipetointilavuudet, näytteiden oton ongelmat suurista tilavuuksista sekä kromatogrammien tulkitsemisongelmat. Kromatogrammeissa piikit saattoivat olla hieman päällekkäin, ne eivät olleet identtisiä ja niissä oli epäpuhtauksia häiritsemässä tulkintaa. Prosessin tarkemmat vuokaaviot eräkohtaisesti ovat esitettyinä liitteissä 3 ja 4.

Kokonais- ja monosakkaridimäärityksissä käytettiin Turun yliopiston kehittämää menetelmää [32]. Kokonaissakkaridimäärityksissä näytteiden polysakkaridit hydrolysoitiin hapolla (2 M HCl 9:1 metanoli-vesiseoksessa), silyloitiin ja analysoitiin kaasukromatografisesti. Monosakkaridimäärityksissä vapaat monomeerit silyloitiin ja määritettiin kaasukromatografisesti.

Massaspektrometrillä selvitettiin fraktioiden sisältämiä aineita. TOC-arvolla seurattiin fraktioiden aineita, joiden pitoisuuksia ei selvitetty muilla analyyseillä. Lisäksi TOC-arvoista seurattiin, korreloivatko ne analysoitujen yhdisteiden pitoisuuksien kanssa. Jos fraktiossa oli paljon sakkarideja, ligniiniä ja uuteaineita, varmistettiin TOC-arvon ja muiden analyysien korrelaatio. TOC-arvo pystyttiin arvioimaan, jos liuoksen pääkomponenttien määrät tunnettiin. TOC:n, sakkaridien, ligniinin ja uuteaineiden välille saatiin yhteys kertoimilla, jotka oli määritetty 0,4:ksi hemiselluloosalle, 0,6:ksi ligniinille ja 0,8:ksi uuteaineille [24, s. 22].

Spektrofotometrialla määritettiin ligniinin pitoisuuksia. Ligniinillä on suurin absorbanssi aallonpituudella 280 nm. Liuennut ligniini voidaan kvantitoida absorbanssista kokeellisesti kuuselle kehitetyllä kertoimella $17,8 \text{ l} / (\text{g} \cdot \text{cm})$ [25, s. 287].

11.1 Esisuodatus Beco-KD-levyillä

Ensimmäisessä esisuodatuskokeessa suodatettiin noin 8 litraa uutetta ja toisessa noin 3,5 litraa uutetta. Kokonaissakkariditappiot olivat keskimäärin 43,5 %, joten esisuodatusta Begerowin Beco-KD-levyillä ei jatkossa käytetty, vaikka se poistikin liuoksen kalvoja tukkivia aineita. Suodatettavista liuksista poistettiin suurimmat kiintoaineet 0,075 mm:n metalliverkolla. Esisuodatus poisti silmämääräisen arvion mukaan valtaosan liuoksessa olevista uute- ja kiintoaineista, joista on haittaa liuoksen käsittelyssä. Esisuodatuskokeiden liuosten kokonaissakkaridikonsentraatiot ennen suodatusta ja suodatuksen jälkeen ovat taulukossa 5. Esisuodattamattoman ja esisuodatetun liuoksen ero näkyy kuvassa 11.

Taulukko 5. Talukosta nähdään, että kokonaissakkaridikonsentraatio laski merkittävästi esisuodatuksessa. Sokereista jäi levyihin keskimäärin 44,5 %.

	Sakkaridipitoisuus ennen suodatusta (g/l)	Sakkaridipitoisuus suodatuksen jälkeen (g)	Sakkariditappio (%)
Suodatuskoe 1	8,1	4,8	41 %
Suodatuskoe 2	11,8	6,1	48 %



Kuva 11. Vasemmalla puolella on esisuodattamattoman liuoksen ja oikealla esisuodatetun liuoksen näyte pakastamisen ja sulattamisen jälkeen. Esisuodattamattoman liuoksen kiinteät komponentit olivat muodostaneet jäykähkön sakan näytepullon pohjalle. Kuvan spaatelilla on irrotettu sakkaa vasemmanpuolisen näytepullon pohjasta.

11.2 Kuumavesiuutot

Ensimmäisessä erässä tehtiin viisi uuttoa, joiden massa oli yhteensä 44,4 l. Sakkarideja utteisiin uutui yhteensä 385 g eli noin 15,6 % uutetun kuusenpurun kuiva-aineesta. Liuoksen kokonaissakkaridipitoisuuksiin vaikutti eniten uuttoon punnitun purun määrä, mutta myös uuttosylinterin lämpötilalla oli merkitystä. Mitä hitaammin uuttoaastian yläosan lämpötila nousi tavoiteltuun lämpötilaan, sitä alhaisemmaksi kokonaissakkaridipitoisuus jäi, sillä silloin uutettava materiaali oli halutussa lämpötilassa vähemmän aikaa. Myös muita uutuvia yhdisteitä tuli vähemmän uutoissa, jotka lämpenivät hitaammin. Paineenvaihteluita ei kirjattu ylös, vaan paine pyrittiin manuaalisesti pitämään samalla tasolla koko uuton ajan.

Uuttojen 1, 2 ja 3 kokonais- ja monosakkaridisaannot sekä ligniini- ja uuteainepitoisuudet jäivät alhaisemmiksi kuin uutoissa 4 ja 5. Tämä johtui uuttojen hitaammasta lämmönoususta ja hieman alhaisemmista lämpötiloista. Uuton 5 selvästi korkeimmat kokonais- ja monosakkaridisaannot sekä ligniini- ja uuteainepitoisuudet johtuvat siitä, että uutossa 5 lämpötila nousi selvästi muita uuttoja nopeammin. TOC-tulokset korreloivat muiden analyysitulosten kanssa. Ensimmäisen erän uuttojen sakkaridisaannot on esitetty taulukossa 6 ja ligniini-, uuteaine- sekä TOC-saannot taulukossa 7.

Taulukko 6. Uutetun purun määrät, utteiden massat sekä uutoille tehtyjen analyysien tulokset.

Uutto	Puraa kuiva-aineena (g)	Utteen massa (kg)	Kokonaissakkaridisaanto (g/kg)	Monosakkaridisaanto (g/kg)
1	453	9,0	127,9	12,4
2	556	9,2	163,3	13,8
3	431	8,9	122,5	13,5
4	476	8,4	171,1	17,0
5	552	8,9	184,4	25,3
Yht.	2469	44,4	Keskimäärin 153,8 g/kg	Keskimäärin 16,4 g/kg

Taulukko 7. Ensimmäisen erän uuttojen ligniini-, uuteaine- ja TOC-saannot.

Uutto	Ligniinisaaanto (g/kg)	Uuteainesaaanto (g/kg)	TOC (g/kg)
1	27,8	10,8	110,5
2	23,8	12,0	103,0
3	26,4	13,5	102,8
4	27,3	13,9	119,1
5	36,3	15,1	140,6
Keskimäärin	28,3 g/kg	13,0 g/kg	115,2 g/kg

Toista erää varten tehtiin 11 kuumavesiuuttoa, joiden yhteismassa oli näytteiden ottamisen jälkeen 96,8 kg ja sakkariidipitoisuus 6,6 g/l. Sakkariideja uutoissa uutui yhteensä noin 640 grammaa eli 12,0 % kuusenpurun kuiva-aineesta. Vaikka uuttoon U12 laitettiin paljon puruja, oli saanto huono, koska lämpötila nousi selvästi hitaammin kuin muissa uutoissa. Osassa uuttoja, joihin oli punnittu paljon puruja ja lämpötila nousi nopeasti, jäi sakkariidisaanto vaatimattomaksi, sillä lämpötilaa ei saatu pysymään tarpeeksi korkeana uuton aikana. Lämpötilan nousun lisäksi uutteen lopputilavuus vaikutti uutteen sakkariidikonsentraatioon. Uuttoihin punnitun kuusenpurun kuiva-ainemassat, uutteen massat ja sakkariidikonsentraatiot ovat taulukossa 8. Uuttojen sakkariidisaannot punnittujen purumäärien mukaan ovat liitteessä 5.

Taulukko 8. Uuttoihin punnitun kuusenpurun kuiva-ainemassat, uutteen massat ja sakkariidikonsentraatiot. Uuttojen U6, U11 ja U13 monosakkariidipitoisuusmäärytykset eivät onnistuneet, eikä niitä tehty uudelleen.

Uutto	Puraa kuiva-aineena (g)	Uutteen massa (kg)	kokonaissakkariidisaanto (g/kg)	Monosakkariidit (g/kg)
U6	486,5	8,7	104,1	
U7	474,3	9,0	134,0	9,8
U8	552,4	8,7	116,6	10,8
U9	470,9	9,1	100,6	10,8
U10	431,7	8,8	136,9	32,3
U11	439,4	8,9	106,8	
U12	559,7	8,8	109,5	48,0
U13	460,8	8,9	114,0	
U14	432,1	9,0	139,5	40,4
U15	496,2	8,8	108,4	31,4
U16	512,1	8,19	150,6	44,4
Yht.	5316,1	96,8	Keskimäärin 120,1 g/kg	Keskimäärin 28,5 g/kg

11.3 Konsentroidut ultrasuodattamalla

Ensimmäisessä suodatuksessa suodatettiin 43,3 kg liuosta, ja se kesti 125 minuuttia. Retentaattiin kaikista sakkariideista jäi 35,6 % ja permeaattiin 46,5 %. Hävikkiin sokeista meni 17,9 %. Hävikki johtui siitä, että laitteistossa ei ollut varsinaista tyhjennysventtiiliä, joten osa konsentroidusta liuoksesta valui lattialle putkiliitoksia avattaessa. Konsentroitua liuosta jäi myös hieman suodatuskasettiin ja putkistoon. Ligniinin kokonaismäärästä retentaattiin jäi 34,5 % ja uuteaineista 50,0 %. TOC-arvot korreloivat muiden analyysitulosten kanssa. Suodatusfraktioiden analyysitulokset ovat taulukossa 9 ja ensimmäisen suodatuksen lämpötila ja permeaattivuo suodatuksen aikana liitteessä 1.

Taulukko 9. Ensimmäisen konsentroidin fraktioiden tiedot ja analyysitulokset. Permeaatti kerättiin 20 litran kannuihin, minkä takia on erikseen permeaatti 1 ja 2. Permeaatti 2:n monosakkaridimääritys epäonnistui, eikä sitä tehty uudelleen.

	Syötetty liuos	Retentaatti	Permeaatti 1	Permeaatti 2	Hävikki
Massa (kg)	43,3	1,5	39,9		1,9
Sakkarideja yht. (g)	376,7	134,1	175,1		67,5
Kokonaissakkaridit (g/l)	8,7	89,4	4,3	4,5	-
Monosakkaridit (g/l)	0,9	1,97	1,07	-	-
Ligniini (g/l)	1,6	11,7	0,86	0,81	-
Uuteaineet (g/l)	0,74	8,5	0,3	0,3	-
TOC (g/l)	6,6	54,4	3,4	2,6	-

Ensimmäisessä konsentroidinnissa liuoksen tilavuus ja massa saatiin pienennettyä tehokkaasti. Yhdisteistä kalvo pidatti parhaiten uuteaineita, sakkariidiketjuja ja ligniiniä, kun taas monosakkaridit läpäisivät kalvoa enemmän. Eri yhdisteiden konsentrintikertoimet ovat esitettynä taulukossa 10.

Taulukko 10. Ensimmäisen konsentroidin konsentroidikertoimet.

	Konsentroidikerroin
Liuoksen massa	27,6
Kokonaissakkaridit	10,3
Monosakkaridit	2,2
Ligniini	7,3
Uuteaineet	11,5
Hiliiyhdisteet (TOC)	8,2

Toisen erän konsentroidinnissa liuoksen massa oli 96,8 kg. Konsentroidintia jatkettiin keskeyttämättä 210 minuuttia, minkä jälkeen liuosta jäädyteltiin välissä, jottei kalvojen maksimilämpötila ylittynyt. Sakkarideista retentaattiin jäi 46,1 %. Permeaatti kerättiin 20 litran säiliöihin, joista ensimmäisen kanisterin sakkaridipitoisuus oli 2,6 g/l ja viimeisen 7,7 g/l. Konsentroiditavan liuoksen väkevöityessä suodattimen läpäisevien sakkaridien määrä kasvoi merkittävästi. Sakkarideja oli yhteensä ennen suodatusta 639 g ja suodatuksen jälkeen 645 g. Sakkaridien kasvanut määrä voidaan selittää vain analyysitulosten virheellisyydellä. Lisäksi retentaatin monosakkaridipitoisuus selittyy analyysitulosten virheellisyydellä, sillä kalvot olivat niin harvat, että ne eivät juurikaan pidätä monosakkarideja. Tämän takia retentaatin monosakkaridipitoisuuden pitäisi olla samaa luokkaa kuin permeaattien. Liuoksen massahäviö suodatuksessa oli 2,1 kg, mikä selittyy otetuista näytteistä ja suodatusjärjestelmän sisään jäävällä liuoksella. Ligniinistä retentaattiin jäi 38,4 %. TOC-tulokset tukevat sakkaridi- ja ligniinianalyysien tuloksia. Toisen konsentroidinnin lämpötila ja permeaattivuo suodatuksen aikana ovat liitteessä 2, suodatusfraktioiden analyysitulokset taulukossa 11 ja konsentroidikertoimet taulukossa 12.

Taulukko 11. Toisen konsentroidinnin fraktioiden tiedot ja analyysitulokset. Ret tarkoittaa retentaattia ja P 1–5 eri permeaattisäiliöitä. Retentaatin monosakkaridipianatuloslyysi lienee virheellinen, sillä sen ei pitäisi olla alkuperäistä monomeerikonsentraatiota pienempi.

	Syötetty liuos	Ret	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	Hävikki
Massa (kg)	96,8	2,0	92,7					2,1
Sakkarideja yht. (g)	638,9	298,0	351,9					-
Kokonaissakkaridit (g/l)	6,6	149,0	2,6	2,6	3,1	4,0	7,7	-
Monosakkaridit (g/l)	1,5	0,2	1,7	1,5	1,7	1,8	1,8	-
Ligniini (g/l)	1,3	24,2	0,8	0,6	0,8	0,9	1,1	-
TOC (g/l)	4,6	83,1	2,4	1,9	3,0	3,0	5,8	-

Taulukko 12. Toisen konsentroidin konsentroitikertomiet.

	Konsentroitikerroin
Liuoksen massa	47,35
Kokonaissakkaridit	22,6
Monosakkaridit	0,1
Ligniini	18,6
Hiilyhdisteet (TOC)	18,1

11.4 Hydrolyysit

Ensimmäisen erän hydrolyysissä H1 liuosta oli noin 1234 g ja sen kokonaissakkaridipitoisuus oli 87,9 g/l. Liuoksen massa neutraloinnin jälkeen oli 1300 g. Liuosta ei hävinnyt hydrolyysissä eikä neutraloinnissa mihinkään, mutta näytteiden otto hydrolyysin ja neutraloinnin aikana pienensivät sen massaa.

Toisen erän hydrolyyseihiin oli käytettävissä 1,97 kg liuosta, jonka kokonaissakkaridipitoisuus oli 149 g/l. Liuos jaettiin kolmeen osaan, ja kullekin osalle tehtiin hydrolyysit erikseen. Tuloksista käy ilmi, että monomeerisaanto on suurempi 37 - 38 % HCl:lla kuin 72 % rikkihapolla. Korkein monomeerisaanto on H1:ssä, mikä saattaa johtua siitä, että liuoksen sakkariidikonsentraatio oli huomattavasti pienempi kuin muissa hydrolyyseyissä. Hydrolysaatit laimennettiin pH:hon 5,5. Hydrolyysien tiedot ovat taulukossa 13, ja hydrolysaattien monomeerikonsentraation kehitys on esitetty taulukossa 14 ja kuvassa 13.

Taulukko 13. Ensimmäisen ja toisen erän hydrolyysien tiedot. H1-hydrolysaatti neutraloitiin 80 g/mol NaOH-liuoksella ja hydrolysaatit H2-H4 noin 170 g/mol NaOH-liuoksella.

	1. erä		2. erä	
	H1	H2	H3	H4
Hydrolyysi	H1	H2	H3	H4
Happo	37 - 38 % HCl	72 % H ₂ SO ₄	37 - 38 % HCl	72 % H ₂ SO ₄
Hapon määrä (ml)	26	8,6	9	8,7
Hydrolysaatin massa (g)	1258	675	645	514,1

Taulukko 14. Ensimmäisen ja toisen erän hydrolyysien eteneminen. H1:n ja H3:n 24 h:n näytteen monomeerikonsentraation laskeminen verrattuna 23 h:n näytteeseen saattaa johtua mittavirheestä tai siitä, että osa sakkarideista muuttuu furfuraaleiksi hyvin happamissa oloissa [21, s. 427].

Aika (h)	Monosakkaridipitoisuus (g/l)			
	H1	H2	H3	H4
0	0,8	0,1	0,4	1,7
1	2,1	0,6	1,4	2,3
2	4,3	1,2	2,6	-
3	5,1	3,2	44,1	42,0
4	44,8	6,4	55,0	52,9
21	45,5	52,6	58,7	-
22	46,9	57,5	67,6	62,9
23	50,1	54,6	-	63,6
24	48,2	58,5	66,5	42,1
Saanto	55 %	39 %	45 %	42 %



Kuva 12. Hydrolyysien eteneminen. Monosakkaridikonsentraatiot eivät nousseet merkittävästi tai kääntyivät laskuun 22 tunnin jälkeen.

11.5 Fermentointikokeet

Ensimmäisen erän fermentointikokeilla oli tarkoitus selvittää, millaisissa konsentraatioissa hiivat pystyvät fermentoimaan liuoksen monosakkarideja etanoliksi. Lisäksi selvitettiin, kumpi VTT:n *S. cerevisiae*n kannoista C-79093 ja C-79099 toimisi tehokkaammin kyseisessä liuoksessa. Ensimmäisen sarjan fermentoinnit kestivät 72 tuntia.

Käytettävänä oli 1,35 kg liuosta, jonka monosakkaridikonsentraatio oli 45,1 g/l. Tästä liuoksesta puolet konsentroidtiin pyöröhaihduttimella liuokseksi, jonka monosakkaridikonsentraatio oli 95,8 g/l. Autoklavoinnin aiheuttama sakkautuminen häytti ensimmäisiä fermentointeja, sillä fermentoituvat sokerit eivät olleet olleet osittain käyttökelpoisessa muodossa. Seuraavat fermentoinnit tehtiin ilman autoklavointia, mikä saattoi johtaa siihen, että *S. cerevisia* –hiivojen lisäksi liuosten sakkarideja käyttivät muutkin mikrobit. Autoklavoidut liuokset ovat kuvassa 12.



Kuva 12. Autoklavoidut kasvatusliuokset fermentointipulloissa. Autoklavoinnin jälkeen kaikki liuokset näyttivät samalta kuin oikeassa pullossa oleva. Vasenta pulloa ravisteltiin, jotta sakka olisi liennut takaisin, mutta komponentit eivät lienneet enää täydellisesti.

Fermentointeja tehtiin ensimmäisessä sarjassa neljä: F1A C-3, F1B C-9, F1C C-3 ja F1D C-9. Koodauksen C-3 viittaa hiivakantaan C-79093 ja C-9 hiivakantaan C-79099. Laimeamman monosakkaridikonsentraation liuokset olivat F1A C-3 sekä F1B C-9 ja väkevämmän konsentraation F1C C-3 sekä F1D C-9.

Liusten F1A C-3 ja F1B C-9 sakkariidit fermentoituivat hyvin, mutta liusten F1C C-3 ja F1D C-9 sakkariidit eivät fermentoituneet lainkaan. Syynä oli luultavasti liian suuri inhibiittoriaineiden konsentraatio liuoksessa, sillä monosakkariidikonsentraatiot eivät olleet *S. cerevisiae* etanolintuottoa haittaavalla tasolla, joka on esimerkiksi glukoosille 380 g/l [20, s. 129]. Ensimmäisen koesarjan perusteella jatkokokeisiin valittiin hiivakanta C-79099, koska hyvin käyneen matalamman sakkariidikonsentraation liuoksen massahäviö oli suurempi kuin hiivakannalla C-79093. Päätös hiivakannan C-79099 käyttämisestä tehtiin massahäviön perusteella, sillä tarkemmat tulokset eri sakkariidien kulumisesta fermentoinnin aikana saatiin vasta myöhemmin. Fermentointikokeiden sakkariidipitoisuuksien ja massojen muutokset ovat taulukossa 15.

Taulukko 15. Ensimmäisen fermentointisarjan tulokset. Väkevämmät liuokset eivät juurikaan fermentoituneet. F1C C-3 -sarjan kasvanut monosakkariidipitoisuus fermentoinnin jälkeen johtunee analyysimenetelmän epätarkkuudesta. F1D C-9 -sarjan kokonais-sakkariidipitoisuusnäytteen analyysi epäonnistui.

Kokeen tunnus	Hiivakanta	Monosakkariidipitoisuus alussa (g/l)	Monosakkariidipitoisuus lopussa (g/l)	Kokonaissakkariidipitoisuus alussa (g/l)	Kokonaissakkariidipitoisuus lopussa (g/l)	Massan muutos (g)
F1A C-3	C-79093	46,1	15,2	86,4	35,4	0,69
F1B C-9	C-79099	43,9	13,3	89,7	40,0	0,71
F1C C-3	C-79093	95,4	95,7	172,9	171,3	0,21
F1D C-9	C-79099	96,1	90,8	177,3	-	0,15

Etanoliksi fermentoituvien heksoosisokereiden kuluminen oli matalamman konsentraation liuoksissa merkittävää. Tässä koesarjassa fermentoitumista saattoi haitata autoklavoinnista aiheutunut kiintoaineiden osittainen sakkautuminen. Fermentoinnin jälkeen liuoksissa F1A C-3 ja F1B C-9 oli tuoksun perusteella etanolia, mutta niitä ei pienen tilavuutensa vuoksi tislattu. Väkevempien fermentointien F1C C-3 ja F1D C-9 analyysinäytteiden näytemäärät kaasukromatografista analyysia varten saattoivat olla liian suuria, joten niiden kromatogrammien tulkitseminen oli epävarmempaa kuin 1A ja 1B -sarjan näytteiden. Täten tuloksia ei voida niiden osalta pitää luotettavina. Jäljelle jääneiden heksoosimonosakkariidien prosentuaaliset osuudet fermentointien jälkeen ovat taulukossa 16.

Taulukko 16. Jäljelle jääneiden heksoosien prosentuaalinen osuus alkuperäisestä fermentoinnin jälkeen. Väkevempien konsentraatioiden liuosten sokeripitoisuuksien nousu fermentoinnin jälkeen selittyy analyysivirheillä, joten niitä voidaan pitää epäluotettavina.

Koe	Mannoosi (g/l)	Glukoosi (g/l)	Galaktoosi (g/l)	Fruktoosi (g/l)
F1A C-3	43,0 %	2,2 %	16,5 %	23,5 %
F1B C-9	36,4 %	2,1 %	16,5 %	1,5 %
F1C C-3	105,3 %	108,2 %	118,7 %	97,2 %
F1D C-9	100,2 %	105,4 %	116,3 %	100,0 %

Fermentoinnissa kului muitakin liuoksen sakkarideja kuin heksooseja. Tämä viittaa kontaminaatioon, sillä *S. cerevisia* –hiivan ei pitäisi kyetä käyttämään pentooseja lainkaan [35, s. 278]. Pentooseista syntyvät lopputuotteet eivät välttämättä ole etanolia, vaan esimerkiksi ksylitolia ja asetaattia [37, s. 323]. Pentoosesista eniten kului ksyloosia ja arabinoosia. Käymisen jälkeen jääneiden pentoosien, deoksiheksoosien ja uronihappojen prosentuaalinen osuus on taulukossa 17.

Taulukko 17. Pentoosi-, deoksiheksoosi- sekä uronihappomonomeerien prosentuaaliset osuudet fermentoinnin jälkeen. Galakturonihappopitoisuudet olivat niin pienet, ettei menetelmän herkkyys riittänyt tunnistamaan niitä.

Näyte	Arabinoosi (g/l)	Rhamnoosi (g/l)	Ksyloosi (g/l)	Glukuronihappo (g/l)	Galakturonihappo (g/l)
F1A C-3	48,2 %	45,0 %	50,2 %	65,9 %	-
F1B C-9	47,9 %	46,7 %	48,3 %	39,0 %	-
F1C C-3	108,8 %	116,9 %	109,4 %	96,1 %	-
F1D C-9	103,6 %	110,7 %	103,1 %	102,8 %	-

Tuloksista voidaan päätellä, että liuosten F1C C-3 ja F1D C-9 inhibiittorikonsentraatiot olivat liian korkeita, koska ne eivät lähteneet kunnolla käymään. Vaikka heksoosi- ja pentoosimonomeerit eivät sellaisenaan ole inhibiittoreita, ne voivat muodostaa ligniinin kanssa ligniini-hiilihydraattikomplekseja, jotka inhiboivat *S. cerevisiaen* etanolintuottoa [20, s. 129]. Taulukossa 18 on vertailtu liuosten F1B C-9 ja F1D C-9 ligniini- ja uutainekonsentraatioita.

Taulukko 18. F1B C-9- ja F1D C-9 -sarjojen uuteaineiden ja liuenneen ligniinin pitoisuudet.

Yhdiste	Fermentoinnin tunnus	
	F1B C-9	F1D C-9
Vanilliini (mg/l)	188,7	685,6
3-metoksi-4-hydroksisinnamaldehydi (mg/l)	142,3	711,2
Dehydroabiieettihappo (mg/l)	249,7	2358,6
(bis-guaiasyyli)-propandioli (mg/l)	271,8	936,6
Conidendriinihappo (mg/l)	268,3	1101,2
Conidendriini (mg/l)	267,7	992,6
Liuennut ligniini (g/l)	1,7	4,1

Koska väkevempien konsentraatioiden hydrolysaatit F1C C-3 (monosakkaridikonsentraatio 95,7 g/l) ja F1D C-9 (monosakkaridikonsentraatio 90,8 g/l) eivät fermentoituneet, konsentroidiin alkuperäistä hydrolysaattia pyöröhaihduttimella lisäfermentointikokeita varten. Lisäkokeilla haluttiin varmistaa, että liuoksen käymättömyys johtui inhibiittoreista eikä esimerkiksi pieleen menneistä hiivojen käsittelyistä. Ensimmäinen lisäkoel F2A C-9 tehtiin samalla menettelyllä kuin 1-sarjan kokeet. Monosakkaridikonsentraatio alussa oli 99 g/l ja 72 tunnin jälkeen 97 g/l. Ligniinin ja uuteaineiden pitoisuudet olivat samaa tasoa kuin sarjan 1-kokeissa, koska jatkokonsentroidi tehtiin samasta hydrolysaatista. Liuoksen massa pienentyi fermentoinnin aikana vain 0,2 g. Tästä pääteltiin, ettei HCL-hydrolysaattia voida fermentoida kovinkaan väkevillä sakkariidikonsentraatioilla, sillä silloin fermentointia haittaavien yhdisteiden pitoisuudet ovat liian korkeat.

Ennen toisen erän hydrolysaattien suurempien tilavuuksien fermentointia kokeiltiin 100 ml:n tilavuuksilla, kuinka fermentointi onnistuu rikkihappohydrolysaatilla kahdella eri konsentraatiolla. Koska ensimmäisen kokeen väkevämät hydrolysaatit eivät fermentoituneet, kokeiltiin, fermentoituisiko hydrolysaatti paremmin sellaisenaan vai laimennettuna suhteeseen 1:2. Laimennetussa liuoksessa monosakkarideja jäi fermentoinnin jälkeen jäljelle 15,6 % ja laimentamattomassa 41,9 %. Laimennetussa liuoksessa monosakkaridit siis fermentoituivat selvästi tehokkaammin. Hiivana käytettiin VTT:n kantaa C-79099. Laimentamattoman liuoksen massahäviö oli 0,9 g ja laimennetun 1,4 g. Tulosten perusteella suurempien tilavuuksien fermentoitavat hydrolysaatit laimennettiin

vedellä suhteessa 1:2 ennen hiivan lisäämistä. Liuosten sakkariidi- ja ligniinipitoisuudet ennen fermentointeja ja niiden jälkeen on esitetty taulukossa 19. Kolmannen fermentointisarjan eli F3:n jäljelle jääneiden heksoosien prosentuaalinen osuus alun heksoosipitoisuudesta on taulukossa 20.

Taulukko 19. F3 C-9 -fermentointien liuosten sakkariidi- ja ligniinipitoisuudet ennen fermentointia ja niiden jälkeen.

	Kokonaissakkaridit (g/l)	Monomeerit (g/l)	Ligniini (g/l)
1:1 ennen fermentointia	130	74	6,7
1:1 fermentoinnin jälkeen	81	31	6,9
1:2 ennen fermentointia	65	32	3,9
1:2 fermentoinnin jälkeen	33	5	5,9

Taulukko 20. F3 C9 -fermentointien jälkeisten heksoosien prosentuaalinen osuus kokonaismäärästä ennen fermentointia.

Heksooseja jäljellä (%)	Mannoosi	Glukoosi	Galaktoosi	Fruktosi	Yht.
F3 C-9 1:1 loppu	36 %	2 %	100 %	52 %	36 %
F3 C-9 1:2 loppu	5 %	0 %	50 %	0 %	7 %

Suurempien tilavuuksien fermentoinnit tehtiin hydrolysaateille siten, että HCL-hydrolysaatti fermentoitiin erillään H₂SO₄-hydrolysaateista, jotka yhdistettiin keskenään. Koska hiivat pystyivät käyttämään sakkarideja huomattavasti tehokkaammin laimeammassa liuoksessa, hydrolysaatit laimennettiin vesijohtovedellä suhteeseen 1:2 alkuperäisestä konsentraatiosta. HCL-hydrolysaatin massa ennen hiivan lisäämistä oli 1140 g ja monosakkaridipitoisuus 37 g/l. H₂SO₄-hydrolysaatin massa ennen hiivan lisäämistä oli 2070 g ja monosakkaridipitoisuus 41 g/l. Fermentoinnit kestivät 144 h. Fermentointien aikana huomattiin, että käymisreaktio alkoi nopeammin ja tehokkaammin rikkihappohydrolysaatilla. Sakkariidit myös fermentoituivat enemmän rikkihappohydrolysaatissa. Kokonais- ja monosakkaridipitoisuudet sekä monosakkaridien prosentuaalinen kuluminen ovat taulukossa 21. Jäljelle jääneiden heksoosien prosentuaalinen osuus fermentoinnin jälkeen on esitetty taulukossa 22.

Rikkihappohydrolysaatin 1:2 -liuoksissa voidaan F3- ja F4-tulosten perusteella olettaa olevan niin vähän inhibiittoreita, etteivät ne estä hiivoja käyttämättä kaikkia sakkarideja. Esimerkiksi molemmissa liuoksissa glukoosi on fermentoitunut kokonaan. F4-tulosten

mukaan HCL-hydrolyysissa syntyy enemmän hiivaa haittaavia yhdisteitä, sillä sakkariidit eivät fermentoituneet yhtä tehokkaasti kuin rikkihappohydrolysaatissa.

Taulukko 21. F4-fermentointien sakkariiditulokset.

F4 C-9 rikkihappohydrolysaatti 1:2	Kokonaissokerit (g/l)	Monomeerit (g/l)	Monomeerejä jäljellä (%)
0 h	60	41	100 %
24 h	51	32	79 %
48 h	-	-	-
72 h	50	22	54 %
96 h	-	-	-
120 h	-	-	-
144 h	21	6	16 %
F4 C-9 suolahappohydrolysaatti 1:2	Kokonaissokerit (g/l)	Monomeerit (g/l)	
0 h	74	37	100 %
24 h	67	36	99 %
48 h	-	-	-
72 h	63	32	89 %
96 h	-	-	-
120 h	-	-	-
144 h	29	12	33 %

Taulukko 22. F4 C-9 -fermentointien jäljelle jääneiden heksoosien prosentuaalinen osuus alkuperäisestä määrästä. Fruktosituloksia ei saatu, koska käytettiin epähuomiossa menetelmää, jossa fruktoosia ei määritetä.

	Mannoosi	Glukoosi	Fruktuosi	Galaktoosi	Yht.
F4 C-9 rikkihappohydrolysaatti (1:2)	12 %	0 %	-	48 %	13 %
F4 C-9 suolahappohydrolysaatti (1:2)	32 %	5 %	-	64 %	30 %

Tarkempia etanolimääryksiä neste- tai kaasukromatografilla tai entsyymaattisesti ei ajanpuutteen vuoksi ehditty tehdä. Sokereiden kuluminen, painohäviöt ja aistinvarainen arviointi kuitenkin viittaavat vahvasti siihen, että liuoksiin muodostui etanolia.

12 Tulosten yhteenveto ja johtopäätökset

Projektissa olleiden uuttojen perusteella voidaan todeta, että uuttomenetelmä ei tuota kovin tasalaatuista uuttotuotetta. Sakkariidisaanto puun kuiva-aineesta vaihteli välillä 100,6–164,4 g/kg. Suurin syy vaihteluun oli se, että liuoksen lämmitysjärjestelmä toimi on-off-periaatteella ja lämmityksen vaikutus tuli viiveellä, joten lämpötilan pitäminen koko ajan halutussa ei ollut mahdollista. Jos samantapaisella menetelmällä halutaan saada tasalaatuista tuotetta, on lämpötilan vakioimiseen kiinnitettävä erityistä huomiota. Osa uutoista epäonnistui liian korkeiden lämpötilojen takia. Tästä johtuen uuttoja ajettiin pienemmällä lämpötilalla epäonnistumisen pelossa, mikä johti pienempiin sakkariidisaantoihin. Jatkossa uuttoja tehtäessä myös uuttojen optimitilavuus olisi syytä selvittää tarkemmin. Uuttojen tilavuus vaihteli manuaalisen paineen säätämisen takia. Kun paine nousi liian korkeaksi ja venttiiliä avattiin hieman, saattoi uutetta purskahtaa useita desilitroja keräysastiaan, ennen kuin paine saatiin takaisin tasaiseksi.

Ensimmäisessä konsentroinnissa saatiin liuoksen kaikista sakkarideista retentaattiin 35,6 % ja toisessa 46,1 %. Todellisesti retentaatin sakkariidimäärä oli suurempi, mutta osa valui lattialle tilavuustappioiden mukana retentaatin talteen keräämisessä. Prosentuaalisesti osuus on vaatimaton, mutta käytössä oli vain yksi kalvo, rajallisesti aikaa sekä konsentroitavaa liuosta. Lisäksi suodatuslaitteistossa ei ollut tyhjennysventtiiliä, jolla kaikki liuos olisi voitu valuttaa pois, ja osa konsentraatista jäi suodatusmoduulin sisään. Konsentroiintiin voitaisiin jatkossa käyttää kahta erikokoista suodatuskalvoa siten, että ensimmäisen kalvon permeaatti konsentroitaisiin uudelleen tiukemmalla kalvolla.

Hydrolyysien perusteella suolahapolla saadaan hieman suurempi monomeerisaanto kuin rikkihapolla. Sakkariidien fermentointi etanoliksi HCl-hydrolysaatilla ei kuitenkaan välttämättä onnistu yhtä hyvin kuin H₂SO₄-hydrolysaatilla, sillä HCl-hydrolysaatin klooriyhdisteitä ei voida saostaa miksikään liukenemattomaksi suolaksi, jolloin sitä ei myöskään voi eristää liuksesta helposti. Fermentointituloksia olisi voitu parantaa, jos rikkihappohydrolysaatti olisi neutraloitu Ca(OH)₂:lla. Tällöin fermentointia haittaavat SO₄⁻²:t olisivat saostuneet CaSO₄:na [26, s. 249 - 250] ja ne olisi voitu erottaa liuksesta esimerkiksi vakuumisuodatuksella. Monomeerisaantoa voitaisiin jatkossa kasvattaa te-

kemällä hydrolyysit korkeammissa lämpötiloissa paineistetusti, jolloin myös hapon kulu-
lutus olisi vähäisempää [21, s. 427].

Tärkeimmät fermentointitulokset ovat heksoosien tehokas käyminen. Osa heksooseista
kului lähes kokonaan liuoksen inhibiittoreista huolimatta. Etanolisaantoja saadaan jatko-
tutkimuksissa suurennettua, jos hydrolyysisaantoa voidaan saada suuremmaksi. Fermen-
tointia haittaavien uuteaineiden ja ligniinin pitoisuudet olivat korkeammat verrattuna
vapaiden monosakkaridien määrään, sillä hydrolyysikokeiden saannot olivat vaatimat-
tomia. Fermentoinnin optimoimiseksi tarvittaisiin lisäkokeita Ca(OH)_2 -neutraloiduilla
liuoksilla. Lisäksi inhibiittoripitoisuudet pitäisi selvittää tarkemmin ja järjestelmälli-
semmin. Tämän työn fermentointikokeiden tulosten luotettavuutta heikentää se, että
lukuun ottamatta ensimmäistä koetta fermentoitavia hydrolysaatteja ei lämpökäsitelty
mitenkään eikä fermentointeja tehty aseptisesti, mikä selittää pentoosien suuren kulumi-
sen. On siis hyvin todennäköistä, että sakkarideja käyttivät myös muutkin mikrobit kuin
valitut *S. cerevisia* -kannat. Jatkossa fermentointikokeita tehtäessä on samankaltaisille
hydrolysaateille jonkinlainen lämpökäsittely suositeltavaa tehdä, mutta autoklaavisteri-
lointi on liian raju.

Työ onnistui käytössä olleilla laitteilla hyvin, vaikka suhteellisen pienten tilavuuksien
takia puhtaan etanolin määrä jäi varsin vaatimattomaksi. Analyysejä ei voida pitää täy-
sin luotettavina, sillä rinnakkaisissa analyyseissä oli eroavaisuuksia. Optimointia varten
tarvittaisiin kuitenkin lisäinvestointeja, kuten suurempia määriä hemiselluloosaliuosta,
suuremmat suodatuslaitteet sekä paineistettuun hydrolyysiin soveltuva astia. Myös
muodustuvien alkoholien eristämiseen ja analysointiin tulee kiinnittää huomiota.

Viitteet

- [1] Soininen, R. Puu- ja puuainesmateriaalit. Puu- ja puuainesmateriaalien opintojakson luentoaineisto. EVTEK-ammattikorkeakoulu, 2006.
- [2] Rowell, R. The Chemistry of solid wood. U.S. Department of Agriculture, 1984.
- [3] Willför, S., Sundberg, A., Hemming, J., Holmbom, B. Polysaccharides in some industrially important softwood species. Wood Sci Technology, 2005.
- [4] Laine, C. Structures of Hemicelluloses and Pectins in Wood and Pulp. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, 2005.
- [5] Al Manasrah, M. Recovery of Hemicelluloses from Wood Hydrolysates by Membrane Filtration. Diplomityö. Lappeenrannan teknillinen yliopisto, 2009.
- [6] Xu, C. Physicochemical Properties of Water-soluble Spruce Galactoglucomannans. Väitöskirja. Turun yliopisto, 2008.
- [7] McMurry, J., Simanek, E. Fundamentals of Organic Chemistry, 6. painos. Quebecor World, 2007.
- [8] Lundqvist, J., Jacobs, A., Palm, M., Zacchi, G., Dahlman, O., Stålbrand, H. Characterization of Galactoglucomannan Extracted from Spruce (*Picea abies*) by Heat-fractionation at Different Conditions. Carbohydrate Polymers, 51. Elsevier Science Ltd., 2003.
- [9] Willför, S. Sundberg, K. Tenkanen, Maija. Holmbom, Bjarne. Spruce-derived Mannans – A Potential Raw Material for Hydrocolloids and Novel Advanced Natural Materials. Verkkojulkaisu, 2007.
- [10] Leppänen, K. The Advances in Hemu project. Metsäntutkimuslaitoksen sisäinen tiedonanto, 2008.
- [11] Persson, T. Jönsson, A. Fouling of Ultrafiltration Membranes during Isolation of Hemicelluloses in the Forest Industry. Department of Chemical Engineering, University of Lund, 2009.
- [12] Ristivirtaus- ja dead-end-suodatuksen ero. (WWW-dokumentti.) Memos Membranes Modules Systems <www.memos-filtration.de/pics/comp_dead_cross.gif>. Lue-ttu 2.7.2009.
- [13] Back, L. Ernst, A, Lawrence, H. Pitch Control, Wood Resin and Derenisation. Tappi Press, 2000.

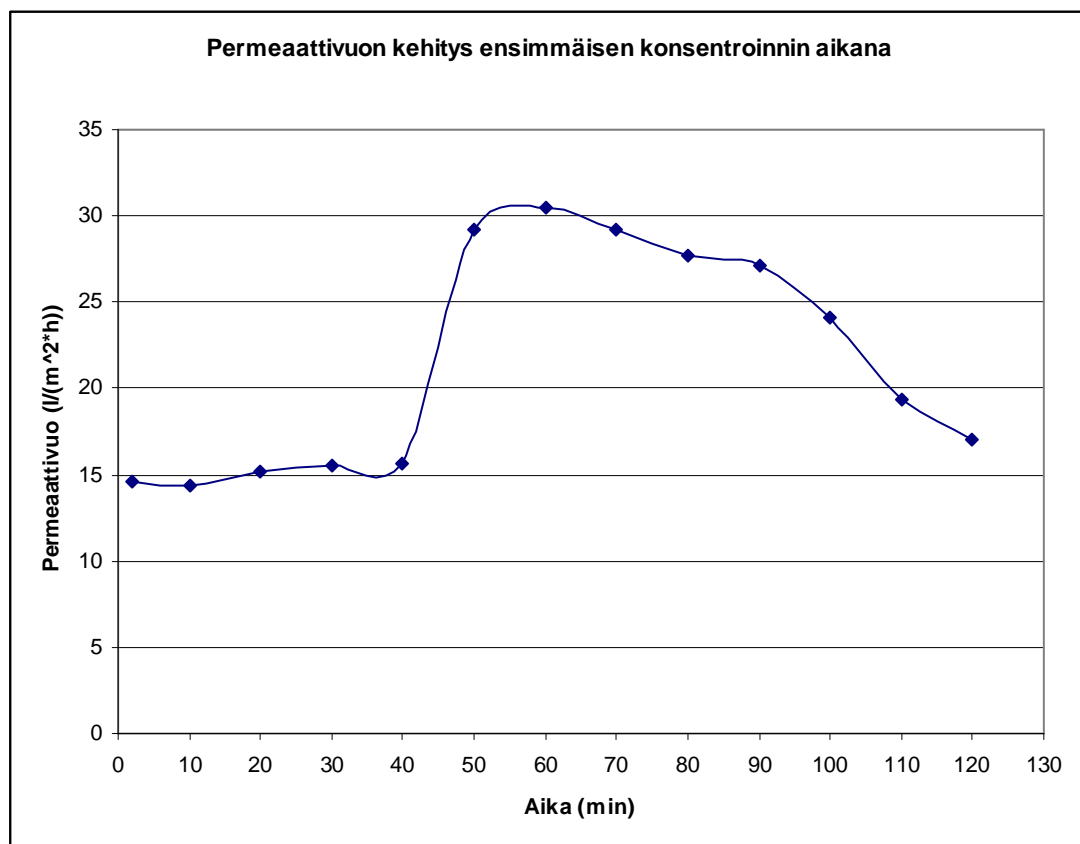
- [14] Wagner, J., Membrane Filtration Handbook, Practical tips and hints. Verkkojulkaisu. 2. painos. Osmonics Inc., 2001.
- [15] Mansikkaviita, S. Polymeerien erotus ultrasuodatuksella. Väitöskirja. Lappeenranta teknillinen yliopisto, 2009.
- [16] Milliporen katalogi. (WWW-dokumentti.)
<<http://www.millipore.com/catalogue/module/c564>>. Luettu 3.11.2009.
- [17] Mulder, M. Basic Principles of Membrane Technology. 2. painos. Kluwer Academic Publishers, 1996.
- [18] Atkins, P. de Paula, J. Elements of Physical Chemistry. 4. painos. Oxford University Press, 2005.
- [19] Penttilä, I. Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. WS Bookwell Oy, 2004.
- [20] Caidian, L., Brink., D., Blanch, H. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. Biomass and Bioenergy 22. Department of Chemical Engineering, University of California at Berkeley, 2002.
- [21] Canettieri, E. V., Moraes Rocha, G. J., Carvalho, J. A., Almeida e Silva, J. B. Optimization of acid hydrolysis from the hemisellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. Biosource Technology 98, 2007.
- [22] Buranov, A. Massa, G. Extraction and characterization of hemicelluloses from flax shives by different methods. Carbohydrate Polymers, 2009.
- [23] Salusjärvi, L. Transcriptome and proteome analysis of xylose-metabolising *Saccharomyces cerevisiae*. VTT publications, 2008.
- [24] Konn, J. Process chemistry in chemitrimmechanical pulping. Väitöskirja. Åbo akademi, 2006.
- [25] Örsä, F. Holmbom, B. Thornton, J. Dissolution and dispersion of spruce wood components into hot water. Wood Science and Technology 31, 1997.
- [26] Metla. Orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) ja liuenneen orgaanisen hiilen (DOC) määrittäminen vesinäytteistä TOC-analysaattorilla (Shimadzu). Menetelmäohje. Versio 1,5. 5.6, 2007.
- [27] Song, T. Pranovich, A. Sumerskiy, I. Holmblom, B. Extraction of galactoglucomannan with pressurized hot water. Holzforschung 62, 2008.
- [28] Ando, H., Sakaki, T., Kokusho, T., Shibata, M., Uemura, Y., Hatate, Y. Decomposition behavior of plant biomass in hot-compressed water. Ind. Eng. Chem. Res. 39: 3688–3693, 2000.
- [29] Atkins, P. W. Beran, J. A. General Chemistry. 2. painos. Scientific American Library, 1990.

- [30] Saarela, A-M., Hyvönen, P., Määttä, S., von Wright, A. Elintarvikeprosessit. 1. painos. Saarijärven Offset, 2004.
- [31] Smeds, A. Kompendium i polysackaridkemi. Institutionen för skogsprodukternas kemi. Åbo Akademi, 1993.
- [32] Sundberg, A., Sundberg, K., Lillandt, C., Holmbom B. Determination of hemicelluloses and pectins in wood and pulp fibres by acid methanolysis and gas chromatography. Nordic Pulp and Paper Research Journal 4/1996.
- [33] Dickenson, T. C. Filters and filtration handbook. 4. painos. University Press, Cambridge, 2004.
- [34] Hartonen, K. Supercritical Fluid Extraction and Pressurized Hot Water Extraction – Novel Environmentally Friendly Analytical Techniques. Väitöskirja. Helsingin yliopisto, 1999.
- [35] Berry, D. R., Russell, I., Stewart, G.G. Yeast Biotechnology. The academic imprint of Unwin Hyman Ltd, 1987.
- [36] Peng, X. Wang, Y., Chai, L., Shu, Y. Thermodynamic equilibrium of CaSO_4 - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - H_2O system. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 19/2009.
- [37] Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology 18:312-331, 1996.
- [38] Budavari, S., O'Neil, M., Smith, A., Heckelman, P. The Merck Index. 11. painos. Merck Publishing, 1989.

LIITE 1. Ensimmäisen suodatuksen permeaattivuot ja lämpötila.

Permeaattivuon nousu 60 minuutin kohdalla johtuu siitä, että syöttöpaine oli alun asettamisen jälkeen nopeasti laskenut noin 2,5 bariin, mikä havaittiin vasta n. 55 minuutin jälkeen. Paine nostettiin takaisin 3 bariin nostamalla pumpun kierrosnopeutta. Lämpötilaa seurattiin koko suodatuksen ajan, mutta sitä ei kirjoitettu ylös kymmenen minuutin välein.

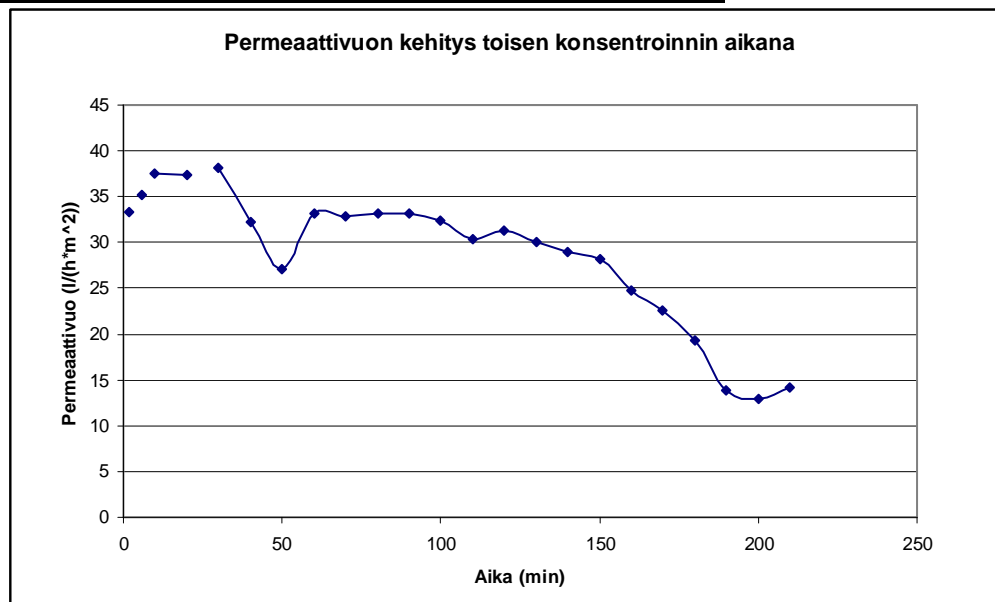
Aika (min)	Permeaattivuo (l/(m ² *h))	Lämpötila (C°)
2	14,58	51,6
10	14,32	
20	15,23	
30	15,55	53,3
40	15,61	
50	29,16	
60	30,45	54,7
70	29,16	54
80	27,74	53,3
90	27,1	53,3
100	24,06	55,1
110	19,35	
120	17,03	55,1



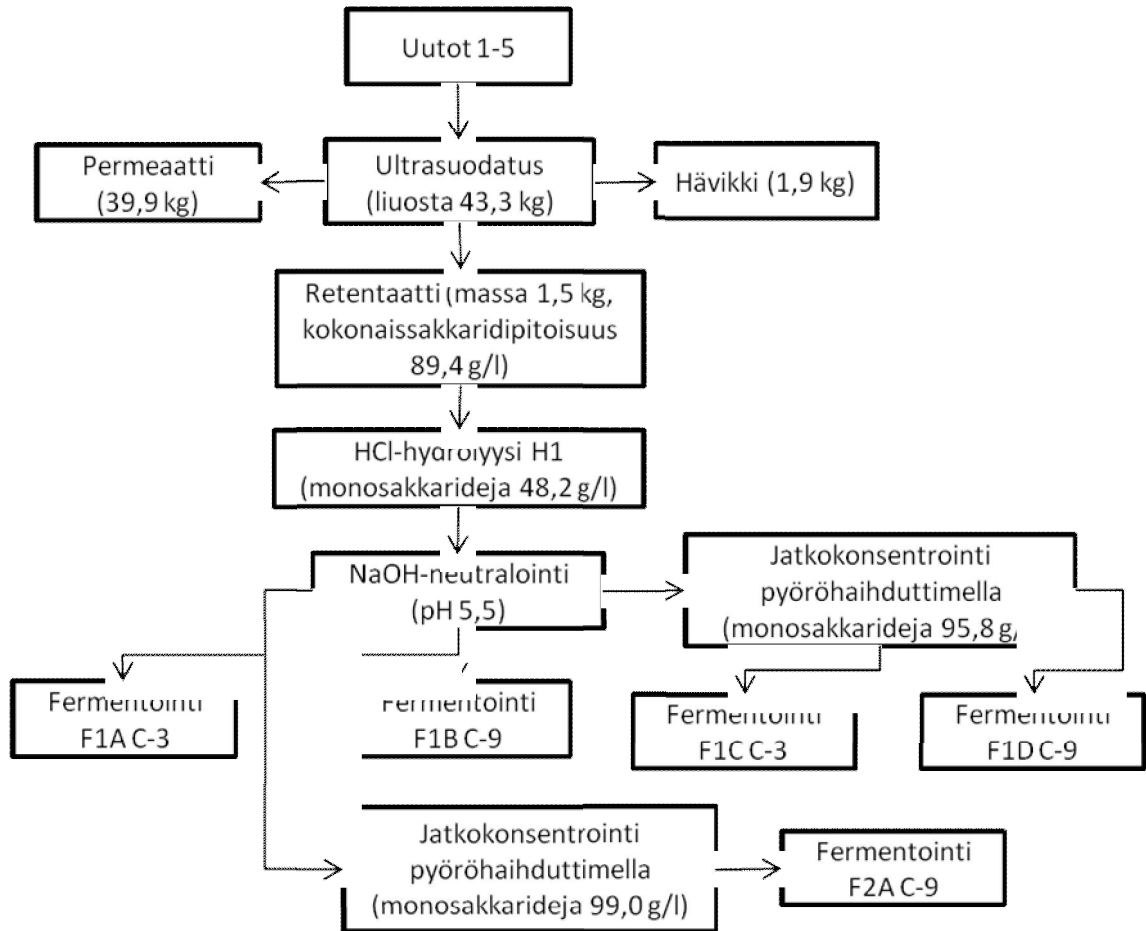
LIITE 2. Toisen suodatuksen permeaattivuon kehitys ja lämpötila konsentroidin aikana.

Permeaattivuon kasvaminen 50 minuutin kohdalla johtuu siitä, että paine nostettiin takaisin 3 bariin, sillä se oli laskenut hieman.

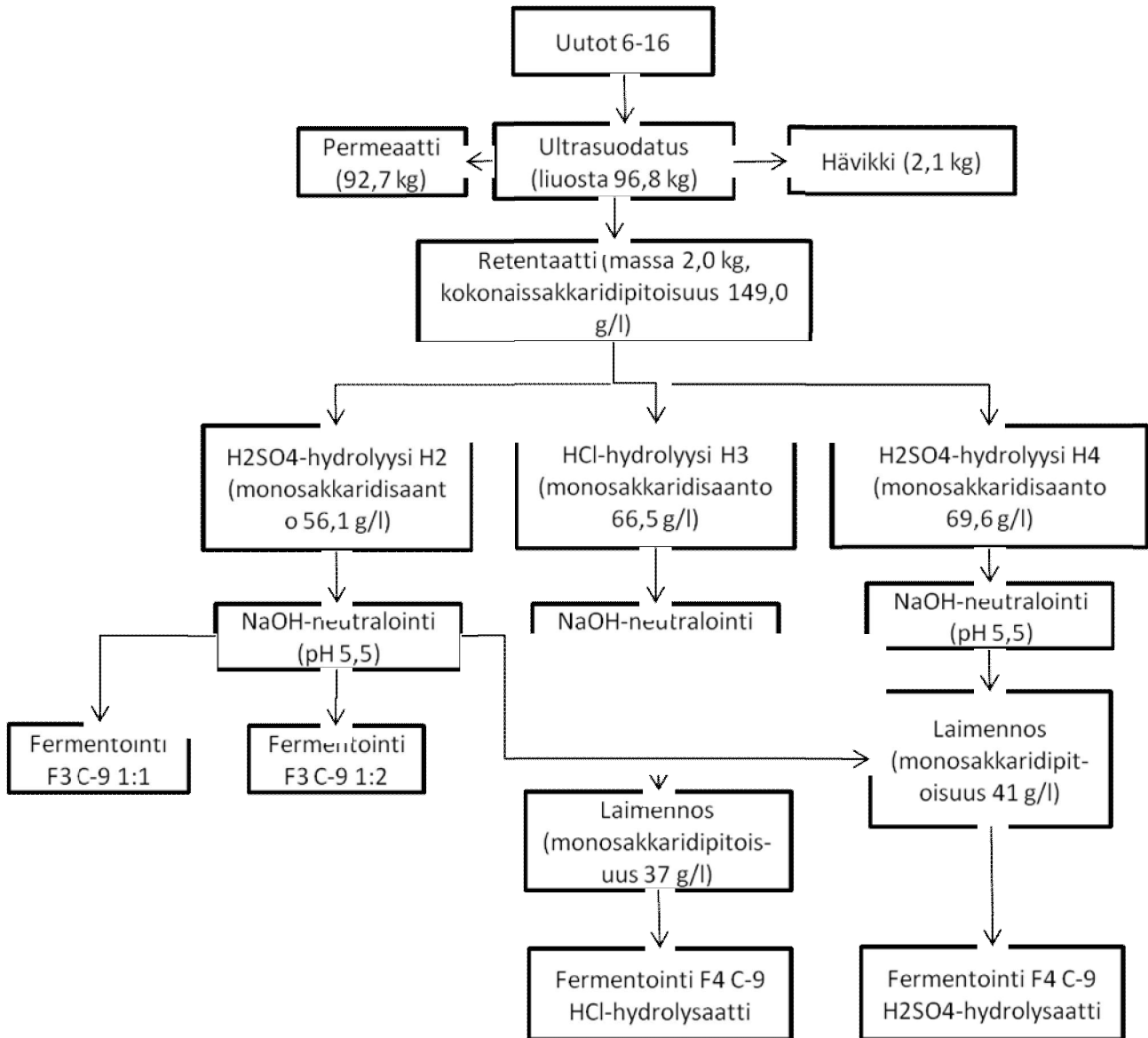
Aika (min)	Lämpötila (C°)	Permeaattivuo (l/(h*m ²))
0		
2	46	33,3
4		
6	47,7	35,2
8		
10	50	37,5
20		37,4
22		
30	53,8	38,1
40		32,3
50	53	27,1
60	52,8	33,2
70		32,9
80	54,4	33,2
90	53,8	33,2
100	53,9	32,4
110	53,8	30,3
120	54,6	31,3
130	53,3	30,1
140	54,6	29
150	54,5	28,2
160	52,8	24,8
170	54,3	22,6
180	53,6	19,3
190		13,8
200	52,2	13
210	53,8	14,2



LIITE 3. Ensimmäisen erän vuokaavio.



LIITE 4. Toisen erän vuokaavio.



LIITE 5. Sakkaridisaannot punnittujen purumäärien mukaan.

Sakkaridisaannot purumäärän mukaan. Korrelaatio punnitun purumäärän ja saannon välillä on huono, sillä lämpötila ja uuton tilavuus vaikuttivat saantoon huomattavasti.

