

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Bio- ja elintarviketekniikka

Tarmo Hautala
Paperitehtaan paperikuitumassa- ja siivouslietejätteen
esi- ja hydrolysointikäsitteilyt glukoosin tuottamiseksi

Insinööri työ 7.10.2008

Ohjaaja: laboratoriopäällikkö Carola Fortelius

Ohjaava opettaja: yliopettaja Heikki Ojamo

Tekijä	Tarmo Hautala
Otsikko	Paperitehtaan paperikuitumassa- ja siivousjätteen esi- ja hydrolysointikäsittelyt glukoosin tuottamiseksi
Sivumäärä	81
Aika	7.10.2008
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Ohjaaja	Laboratoriopäällikkö Carola Fortelius
Ohjaava opettaja	Yliopettaja Heikki Ojamo
<p>Insinööritöössä keskityttiin paperinvalmistusprosessista jätteeksi menevän selluloosakuidun esikäsittelyihin ja hydrolysointeihin. Tarkoituksena oli saada paperinvalmistusprosessissa jo merkittävästi lyhentynyt kuituselluloosa hydrolysoitumaan edelleen glukoosiksi. Onnistuessaan menetelmä mahdollistaisi paperinvalmistusprosessissa syntyneen jätteen tehokkaan kierrätyksen ja uudelleenkäytön. Tällä hetkellä kyseinen jäte kuljetetaan suoraan kaatopaikalle.</p> <p>Nykyään suurin osa maailmalla tuotetusta liikenteen käyttöön menevästä bioetanolista valmistetaan sokeriru'osta (Brasilia), maissista (USA) ja muiden viljalajien jyväosista saatavasta tärkkelyksestä. Nykyisen ruoantarpeen sekä kestävä kehityksen kannalta olisi kuitenkin erittäin tärkeää löytää ruoaksi kelpaavien raaka-aineiden sijaan muita bioetanolille sopivia raaka-aineita. Näitä vaihtoehtoja voisivat olla esimerkiksi puu- ja paperiteollisuuden jätteet, elintarviketeollisuuden jätteet, agroteollisuuden jätteet jne. Tällä hetkellä tehokasta bioetanolin tuotantoa rajoittavat mm. entsyymien kallis hinta. Toisaalta etanolin tuotantoprosessin optimiolosuhteet tunnetaan jo varsin hyvin, mutta ongelmana on edelleen lopputuotteen (etanolin) liian pieni saanto lähtöaineesta, jotta teollinen tuotanto olisi taloudellisesti kannattavaa. Lisätutkimuksia siis tarvitaan aiheeseen liittyen.</p> <p>Kokeita tehtiin kahdella eri kuitumassanäytteellä ja yhdellä liejukuitunäytteellä. Tutkittavat näytteet olivat peräisin siistaamolalta sekä paperitehtaalta. Kokeissa keskityttiin rikkihapon, natriumhydroksidin, etanolin ja etikkahapon esikäsittelyvaikutuksiin kuituselluloosamassaan yhdessä lämpökäsittelyn kanssa. Happo- ja entsyymäätinen hydrolyysi olivat keskeisessä osassa kuitujen käsittelyssä ja pääosa tämän tutkimuksen tuloksista perustuukin näihin menetelmiin.</p> <p>Kuitumassojen kohdalla päästiin parhaimmillaan noin 27,0 %:n glukoosisaantoon. Tällä saantoprosentilla teollinen tuotanto voi olla kannattavaa, jos kaikki muut prosessiin liittyvät asiat on optimoitu kustannustehokkuuden kannalta. Kuituliejulla saantoprosentti oli vain noin 2,5 %. Tulos osoittaa, että laajempi hyödyntäminen glukoosin tuotannossa ei ole kannattavaa.</p>	
Hakusanat	selluloosa, sellulaasi, happohydrolyysi, entsyymäätinen hydrolyysi, jättepaperi, jättekuitu, esikäsittely

Author	Tarmo Hautala
Title	The pre-treatments and enzymatic hydrolysis to produce glucose from paper mill's fiber pulp waste and slush pulp waste.
Number of Pages	81
Date	7 October 2008
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Degree	Bachelor of Engineering
Instructor	Carola Fortelius, Head of the Biotechnology Laboratory
Supervisor	Heikki Ojamo, Principal Lecturer
<p>The main focus of this final year project was on the pre-treatment and hydrolysis of paper industry's waste materials in order to produce glucose. Glucose can be afterwards processed for example into ethanol. At the moment this industrial paper waste is transported straight from the paper mills to the landfills.</p> <p>The major part of bioethanol for transportation purposes in the world is made from sugar cane (Brazil), maize (USA) or other starch rich grains. Nowadays, for the sake of sustainable development it would be very important to find substitute raw materials for foodstuff in the bioethanol industry. These substitutes could be, for example, wastes from the paper industry, agriculture and food industry. Food (maize etc.) should not be used under any circumstances as fuels' raw material unless it has become food waste. At the moment, the efficient production of 2nd generation bioethanol is limited by the high prizes of enzymes etc. On the other hand, the optimum process conditions are quite well-known but the problem is still the same: the ethanol yield from raw materials is too low for industrial manufacturing. It is just not profitable yet. So further studies are needed.</p> <p>The experimental part of this final year project was performed by using two different samples of cellulose fiber pulp and one sample of slush pulp. These samples were collected from various stages of a paper making process from a deinking plant and a paper mill. The experiments focused mainly on the pre-treatment with sulphuric acid, sodium hydroxide and ethanol/acetic acid combined with the heat treatment of the samples. Acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis were essential in this final year project so the majority of the results are based on these methods.</p> <p>The result of this study showed that the maximum of 27 percent of glucose can be obtained from these specific fiber pulp samples. In other words, with procedures like the ones used in this study, it is possible to get 270 kilograms of glucose from one ton of cellulose fiber pulp. The result indicates that industrial utilization could be possible but what comes to the profitability, all the other things concerning the process must be optimized as well.</p> <p>The results concerning the slush pulp sample were not so good. The total glucose yield obtained was only 2.5 percent. The result means that all industrial utilization in a larger scale would be unprofitable.</p>	
Keywords	cellulose, cellulase, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, waste paper, fiber waste, pre-treatment

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet, käsitteet ja määritelmät

1 Johdanto	8
2 Paperimassan valmistus ja rakenne	11
2.1 Sulfaattikeitto	12
2.2 Sulfiittikeitto	18
2.3 Uusiopaperin käsittely ja uusiomassan valmistus	19
3 Selluloosa	25
3.1 Selluloosan hajotus.....	27
3.2 Sellulaasit	29
3.2.1 Endoglukanaasit	30
3.2.2 Sellobiohydrolaasit.....	31
3.2.3 β -glukosidaasit	32
3.3 Kaupallisia sellulaaseja	34
3.3.1 Celluclast [®]	34
3.3.2 Novozyme 188	34
3.3.3 GC 220	34
3.3.4 Rohalase [®] ACL ja Accelerase [™] 1000.....	35
4 Hydrolyysiprosessit.....	36
4.1 Happohydrolyysi	38
4.2 Entsymaattinen hydrolyysi.....	41
4.3 Entsymaattisen hydrolyysin esikäsittelymenetelmiä.....	41
4.3.1 Höyryräjäytys	41
4.3.2 AFEX-käsittely	42
4.3.3 Hiilidioksidiräjäytys.....	44
4.3.4 Mikroaalto- ja ultraäänikäsittely sekä biologinen esikäsittely	45
4.4 SHF (separated hydrolysis and fermentation).....	45
4.5 SSF (simultaneous saccharification and fermentation).....	46
5 Kokeellinen osa.....	48

5.1 Näytteet	48
5.2 Kokeiden suoritus.....	49
5.2.1 Rikkihappoesikäsittely	49
5.2.2 Entsymaattinen hydrolyysi.....	52
5.2.3 Etanoli-etikkahappoesikäsittely	53
5.2.4 Natriumhydroksidi-rikkihappoesikäsittely.....	56
5.2.5 Kokonaishiilihydraattipitoisuuden määrittäminen	57
6 Tulokset.....	60
6.1 Kuiva-aine- ja tuhkapitoisuudet	60
6.2 Rikkihappo	63
6.3 Etanoli-etikkahappo	68
6.4 Natriumhydroksidi-rikkihappo.....	71
6.5 Kokonaishiilihydraattipitoisuus	72
7 Johtopäätökset.....	75
Lähteet.....	77

Lyhenteet, käsitteet ja määritelmät

AFEX	ammoniakkiräjätys (<i>ammonia fiber explosion</i>)
CBH	sellobiohydraasi (<i>cellobiohydrolase</i>)
CBP	yhdistetty bioprosessointi (<i>consolidated bioprocessing</i>)
C ₂ H ₆ S	dimetyylisulfidi (<i>dimethyl sulphide</i>)
CH ₃ SH	metyylimerkaptaani (<i>methyl mercaptan</i>)
CMC	karboksimeetyyliselluloosa (<i>carboxymethyl cellulose</i>)
DNS	3,5-dinitrosalisyylihappo (<i>3,5-dinitrosalicylic acid</i>)
DP	polymerisaatioaste (<i>degree of polymerization</i>)
EG(I/II/III)	endoglukanaasi I/II/III (<i>endoglucanase I/II/III</i>)
EtOH	etanoli (<i>ethanol</i>)
HHV	ylempi lämpöarvo (<i>higher heating value</i>)
HMF	hydroksymetyylifurfuraali (<i>hydroxymethylfurfural</i>)
HSO ₃ ⁻	bisulfiitti-ioni (<i>hydrogensulphite anion</i>)
H ₂ S	rikkivety (<i>hydrogen sulphide</i>)
H ₂ SO ₄	rikkihappo (<i>sulphuric acid</i>)
HEC	hydroksietyyliselluloosa (<i>hydroxyethyl cellulose</i>)
HPLC	korkean erotuskyvyn nestekromatografia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
NaOH	natriumhydroksidi (<i>sodium hydroxide</i>)
Na ₂ S	natriumsulfidi (<i>disodium sulphide</i>)
NH ₃	ammoniakki (<i>ammonia</i>)
NH ₄ OH	ammoniumhydroksidi (<i>ammonium hydroxide</i>)
NREL	kansainvälinen yhdysvaltalainen uusiutuvan energian tutkimuslaboratorio (<i>National Renewable Energy Laboratory</i>)

PCC	saostunut kalsiumkarbonaatti (<i>precipitated calcium carbonate</i>)
pNPG	para-nitrofenyyli- β -D-glukopyranosidi (<i>para-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside</i>)
RID	refraktometri (<i>refractive index detector</i>)
SHF	eriaikainen hydrolyysi- ja fermentointiprosessi (<i>separated hydrolysis and fermentation</i>)
SSF	samanaikainen sakkarifikaatio- ja fermentointiprosessi (<i>simultaneous saccharification and fermentation</i>)
SO ₃ ²⁻	sulfiitti-ioni (<i>sulphite ion</i>)
T	lämpötila (<i>temperature</i>)

1 Johdanto

Tänä päivänä fossiilisten energialähteiden taru alkaa olla loppusuoralla. Eräiden veikkausten mukaan öljy loppuu maailmasta viimeistään 2060-luvulla. Maakaasua riittänee vielä 250 vuodeksi. Koko maailman öljyn tuotannon osalta huippu saavutettiin vuonna 2007 ja maakaasun tuotantohuipun oletetaan tapahtuvan vuosina 2010–2020. Ennusteet pohjautuvat yhdysvaltalaisen geofyysikon M. King Hubbertin matemaattisiin malleihin, joita hän kehitti 1950- ja 1960-luvuilla. Mallit perustuvat tietoihin öljyreserveistä (jo tuotetuista reserveistä, sillä hetkellä tunnetuista reserveistä ja oletettavasti vielä löydettävistä reserveistä) sekä tuotannon kasvusta. Näiden avulla hän loi matemaattisia malleja öljyn tuotannosta. Yhdysvaltojen osalta tuo ennuste on pitänyt ainakin öljyn suhteen paikkansa. Yhdysvaltojen öljyntuotanto saavutti huipunsa jo 1970-luvulla, jonka jälkeen se on pudonnut noin puoleen tähän päivään mennessä. Uusia energianlähteitä on siis pakko kehitellä. (Rehrl & Friedrich, 2005)

Toinen ihmisiä puhuttava asia on ilmastonmuutos, joka johtuu suurelta osin fossiilisten energialähteiden käytöstä. Niille halutaan löytää vaihtoehtoja samalla kun öljyriippuvuudesta pyritään eroon. Ilmastonmuutos on todellisuutta, ja siihen on puututtava. Uusiutuvat luonnonvarat ovat nousseet viime aikoina yhdeksi puhutuimmista ratkaisuista kasvavaan energiaongelmaan ja ilmastonmuutokseen. Etanoli on yksi tärkeimmistä uusiutuvista luonnonvaroista irti saatavista nestemäisistä energianlähteistä. Sen tuotanto on kuitenkin monimutkainen prosessi, jossa on useita eri vaiheita. Tästä syystä etanolin tuotanto vie paljon energiaa, ja taloudellisesti kannattavaan tuotantoon yritetäänkin kuumeisesti löytää tehokasta ratkaisua ympäri maailman.

Biomassasta valmistettu niin sanottu toisen sukupolven polttoaine valmistetaan raaka-aineista, jotka eivät ole ruokaa tai kilpaile suoraan ruoantuotannon kanssa. Itse tuote, ns. bioetanoli, on kuitenkin aivan samaa kuin esimerkiksi ohrasta, maissista, sokeriruosta tai muusta ruokakasvista valmistettava ns. ensimmäisen sukupolven polttoaine. Selluloosasta valmistetun etanolin raaka-aineita voivat olla esimerkiksi

maatalousjätteet, puu ja puunkorjuutätteet, paperiteollisuuden jätteet sekä yhdyskuntajätteet. Raaka-aine on yleensä edullista, mutta etanolin tuottaminen siitä on vielä tällä hetkellä suhteellisen kallista, johtuen mm. entsyymien kalleudesta sekä prosessien energiatehokkaasta optimoimattomuudesta. Syinä energiatehottomuuteen ovat mm. lignoselluloosamateriaalin vaikeahko esikäsittely ja hydrolysoitavuus sekä toisaalta jäteraaka-aineisiin liittyvät logistiset ongelmat.

Toisaalta jos on halua, on olemassa myös ratkaisu. Tästä esimerkkinä suomalainen energiayhtiö St1 Oy, joka on onnistunut löytämään ratkaisun raaka-aineisiin liittyviin logistisiin ongelmiin: sen sijaan että bioetanolin raaka-aineena toimivat elintarvikejätteet kuljetettaisiin käsittelylaitoksille, kuljetetaan käsittelylaitokset lähelle jäteraaka-aineiden syntypaikkaa. Laitokset ovat kompakteja ja pieniä standardimittakaavan tehdaskomplekseja, joita on helppo rakentaa ja purkaa tarvittaessa. St1 Biofuels Oy:llä on patentoitu menetelmä etanolin tuottamiseen elintarvikejätteistä, ja toimintamalli, jonka puitteissa he toimivat, on tällä hetkellä ainutlaatuinen koko maailmassa. (St1 2008)

Monet muutkin (energia)yritykset tekevät tutkimusta tällä alueella paljon, ja varmaa on, että tulevaisuudessa yhä useampi polttoainelitra tuotetaan lignoselluloosapohjaisista raaka-aineista. Sen lisäksi, että sen uskotaan olevan tulevaisuudessa kannattavaa, se on myös oikein toteutettuna ympäristöystävällistä.

Selluloosabiomassasta valmistetun etanolin valmistuksen voi jakaa karkeasti neljään pääryhmään: esikäsittelyyn (biomassasta tuotetaan polymeerisiä sokereita), entsymaattinen hydrolyysiin (monomeerisokereita polymeerisokereista), fermentointiin (etanolin tuotto monomeerisokereista) sekä puhdistukseen (etanolin puhdistus ja konsentrointi). Esikäsittely on usein happo- ja/tai lämpökäsittely ja näiden eri yhdistelmävariaatiot.

Tässä insinööriydessä keskityttiin puu- ja paperiteollisuudesta ylijäävien jätteiden tarjoamien mahdollisuuksien tutkimiseen etanolin tuotannossa. Tutkimus käsittelee monomeerisokereiden (tässä tapauksessa glukoosin) tuotantoa valituista

paperiteollisuuden jätteistä. Työn tilaajana oli pääasiassa Metropolia Ammattikorkeakoulu (entinen EVTEK-ammattikorkeakoulu), mutta aiheesta kiinnostuneena ja rakentavana yhteistyökumppanina oli myös St1 Biofuels Oy, joka toimi työn osatilaajana.

Kaikki tähän insinööriyöhön liittyvät laboratoriokokeet suoritettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun Vantaan yksikön bio- ja elintarviketekniikan laboratoriotiloissa. Kokeita tehtiin kahdella eri kuituselluloosanäytteellä sekä yhdellä liejunäytteellä. Kokeet suoritettiin marraskuun 2007 ja syyskuun 2008 välillä.

2 Paperimassan valmistus ja rakenne

Paperimassa koostuu sellusta, eli kemiallisesta massasta ja mekaanisesta massasta sekä erilaisista täyteaineista sekä päällystepigmenteistä. Eri kierrätyspaperilaatujen koostumukset käyvät ilmi seuraavasta taulukosta. Taulukossa 1 mainittu kierrätysosuus tarkoittaa uusiokäyttöön menevän kyseisen puu- ja paperiteollisuuden tuotteen määrää. Esimerkiksi sanomalehtipaperista melkein puolet (41 %) menee uudelleen käyttöön paperinvalmistukseen. (Haarla, 2000).

Taulukko 1. Eri paperilaatujen koostumus. (Haarla, 2000)

Raaka-aine	Aikakausilehti	Sanomalehti	Puuvapaa paperi	Muut painopaperit	Muut paperit
Kemiallinen massa	20 %	5 %	80 %	70 %	52 %
Mekaaninen massa	52 %	90 %	0 %	8 %	30 %
Täyteaineet ja päällystepigmentit	28 %	5 %	20 %	22 %	18 %
Summa	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Kierrätysosuus	39 %	41 %	9 %	4 %	6 %

Kemiallista massaa kutsutaan selluksi, jotta se helpommin nimellisesti erottuu mekaanisesta massasta. Sellumassa on kemiallisesti kuidutettua puumassaa. Mekaanisella massalla tarkoitetaan puumassan joukossa olevaa hioketta tai hierrettä, jota syntyy mekaanisen paperimassan valmistuksen yhteydessä. Mekaanista paperimassanvalmistusta voi olla esimerkiksi mekaaninen kuidutus, jossa raaka-ainetta – hionnassa pölliä ja hierrossa haketta – rasitetaan jaksoittaisesti pyörivän kuormituselementin avulla. Tällöin mekaaninen rasitus välittyy puuhun hiontakiven pintarakeiden tai jauhimen teräkuvioiden kautta. Kemiallista paperimassaa valmistetaan esimerkiksi sulfiitti- ja sulfaattikeitolla. Sulfaattikeitto on tällä hetkellä maailmassa huomattavasti enemmän käytetty kuin sulfiittikeitto, johtuen sen paremmasta saannosta ja ympäristöystävällisyydestä. Kemiallisen massan ja mekaanisen massan välimuoto on kemimekaaninen massa, jonka valmistuksessa käytetään molempien käsittelyiden tarjoamia etuja. (Isotalo, 2004; Laatikainen, 1987)

2.1 Sulfaattikeitto

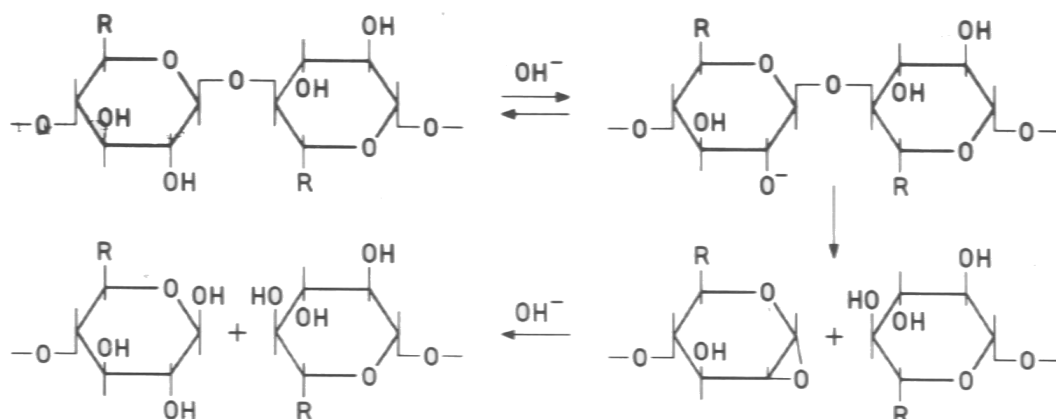
Toinen varsinaisista kemiallisista käsittelymenetelmistä on nimeltään sulfaattikeitto. Sen kehitti saksalainen C. F. Dahl 1800-luvulla. Suomessa ensimmäinen sulfaattisellun valmistus aloitettiin vuonna 1886 Valkeakoskella. Sulfaattiprosessi soveltuu kaikille puulajeille. Sulfaattikeiton olosuhteet ovat alkaliset, ja siitä saadaan arvokkaita sivutuotteita, mm. tärpättiä ja mäntyöljyä. (Isotalo, 2004)

Sulfaattikeitto suoritetaan joko jaksoittaisena keittona, eräkeittona tai jatkuvana keittona. Tavallinen eräkeitin on teräksinen paineastia, tilavuudeltaan noin 160–400 m³, ja siinä on keiton aikana nestettä noin 3,5–4 kertaa syötetyn hakkeen määrä. Lämpötila keiton aikana on noin 165–170 °C. Keittoaika on suhteellisen lyhyt, kokonaiskeittoaika täytöstä tyhjennykseen on noin 4 tuntia. (Isotalo, 2004)

Jatkuvassa keitossa hake syötetään esimerkiksi korkean pystykeittimen yläosaan yhdessä keittoliuoksen (valkolipeän) kanssa. Puu keittyy selluksi laskeutuessaan alas keitintä. Keittimen puolella välissä valkolipeä muuttua väriväin osallistuessaan reaktioon hakkeen sisältämien aineiden kanssa, jolloin siitä tulee ns. mustalipeää. Mustalipeä poistetaan ja ennen ulosohjausta keittynyt sellu vielä pestään laihamustalipeällä. (Isotalo, 2004)

Keittojen tarkoituksena on erottaa puun kuidut toisistaan liuottamalla puun ligniiniin, että mahdollisimman vähän hiilihydraatteja liukenee. Menetelmästä puhuttaessa käytetään myös termiä puun delignifointi. Kaikkea ligniiniä ei voida kuitenkaan poistaa, koska tällöin puumassan selluloosakuidut vaurioituisivat liikaa, jolloin paperin lujuusominaisuudet kärsisivät. Lopullinen ligniinin määrä valkaistulla havupuumassalla on noin 3–4 % ja valkaistulla koivumassalla noin 2,5–3 %. Valkaisemattomien havupuumassojen lopullinen ligniinipitoisuus on jopa noin 13 %. Sulfaattikeittoprosessissa häviää ligniinin ohella samalla väistämättä myös hemiselluloosaa ja selluloosaa, jotka hajoavat mm. ns. alkalisen hydrolyysin ja päätepilkkoutumisen myötä, ks. kuvat 1 ja 2. (Isotalo, 2004; Nuortila-Jokinen, 2004; Seppälä, 2001)

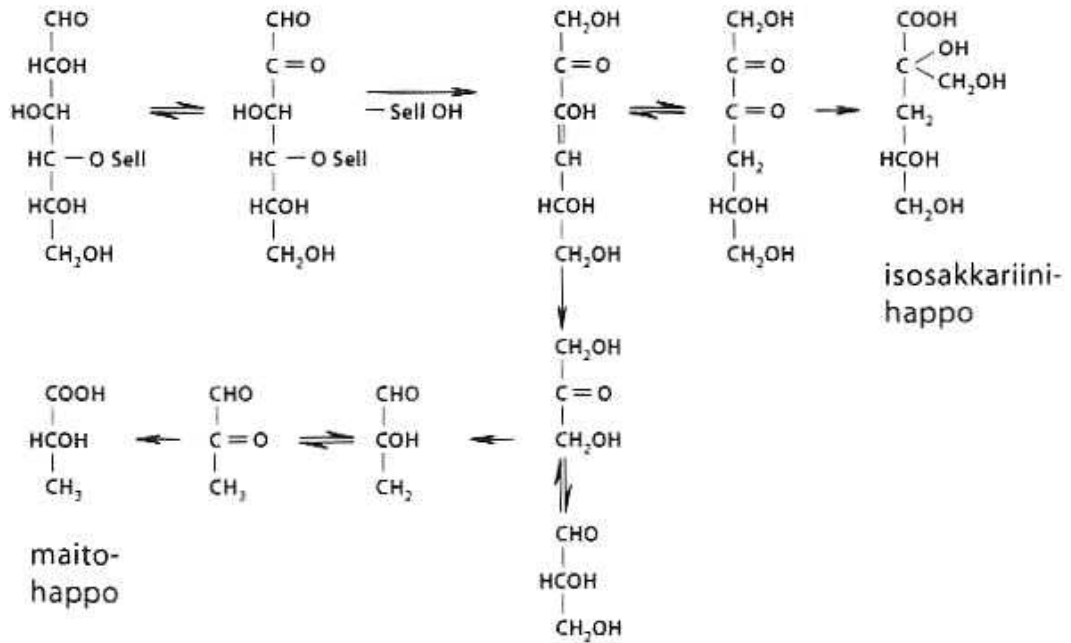
Selluloosan alkalisessa hydrolyysissä hiilihydraatti pilkkoutuu, jolloin muodostuu uusia pelkistäviä päitä. Nämä pelkistävät päät osallistuvat päätepilkkoutumisreaktioihin. Alkalinen hydrolyysi tapahtuu vasta korkeammissa lämpötiloissa, noin 160–170 °C:n lämpötiloissa, ja reaktio on hidas. Esimerkki alkalisesta hydrolyysistä on esitetty kuvassa 1. Alkalinen hydrolyysi alkaa, kun hiilihydraatti joutuu alkaliseseen ympäristöön, esimerkiksi NaOH-käsittelyssä. Tällöin selluloosan perusyksikön ensimmäisen glukoosiyksikön toisessa hiilessä kiinni oleva OH-ryhmä hapettuu, jolloin muodostuu negatiivisesti varautunut happiatomi (O^-), hydroksyyli-ryhmä siis ionisoituu. Muodostunutta yhdistettä kutsutaan anhydrosokeriksi. Tämän jälkeen happisilta selluloosan perusyksikön kahden glukoosimolekyylin välillä katkeaa ja vapaana oleva H^+ -ioni liittyy katkenneen happisillan happiatomiin muodostaen muodostuvan glukoosiyksikön neljänteen hiiliatomiin hydroksyyli-ryhmän OH. Samanaikaisesti negatiivisesti varautunut happiatomi (O^-) liittyy saman glukoosiyksikön ensimmäiseen hiileen. Sidosta kutsutaan myös epoksirengaaksi. Lopulta epoksirengas aukeaa ja vesimolekyylin yhtyessä syntyy yksi uusi hydroksyyli-ryhmä glukoosimolekyylin ensimmäiseen ja toiseen hiileen. Selluloosan alkalisessa hydrolyysissä muodostuu siis yksi uusi pelkistävä pää (-CHOH). (Isotalo, 2004; Nuortila-Jokinen, 2004)



Kuva 1. Polysakkaridien alkalinen hydrolyysi. $R = -CH_2OH$ (selluloosa) tai $-H$ (ksylaani). (Isotalo, 2004)

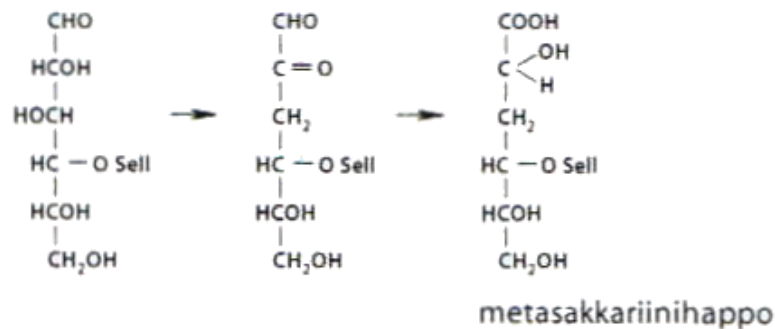
Päätepilkkoutumisreaktio, ns. *peeling off*, on yksi alkalisen hydrolyysin tyypillisiä reaktioita, ja se on sulfaattikeiton kannalta hyvin haitallinen reaktio, ks. kuva 2. Siinä selluloosasta tai hemiselluloosasta irtoaa monosakkaridiyksiköitä, joista muodostuu

erilaisia karboksyylihappoja. Sen pääasiallinen lopputuote on isosakkariinihappo. Muista muodostuvista hapoista mainittakoon maitohappo ja metasakkariinihappo (ks. kuva 3). Päätepilkkoutuminen alkaa jo 80–100 °C:n lämpötilassa. (Isotalo, 2004)



Kuva 2. Selluloosan päätepilkkoutumisreaktio. (Isotalo, 2004)

Päätepilkkoutumisreaktio loppuu ns. pysäytysreaktioon, *stopping reaction*, jossa yhtenä lopputuotteena on stabiili metasakkariinihappo (kuva 3).



Kuva 3. Selluloosan alkalisen hydrolyysin pysäytysreaktio. (Isotalo, 2004)

Puun ”kypsymistä” selluksi seurataan ns. kappaluvun avulla. Kappaluku on puumassan ligniinipitoisuuden verrannollinen suure. Kerroin, jolla kappaluvusta voidaan suoraan

laskea puumassan ligniinipitoisuus, on kuitenkin massalajikohtainen. Muutamina esimerkkeinä mainittakoon

mänty- ja kuusimassa: 0,153

koivumassa: 0,165

Mänty- ja kuusipuumassa keitetään useimmiten kappa-alueelle 25–35 ja koivumassa kappalukuun noin 20. Tällöin kokonaiskeittosaannot puusta laskien ovat vastaavasti 44–47 % ja 52–54 %. (Isotalo, 2004; Seppälä, 2001)

Sulfaattikeiton keittolipeästä käytetään nimitystä valkolipeä, ja se on voimakkaasti emäksinen. Sen vaikuttavat kemikaalit ovat NaOH ja Na₂S. Valkolipeä sisältää myös muita natriumsuoloja, kuten natriumsulfaattia (Na₂SO₄) ja natriumkarbonaattia (Na₂CO₃) sekä pieniä määriä sulfiitteja ja klorideja. Tyypillisen valkolipeäanalyysin tulokset näkyvät taulukossa 2. Sulfaattikeiton aikainen lämpötila vaihtelee 150–170 °C:n välillä. (Isotalo, 2004; Seppälä, 2001)

Taulukko 2. Tyypillisen valkolipeän laboratorioanalyysi. (Materiaali 2008)

Aine	Määrä g/kg kuiva-ainetta
Natrium	78,0
Kalium	14,1
Rikki _{tot}	22,4
Kloori _{tot}	1,7
S ²⁻	18,0
NaOH	88,2
Na ₂ S	41,8
Na ₂ CO ₃	40,3
Na ₂ SO ₃	0,1
Na ₂ S ₂ O ₃	9,0
Na ₂ SO ₄	0,5
Kokonaisalkali (g NaOH/l)	161,6
Aktiivinen alkali (g NaOH/l)	131,2
Tehollinen alkali (g NaOH/l)	109,8

Taulukossa 2 ilmoitettujen alkalien määritykset ovat seuraavat:

Kokonaisalkali: kaikki alkalisuolat

Aktiivinen alkali: $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{S}$

Tehollinen alkali: $\text{NaOH} + \frac{1}{2} \text{Na}_2\text{S}$

Sulfaattikeiton jälkeen massa pestään ja keittoliemi otetaan talteen. Sitä kutsutaan värinsä takia mustalipeäksi. Mustalipeä on periaatteessa reagoinutta valkolipeää. Se sisältää keiton aikana puusta irronnutta ainesta ja keittokemikaaleja. Mustalipeä konsentroidaan haihduttamossa, jonka jälkeen se poltetaan soodakattilassa kemikaalien regeneroimiseksi ja energian tuottamiseksi. Taulukossa 3 on kuvattu tyypillisen mustalipeän laboratorioanalyysitulokset. (Materiaali 2008; Seppälä *et al.*, 2001)

Taulukko 3. Tyypillisen mustalipeän laboratorioanalyysi. (Materiaali 2008)

Aine	Määrä g/kg kuiva-ainetta
Natrium	19,30
Kalium	3,34
Rikki _{tot}	5,50
Kloori _{tot}	0,41
S^{2-}	1,93
NaOH	1,10
CO_3^{2-}	6,20
Na_2SO_3	0,10
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	2,13
Na_2SO_4	1,23
Hiili	31,90
Vety	3,33
Typpi	0,08
Lämpöarvo HHV MJ/kg	12,74

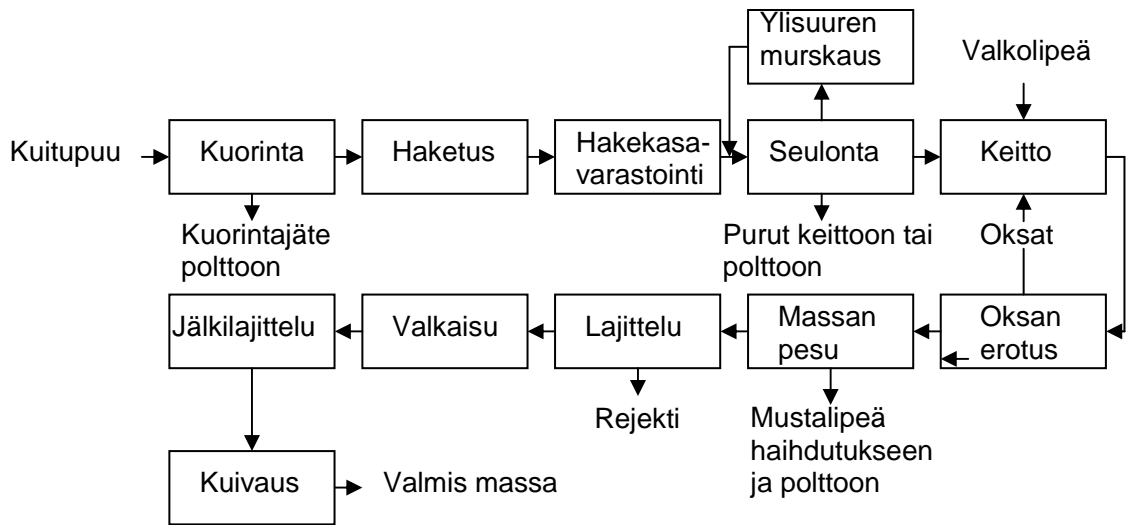
Lämpöarvo HHV taulukossa 3 kuvaa lämpömäärää, joka vapautuu, kun poltetaan kilo mustalipeää. Kyseessä on ns. ylempi lämpöarvo (myös kalorimetriseksi lämpöarvoksi kutsuttu). (Materiaali 2008)

Ligniinin liukenemisessä voidaan sulfaattikeiton aikana erottaa kolme päävaihetta: uutosvaihe, bulkkidelignifioituminen ja jäännösdelignifioituminen. Uutosvaihe on reaktionopeudeltaan hidas ja lämpötila on alle 140 °C. Sen aikana puun ligniinistä häviää noin 15–25 %. Sen aikana tapahtuu myös suurin osa hiilihydraattien mahdollisista saantotappioista. (Alén, 2000; Tuulos-Tikka, 2002)

Bulkkidelignifioitumisvaiheessa, joka alkaa lämpötilan noustua yli 140 °C:n, puun ligniinistä häviää suurin osa, toisin sanoen reaktionopeus on huipussaan ja ligniinistä liukenee noin 70–80 %. Bulkkidelignifioituminen kestää aina siihen saakka, kunnes hakkeesta on poistunut noin 90 % ligniinistä. Lämpötila ei nouse tässä vaiheessa yli 170 °C:n. (Alén, 2000; Tuulos-Tikka, 2002)

Viimeisessä vaiheessa lämpötila on yli 170 °C, reaktionopeus laskee ja ligniinin sekä hiilihydraattien liukenemisnopeudet muuttuvat epäedullisiksi, jolloin keittosaanto laskee, toisin sanoen hiilihydraattien saantotappioreaktiot kiihtyvät. Jos ligniinipitoisuus lasketaan alle 1 prosentin, massan lujuus ja saanto huononevat, koska hiilihydraatit liukenevat tässä vaiheessa nopeammin kuin ligniini. (Alén, 2000; Tuulos-Tikka, 2002)

Hiilihydraateilla tarkoitetaan tarkemmin hemiselluloosaa (glukomannaanit ja ksylaanit) ja selluloosaa. Ligniinin pilkkoutuessa syntyy haisevia yhdisteitä: rikkivetyä (H_2S), metyylimerkaptania (CH_3SH) ja dimetyylisulfidia (C_2H_6S), jotka omalta osaltaan ovat vastuussa sellutehtaiden vastenmielisestä ja löyhkäävästä hajusta. Keiton aikana muodostuvat kloroformit myös tummentavat keittoliuosta koko keiton ajan. Kuvassa 4 on esitetty koko sulfaattisellutehtaan lohkokaavio ilman kemikaalikiertoa ("keitto" viittaa sulfaattikeittoon). (Alén, 2000; Isotalo, 2004; Seppälä *et al.*, 2001; Tuulos-Tikka, 2002)



Kuva 4. Sulfaattikeittotehtaan lohkokkaavio ilman kemikaalikiertoa. (Isotalo, 2004)

2.2 Sulfiittikeitto

Sulfiittikeiton keksijänä pidetään yhdysvaltalaisesta B. C. Tilghmanista, joka sai keksinnölleen patentin vuosina 1866–1867. Menetelmää kehiteltiin tämän jälkeen eri puolilla Eurooppaa, mm. Ruotsissa ja Saksassa. Ruotsissa keitto perustui magnesiumbisulfiittiin ja Saksassa kalsiumbisulfiittiin. Maailman ensimmäinen sulfiittitehdas perustettiin Ruotsin Bergvikiin vuonna 1874. Kalsiumbisulfiitin käyttö yleistyi vähän tämän jälkeen eniten käytetyksi menetelmäksi sulfiittikeitossa, ja se syrjäytti lähes kokonaan magnesiumbisulfiitin käytön. Sulfiittikeitto puolestaan syrjäytti jo aiemmin keksityn sulfaattikeiton. Syynä pidetään mm. hyvää keittosaantoa, massan korkeahkoa vaaleutta valkaisuettomana sekä helpompaa valkaistavuutta yhä suurempiin vaaleuksiin. Suomessa käynnistyi sulfiittimassan valmistus vuosina 1884–1886, kun Kuusankosken, Kymin ja Nokian tehtaat käynnistyivät. Vielä 1960-luvulla sulfiittikeittomenetelmä oli selvästi yleisin sellunvalmistustapa Suomessa ja yleisin raaka-aine tuolloin oli kuusipuu. Vuonna 1991 suljettiin Suomen viimeinen sulfiittisellutehdas. Siitä lähtien Suomessa on valmistettu sellua enää sulfaattikeittomenetelmällä. Syynä on lähinnä sulfaattikeiton selkeästi suurempi ympäristöystävällisyys. (Avain 2006; Isotalo, 2004)

Perinteinen sulfiittikeitto tapahtuu happamissa olosuhteissa, toisin kuin sulfaattikeitto. Sulfiittikeitosta on kehitetty kuitenkin paljon erilaisia variaatioita, joissa pH on joko hapan, neutraali tai emäksinen. Eri sulfiittikeittomenetelmät jaetaan niiden pH:n mukaan joko happamaan bisulfiitti-, bisulfiitti-, neutraaliin sulfiitti- tai alkaliseen sulfiittikeittoon. Keittojen pH:t ovat vastaavasti 1,5–2,5; 3–5,5; 7–10 sekä 11–13. Vastaavat keittojen lämpötilat ovat 120–150 °C, 155–165 °C, 170–180 °C sekä 170–180 °C, ks. taulukko 4. Sulfiittikeiton vaikuttavina kemikaaleina ovat bisulfiitti-ionit (HSO_3^-) ja ylimäärä rikkidioksidia (SO_2) tai bisulfiitti- ja sulfiitti-ionit (SO_3^{2-}). Sulfiittikeitolla valmistetaan mm. nenäliinoja ja saniteettipapereita sekä muita pehmeitä papereita. Sulfiittikeitossa puun kuidut pehmenevät selvästi enemmän sulfaattikeittoon nähden. Keiton jälkeen massa on myös vaaleampaa kuin sulfaattikeitossa. (Isotalo, 1996; Isotalo, 2004)

Taulukko 4. Eri sulfiittikeittomenetelmien olosuhteet. (Isotalo, 1996)

Keittomenetelmä	Vaikuttavat kemikaalit	pH	Lämpötila °C
Hapan bisulfiitti	$\text{SO}_2, \text{HSO}_3^-$	1,5–2,5	120–150
Bisulfiitti	HSO_3^-	3–5,5	155–165
Neutraali sulfiitti	$\text{HSO}_3^-, \text{SO}_3^{2-}$	7–10	170–180
Alkalisulfiitti	SO_3^{2-}	11–13	170–180

2.3 Uusiopaperin käsittely ja uusiomassan valmistus

Suomessa valmistettiin paperia ja kartonkia vuonna 2006 yhteensä 14,1 miljoonaa tonnia, mikä on enemmän kuin koskaan. Edellisestä vuodesta nousua oli noin 14 %. Massan tuotanto kipusi myös uuteen ennätykseensä vuoden takaisesta ollen 13 miljoonaa tonnia. Kasvua vuoteen 2005 verrattuna oli 17 %. Kemiallisen massan, eli sellun, tuotantomäärä vuonna 2006 oli noin 8 miljoonaa tonnia. Vuonna 2007 paperin ja kartongin tuotanto kasvoi runsaalla prosentilla vuoteen 2006 verrattuna ollen noin 14,3 miljoonaa tonnia. Sellun tuotanto vastaavasti pieneni noin pari prosenttia vuoden takaisesta, jääden noin 7,7 miljoonaan tonniin. Metsäteollisuuden vuosituotantokapasiteetteja on kuvattu taulukossa 5. (Metsä 2007; Metsä 2008)

Taulukko 5. Metsäteollisuuden tuotanto Suomessa 2006 ja 2007. (Metsä 2008)

	Yksikkö 1000	2006	2007	Muutos-% 2007/2006
Havusahatavara ^{arvio}	m ³	12 145	12 400	2
Vaneri ^{arvio}	m ³	1 415	1 410	0
Sellu	t	7 946	7 699	-2
Paperi	t	11 174	11 272	1
paino- ja kirjoituspaperit, josta	t	9 744	9 768	0
mekaaninen (sis.sanomalehtipaperin)	t	6 699	6 776	1
puuvapaa	t	3 045	2 992	-2
muut paperit	t	1 429	1 504	5
Kartonki	t	2 967	3 063	3
Paperi ja kartonki yhteensä	t	14 140	14 335	1

Metsäteollisuudessa syntyi jätettä vuonna 2007 seuraavasti, ks. taulukko 6.

Taulukko 6. Metsäteollisuuden jätteet vuonna 2007. (Massa 2007)

	tonnia
Kaatopaikkajätteet (kuiva-aineena)	242 000 ¹⁾
- tuhka	79 000
- soodasakka ja meesa	86 000
- siistausjäte	17 000
- kuitu- ja pastaliete	10 000
- jätevedenpuhdistamojen liete	21 000
- puujäte	6 000
- kierrätyskelvoton jätepaperi	7
- muita jätteitä	20 000

1) lukuun sisältyy käsittelylaitoksille toimitettu ongelmajäte.

Uusiopaperilla tarkoitetaan keräyspaperista ja -kartongista valmistettua paperia. Keskimäärin keräyspaperin osuus kaikesta raaka-aineesta paperin ja kartongin valmistuksessa Suomessa on noin 5 %. Luku on pieni, koska suurin osa, yli 90 %, Suomessa valmistetusta paperista viedään ulkomaille. Keräyspaperin käsittelyn tarkoituksena on paperikuitujen alkuperäisten ominaisuuksien mahdollisimman tehokas

palauttaminen sekä sen sisältämien epäpuhtauksien poistaminen. Kotikeräyspaperista valmistetaan mm. uutta sanomalehtipaperia, vaaleasta konttoripaperista tehdään pehmopaperituotteita. Nämä massat joudutaan siistaamaan, eli paperimassasta poistetaan paino-, väri- ja täyteaineet. Keräyspahvi ja nestepakkauskartonki hyödynnetään kartonkiteollisuudessa ennen kaikkea hylsyjen raaka-aineena. Tämä ei edellytä paperimassan siistausta. Näiden lisäksi pieniä määriä keräyspaperia käytetään mm. lämmöneristeiden, ns. eko- eli selluvillan, valmistuksessa. Myöskään tätä osaa uusiopaperimassasta ei tarvitse siistata. (Seppälä *et al.*, 2001)

Taulukko 7. Paperiteollisuuden tuotteiden kierrätys. (Kierto 2008)

Keräyslajit	Mistä kerätään	Mitä paperi- tai kartonkitehtaalla tapahtuu	Lopputuotteet
Lehdet	Kotitaloudet, Kirjapainot, Toimistot	Lehdet ja muu kotikeräyspaperi siistataan eli painoväri pestään pois. Siistatusta massasta valmistetaan uutta sanomalehtipaperia tai pehmopaperia. Myös vaalea toimistopaperi siistataan ja syntyvästä massasta valmistetaan pehmopaperia	Sanomalehdet, luettelot, hakemistot, katalogit ja pehmopaperituotteet
Toimistopaperi	Yritykset, Muut yhteisöt	Vaalea toimistopaperi siistataan ja syntyvästä massasta valmistetaan pehmopaperia.	Pehmopaperituotteet, esim. wc-paperit, nenäliinat ja talouspyyhkeet
Aaltopahvi	Kaupat, Teollisuus	Aaltopahvin paperikuidut erotellaan muista mahdollisista kerroksista. Aaltopahvin ruskea väri ei poistu siistatessa.	Kartonkihylsyt ja aaltopahvin välikerrokset
Keräyskartonki	Kotitaloudet, Suurtaloudet (esim. koulut, ravintolat)	Keräyskartongin paperikuidut erotellaan muista mahdollisista kerroksista. Paperikuidut käytetään uudelleen raaka-aineena.	Kartonkihylsyt
Kartonkitölkit	Kotitaloudet, Suurtaloudet	Tölkkien muovipinnoite ja alumiinivuoraus erotetaan kartonkikuiduista. Muovi kaasutetaan energiaksi ja alumiini käytetään uudelleen alumiinifoliotehaalla.	-

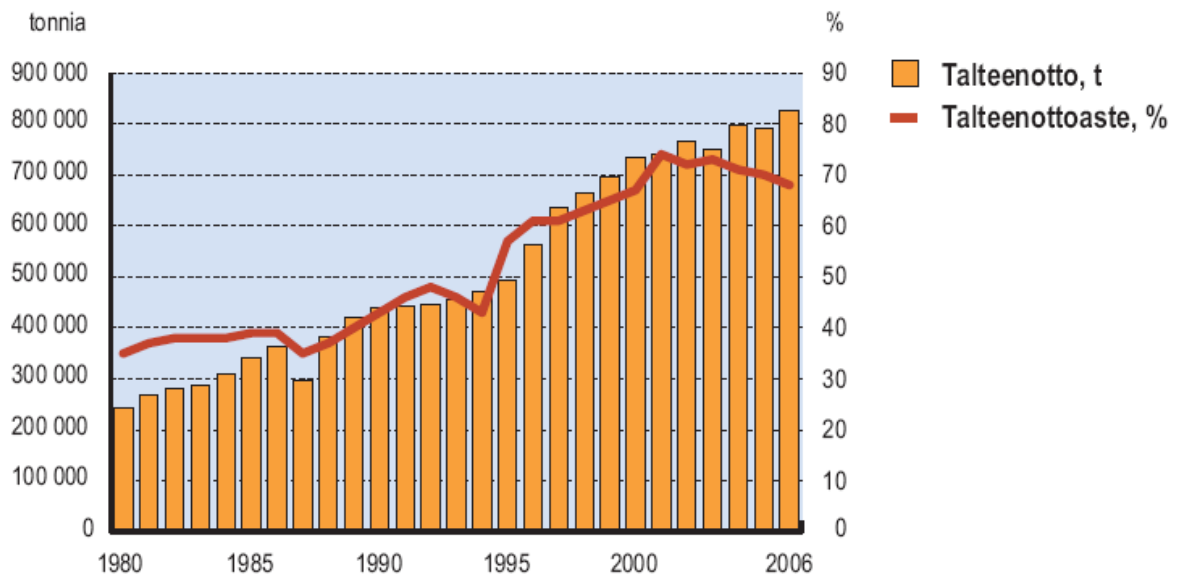
Eri keräyspaperilajit lajitellaan omiin ryhmiinsä ja puhdistetaan. Tarvittaessa ne paalataan ja varastoidaan sekä toimitetaan tehtaille raaka-aineeksi. Luottamuksellista

käsittelyä vaativat toimistopaperit tuhoetaan tarvittaessa turvallisesti silpuksi ennen paalausta ja kuljetusta tehtaille. (Kierto 2008)

Uusiopaperimassan raaka-aineeksi soveltuu melkein kaikki, mikä on aiemmin ollut paperia tai kartonkia. Paperit sisältävät kartonkia enemmän erilaisia epäpuhtauksia, esimerkiksi kirjojen, lehtiöiden ja luetteloiden kantoja, niittejä, muovikansia ja painovärejä yms. Kotikeräyspaperi soveltuu erittäin hyvin uusiopaperimassaksi. Keräyspaperit jaetaan kolmeen luokkaan niiden uusiopaperin valmistuksessa hyödynnettävien paperiteknisten ominaisuuksien myötä:

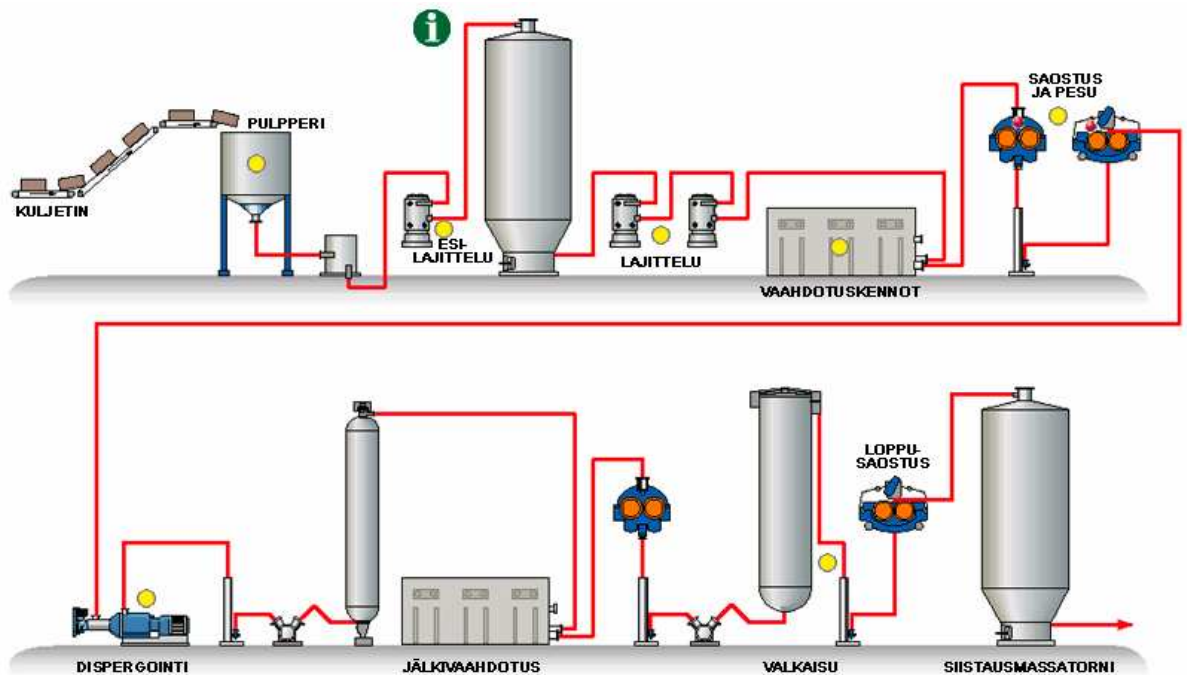
- Alemmat lajit: sanomalehdet, kotikeräyspaperi ja sekalaiset keräyspaperit
- Keskilajit: ruskeat kartongit, voimapaperit ja puupitoiset sekä puuvapaat painopaperit ja kartongit
- Ylemmät lajit: painamattomat puupitoiset ja puuvapaat paperit

Kotitalouksista kerättävä keräyspaperi on varsin tasalaatuista ja sisältää sanomalehtiä 65–70 %, aikakausilehtiä 20–25 % ja muuta sekalaista paperia, kartonkia ja pahvia alle 10 %. Yhdestä tonnista keräyspaperia saadaan uusiomassaa noin 850 kg. Määrä vastaa 20:tä kuitupuuta metsässä. Uusiomassatonnin valmistaminen kuluttaa sähköenergiaa 300–350 kWh ja samalla syntyy jätevettä 10–15 m³. Jätevesi puhdistetaan ja siitä syntyy noin 100–200 kg kuivaa jätettä. Näiden lisäksi muita kuluja aiheuttavat erilaiset kemikaali- ja investointikustannukset. Kuvassa 5 on esitetty keräyspaperin ja -kartongin talteenotto-tilastoja vuodesta 1980 lähtien aina vuoteen 2006 saakka. Talteenottoaste kuvaa keräyspaperin talteenottoa suhteessa paperin kulutukseen. (Seppälä *et al.*, 2001)



Kuva 5. Keräyspaperin ja -kartongin talteenotto vuosina 1980–2006. (Metsä 2007)

Uusiopaperimassa on siis ainakin kertaalleen käynyt läpi kaikki paperinvalmistukseen liittyvät vaiheet, jauhatuksen, kemikaalikäsittelyt ja kuivatuksen. Kaikki nämä ovat vaikuttaneet kuidun ominaisuuksiin, joten se käyttäytyy jokaisella uusiokerralla hieman eri lailla kuin edellisellä. Kuivaus vaikuttaa kuidun ominaisuuksiin enemmän kuin muut osatekijät. Kuivauksen myötä kuidun seinämät ovat luhistuneet ja kovettuneet, mikä vaikeuttaa sen turpoamista uusiokäytössä. Uusiopaperimassan sisältämät kemikaalijäämät myös lisäävät paperikoneiden puhdistuskertoja. Jätepaperin lajittelu on sen prosessointia ajatellen hyvin tärkeää. Puhdas jae käsitellään pelkästään mekaanisesti.



Kuva 6. Keräyspaperin käsittely ja kierrätyskuidun valmistus. (Teollisuus 2003)

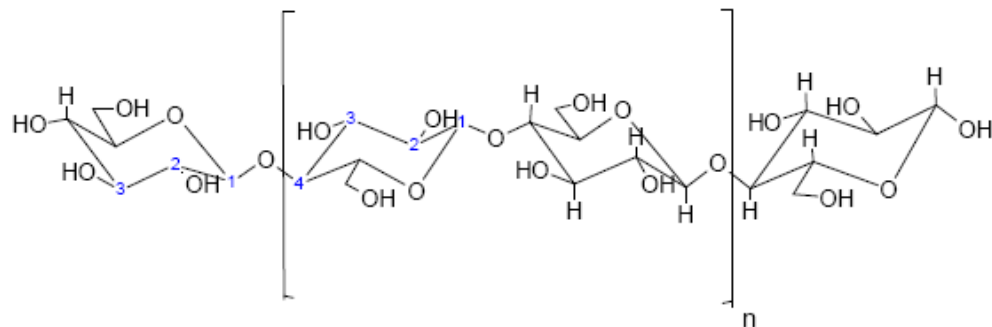
Aluksi keräyspaperi hajotetaan ns. pulpperissa ja raskaat epäpuhtaudet erotetaan pyörrepuhdistimissa. Hajotettu massa kuidutetaan, pestään ja lajitellaan. Painetun paperin käsittelyyn kuuluu osana myös kemiallinen musteenpoisto. Tässä käytetään apuna lipeää ja dispergointiaainetta, jotka kummatkin lisätään pulpperointivaiheessa. Dispergoinnin tarkoituksena on saada liimaushartsit ja pigmenttien sideaineet irtoamaan, jolloin seuraavassa vaiheessa tapahtuva kuidutus ja pigmenttien pesu eli valkaisu helpottuvat. Musteenpoistoprosessissa mekaaninen kuidutus tapahtuu kuin edellä, mutta tällä kertaa pesuvaiheen merkitys on entistä tärkeämpi. Kuidutettu massa pestään esimerkiksi flotaatiopesulla. Siinä massasulppuun sekoitetaan ilmaa, joka pigmenttipartikkeleihin tarttuessaan nostaa ne sulpun pinnalle, josta ne poistetaan kaapimella. (Casey, 1980)

Kierrätyspapereista saatavaa paperimassaa voidaan kierrättää 5–6 kertaa paperinvalmistusprosessin läpi, ennen kuin sen sisältämät selluloosaketjut ovat lyhentyneet niin merkittävästi, että paperin ja kartongin valmistaminen on mahdotonta. Tuolloin siitä syntyy jätettä, joka normaalisti menee kaatopaikalle. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli hyötykäyttää juuri tuota ylijäämämassaa ja tuottaa siitä edelleen

happokäsittelyn ja entsyymaattisen hydrolyysin avulla pelkistäviä sokereita, joista voitaisiin edelleen tuottaa esimerkiksi etanolia.

3 Selluloosa

Selluloosa muodostuu useista tuhansista jonossa olevista D-glukoosiyksiköistä. Glukoosiyksiköt ovat kiinni toisissaan kemiallisilla β -1,4-glykosidisilla sidoksilla. Joka toinen glukoosimolekyyli on kiertynyt 180° molekyyliakselinsa ympäri, joten teoriassa pienin selluloosan muodostava yksikkö on kahden glukoosiyksikön muodostama sellobioosi, ks. kuva 7. Sellobioosiyksikkö on pituudeltaan noin 1,03 nm. Pitkät selluloosamolekyylit (glukoosiyksiköiden määrä vaihtelee noin välillä 100–14 000) pakkautuvat yhteen vetysidosten avulla muodostaen selluloosa-alkeisfibrillejä (paksuus noin 3,5 nm), jotka yhteen liittyessään muodostavat selluloosafibrillejä, joita kutsutaan myös kristalliiteiksi. Tämä osa selluloosasta on järjestäytyntä ja sitä kutsutaan kiteiseksi selluloosaksi. Loppuosa selluloosasta on amorfisessa eli järjestäytymättömässä muodossa. (Isotalo, 2004; Miettinen, 1995; Reinikainen, 1994; Yarema, 2005)

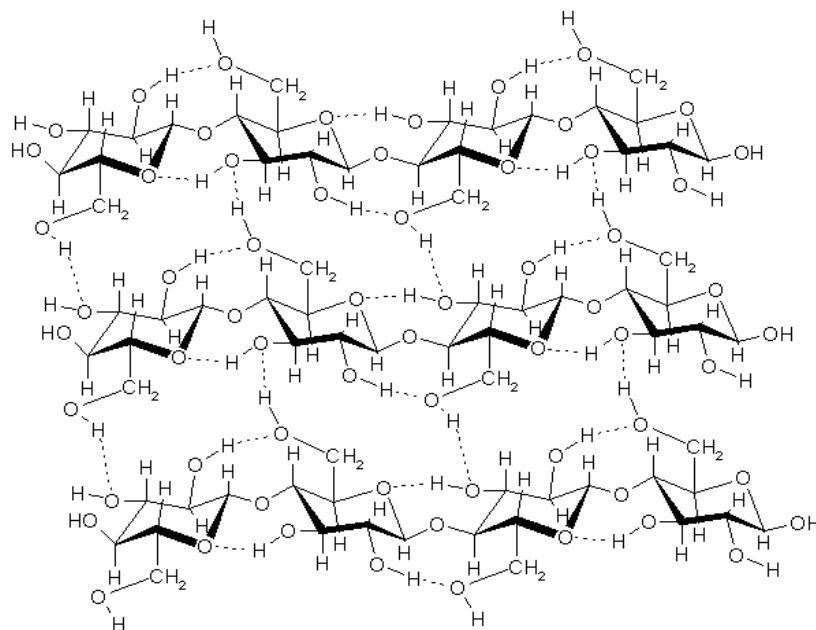


Kuva 7. Selluloosamolekyylin rakenne. Keskellä selluloosan perusyksikkö, sellobioosi, joita voi selluloosamolekyylissä olla n-kappaletta. Kuvassa ns. ei-pelkistävä pää jää sen vasemmalla puolelle ja pelkistävä pää oikealle. (Isotalo, 2004)

Polymeeriketjun sisältämien monomeeriyksiköiden, esimerkiksi glukoosiyksiköiden, lukumäärää kutsutaan polymerisaatioasteeksi (= DP). Jos polymerisaatioaste on yli 10 000, on selluloosamolekyylin moolimassa tällöin yli $1,5 \cdot 10^6$ g/mol. Selluloosa-alkeisfibrilli, jossa on tuhansia glukoosiyksiköitä, on noin 2-3 μm pitkä, mutta koska alkeisfibrillit ovat kiinni toisissaan eri kohdista, voivat yksittäiset selluloosafibrillit olla

satojakin mikrometrejä pitkiä. Elektronidiffraktiolla on saatu selville, että selluloosafibrillit ovat yhdensuuntaisia siten, että kaikki pelkistävät päät ovat samalla puolella selluloosamolekyylissä. Selluloosafibrillien välissä on muutamien nanometriä mittainen väli. Useat entsyymit ovat suuria molekyyliä, ja tämän takia niiden on joskus vaikea päästä käsiksi selluloosan glukoosiyksiköiden välisiin sidoksiin. Tästä syystä tehokas esikäsittely on erittäin tärkeää selluloosan hydrolyysiä ajatellen. (Isotalo, 2004; Miettinen, 1995; Reinikainen, 1994; Yarema, 2005)

Osa selluloosasta on kiteisessä muodossa, joten selluloosaa voidaan kutsua suureksi sokerivarastoksi, jonka hajoaminen luonnossa on hidasta, johtuen sen veteen liukenemattomasta rakenteesta. Selluloosan rakenne on siis jäykkää ja kestävä. Kiteistä selluloosaa voi olla rakenteesta jopa 75 %, ja se on hyvin resistentti erilaisia kemikaaleja vastaan. Vaikka selluloosa ei liukene veteen, on sillä taipumus sitoa vettä itseensä. Tällöin vesimolekyylit sitoutuvat selluloosan järjestäytymättömien alueiden vapaisiin hydroksyyliiryhmiin vetysidoksilla, jolloin selluloosa turpoaa. Paperinvalmistuksessa hyödynnetään tätä ominaisuutta. Tällöin kuivatun paperimassan selluloosan pintojen väliin jää voimakkaita vetysidoksia, jotka vahvistavat valmistettavan paperin sidoslujutta. (Isotalo, 2004; Miettinen, 1995; Reinikainen, 1994; Yarema, 2005)



Kuva 8. Kiteisen selluloosan rakenne. Alkeisfibrillien välissä on vahvoja vetysidoksia ja heikompia Van der Waalsin voimia. (Selluloosa 2008)

Selluloosa on maailman yleisin orgaaninen yhdiste. Kaikesta maailman kasvimateriaalista selluloosan osuus on noin 33 %. On olemassa entsyymejä, jotka pystyvät tehokkaasti hajottamaan selluloosaa. Näitä entsyymejä kutsutaan sellulaaseiksi. Niitä on periaatteessa kolme eri tyyppiä, ja ne jaotellaan toimintatavan perusteella. Usein näiden kolmen entsyymin yhtenäinen vaikutus eli annossuhteet vaikuttavat oleellisesti hydrolyysin onnistumiseen ja laajuuteen. *Trichoderma reesei* -homeen tuottamat sellulaasit ovat eniten tutkittu ja parhaiten tunnettu sellulaasiryhmä tällä hetkellä. (Isotalo, 2004; Miettinen, 1995; Reinikainen, 1994; Yarema, 2005)

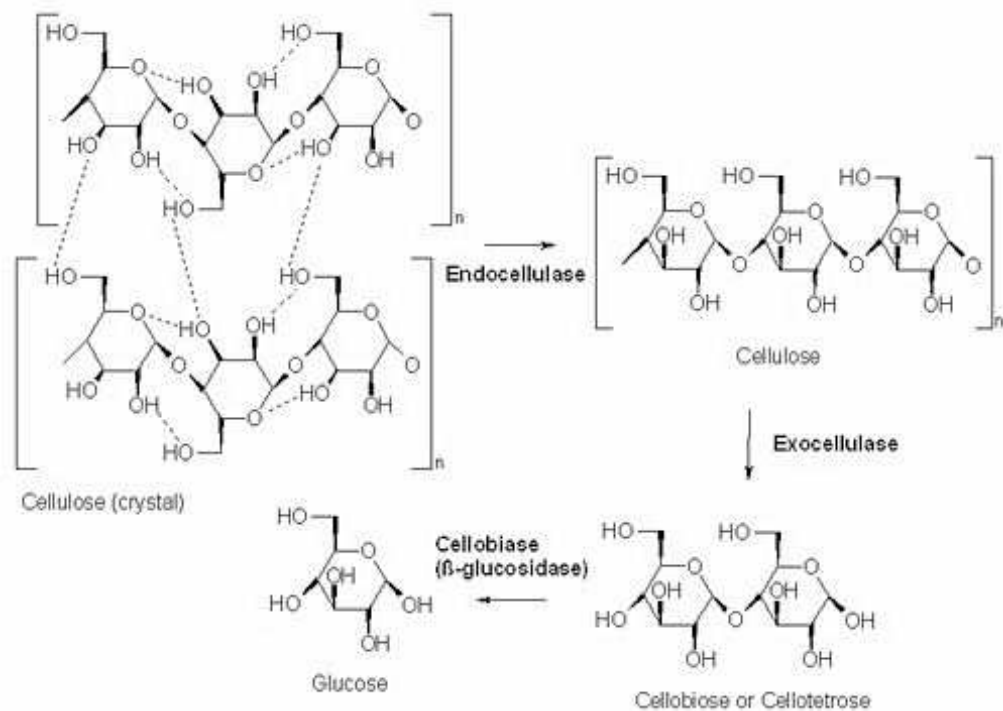
3.1 Selluloosan hajotus

Selluloosaa voidaan esikäsitellä entsyymien toiminnan helpottamiseksi mm. happo- tai emäskäsittelyillä. Happo ja emäs molemmat turvottavat selluloosan rakennetta, jolloin entsyymien on helpompi päästä käsiksi glukoosiyksiköiden välisiin sidoksiin. Happo katkaisee sattumanvaraisesti selluloosapolymeerin β -1,4-glykosidisen sidoksen happisillan kohdalta, ja samalla siihen liittyy vesimolekyyli. Emäs katkoo sidoksia myös, muttei ole lähellekään yhtä tehokas kuin happo. Hapoesikäsitteilyn yleisenä ohjenuorana voidaan pitää yhdistelmiä heikko happo – korkea lämpötila tai vastaavasti vahva happo – matala lämpötila. Esimerkkeinä kyseisistä esikäsitteilyistä:

heikko happo – korkea lämpötila: 2 % H_2SO_4 – 180 °C

vahva happo – matala lämpötila: 72 % H_2SO_4 – 50 °C.

Selluloosan (tai tärkkelyksen) hajoamista mono-, di-, tri- tai oligomeereiksi kutsutaan sakkarifikaatioksi ja tällä hetkellä eniten käytetty menetelmä sen suorittamiseen on entsymaattinen hydrolyysi, ks. kuva 9. Se kuitenkin vaatii onnistuakseen jonkinlaisen esikäsitteilyn, esimerkiksi happokäsittelyn. Tutkimuksissa on todettu vahvan happokäsittelyn hajottavan heksoosisokereita, esimerkiksi glukoosia, galaktoosia, mannoosia ja ramnoosia, 5-hydroksymetyylifurfuraaleiksi ja pentoosisokereita, esimerkiksi arabinoosia ja ksyloosia, furfuraaleiksi. Furfuraaliyhdisteet ovat haitallisia ajatellen esimerkiksi fermentointia, jota ne inhiboivat voimakkaasti. (Larsson *et al.*, 1999)



Kuva 9. Selluloosan hajoaminen eri entsyymien (ekso- ja endoglukanaasin sekä β -glukosidaasin) vaikutuksesta glukoosiksi. (Sellulaasi 2008)

Kokonaisselluloosapitoisuuden tutkimiseksi organisesta näytteestä voidaan se ensin käsitellä vahvalla rikki- tai typpihapolla, jotta ligniini ja hemiselluloosa saadaan liukenemaan. Tämän jälkeen hapon ja lämpötilan vaikutuksesta furaldehydeiksi hajonneen selluloosan annetaan reagoida antronin kanssa happamissa olosuhteissa (rikkihappo), jolloin muodostuu sinivihreää yhdistettä. Lopulta analysoidaan spektrofotometrisesti pelkistävien sokereiden pitoisuus. Antroni on kuitenkin voimakas myrkky, jonka käyttöä ei suositella ja jota käytettäessä tulee tarkasti noudattaa turvallisuusmääräyksiä. Antronimääritysten suosio on vähentynyt kokonaishiilihydraattimäärityksessä viime aikoina selvästi. Antronin korvikkeena voidaan käyttää myös fenolia. Tällöin korkean lämpötilan ja happaman ympäristön vaikutuksesta furaanin johdannaisiksi, kuten furaldehydiksi (= furfuraali) tai hydroksymetyylifuraldehydiksi (= hydroksymetyylifurfuraali, HMF), muuttunut selluloosa reagoi fenolin kanssa muodostaen tummia kompleksisia yhdisteitä. Muodostunut yhdiste absorboi valoa parhaiten aallonpituudella 480 nm (pentoosit) ja 490 nm (heksoosit). Alkuperäinen sokeripitoisuus on suoraan verrannollinen

absorbanssiin. Myös fenoli on antronin tapaan myrkyllinen, joten sen käyttö kokonaishiilihydraattipitoisuuksien analytiikassa on vähentynyt. (Cui, 2005)

Yhä enemmän on siirrytty analyyseihin, joissa näyte käsitellään aluksi vahvalla hapolla, esimerkiksi rikkihapolla, jonka jälkeen se varsinaisesti hydrolysoidaan laimeammalla hapolla. Lopulta kokonaishiilihydraattipitoisuus määritetään kromatografisesti. Tästä on olemassa monia standardeja, yhtenä esimerkkinä mainittakoon NRELin standardoitu menetelmä hiilihydraattien ja ligniinin määrittämiseen biomassasta. Analyysi on huomattavasti ympäristö- ja ihmisystävällisempi kuin edellä mainitut antroni- ja fenolimenetelmät. (Sluiter *et al.*, 2008)

3.2 Sellulaasit

Sellulaaseja tuotetaan sienimikrobeilla ja bakteereilla. Vain muutama sienisuku kykenee tuottamaan täydellisen entsyymijoukon, jolla pystytään hydrolysoimaan kiteistä eli natiivia selluloosaa. Tunnetuimmat sienisuvut ovat *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Phanerochaete* ja *Schizophyllum*. Eniten tutkittu ja parhaiten tunnettu näistä on *Trichoderma*-suku ja tarkemmin sanoen *T. reesei*. Usein näiden sienimikrobien tuottamat sellulaasit sisältävät useita endo- ja eksoglukanaaseja, mutta vain muutamia β -glukosidaaseja. Nämä sellulaasit ovat useimmiten aktiivisia joko happamassa tai neutraalissa pH:ssa. On kuitenkin olemassa sellulaaseja, joiden pH-optimi on välillä 5–10, esimerkkinä *Humicola insolens* -homeen tuottama sellulaasi. (Reinikainen, 1994)

Bakteeriperäiset sellulaasit ovat vähemmän tunnettuja niiden vaikean tutkimisen takia. Kuitenkin tiedetään, että esimerkiksi *Clostridium*-, *Acetovibrio*-, *Ruminococcus*-, *Streptomyces*-, *Microbispora*- sekä *Cellulomonas*-suvun bakteereilla on saatu tuotettua entsyymejä, joissa on havaittu sekä endo- että eksoglukanaasiaktiivisuuksia. *Cellulomonas*-suvun *C. fimi* -kanta on paljon tutkittu sellulaasien tuotannossa. Useimmat bakteeriperäiset sellulaasit eivät kykene hydrolysoimaan kiteistä selluloosaa tehokkaasti. (Wood & Garcia-Campayo, 1990)

Kaupalliset sellulaasit ovat entsyymiseoksia, joiden teho perustuu endo- ja eksoglukanaasien synergiaan. Eritoten synergian vaikutus korostuu sellulaasien hajottaessa kiteistä selluloosaa. Tutkimuksissa on todettu synergian toimivan tehokkaimmin, jos mukana on paljon eksoglukanaaseja, mutta suhteessa niihin vain vähän endoglukanaaseja. Substraatin laadulla on myös suuri merkitys synergian tehokkuuteen. (Henrissat *et al.*, 1985; Nidetzky *et al.*, 1993)

Entsyymien aktiivisuutta on vaikea kuvailla yksiselitteisesti ja yleisellä kaavalla. Tämä johtuu mm. siitä, että osa entsyymistä voi olla denaturoituneena tai muuten inaktiivisessa muodossa. Entsyymien aktiivisuudesta puhuttaessa käytetään termiä katalyyttinen aktiivisuus, ja sitä kuvataan mm. yksiköillä U ja IU. Entsyymin tehtävänä on toimia biokemiallisen reaktion katalyyttinä, eli se nopeuttaa tapahtuvaa reaktiota moninkertaisesti. U/g tarkoittaa entsyymin puhtausastetta eli sitä, kuinka suuri aktiivisuus on grammalla entsyymiä. U on entsyymimäärä, joka riittää katalysoimaan substraatin biokemiallista muutosta yhden mikromoolin verran yhdessä minuutissa optimaalisissa reaktio-olosuhteissa (lähinnä T ja pH). Eri entsyymeillä on omat optimireaktio-olosuhteensa. Näissä standardioptimiolosuhteissa (T ja pH) päästään parhaaseen mahdolliseen saantoon haluttua lopputuotetta. IU on ns. kansainvälinen entsyymiaktiivisuusyksikkö (*International unit*), sen määritelmä on sama kuin U:lla. Eräs entsyymitekniikassa myös käytetty yksikkö on ns. katali. Yksi katali entsyymiä kykenee katalysoimaan substraatin biokemiallista muutosta yhden moolin verran sekunnissa. Yksi katali vastaa näin ollen siis karkeasti 60 000 000 U:ta, koska entsyymiaktiivisuudet vaihtelevat hiukan eri entsyymien välillä. (Perry & Green, 2007)

3.2.1 Endoglukanaasit

Endoglukanaasit ovat entsyymejä, jotka katkovat selluloosaketjun D-glukoosiyksiköiden välisiä β -1,4-glykosidisia sidoksia sekä kiteisen selluloosan selluloosa-alkeisfibrillien välisiä vetysidoksia täysin sattumanvaraisesti. Samalla kun selluloosaketju katkeaa, syntyy yksi uusi pelkistävä pää. Toisin sanoen selluloosaketjun katkettua β -1,4-glykosidisesta sidoksestaan syntyy kaksi glukoosiketjua, joiden toiset päät ovat pelkistäviä. Liukoista substraattia käytettäessä hydrolysoitavan liuoksen

viskositeetti putoaa nopeasti endoglukanaasien vaikutuksesta, mitä ei tapahdu esimerkiksi eksoglukanaasien kohdalla. Muutamina esimerkkeinä endoglukanaaseja tuottavista mikrobeista ovat *T. reesei* sekä rekombinantti *S. cerevisiae* (EGI). Tunnetuimmat endoglukanaasit kulkevat nimillä EGI, EGII ja EGIII. EGI pystyy pilkkomaan sekä kiteistä että puolikiteistä selluloosaa. Puolikiteisessä selluloosassa selluloosan rakenne on puoliksi järjestäytynyt suoriin ja vetysidoksin toisissaan kiinni oleviin selluloosafibrilleihin, joita myös kristalliteiksi kutsutaan. EGI on tehokas myös ns. substituutiselluloosaan, esimerkiksi selluloosaetereihin CMC ja HEC. EGI pilkkoo selluloosaketjua täysin sattumanvaraisesti. EGI on myös aktiivinen vehnän β -glukaanin hydrolysoinnissa. EGII hydrolysoi substituutiselluloosaa, β -glukaania ja puolikiteistä selluloosaa, mutta sillä on hieman pienempi katalyyttinen aktiivisuus kuin EGI:llä. EGIII ei kykene pilkkomaan puolikiteistä selluloosaa eikä ksylyaania, mutta se hydrolysoi β -glukaania sekä erityisen tehokkaasti CMC:tä ja HEC:tä, joista se tuottaa glukoosia. β -glukaanin rakenne on lähes identtinen selluloosan kanssa. Ainoa ero on noin joka kolmannen tai neljännen β -1,4-glykosidisen sidoksen korvautuminen β -1,3-glykosidisella sidoksella. (Miettinen, 1995; Reinikainen, 1994)

3.2.2 Sellobiohydrolaasit

Sellobiohydrolaasien tunnetuin tuottaja on *T. reesei* -home. Se tuottaa kahta eri sellobiohydrolaasia, CBHI:tä ja CBHII:ta. Rakenteellisesti CBHI on parhaiten karakterisoitu sellobiohydrolaasi, mutta CBHII:n ytimen täydellinen 3D-rakenne tunnettiin jo sitä ennen. *A. niger* -home tuottaa myös kahta eri sellobiohydrolaasia, CBHa:ta ja CBHb:tä. Kolmas sellobiohydrolaaseja tuottavista mikrobeista on *P. chrysosporium*, joka tuottaa neljää eri CBH:ta (CBHI–IV). Sellobiohydrolaasien nimi tulee siitä, että ne katkovat selluloosaketjun päistä kahden glukoosimolekyylin yksiköitä, sellobiooseja. CBHI katkoo glukoosiketjun pelkistävästä päästä kahden glukoosin yksiköitä, kun taas CBHII tekee saman, mutta ei-pelkistävästä päästä. (Den Haana *et al.*, 2007; Miettinen, 1995; Reinikainen, 1994)

3.2.3 β -glukosidaasit

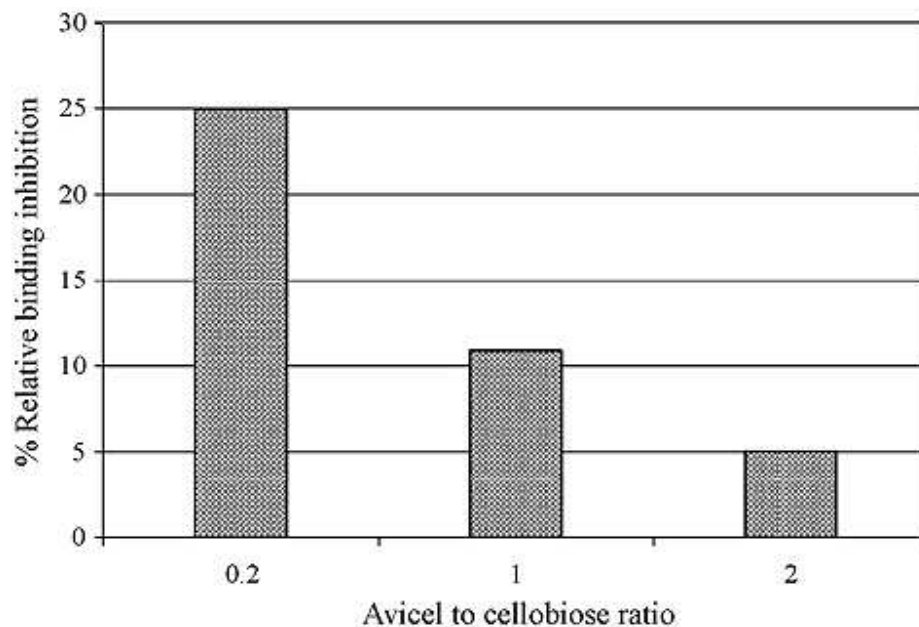
β -glukosidaaseja tuottavista mikrobeista muutamina esimerkkeinä mainittakoon enterobakteeri *Escherichia coli*, hypertermofiili arkkibakteeri *Pyrococcus furiosus* sekä *A. aculeatus* -home, kaupallisesti paremmin tunnettu *Aspergillus*-sukuna. β -glukosidaasit hajottavat sellobioosiyksiköitä glukoosiyksiköiksi. Ne eivät kykene hajottamaan tätä suurempia glukoosimolekyyliyksiköitä. (Miettinen, 1995)

On tärkeää, että β -glukosidaasia on riittävästi, jotta selluloosan hydrolysoituminen tapahtuisi mahdollisimman optimaalisesti. Tähän liittyen vielä nykyäänkin oletetaan, että hydrolyysissä syntyvät sellobioosit inhiboivat edellä mainittujen kahden muun entsyymin toimintaa ja samalla hydrolyysin tulos heikkenee. (Miettinen, 1995)

Entsyymien toiminnan heikkenemisellä tarkoitetaan mm. sitä, että niiden kyky tarttua substraattiin heikkenee. Tutkimuksissa on todettu, että yhden prosentin (10 g/l) sellobioosipitoisuus laskee sellulaasien aktiivisuutta noin 12 prosentilla ja sellobioosipitoisuuden ylittäessä 15 prosenttia (150 g/l) sellulaasien toiminta lakkaa kokonaan. Kuvasta 10 selviää sellobioosien määrän vaikutus sellulaasien tarttumiskykyyn substraattiin. Vastatoimenpiteenä kyvyn heikkenemiselle olisi substraattipitoisuuden kasvattaminen suhteessa inhiboivien yhdisteiden määrään liuoksessa. (de Vos *et al.*, 1998; Kumar & Wyman, 2008; Miettinen, 1995)

Samoin on todettu, että lopulta syntyvät yksittäiset glukoosiyksiköt inhiboivat hydrolyysiä. Glukoosi inhiboi sellulaasien toimintaa kuitenkin paljon vähemmän kuin sellobioosit. Karkeana arviona glukoosipitoisuuden tulisi olla useita kymmeniä grammoja litrassa (noin 5-10 %), jotta sellulaasien merkittävää inhiboitumista tapahtuisi. Glukoosin inhiboimisvaikutus voidaan poistaa esimerkiksi entsyymaattiseen hydrolyysiin yhdistetyllä fermentoinnilla (ns. SSF-menetelmä, ks. kohta 4.5), jolloin syntyvät glukoosiyksiköt fermentoitaisiin samanaikaisesti hiivan, esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae*, avulla etanoliksi. Nykyään käytetään myös termiä CBP (*consolidated bioprocessing*), jolla tarkoitetaan eräänlaista vieläkin kehittyneempää ja taloudellistehokkaammin integroitua SSF-prosessia. Siinä kaikki kolme päävaihetta,

jotka tarvitaan muuttamaan biomassa etanoliksi, on integroitu samaan reaktioastiaan. Päävaiheet ovat sokerointientsyymien tuotanto, esikäsitellyn biomassan entsyymattinen hydrolyysi ja heksoosi- sekä pentoosisokereiden fermentointi. Merkittävin ero SSF:n ja CBP:n välillä on juuri entsyymien tuottotavassa. Ainakaan vuoteen 2007 mennessä ei markkinoilla ollut ”supermikrobia”, joka kykenisi hoitamaan prosessin eri vaiheet (sokeroinnin ja fermentoinnin) yksinään. Jo tuolloin kuitenkin tutkittiin kuumeisesti mahdollisuutta, että *S. cerevisiae*n geneettisellä muuntelulla voitaisiin luoda kyseinen ”supermikrobi”. Mitään mullistavaa läpimurtoa ei ainakaan tiettävästi ole vielä asian suhteen tehty. (de Vos *et al.*, 1998; Kumar & Wyman, 2008; Lynd *et al.*, 2005; Lynd *et al.*, 2007; Miettinen, 1995)



Kuva 10. Sellobioosin vaikutus entsyymiaktiivisuuteen. Taulukon määrittämissä sellobioosin määrä pidettiin vakiona (50 mg/ml) ja Avicel PH-101:n (puhdas selluloosa) määrää vaihdeltiin välillä 10–100 mg/ml. Y-akseli kuvaa suhteellista sellulaasien inhiboitumisprosenttia. Avicel-sellobioosisuhteen ollessa 0,2 (10 mg/ml:50 mg/ml) entsyymiaktiivisuudesta häviää 25 %. (Kumar & Wyman, 2008)

3.3 Kaupallisia sellulaaseja

3.3.1 Celluclast[®]

Celluclast[®] on *T. reesei* -homeen erään tietyn kannan tuottamien entsyymien seos, jota käytetään katalysoimaan selluloosan pilkkoutumista glukoosi-, sellobioosi- ja muiksi näitä pidemmiksi selluloosaketjuyksiköiksi. Celluclast[®]-liuos sisältää endo- ja eksoglukanaaseja sekä pieniä aktiivisuuksia β -glukanaaseja. Entsyymien teollinen tuotanto tapahtuu tarkoin rajatuissa olosuhteissa. Tässä insinööriyössä käytetty entsyymi on Novozyme A/S:n valmistama. Kyseisen liuoksen entsyymiaktiivisuus on ≥ 700 U/g. (Rosgaard *et al.*, 2007; Tuoteseloste Celluclast[®] 2007)

3.3.2 Novozyme 188

Novozyme 188 on *A. niger* -homeen tuottama β -glukosidaasientsyymi. Se pilkkoo kahden glukoosiyksikön muodostamia sellobioosiyksiköitä yksittäisiksi glukoosiyksiköiksi. Tässä insinööriyössä käytettiin Novozyme A/S:n valmistamaa entsyymiä. Kyseisen entsyymiliuoksen entsyymiaktiivisuus on ≥ 250 U/g. (Tuoteseloste Novozymes 188 2007)

3.3.3 GC 220

GC220 on Genencorin (Genencor on osa Danisco A/S yhtiötä) valmistama sellulaasientsyymivalmiste. Sen kerta-annostuksena valmistaja suosittelee 320 g per 1000 kg kuiva-ainetta. GC220 on erityisen tehokas selluloosan, hemiselluloosan ja β -glukaanin hydrolyysissä ja sitä valmistetaan teollisesti fermentoimalla kontrolloiduissa olosuhteissa. Tuottajana toimii *T. reesei* -home. Entsyymiliuos sisältää useiden eri entsyymien entsyymiaktiivisuuksia, mutta se on standardoitu karboksimeetyyliselluloosaa (CMC) hydrolysoivan entsyymiaktiivisuuden mukaan. Entsyymiaktiivisuus on vähintään 6200 IU/g ja entsyymiliuos on täysin veteen liukeneva. Entsyymien teho perustuu kuitenkin kaikkien eri entsyymiaktiivisuuksien synergiaan. Liuoksen tiheys on välillä 1,10–1,20 g/ml. GC220:n pH-optimi 50 °C:ssa ja

sen alapuolella on 3,5–6,5. Lämpötilan ollessa 50–65 °C on entsyymin optimi-pH välillä 4,0–5,5. Kun liikutaan yli 70 °C:n lämpötilassa, on optimi-pH välillä 4,5–5,0. (Tuoteseloste GC220 2007)

3.3.4 Rohalase[®] ACL ja Accelerase[™] 1000

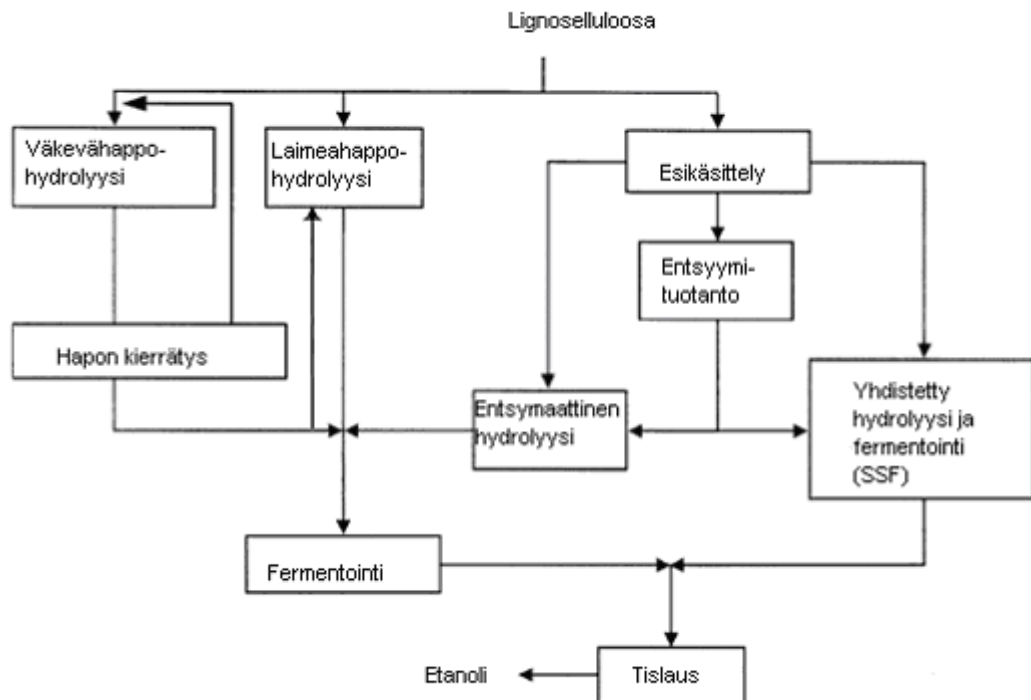
Edellä mainittujen sellulaasien lisäksi markkinoilla on kirjava joukko eri valmistajien valmistamia sellulaasientsyymivalmisteita, kuten Rohalase[®] ACL, joka on AB Enzymesin valmistama sellulaasi. Se pystyy hydrolysoimaan selluloosaa ja muita ei-tärkkelyspohjaisia polysakkarideja. AB Enzymes on osa englantilaista ABF Ingredients Oy:tä. Suomessa ABF Ingredients Oy:llä ja Altialla on yhteishanke, joka tunnetaan nimellä ROAL Oy. ROAL Oy kehittää ja tuottaa patentoituja *Trichoderma*-suvun tuotteita. AB Enzymes toimii ainoana ROAL Oy:n tuotteiden jakelijana. (AB-Enzymes 2008)

Accelerase[™] 1000 on Genencorin valmistama sellulaasi, joka lanseerattiin syksyllä 2007. Se on tarkoitettu lignoselluloosamassan hydrolysointiin. Se kykenee hydrolysoimaan tehokkaasti biomassan sisältämää selluloosaa ja hemiselluloosaa. Kyseisen sellulaasin entsyymiaktiivisuudet ovat seuraavat: endoglukanaasi 2500 CMC U/g, β-glukosidaasi 400 pNPG U/g. Endoglukanaasiaktiivisuus on ilmoitettu karboksimeetyyliselluloosa-aktiivisuuden yksikkönä (CMC U). Sen merkitys on hieman eri kuin pelkällä U:lla. Standardintilosuhteet vaihtelevat näiden välillä (ks. kohta 3.2), CMC U:n standardilämpötila on tässä tapauksessa 50 °C ja -pH 4,8. β-glukosidaasin aktiivisuusyksiköllä pNPG:llä tarkoitetaan sitä, kuinka monta mikromoolia nitrofenolia vapautuu entsyymin vaikutuksesta para-nitrofenyyli-B-D-glukopyranosidista 10 minuutissa lämpötilan ollessa 50 °C ja pH:n 4,8. Entsyymiä tuotetaan modifioidulla *T. reesei* -homeella. Sen optimi-pH on välillä 4,0–5,0 ja lämpötilaoptimi välillä 50–65 °C. Yli 70 °C:n lämpötilassa Accelerase[™] 1000 inaktivoituu. (Tuoteseloste Accelerase[™] 1000 2007)

4 Hydrolyysiprosessit

Lignoselluloosamateriaalin hydrolysointimenetelmiä on useita: happohydrolyysi, alkalihydrolyysi, entsyymaattinen hydrolyysi, höyryräjäytys, AFEX-käsittely, hiilidioksidiräjäytys, organosolv-käsittely tms. Tällä hetkellä selluloosan hydrolysoinnissa on kuitenkin kaksi menetelmää, jotka ovat muita huomattavasti enemmän käytettyjä. Nämä kaksi prosessia ovat happohydrolyysi sekä entsyymaattinen hydrolyysi. Niitä voidaan käyttää yksinään tai integroida ne yhteen esimerkiksi etanolintuotantoprosessissa. Monia edellä mainittuja hydrolyysikäsitteilyjä käytetäänkin teollisuudessa esikäsitteilynä juuri entsyymaattiselle hydrolyysille. Etanolintuotannossa selluloosasta juuri esikäsitteilyllä on kaikkein ratkaisevin merkitys tuotensaannon maksimoinnissa ja tällä hetkellä se onkin yksi suurimmista koetinkivistä tehokkaassa teollisessa toisen sukupolven bioetanolin tuotannossa. (Imai *et al.*, 2003; Virtanen, 2006; Zhu *et al.*, 2005)

Kuvassa 11 on esitetty erilaisia käsitteilyvaihtoehtoja selluloosaperäiselle raaka-ainemateriaalille. Happohydrolyyseyä voidaan tehdä joko heikolla tai vahvalla hapolla. Tällöin lämpötilalla on suuri merkitys hydrolyysin onnistumisessa. Sen rinnalla voidaan tehdä myös alkalisia käsitteilyjä raaka-aineelle. Periaatteessa alkalinen vaikutus selluloosamassaan on sama kuin haponkin: se turvottaa ja pilkkoo selluloosarakennetta, jolloin entsyymien toiminta helpottuu. Happo- ja alkalikäsitteily liuottaa lignoselluloosamassan hemiselluloosaa ja osin myös ligniiniä. Käsitteily toimii usein esikäsitteilyvaiheena, jota seuraa entsyymaattinen hydrolyysi. Entsyymaattinen hydrolyysi on kaikkein spesifisin, turvallisin ja luonnonmukaisin prosessi selluloosan hajottamiseksi. Kuvan 11 entsyymaattisen hydrolyysin esikäsitteilynä voi olla esimerkiksi happo- ja/tai alkalikäsitteily. (Imai. *et al.*, 2003; Virtanen, 2006; Zhu *et al.*, 2005)



Kuva 11. (Ligno)selluloosapohjaisen raaka-aineen käsittelyvaihtoehtoja etanolin tuotannossa. Kuvassa mainittu esikäsitely voi olla mikä tahansa edellisessä kappaleessa mainittu käsittelymenetelmä. Väkevähappohydrolyysiä voi seurata myös laimeahappohydrolyysi ennen fermentointia. (Virtanen, 2006)

Biomassan happo- tai alkaliesikäsitelyyn voi suorittaa monella tapaa, tärkeintä on riittävä lämpötila suhteessa käytetyn hapon tai alkalien pitoisuuteen. Esikäsitelyyn voi suorittaa autoklaavissa tai hieman korkeammassa lämpötilassa höyryräjäytyksessä (180–200 °C). Myös mikro- ja ultraääniäaltoja voi hyödyntää. Mikroaaltokäsittely on suhteellisen uusi tapa esikäsitellä biomassaa. Tästäkin löytyy kuitenkin esimerkkejä kirjallisuudesta. Ultraäänikäsitelyssä biomassan rakenne hajoaa voimakkaan ultraäänin vaikutuksesta. Tällöin mitään happo- tai alkalikäsitelyä ei välttämättä tarvita. (Zhu *et al.*; 2005, Imai *et al.*, 2003)

Hydrolyysiprosessin reaktioastioiden materiaaleja on tutkittu jonkin verran, ja on todettu, että jotkin materiaalit vaikuttavat mm. glukoosin hajoamiseen. Oletus on, että astian sisäpinnalta irtoaa metalli-ioneja käsiteltävään seokseen. Kuparin on todettu olevan hyvä valmistusmateriaali sen johdosta, että se ei juuri vaikuta glukoosin hajoamiseen, mutta se ei sovellu emäksisiin olosuhteisiin. Ruostumattomalla teräksellä

on todettu olevan merkittävä ja puhtaalla raudalla erittäin suuri vaikutus glukoosin nopeaan hajoamiseen prosessin aikana. (Glukoosin hajoaminen 2008)

4.1 Happohydrolyysi

Hapon vaikutuksesta selluloosa hydrolysoituu, eli se katkeaa glykosidisen happisillan kohdalta, jolloin siihen liittyy yksi vesimolekyyli, ks. kuva 12. Kemiallisesti ilmaistuna protoni liittyy ensin happiatomiin, sidos katkeaa ja vesimolekyyli liittyy katkenneeseen kohtaan. Selluloosan hydrolyysi vaatii siis aina vesimolekyylien läsnäoloa. Selluloosan hydrolysoinnissa on mahdollista käyttää orgaanisia tai epäorgaanisia happoja. Tällä hetkellä eniten käytetty happo on rikkihappo sen halvan hinnan ja helpon saatavuuden takia. Rikkihappo ei reagoidessaan myöskään muodosta myrkyllisiä yhdisteitä. (Galbe & Zacchi, 2002; Ye & Jiayang, 2002)

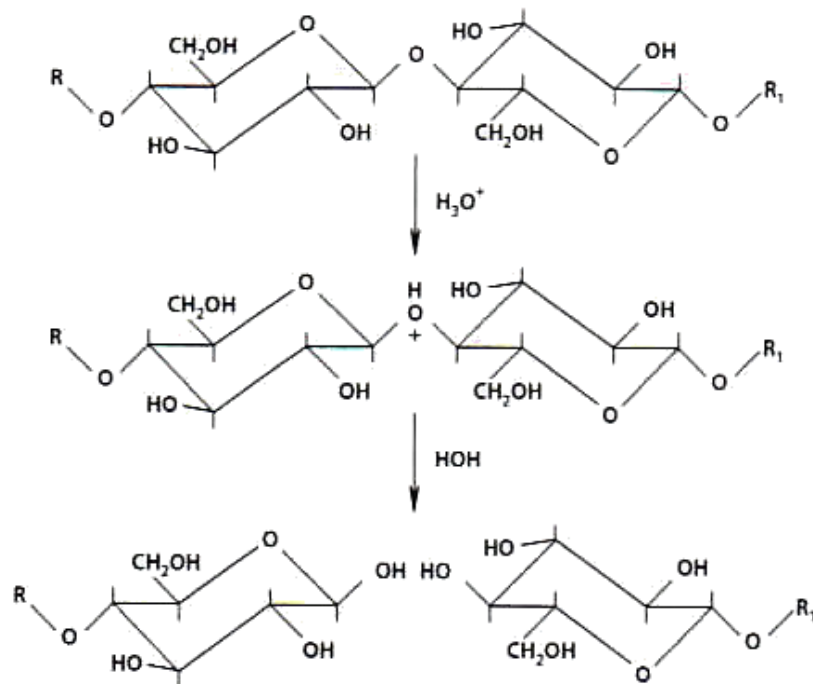
Muita epäorgaanisia mahdollisesti käytettäviä happoja ovat esimerkiksi typpi- ja suolahappo. Suolahapon käytöllä on toisaalta se ongelma, että yhdisteen sisältämä kloori on myrkyllistä ja korrodoi voimakkaasti reaktioastioiden sisäpintoja. Kloori on siis toisin sanoen voimakas hapetin. (Ye & Jiayang, 2002)

Orgaanisista hapoista mainittakoon etikkahappo, muurahaishappo tai maleiinihappo. Tutkimuksissa on todettu epäorgaanisten happojen toimivan orgaanisia happoja paremmin selluloosan esikäsitelyssä. Orgaanisten happojen käytön etuna on kuitenkin se, että ne eivät katalysoi glukoosin hajoamista eikä täten esimerkiksi furfuraaleja tai muita ei-toivottuja yhdisteitä pääse syntymään. Toisaalta jos ajatellaan prosessia pitemmälle, esimerkkinä etanolintuotanto. Siinä (tavallisesti) *S. cerevisiae* -hiiva tuottaa glukoosista etanolia käymisreaktiossa. Etikkahapon läsnäolo suurena pitoisuutena inhiboi merkittävästi tällöin hiivan toimintaa. Sama tapahtuu esimerkiksi maitohapon läsnä ollessa, mutta inhiboitumisreaktio ei ole tällöin aivan yhtä voimakas. (Galbe & Zacchi, 2002)

Kirjallisuudesta löytyy myös tietoa niin sanottujen organosolv-seosten käytöstä selluloosan hydrolysoinnissa. Organosolv-seoksissa on orgaaninen liuotin tai

orgaaninen nestemäinen liuotin (tästä nimi organosolv) sekä epäorgaaninen happokatalyytti. Epäorgaaninen katalyytti voi olla esimerkiksi HCl tai H₂SO₄. (Ye & Jiayang, 2002)

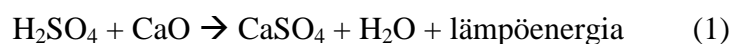
Edellä mainituilla esikäsitteilyllä selluloosan rakenne saadaan osin pilkottua ja samalla turvotettua, jolloin entsyymien toimintaedellytykset paranevat merkittävästi. Korkeiden lämpötilojen (noin 100–200 °C) käyttö on myös oleellista happo- ja alkalihydrolyysin onnistumisen kannalta. Mitä väkevämpää happoa tai alkalia käytetään, sen matalampaa lämpötilaa tarvitaan ja *vice versa*. Optimiolosuhteita ei voida yleistää, vaan ne ovat eri raaka-aineille hivenen erilaiset. (Galbe & Zacchi, 2002; Ye & Jiayang, 2002)



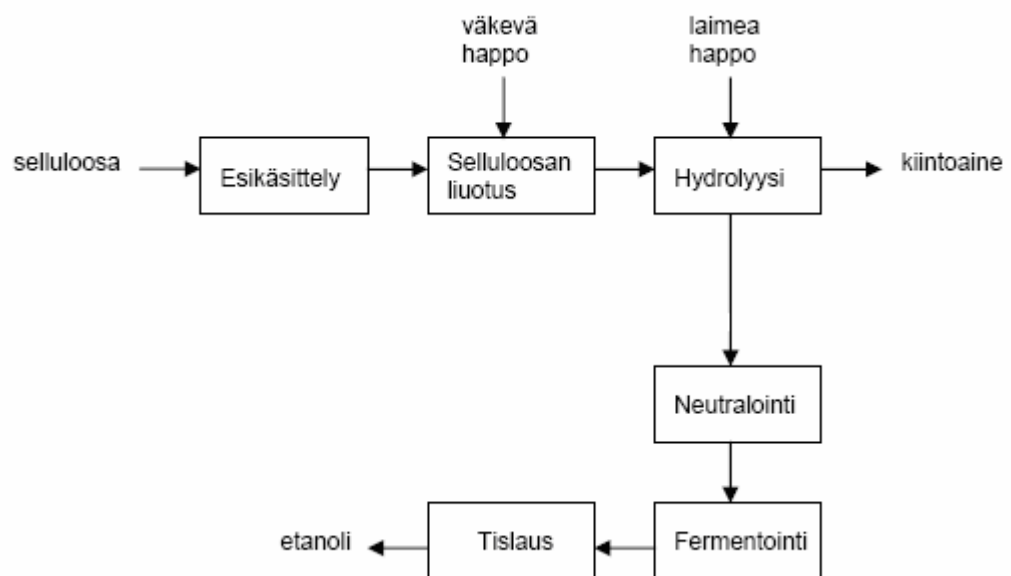
Kuva 12. Polysakkaridien happohydrolyysireaktio. $R_{(1)} = (C_6H_{10}O_5)_n$ (Isotalo, 2004)

Selluloosan happohydrolyysissä voidaan käyttää erilaisia vahvan hapon ja heikon hapon yhdistelmiä. Vahva happo pilkkoo selluloosan glukoosiyksiköiden välisiä vetysidoksia, jolloin selluloosa muuttuu amorfiseksi. Heikko happo hydrolysoi tästä eteenpäin glukoosien välisiä β -1,4-glykosidisia sidoksia, ks. kuva 13. Laimean happokäsittelyn jälkeen hydrolysaatista erotetaan mahdollisesti liukenematon kiintoainne, jonka jälkeen hydrolysaatti neutraloidaan ja fermentoidaan edelleen etanoliksi. Liukenematon

kiintoaine voidaan käyttää esimerkiksi energiantuottamiseen polttamalla. Jos käytetään happona rikkihappoa, voidaan neutralointivaiheessa käyttää neutralointiin esimerkiksi kalsiumoksidia (CaO), joka tunnetaan myös nimellä sammutettu kalkki. Tällöin tapahtuu neutraloitumisreaktio, jossa muodostuu kalsiumsulfaattia ja vettä, ks. kaava 1. Reaktio on voimakkaasti eksoterminen, eli se luovuttaa lämpöenergiaa. Tämän energian talteenotto ja hyödyntäminen on mahdollista ja myös erittäin kannattavaa. (Galbe & Zacchi, 2002; Virtanen, 2006)



Happohydrolyysillä voidaan saavuttaa yli 90 % sokerisaanto selluloosamassasta. Vahva epäorgaaninen happo hajottaa osan syntyneestä glukoosista mm. furfuraaleiksi. Tämän vuoksi 100 % saanto ei ole teoriassa edes mahdollinen. Korkeat saannot vaativat usein vahvan (esimerkiksi 50–70 % H₂SO₄) hapon käyttöä. Vahvan hapon vaikutus ei kuitenkaan välttämättä vaadi korkeaa lämpötilaa tässä tapauksessa. Vahvan hapon käyttö tuo teollista prosessia ajatellen eteen todellisen ongelman: happo täytyy neutraloida seoksesta ja sen talteenotto itsessään on jo hankalaa ja vaatii kalliit asianmukaiset laitteet. Tähän hapon talteenottoon on olemassa joukko erilaisia menetelmiä, esimerkkinä kromatografinen erotus. (Galbe & Zacchi, 2002; Virtanen, 2006)



Kuva 13. Selluloosan käsittely etanolin tuottamiseksi. (Virtanen, 2006)

4.2 Entsymaattinen hydrolyysi

Entsymaattinen hydrolyysi on tällä hetkellä eniten käytetty menetelmä biomassan hydrolysoinnissa maailmassa. Se perustuu sellulaasientsyymeihin ja näiden kykyyn pilkkoa selluloosaa. Lämpötilalla ja pH:lla on suuri merkitys prosessin onnistumisessa, sillä eri sellulaaseilla on erilaiset lämpötila- ja pH-optimit. Tavallisesti sellulaasien lämpötilaoptimit vaihtelevat noin 50 °C:n molemmin puolin, pH-optimin ollessa noin 4–6. (Palonen & Viikari, 2004)

Entsymaattisella hydrolyysillä voidaan saavuttaa hyvin spesifinen selluloosan hydrolyysi, jolloin saanto hydrolysoituvasta osasta on hyvä. Entsyymien spesifisyyden myötä vältetään erilaisten ei-toivottujen yhdisteiden syntyminen. Happohydrolyysiin verrattuna entsymaattinen hydrolyysi on kuitenkin hidas. Toinen merkittävä tekijä on entsyymien kallis hinta. Niiden hinta on kuitenkin laskenut merkittävästi viimeisen 10 vuoden aikana. Entsyymien hinnat ovat pudonneet jopa 90 % 2000-luvun alkuvuosista tähän päivään mennessä. Suurimpia entsyymien tuottajia maailmassa ovat tällä hetkellä Daniscon omistama Genencor sekä Novozymes A/S. (Palonen & Viikari, 2004)

4.3 Entsymaattisen hydrolyysin esikäsittelymenetelmiä

4.3.1 Höyryräjäytys

Ennen entsymaattista hydrolysointia, joudutaan suorittamaan erilaisia esikäsittelyjä, joista happohydrolyysi mainittiin jo edellisessä kappaleessa. Muita esikäsittelymenetelmiä ovat mm. höyryräjäytys, jossa massa voidaan käsitellä hapolla, jonka jälkeen se kuumennetaan noin 180—200 °C:seen kovassa ylipaineessa. Hapon tai muun lisäkemikaalin käyttö ei kuitenkaan ole välttämätöntä. Tämän jälkeen astian paine pudotetaan muutamassa sekunnissa normaaliin ilmanpaineeseen, jolloin massan rakenne ikään kuin ”räjähtää” painenvaihtelun myötä. Samalla massan rakenne hajoaa ja sen pinta-ala kasvaa, jolloin entsyymien tarttumapinta-ala suurenee. (Mosier *et al.*, 2005; Palonen & Viikari, 2004)

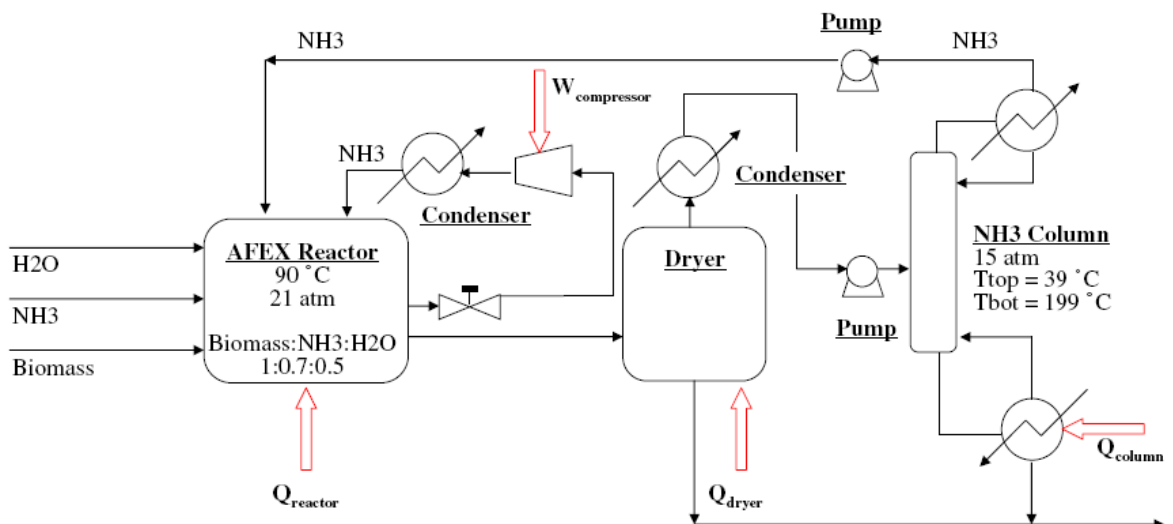
4.3.2 AFEX-käsittely

Eräs toinen räjähdysesikäsitteily on ns. ammoniakkiräjäytys (AFEX-räjäytys). Se on yksi fysikaaliskemiallisista esikäsitteilymenetelmistä. Sitä on kokeiltu mm. lignoselluloosamateriaalin sekä viljarehun hydrolysoinnissa. AFEX-räjäytyksessä lignoselluloosamateriaali käsitellään ammoniakilla ja altistetaan korkeassa lämpötilassa nopealle painenvaihtelulle. Prosessireaktorissa ammoniakki on kontaktissa raaka-aineen kanssa joko kaasuna tai sekoittuneena johonkin nesteeseen, esimerkiksi veteen. Käsiteltävän raaka-aineen partikkelikoko ei ole oleellinen tekijä tehokkaan vaikutuksen kannalta. Periaatteeltaan AFEX-räjäytys muistuttaa paljon höyryräjäytystä. AFEX-räjäytyksessä ammoniakkin annostus on noin 0,3–2,0 kg nestemäistä ammoniakkaa per kilo lignoselluloosamateriaalikuiva-ainetta. Lämpötila käsittelyssä on 70–90 °C, paine yli 20 bar ja käsittelyaika välillä 5–30 min. Menetelmä soveltuu myös yhdyskuntajätteen ja (havupuu)sanomalehtipaperin (*softwood newspaper*) hydrolyysin esikäsitteilymenetelmäksi. Sanomalehtipaperin hydrolyysikokeissa saavutetut lopulliset monomeerisokerisaannot olivat kuitenkin vain noin 40 %, johtuen mm. sanomalehtipaperimassan sisältämästä korkeasta ligniinipitoisuudesta (18–30 %). AFEX-räjäytys ei myöskään liuota hemiselluloosaa yhtä tehokkaasti kuin tavallinen happoesikäsitteily tai höyryräjäytys (hapolla). Prosessissa käytetty ammoniakki pitää kierrättää ympäristön ja prosessin taloudellisuuden takia. (Newton-Sendich *et al.*, 2008; Vlasenco *et al.*, 1997; Ye & Jiayang, 2002)

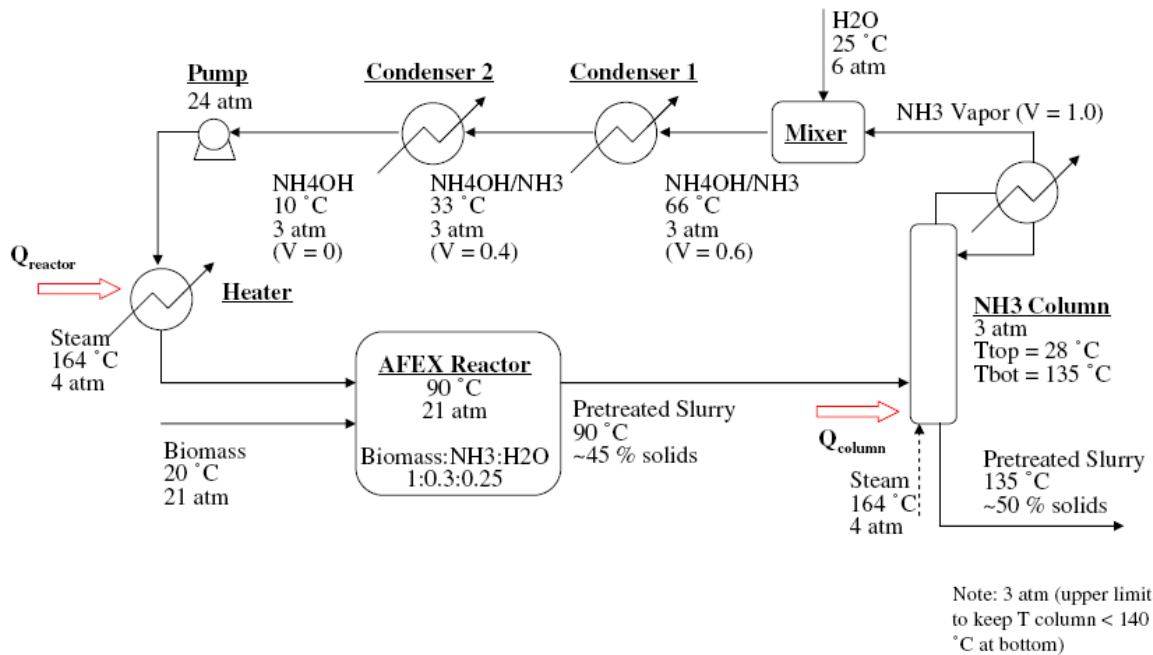
Aivan hiljattain (kevällä 2008) julkistettiin uudet suositukset AFEX-prosessin optimaalisista olosuhteista viljarehulla. Ammoniakin määrä on noin 0,3 kg per 1,0 kg viljarehukuiva-ainetta ja prosessissa kuluva vesimäärä noin 0,25 kg per 1,0 kg viljarehukuiva-ainetta. Samassa raportissa todettiin, että AFEX-menetelmällä bioetanolin tuottaminen lignoselluloosamassasta on nykyään kustannustehokkaampaa kuin aikaisemmin. Etanolin minimimyyntihinta on laskenut 1,41 \$:sta/gallona (2003) 0,81 \$:iin/gallona (2008). Valmistusprosessi on ns. yhdistetty bioprosessointi (CBP) ja entsymaattinen hydrolysointi, jota seuraa fermentointi. Etanolin minimimyyntihinnan laskun syynä ovat kyseisen prosessin uudet prosessiparametrit ja paranneltu

ammoniakin talteenotto prosessi. Kyseinen tutkimus tehtiin viljarehulla (*corn stover*). (Newton-Sendich *et al.*, 2008)

Samassa tutkimuksessa tutkittiin ammoniakin joko täydellistä tai osittaista korvaamista halvemmalla ammoniumhydroksidilla (NH_4OH). Tulokset olivat aiempaa parempia. Parhaimmillaan prosessin glukoosisaantoprosentti vilja-ammoniakki-vesimassasta oli 98,7 % (NH_3 50 % ja NH_4OH 50 %). Tämä tarkoittaa sitä, että maksimietanolisaanto uudella parannellulla AFEX-prosessilla on 295 litraa per tonni viljarehukuiva-ainetta. Aikaisemmalla vanhalla AFEX-käsittelyllä tehdyllä kokeella päästiin vastaavasti glukoosisaantoon 93,0 % (267 l/t ka:ta). Uuden AFEX-käsittelyn parametrit olivat seuraavanlaiset: ammoniakin (ts. ammoniakin ja ammoniumhydroksidiseoksen) määrän suhde biomassan määrään 0,3:1, veden määrä suhteessa biomassan määrään 0,25:1, AFEX-prosessin lämpötila on 90°C ja käsittelyaika 5 min. Uudet tutkimukset myös selvensivät, että AFEX-prosessi soveltuu yhtä hyvin kostealle kuin vähän kuivemmallekin raaka-ainemassalle. Myös reaktorin paineolosuhteilla voidaan vaikuttaa glukoosisaantoon. Reaktoriin lisätty typpikaasu ja sen muodostama ylipaine parantaa glukoosisaantoa, koska typpikaasu estää ammoniakin höyrystymisen joko kokonaan tai merkittävästi. (Newton-Sendich *et al.*, 2008)



Kuva 14. Aiemmin käytetyn AFEX-prosessin osalohkokaavio. Kuvasta näkyy ammoniakin kierto prosessissa ja raaka-aineen käsittely ennen entsyymaattista hydrolyysiä. (Newton-Sendich *et al.*, 2008)



Kuva 15. Uuden parannellun AFEX-käsittelyn osalohkokaavio. Kuvasta selviää raaka-ainemassan käsittely ennen entsyymaattista hydrolyysiä sekä ammoniakki-ammoniakkihydroksidi-seoksen talteenotto ja kierrätys. (Newton-Sendich et al., 2008)

4.3.3 Hiilidioksidiräjätys

Hiilidioksidiräjätys on myös eräs lignoselluloosamateriaalin hydrolyysiprosessissa käytetyistä esikäsittelymenetelmistä. Se perustuu muiden räjäytysmenetelmien tapaan nopeaan paineenlaskuun. Annosmääränä hiilidioksidia on muutamia kiloja per kilo lignoselluloosamateriaalikuiva-ainetta. Prosessin aikana paine voi olla jopa 300 baaria. Lignoselluloosamateriaalien tutkimuksissa on todettu, että suuri paine on kriittinen hiilidioksidiräjätöksessä, mutta liian suuri paine voi vaikuttaa negatiivisesti hydrolyysiin. Lopulliset monomeerisokerisaannot lignoselluloosamateriaaleista ovat olleet tavallisesti pienempiä CO₂-räjäytyksellä kuin AFEX- tai höyryräjäytyksellä saadut. Kuitenkin CO₂-räjäytyksen on todettu olevan taloudellisesti parempi vaihtoehto kierrätyspaperiraaka-aineelle kuin AFEX- tai höyryräjäytys. Syynä tähän on se, että CO₂-räjäytyksessä ei muodostu niin helposti inhiboivia yhdisteitä. Hiilidioksidiräjätöksellä on tehty kokeita mm. lignoselluloosamateriaaleilla (haapa ja keltamänty). (Kim & Hong, 2001; Ye & Jiayang, 2002; Zheng et al., 1998)

4.3.4 Mikroaalto- ja ultraäänikäsitteily sekä biologinen esikäsitteily

Autoklaavin sijaan on mahdollista käyttää myös mikroaaltoja tuottamaan tarpeeksi lämpöä, jotta esikäsitteily onnistuu. Maailmalla tutkimuksissa käytetäänkin jo mikroaaltouuneja eri analyysien esikäsitteilyvaiheissa. Samoin ultraääntä on hyödynnetty biomassan esikäsitteilyssä. Ultraäänikäsitteily katalysoi entsyymien kykyä hydrolysoida selluloosaa. Voimakkaalla, lyhytkestoisella ultraäänikäsitteilyllä on todettu olevan vaikutusta selluloosan rakenteen hajoamiseen. (Linde *et al.*, 2008)

Biologisella esikäsitteilyllä tarkoitetaan (ligno)selluloosamassan käsitteilyä biologisesti mikrobeilla tai muilla mikro-organismeilla. Jotkut mikro-organismit kykenevät hajottamaan ainoastaan selluloosaa ja toiset sekä selluloosaa että ligniiniä. Lignoselluloosan tehokkaimpia hajottajia ovat valkolahottajasienet, jotka tuottavat ligniiniä hajottavaa ligniiniperoksidaasia. Kyseinen oksidaasi on tehokas lignoselluloosan hajottaja. Esimerkkinä kyseisen valkolahottajasienisuvun mikrobista on *Phanerochaete chrysosporium* -home. Muita hajottajaorganismeja ovat ruskolahottaja- ja ns. soft rot -hajottajasienet. (Ye & Jiayang, 2002)

4.4 SHF (*separated hydrolysis and fermentation*)

SHF:llä tarkoitetaan erillistä hydrolysointi- ja fermentointiprosessia. Prosessia voisi myös kuvailla panostoisiksi prosesseiksi. Siinä (ligno)selluloosapohjaisesta materiaalista tuotetaan ensin esikäsitteilyvaiheessa käymiskelpoisia sokereita. Esikäsitteily voi olla joko yhdistetty happo ja/tai alkaliesikäsitteily ja entsyymattainen hydrolyysikäsitteily tai vain pelkästään entsyymattainen hydrolyysikäsitteily. Esikäsitteily suoritetaan eri astiassa kuin varsinainen fermentointi. Tämä lisää tuotantokustannuksia, ja prosessi vaatii liuosten siirtoon käytettäviä laitteita. Liuosten siirtämisessä astiasta toiseen on otettava huomioon mahdollinen kontaminaatoriski. (Miettinen, 1995; Öhgren *et al.*, 2007)

SHF:n todellinen etu on se, että raaka-aineen hydrolysointi ja sitä seuraava fermentointi voidaan kumpikin suorittaa optimaalisissa olosuhteissa. Usein esimerkiksi

entsyymäattisen hydrolyysin optimilämpötila on välillä 50–65 °C, kun fermentoinnissa se on noin 30–32 °C (*S. cerevisiae* optimilämpötila). pH:lla ei ole juurikaan merkitystä entsyymäattisen hydrolyysin ja fermentoinnin välillä tässä tapauksessa. SHF on usein lignoselluloosamateriaalista puhuttaessa saannoltaan hieman SSF:ää huonompi. Itse hydrolyysi myös vaikeutuu samalla kun liuoksen sokeripitoisuus kasvaa, koska esimerkiksi glukoosi inhiboi tiettyjen sellulaasien, esimerkiksi endoglukanaasien ja sellobiohydrolaasien, toimintaa. (Miettinen, 1995; Öhgren *et al.*, 2007)

4.5 SSF (*simultaneous saccharification and fermentation*)

SSF:n lyhenne tulee sanoista *simultaneous saccharification and fermentation*, ja sillä tarkoitetaan integroitua sakkarifikaatio- ja fermentointiprosessia. Sakkarifikaatiolla tarkoitetaan selluloosan tai muun biomassan sokerointiprosessia, jossa pitkät glukoosiketjut katkotaan joko entsyymäattisesti tai eri hydrolyysimenetelmillä lyhyemmiksi mono- di- tri- ja oligomeereiksi. Fermentoinnilla näistä lopputuotteista tuotetaan etanolia. (Nörgård, 2005)

Fermentointi tapahtuu samassa astiassa yhdessä sakkarifikaation kanssa. Prosessi voi olla periaatteessa myös jatkuvatoiminen, jossa esimerkiksi prosessiastian painetta alentamalla ja lämpötilaa hieman nostamalla saadaan fermentoinnissa syntynyt etanoli poistettua reaktioastiasta, jotta lopputuoteinhibitio (glukoosi) estyy. Etanolin poisto muilla tavoin toteutetaan esimerkiksi fermentointiliuosta tislaamalla tai adsorptiota hyödyntämällä. Tislaus perustuu erotettavien aineiden erilaisiin höyrynpaineisiin ja sitä kautta erilaisiin kiehumispisteisiin. Etanolin kiehumispiste normaali-ilmanpaineessa on 78,37 °C. Adsorptio perustuu fysikaaliseen ilmiöön, jossa neste tai kaasu muodostaa ohuen kalvon kiinteän tai nestemäisen aineen (adsorbentin) pintaan, josta se voidaan erottaa. (Nörgård, 2005; Perry & Green, 2007)

Astiassa oleva mikrobi, useimmiten *S. cerevisiae* -hiiva, tuottaa samanaikaisesti glukoosista etanolia kun biomassan rakenne katkeaa lyhyemmiksi glukoosiyksiköiksi sellulaasien vaikutuksesta. Samalla syntyy hiilidioksidia. *S. cerevisiae* takia SSF:n prosessilämpötila pidetään alle 35 °C:ssa, mieluiten 30 °C:ssa. 35 °C alkaa olla *S.*

cerevisiae lämpötilan suhteen yläkipuraja. Lämpötilan ylittäessä 40 °C, *S. cerevisiae* normaalisti kuolee. Tuorehiiva kuolee myös noin yli 15 prosentin etanolipitoisuudessa. Tämän vuoksi on tärkeää saada etanoli poistettua reaktioastiassa tarpeeksi ajoissa. (Nörgård, 2005; Virtanen, 2006)

Selluloosasta puhuttaessa lämpötilojen suhteen ei kyetä optimoimaan SSF:n molempia osaprosesseja, koska sakkarifikaatioon osallistuvien entsyymien optimilämpötila on usein 50–65 °C:een välillä. Tavallisen tuorehiivan käyttö siis estää korkeampien lämpötilojen käyttöä SSF-prosessissa. Tähän voisi olla ratkaisuna esimerkiksi geenimuunnellut käymismikrobit. Toisaalta esimerkiksi tärkkelyksen hydrolyysiin käytetään nykyään tiettyjä entsyymejä tai yhdistelmäentsyymejä, jotka pystyvät toimimaan hiivan optimilämpötilassa täysin moitteetta. Tällöin on kyse tehokkaasta SSF:stä. (Nörgård, 2005; Virtanen, 2006)

Prosessiastian tulee olla ilmatiivis ja vapaa haittamikrobeista, jotta ei-toivottuja yhdisteitä ei pääse syntymään. Normaalina toimenpiteenä astiaan syötettävät ravinneliuoksetkin autoklavoidaan, jotta mikrobikontaminaatio estyisi. Prosessin yhtenä suurena etuna pidetäänkin sitä, että liuokseen ei ehdi kertyä suuria määriä glukoosia, joka inhiboi entsyymäattista hydrolyysiä, mm. endoglukanaasien toimintaa häiritsemällä. (Nörgård, 2005)

Verrattaessa SHF:ää ja SSF:ää on todettu, että SSF:llä päästään suurempiin saantoihin ja parempaan tuottavuuteen. Jos tuottavuus on kaksi kertaa parempi, voidaan reaktorin koko pienentää puoleen, jolloin saanto on sama. Toisaalta kontaminaatoriskin takia SSF-prosessia voi olla vaikea ajaa jatkuvatoimisena suuressa mittakaavassa. Toinen ongelma on entsyymejä tuottavan hiivan ja mahdollisesti liukenemattoman ligniinin erottaminen toisistaan lignoselluloosan käsittelyprosessissa. Mikäli hiivaa ei saada kierrätettyä, joudutaan jokaiseen ajoon laittamaan uusi hiivasiirrote, jolloin tuotantokustannukset kasvavat. Näin hiiva ei myöskään saa mahdollisuutta sopeutua väliaineeseen (substraattiin). Hiivan sopeutuminen olisi välttämätöntä, jotta se oppisi kestämään paremmin prosessin aikana muodostuvia inhiboivia sivutuotteita. (Stenberg *et al.*, 2000)

5 Kokeellinen osa

5.1 Näytteet

Kokeissa oli mukana kuitumassaa, joka oli kulkenut viisi kertaa paperinvalmistusprosessin läpi alusta loppuun, eli sen selluloosakuidut olivat lyhentyneet merkittävästi. Kyseinen massa ei tämän vuoksi enää soveltunut uudelleenkierrätettäväksi, koska selluloosakuitujen lyhyydestä johtuen paperin valmistus olisi ollut erittäin vaikeaa, jopa mahdotonta. Massa oli vetistä ja valkoista massaa, jonka kuiva-ainepitoisuudeksi saatiin 9,5 % ja tuhkapitoisuudeksi 7,5 % kuiva-aineesta. Kuidun täsmällistä koostumusta ei ollut tiedossa, eikä kyseistä analyysiä tehty. Tutkimuksessa oletettiin kuidun olevan puhdasta selluloosaa. Kuitumassanäytteen juuri täsmällinen näytteenottoaika ei myöskään ollut tiedossa. Tästä eteenpäin kyseinen kuitu merkitään KUIDUKSI 1.

Toisen kokeissa mukana olleen kuitumassan koostumus oli seuraavanlainen: siistaamorejekti 45,0 %, hiertämö/paperikonerejekti 30,0 %, bioliete 5,0 % ja esiselkeyttimen pohjaliete 20,0 %. Kuitumassan kuiva-ainepitoisuudeksi saatiin 49,9 % ja tuhkapitoisuudeksi 16,0 % kuiva-aineesta. Kuiva-aineesta orgaanisen massan osuus oli 65,0 %. Kuitumassa sisälsi pieniä puulastuja, joiden alkuperää on vaikea lähteä arvioimaan. Täysin tarkkaa näytteenotopistettä kuitumassalle ei ole tiedossa. Tästä eteenpäin merkitään kyseinen kuitu KUIDUKSI 2.

Sanalla ”rejekti” tarkoitetaan paperimassan eri lajitteluvaiheissa erotettua hylättyä massaa. Se on siis paperinvalmistuksen kannalta jätettä. Siistaamorejektiä syntyy painovärin vaahdotuksessa (eniten), pulpperointirummussa, lajittelussa ja veden käsittelyssä. Normaalisti siistaamorejekti kuivataan puristamalla noin 40 prosentin kuiva-ainepitoisuuteen ja viedään suoraan kaatopaikalle. (Seppälä *et al.*, 2001)

Viimeinen näyte oli otettu siistaamon jätevedenpuhdistamon suotonauhapuristimelta. Näyte oli siistauslietettä, jonka kosteusprosentti oli noin 85,0 %. Sen kuiva-aineesta oli 20,0 % tuhkaa, 50,0 % epäorgaanista ainesta ja 50,0 % orgaanista ainesta, lähinnä lyhyttä paperikuitua. Epäorgaaninen aine oli kaoliinia, savea, PCC:tä ja painomustetta

sekä jotain muuta epämääräistä ainetta. Tarkempia tutkimuksia tuon ”epämääräisen aineen” kohdalla ei suoritettu, vaan tieto saatiin toimituksen yhteydessä itse tehtaalta. Tästä eteenpäin merkitään kyseistä näytettä LIEJUKSI.

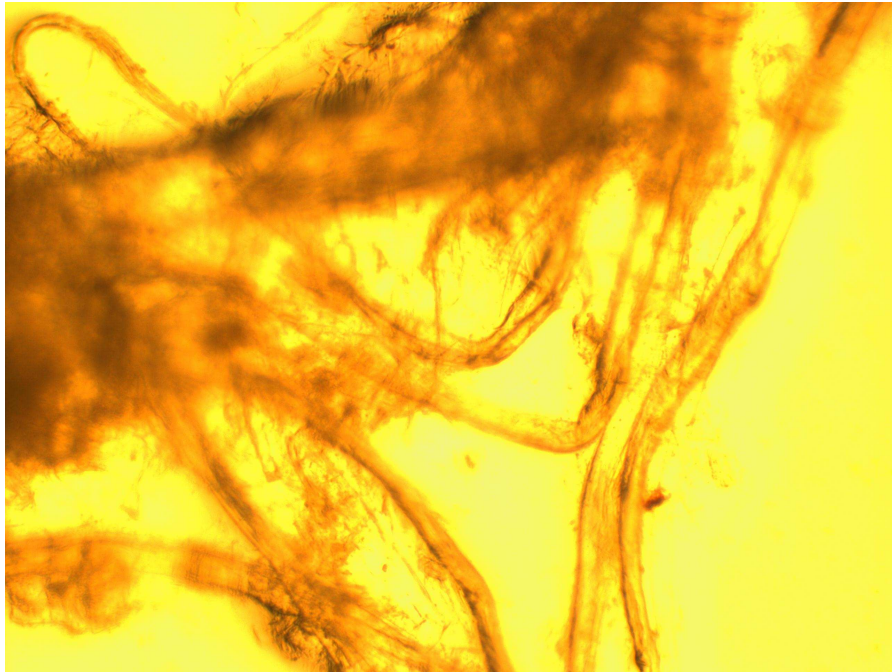
Kuiva-ainemääritykset tehtiin uunikosteutena uunissa sekä infrapunavaa’alla. Esikäsitelyreagensseina kokeissa käytettiin rikkihappoa, natriumhydroksidi-rikkihappoyhdistelmää sekä etanoli-etikkahapposeosta.

5.2 Kokeiden suoritus

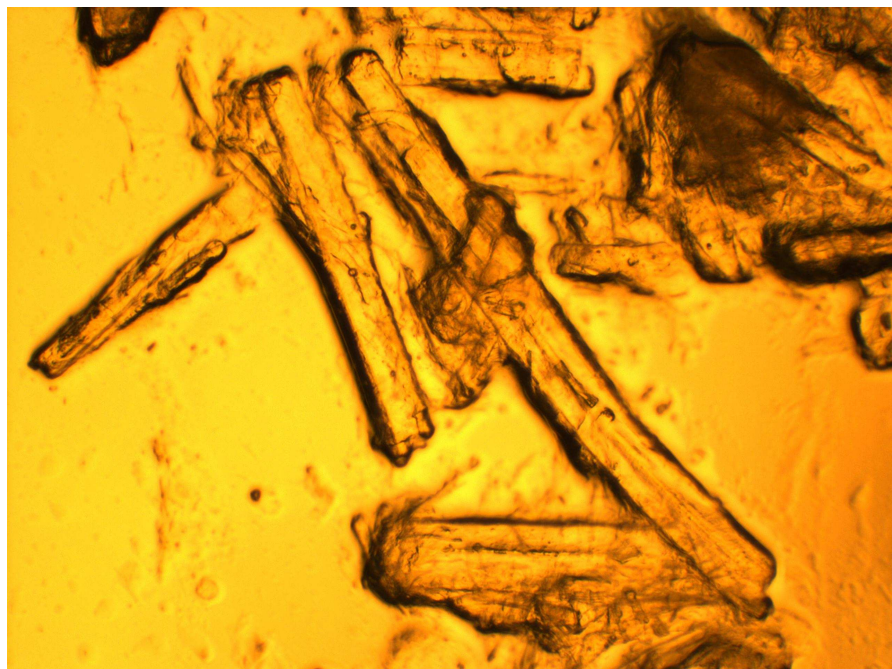
Lyhykäisydessään kokeiden suoritus noudatti seuraavaa kaavaa: happo- ja/tai alkaliesikäsitely autoklaavissa (ts. happo- tai alkalihydrolyysi) → sakan neutralointi (suodatus imusuodatuksena + pesu) → entsymaattinen hydrolyysi puskuriliuoksessa optimaalisissa olosuhteissa → muodostuvien pelkistävien sokereiden analysointi spektrofotometrisesti (DNS-analyysi).

5.2.1 Rikkihappoesikäsitely

Kokeiden tarkoituksena oli kokeilla erivahvuisten rikkihappoliuosten vaikutusta selluloosakuituun esikäsitelyvaiheen aikana. Oletuksena oli, että epäorgaaninen rikkihappo pilkkoo ja turvottaa selluloosakuituketjuja esikäsitelyn aikana ja samalla helpottaa tulevaa entsymaattista hydrolyysiä. Esikäsitely suoritettiin autoklaavissa, jossa lämpötila nostettiin 121 °C:seen ja käsittelyajaksi valittiin 20 min. Schott-pullojen korkit olivat autoklaavissa vain löyhästi kiinni siellä tapahtuvien paineenvaihteluiden takia. Käytettyjen rikkihappoliuosten vahvuudet olivat 1-, 5- tai 10-tilavuusprosenttia. Ohessa on esikäsittelemättömän ja 10-tilavuusprosenttisella H₂SO₄-liuoksella käsitellyn kuitu 1:n mikroskooppikuvat. Mikroskopoinnissa on käytetty 100-kertaista suurennosta. Rikkihappokäsittely on suoritettu autoklaavissa. Kuten kuvista 16 ja 17 nähdään, on rikkihappo pilkkonut selvästi kuidun rakennetta.



Kuva 16. Esikäsittelemättömän kuitu 1:n mikroskooppikuva.



Kuva 17. 10-tilavuusprosenttisella H_2SO_4 -liuoksella käsitellyn kuitu 1:n mikroskooppikuva.

Kuiva-ainemääritys

Kokeiden aikana suoritettiin näytteistä kuiva-ainemäärityksiä. Määritys tehtiin uunikosteutena, jossa punnittiin näytettä taarattuun lasiastiaan. Näyteastia laitettiin vuorokaudeksi (24 h) uuniin 105 °C:seen. Tämän jälkeen näyteastia punnittiin ja erotuksen avulla laskettiin näytteen sisältämä kuiva-ainepitoisuus.

Toinen käytetty kuiva-aineen määritysmenetelmä oli IR-kuivaus. Tätä menetelmää käytettiin muutaman kerran, lähinnä toimimaan ikään kuin rinnakkaisanalyysinä uunikosteudelle. IR-analyysi perustuu infrapunasäteisiin, jotka haihduttavat kaiken vapaan veden näytteestä. Analyysilaitteisto koostui IR-kuivaimesta (Mettler LP16), joka oli yhdistetty vaakaan (Mettler PM100).

Tuhkapitoisuuden määrittäminen

Sekä kuitunäytteistä että liejunäytteistä määritettiin myös tuhkapitoisuus. Tuhkapitoisuus kuvaa näytteen sisältämän epäorgaanisen aineksen määrää. Määritys suoritettiin Opetushallituksen julkaisemalla menetelmällä. Menetelmä soveltuu mm. selluloosapitoisten materiaalien tuhkapitoisuuden määrittämiin. Määritys suoritettiin muhveliuunissa. Astioina käytettiin keraamisia kuppeja, joita esikuumennettiin painon vakioimiseksi muhveliuunissa puolen tunnin ajan 600 °C:ssa ennen varsinaista käsittelyä. Vakioimisen jälkeen astiat punnittiin ilman näytettä ja näytteen kera. Punnituksen jälkeen astiat laitettiin takaisin muhveliuuniin. Uunin lämpötila pidettiin 600 °C:ssa koko määrittämisen ajan. Käsittelyaika oli 3 tuntia. Kuumennuksen jälkeen näyteastiat siirrettiin välittömästi eksikkaattoriin jäähtymään ennen lopullista punnitusta, joka tehtiin heti astioiden jäähtytyä. Erotuksen avulla saatiin määritettyä näytteen tuhkapitoisuus. (Selluloosan tuhkapitoisuus 2008)

Autoklavointi

Alkuperäisistä kuitu- ja liejunäytteistä punnittiin tasan 5,0 g kuiva-ainetta 200 ml:n tiiviskorkillisiin Schott-pulloihin. Poikkeuksena ensimmäinen koesarja, jossa kuiva-

ainepitoisuus oli 10,0 g. Tämän jälkeen pulloihin lisättiin tasan 100 ml rikkihappoa, jonka vahvuus oli joko 1-, 5- tai 10-tilavuusprosenttia. Pulloa sekoitettiin muutaman kerran, jotta näyte sekoittuisi kauttaaltaan rikkihappoliuokseen. Lopuksi pulloit laitettiin autoklaaviin, korkit vain löyhästi kiinni kierrettyinä autoklaavissa vallitsevien painenvaihteluiden takia. Autoklaavin lämpötilaksi asetettiin 121 °C ja käsittelyajaksi 20 min. Autoklavoinnin aikana happo hydrolysoi näytteiden selluloosaketjuja muodostaen mono-, di-, tri- ja oligosakkarideja. Samalla selluloosan rakenne turpoaa, mikä helpottaa myöhempää entsymaattista hydrolysointia.

Autoklavoitujen näytteiden suodatus

Autoklaavikäsittelyn jälkeen pullojen annettiin jäähtyä noin 50 °C:seen, jonka jälkeen rikkihappo pestiin tislatulla vedellä pois seoksesta. Tämä suoritettiin imusuodatuksena keraamisen sintterin ja siinä olevan suodatinpaperin avulla. Suodatinpaperina käytettiin kudottua polypropeenikangasta, jota käytetään mm. rumpusuodattimessa. Seos siirrettiin Schott-pullosta keraamiselle sintterille, jossa se neutraloitiin huuhtelemalla sitä tislatulla vedellä. Pesuveden määrä huomioitiin suodoksen lopullisessa tilavuudessa. Suodokset otettiin talteen ja niiden DNS- ja kuiva-ainepitoisuudet määritettiin myöhemmin.

5.2.2 Entsymaattinen hydrolyysi

Suodatuksen yhteydessä talteen otetut sakat laitettiin puhtaisiin 200 ml:n Schott-pulloihin. Sakan pH tarkistettiin aluksi pH-paperilla. Hydrolyysin onnistumisen kannalta oli tärkeää, että puhdistetun sakan pH oli pesun jälkeen noin 7. Tämän jälkeen pulloihin laitettiin natriumasetaattipuskuria, jonka pH oli 5. Puskuriliuoksen pH:n oikea arvo oli tärkeää käytettävien entsyymien takia. Liian korkea tai matala pH-arvo inaktivoisi entsyymit. Puskuriliuoksen lisäyksen jälkeen Schott-pulloihin laitettiin tarvittavat entsyymit. Lopuksi pulloja sekoitettiin hieman, minkä jälkeen otettiin ns. nolla-näyte. Nollanäytteen avulla määritettiin ajan hetkellä nolla ($t(0)$) olevien pelkistävien sokereiden pitoisuudet liuoksissa DNS-määrityksessä. Muutaman kokeen

jälkeen huomattiin ajan hetkellä nolla ($t(0)$) olevien pelkistävien sokereiden pitoisuuksien olevan aina ”nolla”, joten siitä eteenpäin lopetettiin nollanäytteen otto ja otaksuttiin näin olevan kaikissa kokeissa. Teoriassa nollanäytteen absorbanssi ja siitä edelleen laskettava pelkistävien sokereiden pitoisuus ei ole koskaan nolla, vaan se riippuu DNS-standardisuoran arvoista, ks. kohta *DNS-standardisuora*. Lopulta pullo vietiin tasoravistelijaan, jonka lämpötila oli säädetty 45 °C:seen. Näytteitä otettiin vaihtelevin väliajoin Eppendorf-putkiin, jotka kuumennettiin 80 °C:seen ja pidettiin tässä lämpötilassa vähintään 10 min, jolloin entsyymireaktio pysähtyi. Tämän jälkeen Eppendorf-putket fuugattiin sentrifugilla (kierrosnopeus 10 000 kierrosta/min) ja vietiin säilöön. Näytteitä säilytettiin kylmiössä, jonka lämpötila oli 4 °C. DNS-analyysit suoritettiin varastoiduista näytteistä kootusti 5 päivän sisällä näytteenotosta. DNS-analyysiin otettiin näyte fuugatun Eppendorf-putken supernatanttiosasta.

Kokeissa käytetyt entsyymit

Entsyyttisissä hydrolyysikokeissa oli mukana kolme eri entsyymiä: Novozyme A/S:n valmistama *T. reesei* -homeen tuottama sellulaasi Celluclast[®], Novozyme A/S:n valmistama *A. niger* -homeen tuottama sellobiaasi Novozyme 188 sekä Genencorin[®] valmistama *T. reesei* -homeen tuottama sellulaasi GC 220. Kokeissa käytetyt entsyymit näkyvät tulostaulukoiden yhteydessä.

5.2.3 Etanoli-etikkahappoesikäsittely

Eräissä kokeissa käytettiin etanoli-etikkahapposeosta rikkihapon sijaan kuitujen esikäsittelyssä. Ideana oli se, että etanoli turvottaisi kuitunäytteiden selluloosaketjuja ja etikkahappo katkoisi niitä. Orgaaninen etikkahappo on luontoystävällisempi happo kuin epäorgaaninen rikkihappo. Orgaanisia happoja käytettäessä ei sokereista myöskään muodostu haitallisia furfuraaleja tai HMF:ää tms. Teollista tuotantoa ajatellen etanoli saataisiin käyttöön suoraan lopputuotteesta (otaksuen, että syntyneet sokerit fermentoitaisiin edelleen etanoliksi). Kokeissa kokeiltiin esikäsittelyissä yhdistelmiä 50 ml etanolia ja 5 ml etikkahappoa sekä 50 ml etanolia ja 20 ml etikkahappoa. Etanoli oli

puhdasta, eli noin 99,5 massaprosenttista *spiritus fortista* (valmistaja Altia Oy, luokka Aa) ja etikkahappo vastaavasti 99,6 massaprosenttista. Esikäsitteilyt tehtiin autoklaavin sijasta uunissa. Tarkoitus oli ylläpitää esikäsitteilyä 24 tunnin ajan. Uunin lämpötila oli 105 °C. Kokeet tehtiin 500 ml:n Schott-pulloissa, joiden korkkien ja pullonsuiden väliin laitettiin kumitiiviste estämään etanolin haihtumista. Etanolin kiehumispiste on 78,37 °C ja etikkahapon vastaavasti 118,10 °C normaali-ilmanpaineessa. Koe onnistui osittain, koska osasta koepulloista olivat korkit auenneet (alun perin koepulloja oli 6 kpl). Tällaista uunikäsittelyä ei täten suositella tehtäväksi Schott-pulloilla, joiden korkit ovat kiinni. Syynä ovat juuri eri aineiden olomuodonmuutoksista johtuvat paineenvaihtelut ja siitä syntyvät astioiden räjähdysvaarat. Tällaiset kokeet vaativat asianmukaisia painepulloja, jolloin kokeiden suorittaminen olisi turvallista. (Perry & Green, 2007)

Refluksointi

Uunin käytölle etanoli-etikkahappokokeen esikäsitteilyvaiheessa kokeiltiin korvaavana menetelmänä refluksointia. Käytetty refluksointilaitteisto näkyy kuvasta 18. Refluksoinnissa kuumennettiin kuitunäyte-etanoli-etikkahapposeosta pyörökolvissa, jolloin etanoli alkoi haihtua. Haihde jäähdytettiin pystyjäähdyttimellä jääkylmällä vedellä. Veden kiertosuunta oli alhaalta ylöspäin, jolloin kylmin vesi kohtasi kuumimman haihteen heti pystykolonnin alkupäässä. Haihde tiivistyi kolonnissa, josta se valui takaisin kolviin. Lämmitys suoritettiin sähkölämmittimellä, jonka lämpötila pidettiin noin 100 °C:ssa. Lämpötilan tarkka säätö ja seuranta ei ollut mahdollista, johtuen sähkölämmittimen rajallisista säätöominaisuuksista. 100 °C:n lämpötilassa etikkahappo ei vielä höyrysty, mutta etanoli kylläkin. Näytettä refluksoitiin yhteensä 4 tuntia.



Kuva 18. Refluksointilaitteisto.

Kuitumassan mekaaninen hajotus

Kokeen tarkoitus oli testata kuitumassan mekaanisen hajotuksen sekä refluksoinnin vaikutusta lopulliseen pelkistävien sokereiden pitoisuuteen. Refluksointi toimi uunin sijaan esikäsitteilymenetelmänä. Mekaaninen hajotus suoritettiin T25 Ultra Turraxilla (Janke & Kunkel IKA[®], Saksa). Laite soveltuu pienen mittakaavan mekaanisiin hajotustoimenpiteisiin. Laite on kooltaan hieman tavallista sauvasekoitinta kookkaampi, ja sen kierroslukumäärät vaihtelevat välillä 8000–24 000 kierrosta/min. Molempien näytteiden kohdalla Ultra Turrax -käsittely kesti 2 min. Näytteenä oli kuitu 1 ja se laitettiin etanoli-etikkahapposeokseen, jossa oli 50 ml etanolia sekä 20 ml etikkahappoa. Refluksointiaika oli 4 tuntia. Kuiva-ainepitoisuudet olivat kokeissa seuraavat: kuitu 1 koepulloissa 5,0 g (= 71,4 g/l) ja kuitu 2 koepulloissa 10,0 g (= 142,8 g/l). Erilaisen lopputilavuuden (= 70 ml) takia myös litrapitoisuudet olivat hieman erilaiset.

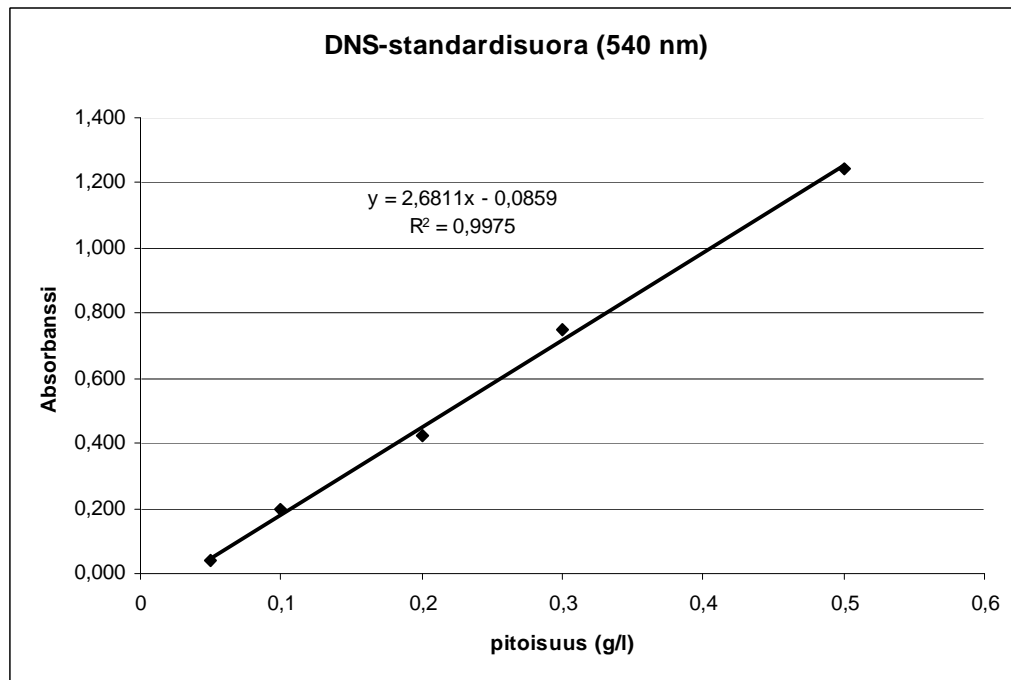
Refluksoinnin jälkeen näyte pestiin tislatulla vedellä suodattamalla ennen entsyymaattista hydrolyysiä. Entsyymiannoksina käytettiin 10-kertaisia määriä eli Celluclast[®] 9 ml/näyte ja Novozyme 188 2,4 ml/näyte. GC 220:n annostus oli 20-kertainen eli edelleen 56 µl/5,0 g kuiva-ainetta.

5.2.4 Natriumhydroksidi-rikkihappoesikäsittely

Kuitujen entsyymaattisen hydrolyysin yhtenä esikäsittelymenetelmänä kokeiltiin alkalien ja hapon yhtenäistä vaikutusta selluloosanäytteeseen. Ideana oli se, että alkalilla (natriumhydroksidilla) käsitelty kuitu hajoaisi tehokkaammin alkalikäsittelyä seuraavassa happokäsittelyssä (rikkihappo). Kokeissa käytettiin 1-tilavuusprosenttista NaOH-liuosta ja 5-tilavuusprosenttista H₂SO₄-liuosta. Alkalien odotettiin esiturvottavan kuitujen rakennetta, jolloin happokäsittelyn aikainen kuitujen katkeaminen helpottuisi. Myös happokäsittely turvottaa kuitujen rakennetta. Molemmat esikäsittelyt suoritettiin autoklaavissa, jonka lämpötila säädettiin 121 °C:seen. Käsittelyaika kummallakin esikäsittelyllä oli 1 tunti. Esikäsittelyjen välissä kuitumassa pestiin tislatulla vedellä ja suodatettiin lasikuitusinterillä alipainetta hyväksikäyttäen. Pesuvaiheessa sakasta ei erottunut juurikaan kiinteitä partikkeleita suodokseen. Happohydrolyysin jälkeen pesty sakka laitettiin edelleen entsyymaattiseen hydrolyysiin natriumasetaatipuskuriliuoksessa.

DNS-standardisuora

Pelkistävien sokereiden pitoisuuden määrittämiseksi tehtiin DNS-standardisuora. Suora tehtiin VTT:n menetelmäohjeen mukaan. Suoran määrittämisessä sokerina käytettiin glukoosia. Standardisuoraksi saatiin kuvan 19 mukainen kuvaaja. Y-akselilla on absorbanssi ja x-akselilla sokeristandardin sokeripitoisuus. Suoran (= *trend line*) R²-arvoksi saatiin 0,9975, joten suoran avulla määritettyjä tuloksia voidaan pitää luotettavana. Spektrofotometrin aallonpituutena oli 540 nm. (Bailey, 2000)



Kuva 19. DNS-standardisuora.

Saatu kuvaaja oli periaatteessa vain suuntaa-antava, koska se muuttui hieman jokaisella määrityskerralla, johtuen mm. kokeessa käytettävästä DNS-reagenssista sekä marginaalisesti muuttuvasta keittoajasta ja -lämpötilasta. Muutos ei tosin ollut koskaan suuri, eikä täten mitenkään tässä tapauksessa merkittävä. Tämän vuoksi kuitenkin DNS-määrityksissä otettiin mukaan muutama standardinäyte, esimerkiksi 0,1 g/l ja 0,3 g/l glukoosia sisältävät liuokset, ja verrattiin niitä yllä olevaan standardisuoraan. Niiden avulla mahdollisesti korjattiin suoran antamia tuloksia. Tulevassa tulososassa näiden korjaavien standardinäytteiden tuloksia ei ole kuitenkaan ilmoitettu.

5.2.5 Kokonaishiilihydraattipitoisuuden määrittäminen

Kokonaishiilihydraattipitoisuuden määrittäminen suoritettiin NREL:n standardoimalla menetelmällä. Määrittäminen tehtiin sekä kuidulla 1 että kuidulla 2. Määrittäminen ei välttämättä sovellu näytteille, joiden tuhkapitoisuus on yli 10,0 %. Kuitu 2:n kohdalla täytyy siis olla kriittinen tuloksen suhteen, sillä kuitumassan tuhkapitoisuus oli 32,0 %. Määrittävien näytteiden on oltava myös kosteuspitoisuudeltaan alle 10,0 %. Kosteiden näytteiden kuivaus tuli suorittaa ≤ 40 °C:n lämpötilassa, jotta välttyttäisiin

hiilihydraattien ylimääräisiltä saantomenetyksiltä. Kuitu 1 ja kuitu 2 kuivattiin 38 °C:ssa 48 h ennen analysointia. Kuivauksen jälkeen näytteitä säilytettiin tiiviissä muovipullossa kylmiössä, jonka lämpötila oli 4 °C. Molempien näytteiden kuiva-ainepitoisuus määritettiin tämän jälkeen IR-kuivaimella.

Kokonaishiilihydraattimäärityksessä käytettiin kovaa painetta ja korkeita lämpötiloja kestäviä näyteputkia (= *pressure tubes*), joiden tilavuus oli 120 ml (valmistaja Laborex Oy, Suomi). Autoklavoinnin aikana putket olivat korkit kiinni kierrettyinä koko ajan, jotta reagenssien haihtuminen saatiin estettyä kokonaan. Alussa näytettä punnittiin $300 \pm 10,0$ mg näyteputkeen ja siihen lisättiin $3,00 \pm 0,01$ ml 72-tilavuusprosenttista rikkihappoa. Tämän jälkeen näytteitä inkuboitiin vesihauteessa 30 ± 3 °C:n lämpötilassa 60 ± 5 minuuttia välillä lasisauvalla sekoittaen. Sekoitettaessa putkien tuli olla koko ajan vesihauteessa ja sekoitus tuli suorittaa varovaisesti, jotta näyteliuos ei räiskyisi putken reunan yli. Putkissa ei ollut tässä vaiheessa korkkeja. Inkuboinnin jälkeen putkiin lisättiin $84,00 \pm 0,04$ ml tislattua vettä, jotta liuos saatiin laimenemaan rikkihapon suhteen 4-tilavuusprosenttiseksi. Määrityksessä käytetyt reagenssimäärät ovat tarkat ilman poikkeamia. Luvun perässä oleva \pm -merkki kuvaa rajoja, joiden sisällä tulee NREL:n ohjeen mukaan toimia, jotta tulosta voidaan pitää luotettavana. (Sluiter *et al.*, 2008)

Vesihauideinkuboinnin aikana tehtiin sokeristandardiliuokset, joissa oli 0,1–2,0 mg/ml glukoosia (0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,5 ja 2,0 mg/ml). Liuokset tehtiin samanlaisiin putkiin kuin varsinainen näyteliuoskin. Sokeristandardien avulla saatiin piirrettyä standardisuora glukoosille, jonka avulla määritettiin näytteiden sisältämät glukoosipitoisuudet. Liuokset tehtiin tislattuun veteen ja niiden tilavuudet olivat 10 ml. Tähän määrään lisättiin vielä tasan 348 μ l 72-tilavuusprosenttista H₂SO₄-liuosta, jolloin kokonaistilavuudeksi saatiin 10,348 ml.

Sekä näyte- että sokeristandardiliuokset laitettiin tämän jälkeen autoklaaviin 121 °C:seen 1 tunniksi. Oli tärkeää, että putkien korkit pysyivät kiinni autoklaavikäsittelyn aikana, jotta reagenssien haihtumista, ja sitä kautta lopullisen tuloksen virhettä, ei tapahtuisi. Autoklavoinnin jälkeen putkien annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi ennen

niiden avaamista. Tämän jälkeen kaikki näytteet suodatettiin lasikuitusinterien läpi. Lasikuitusinterit olivat ennen suodatusta olleet neljä tuntia muhveliuunissa 575 ± 25 °C:n lämpötilassa, minkä jälkeen ne oli jäädytetty eksikkaattorissa (1 h). Tällä varmistettiin niiden ehdoton puhtaus mikrobeista ja muista aineista. Suodatetusta näytteestä sekä standardiliuoksesta otettiin 20 ml 50 ml:n erlenmeyerpulloihin, joissa niiden pH säädettiin välille 5–6 kalsiumkarbonaatilla. pH:n muutosta seurattiin pH-mittarilla. Suodoksen asetuttua siitä otettiin tilkka supernatanttia, joka suodatettiin 0,2 µm:n mikrobisuodattimella HPLC:n näytepulloon.

NREL:n ohjearvoiset HPLC:n ajoparametrit kokonaishiilihydraattien määrittämisessä olivat seuraavanlaiset (suluissa tämän insinööriyön kokeissa käytetyt parametrit, mikäli ne erosivat NREL:n ohjearvoista). (Sluiter *et al.*, 2008)

Kolonne:	Aminex HPX-87P (Aminex HPX-87H)
Injektio-tilavuus:	10–50 µl (10 µl)
Liikkuva faasi:	0,2 µm suodattimen läpi suodatettu tislattu vesi, josta on poistettu kaasut (0,005 M H ₂ SO ₄ -liuos)
Virtausnopeus:	0,6 ml/min
Kolonnin T:	80–85 °C (50 °C)
Detektorin T:	Mahdollisimman lähellä kolonnin lämpötilaa (55 °C)
Detektori:	Refraktometri (RID)
Ajoaika:	35 min.

HPLC-ajoparametrit olivat NREL:n ohjeen mukaisia lukuun ottamatta liikkuvaa faasia, joka oli asianmukaisen veden (= *HPLC grade water*) sijasta 5 mM rikkihappoa. Kyseinen ”asianmukainen” vesi on normaalisti 0,2 µm:sen mikrobisuodattimen läpi suodatettua tislattua vettä, josta on poistettu kaikki mahdolliset kaasut. Kolonnin lämpötila oli myös NREL:n ohjeista poikkeava. Lämpötila oli 80 °C:n sijasta 50 °C, mikä johtui puutteista HPLC-laitteistossa (kolonne oli kiinnitetty huonosti laitteiston lämmityselementteihin, eikä sitä voinut mitataushetkellä korjata). Nämä muutokset

johtivat auttamatta siihen, että yhdisteiden retentioajat HPLC-ajossa hieman muuttuivat. (Sluiter *et al.*, 2008)

Kokeen aikana osa sokereista voi muuttua rikkihapon vaikutuksesta muiksi yhdisteiksi, kuten furfuraaleiksi (pentoosisokerit) ja hydroksymetyylifurfuraaleiksi (heksoosisokerit) kuten NREL:kin ohjeessaan mainitsee. Jos näin käy, on alkuperäistä sokeripitoisuutta huomattavan hankala määrittää. Muodostuneiden yhdisteiden tutkiminen vaatisi useamman standardisuoran tekoa ja analysoimista. Ajanpuutteen vuoksi tässä tutkimuksessa ei näitä kyetty tekemään.

6 Tulokset

6.1 Kuiva-aine- ja tuhkapitoisuudet

Kuiva-ainemääritys

Alkuperäisten näytteiden kuiva-ainetuloiksi saatiin seuraavat tulokset, ks. taulukko 8.

Taulukko 8. Alkuperäisten selluloosakuitu- ja liejunäytteiden kuiva-ainepitoisuudet.

Kuitu 1	9,5 %
Kuitu 2	49,9 %
Lieju	14,5 %

Autoklavoinnin jälkeen suoritettiin sakkujen pesu imusuodatuksena. Tislatulla vedellä huuhdeltujen näytteiden suodokset otettiin talteen ja niistä määritettiin kuiva-ainepitoisuudet, ks. taulukko 9. Suodoksista määritettiin myös pelkistävien sokereiden pitoisuus DNS-menetelmällä ja määrittelyssä huomioitiin pesuveden aiheuttama muutos suodoksen tilavuuteen. DNS-analyysin tulokset näkyvät taulukossa 10 ja niistä ilmenee, kuinka paljon kuitunäytteen sokereista kulkeutui pesuveden mukana imusuodatuksessa suodokseen.

Taulukko 9. Rikkihapposuodosten kuiva-ainepitoisuudet.

Kuitu 1	1 % H ₂ SO ₄	0,20 %
	5 % H ₂ SO ₄	2,75 %
	10 % H ₂ SO ₄	5,75 %
Kuitu 2	1 % H ₂ SO ₄	0,15 %
	5 % H ₂ SO ₄	1,50 %
	10 % H ₂ SO ₄	2,45 %

Taulukko 10. Rikkihapposuodosten pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

		g/l
Kuitu 1	1 % H ₂ SO ₄	0,03
	5 % H ₂ SO ₄	0,29
	10 % H ₂ SO ₄	0,31
Kuitu 2	1 % H ₂ SO ₄	0,02
	5 % H ₂ SO ₄	0,4
	10 % H ₂ SO ₄	0,41

Rikkihapposuodosten kuiva-ainepitoisuustuloksista (taulukko 9) voidaan sanoa, että kuitu 1:n kohdalla pitoisuus on selvä. 10-prosenttinen rikkihappo on jo sen verran voimakasta, että se pystyy helposti liuottamaan kuitumassaa. 5,75 %:n kuiva-ainepitoisuus on jo merkittävä pitoisuus ajatellen suurempaa mittakaavaa. Kuitu 2:n kuiva-ainepitoisuudet seurasivat samankaltaista trendiä rikkihapon voimakkuuden noustessa, mutta korkeimmillaan suodokseen päätyvän kuiva-aineen määrä oli 2,45 % eli yli puolet pienempi kuin kuidulla 1. Syynä tähän lienee se, että kuitu 2 oli olomuodoltaan kuivempaa kuin kuitu 1 ja se sisälsi enemmän epäpuhtauksia kuin kuitu 1.

Taulukon 10 tuloksista voidaan päätellä, että rikkihappoesikäsittelyn aikana pilkkoutunut selluloosakuitu ja samalla syntyneet lyhyemmät selluloosaketjut eivät suurissa määrin kulkeudu pesuveden mukana suodatuksen yhteydessä suodokseen. Tämä on teollista mittakaavaa ajatellen hyvä asia, koska mitä vähemmän pesuveden mukana lähtee pilkkoutuneita selluloosaketjuja, sen parempi. Tulosten perusteella voidaan myös päätellä, ettei 5-tilavuusprosenttisen ja 10-tilavuusprosenttisen rikkihappoesikäsittelyn välillä ole juurikaan eroa suodoksiin päätyvien pelkistävien

sokereiden määrien suhteen. Toisaalta on muistettava taulukon 9 mukaiset kuiva-ainehäviöt suodatuksen aikana, sillä pelkistävien sokereiden pitoisuus (taulukko 10) on eri kuin todellinen glukoosipitoisuus. DNS-analyysillä saadaan määritettyä kaikki näytteen sisältämät mono-, di-, tri- ja oligomeerit. Kuiva-ainepitoisuus ilmaisee kuinka paljon näitä on yhteensä. Toisin sanoen kuiva-ainehäviö ilmaisee paremmin sen kuinka paljon ”glukoosia” todella häviää suodatuksen yhteydessä.

Kokonaishiilihydraattipitoisuuden määrittämisessä mukana olleiden kuitunäytteiden kuiva-ainepitoisuudet näkyvät taulukossa 11. Kyseiset näytteet kuivattiin 38 °C:ssa 48 h ajan.

Taulukko 11. Kokonaishiilihydraattipitoisuusmäärittämisessä mukana olleiden kuitunäytteiden kuiva-ainepitoisuudet kuivauksen jälkeen.

Kuitu 1	87,4 %
Kuitu 2	94,1 %

Tuhkapitoisuuden määrittäminen

Tuhkapitoisuusanalyyseissä saatiin alkuperäisten näytteiden tuhkapitoisuuksiksi seuraavat tulokset, ks. taulukko 12.

Taulukko 12. Alkuperäisten selluloosakuitu- ja liejunäytteiden tuhkapitoisuudet kuiva-aineesta.

Kuitu 1	7,5 %
Kuitu 2	16,0 %
Lieju	20,0 %

Entsymaattisen hydrolyysikokeiden osalta saadut tulokset esitetään kunkin esikäsitteilyreagenssin osalta erikseen. Kaikissa spektrofotometrisissä mittauksissa oli aallonpituutena 540 nm. Mittauksissa käytettiin eri laimennossuhteita, mutta ne on otettu huomioon lopullisissa tuloksissa. Kaikissa kokeissa, osittain ensimmäistä lukuun ottamatta, käytettiin alkuperäisinä kuiva-ainepitoisuuksina kuidulla 1 5,0 g ja kuidulla 2 10,0 g. Tästä seuraa, että alun esikäsitteilyssä kuiva-aineen määrä on ollut joko 50 g/l tai 100 g/l, koska käytetyn hapon kokonaistilavuus oli 100 ml.

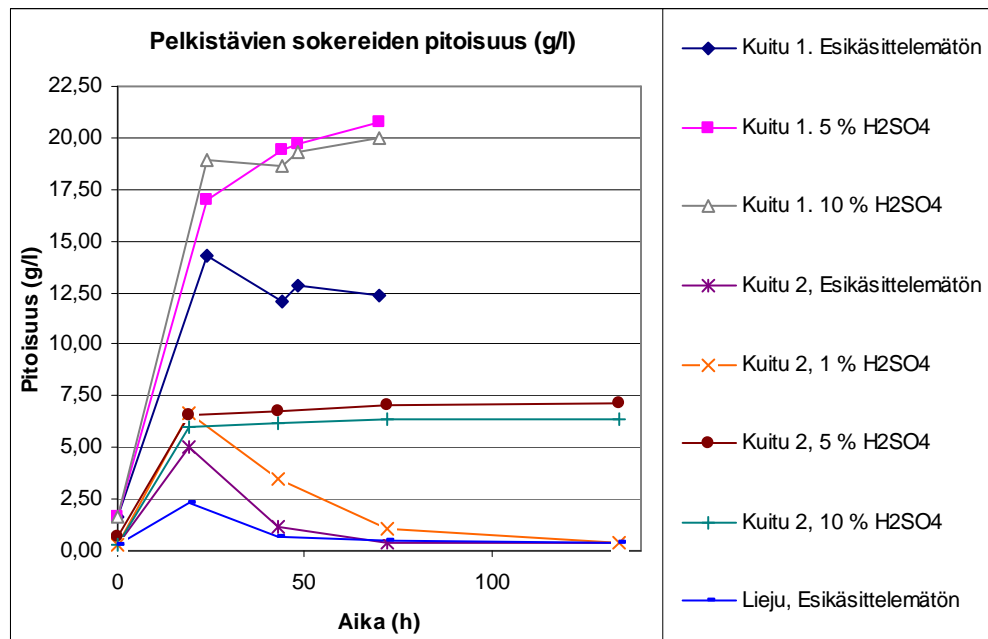
6.2 Rikkihappo

Kokeessa selvitettiin eri rikkihappoesikäsitteilyiden vaikutusta kuituihin 1 ja 2. Kokeessa käytettiin 1-, 5- ja 10-tilavuusprosentista rikkihappoa. Samalla tutkittiin pelkän entsyymattisen hydrolyysin vaikutusta samoihin, mutta esikäsittelemättömiin, kuituihin. Näiden lisäksi liejuun kokeiltiin ainoastaan entsyymattista hydrolyysiä. Entsyymattisen hydrolyysin aikana lämpötila pidettiin vakioituna 45 °C:ssa. Samalla näytepulloja sekoitettiin tauotta noin kolmen päivän ajan tasoravistelijassa.

Kuidun 1 kokeissa kuiva-ainepitoisuus oli 10,0 g (100 g/l) ja kuidulla 2 5,0 g (50 g/l). Liejun kuiva-ainepitoisuus oli myös 5,0 g (50 g/l). Kussakin näytteessä Celluclast[®] annostus oli 0,9 ml/koepullo ja Novozyme 188:n 240 µl/koepullo. Edellä mainittujen entsyymien entsyymiaktiivisuudet ovat vastaavasti 700 U/g (Celluclast[®]) ja 250 U/g (Novozyme 188). Saatiin seuraavat tulokset, ks. taulukko 13.

Taulukko 13. Rikkihappokokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet. Tulosten tarkastelussa huomioitava alkuperäisten näytteiden kuiva-ainepitoisuudet (10,0 g).

NÄYTTEET	Pelkistävien sokereiden pitoisuus (g/l)				
	0 h	24 h	44 h	48 h	70 h
Kuitu 1, Esikäsittelemätön					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	1,6	14,28	12,05	12,85	12,33
Kuitu 1, 5 % H ₂ SO ₄					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	1,6	17,04	19,37	19,73	20,72
Kuitu 1, 10 % H ₂ SO ₄					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	1,6	18,96	18,65	19,34	20,01
	0 h	19 h	43 h	72 h	134 h
Kuitu 2, Esikäsittelemätön					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	0,32	5,02	1,19	0,41	0,36
Kuitu 2, 1 % H ₂ SO ₄					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	0,32	6,63	3,47	1,02	0,34
Kuitu 2, 5 % H ₂ SO ₄					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	0,64	6,52	6,8	7,08	7,13
Kuitu 2, 10 % H ₂ SO ₄					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	0,32	6	6,17	6,42	6,37
Lieju, Esikäsittelemätön					
1x Celluclast [®] /Novozyme 188	0,32	2,3	0,64	0,47	0,38

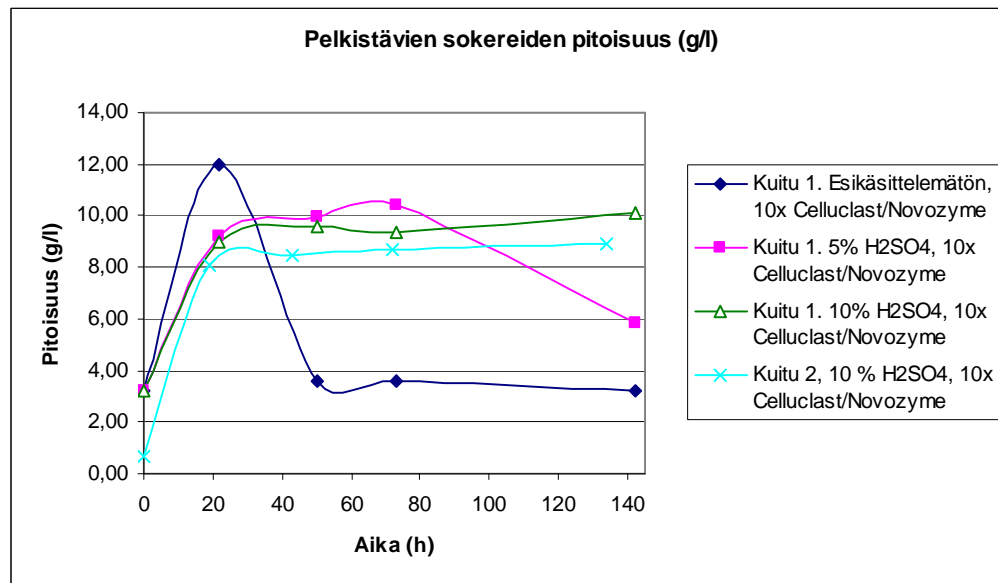


Kuva 20. 1. rikkihappokokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

Entsyymiannostuksen kasvattamista 10-kertaiseksi ja sen vaikutusta entsyymaattiseen hydrolyysiin kokeiltiin myös. Celluclastin[®] annostus oli täten 9 ml/koepullo ja Novozyme 188:n 2,4 ml/koepullo. Entsyymiaktiivisuudet ovat 700 U/g (Celluclast[®]) ja 250 U/g (Novozyme 188). Kokeessa käytetyn kuitu 1:n kuiva-ainepitoisuus puolitettiin. Kokeen alussa kuidun kuiva-ainepitoisuus oli nyt 5,0 grammaa (= 50 g/l). Näin tehtiin myös jatkossa kaikkien kuitu 1 kokeiden kohdalla. Kuitu 2:n kuiva-ainemäärä alussa oli edelleen 10,0 g (= 100 g/l), kuten myös kaikissa kuitu 2:n kokeissa tästä eteenpäin. Kokeista saatiin seuraavat tulokset, ks. taulukko 14.

Taulukko 14. 2. rikkihappokokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet

NÄYTTEET	Pelkistävien sokereiden pitoisuus (g/l)				
	0 h	22 h	50 h	73 h	142 h
Kuitu 1. Esikäsittelemätön, 10x Celluclast [®] /Novozyme	3,20	12,01	3,61	3,58	3,20
Kuitu 1. 5 % H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] /Novozyme	3,20	9,21	9,95	10,40	5,85
Kuitu 1. 10 % H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] /Novozyme	3,20	8,99	9,58	9,40	10,14
Kuitu 2, 10 % H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] /Novozyme	0,64	8,11	8,48	8,72	8,94



Kuva 21. 10-kertaisen entsyymiannostuksen vaikutus pelkistävien sokereiden pitoisuuksiin (huomioi alkuperäinen kuiva-ainepitoisuus kuitu 1:n kohdalla).

Tuloksista nähdään, että entsyymiannostuksen nostaminen 10-kertaisesti ei merkittävästi lisää lopullista pelkistävien sokereiden pitoisuutta seoksessa. Esikäsittelemättömän kuitu 1:n maksimisaanto oli korkeampi kuin kummallakaan rikkihappoesikäsitellyllä kuidulla. Maksimisaanto saavutettiin 22 tunnin jälkeen, mutta sen jälkeen pitoisuus lähti selvään laskuun. Varmaa syytä näin suurelle ja selvälle laskulle ei löytynyt. On mahdollista, että alkuperäisen kuidun sisältämät mikrobit ovat käyttäneet syntyneitä sokereita ravinnokseen. Esikäsitteilyn (happo+autoklaavi) puuttuessa kontaminaation mahdollisuus on lähes varma. Toinen mahdollisen kontaminaation lähde on näytteiden käsittely kokeen ajan (pullotukset, näytteiden otot jne.).

Tuloksista nähdään, että hydrolyysi etenee loppuun jo ensimmäisen vuorokauden kuluttua aloittamisesta. Pientä nousua pelkistävien sokereiden pitoisuuksissa tosin ilmenee tämänkin jälkeen, mutta ei merkittävää. Huomioitavaa on myös se, että esikäsittelemättömän kuidun sekä pienellä happopitoisuudella (1-tilavuusprosentti) esikäsitellyn kuidun pelkistävien sokereiden pitoisuudet lähtevät laskuun vuorokauden kuluttua entsyymattisen hydrolyysin aloittamisesta. Sama ilmiö todettiin esikäsittelemättömän lietteen kohdalla. Suuremmilla esikäsitteilyn aikaisilla happopitoisuuksilla (5- ja 10-tilavuusprosenttia) näin ei käy, vaan vuorokauden

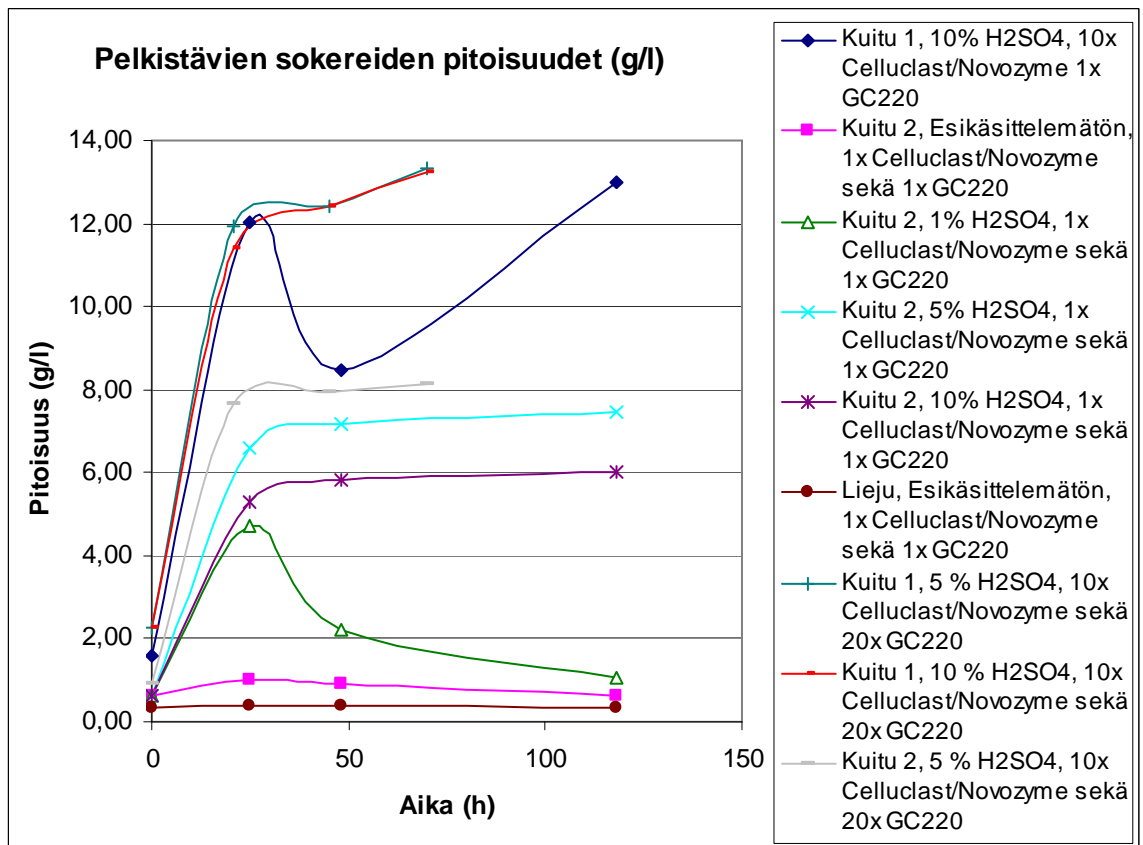
kuluttua, maksimipitoisuus jo lähes saavutettuna, pelkistävien sokereiden pitoisuus pysyy lähes muuttumattomana. Syynä pitoisuuden laskuun on mitä varmimmin vieraiden haittamikrobien läsnäolo, joita 1-tilavuusprosenttinen rikkihappo ei ole kyennyt tappamaan. Jos mikrobikontaminaatio olisi tapahtunut kokeen aikana, esimerkiksi esikäsitteilyn jälkeisen sakan pesun aikana, olisivat todennäköisesti myös muut näytteet kontaminoituneet ja seurauksena olisi ollut samankaltainen pelkistävien sokereiden pitoisuuden lasku entsyymäattisen hydrolyysin aikana.

Kokeita tehtiin myös Genencorin valmistamalla GC 220 -sellulaasilla. Osassa näytepulloista käytettiin 20-kertaista annostusta, jotta nähtäisiin GC220:n todellinen vaikutus entsyymäattisen hydrolyysin kulkuun. Kyseisien kokeiden näytteet myös käsiteltiin mekaanisella hajottajalla, ks. kohta 5.2.3. Muiden entsyymien kohdalla annosmäärät olivat edelleen (ellei kuvassa 22 muuta mainita): Celluclast[®] 0,9 ml/koepullo ja Novozyme 188 240 µl/koepullo. Edelleen alkuperäistä kuitumassaa oli kuitu 1:n koepulloissa 5,0 g (= 50 g/l) ja kuitu 2:n koepulloissa 10,0 g (= 100 g/l). Saadut tulokset on esitetty taulukossa 15.

Taulukko 15. 3. rikkihappokokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

NÄYTTEET	Pelkistävien sokereiden pitoisuus (g/l)			
	0 h	25 h	48 h	118 h
Kuitu 1, 10% H ₂ SO ₄ 10x entsyymimäärä	1,60	12,01	8,48	13,00
Kuitu 2 Esikäsittelemätön	0,64	1,01	0,89	0,64
Kuitu 2 1 % H ₂ SO ₄	0,64	4,69	2,21	1,07
Kuitu 2 5 % H ₂ SO ₄	0,64	6,59	7,15	7,47
Kuitu 2 10 % H ₂ SO ₄	0,64	5,28	5,81	6,00
Lieju Esikäsittelemätön	0,32	0,40	0,36	0,32
	0 h	21 h	45 h	70 h
Kuitu 1, 5% H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] ja Novozyme 188 sekä 20x GC220	2,24	11,95	12,39	13,33
Kuitu 1, 10% H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] ja Novozyme 188 sekä 20x GC220	2,24	11,38	12,39	13,21
Kuitu 2, 5 % H ₂ SO ₄ 10x Celluclast [®] ja Novozyme 188 sekä 20x GC220	0,90	7,65	7,96	8,14

Taulukon 15 ja kuvan 22 tuloksista nähdään edelleen, että esikäsittelemättömän kuitu- ja liejunäytteen kohdalla pelkistävien sokereiden saannon saavutettua maksiminsa noin vuorokauden kuluttua, se lähtee selvään laskuun. Sama käy näytteelle, jonka esikäsitelyssä käytettiin 1-tilavuusprosenttista rikkihappoa. Kuvaajassa näkyvän kuitu 1:n notkahdus pitoisuudessa 50 tunnin kohdalla johtuu mitä luultavimmin mittausvirheestä tai näytteenottotilanteesta tapahtuneesta erheestä. Kuvaajasta ilmenee myös se, että kuitu 2:een puree paremmin esikäsitelyssä 5-tilavuusprosenttinen rikkihappo kuin 10-tilavuusprosenttinen. Tämä on positiivista ajatellen suurempaa mittakaavaa. Tosin 5-tilavuusprosenttinenkin rikkihappo teollisessa mittakaavassa asettaa haasteita laitteistolle.



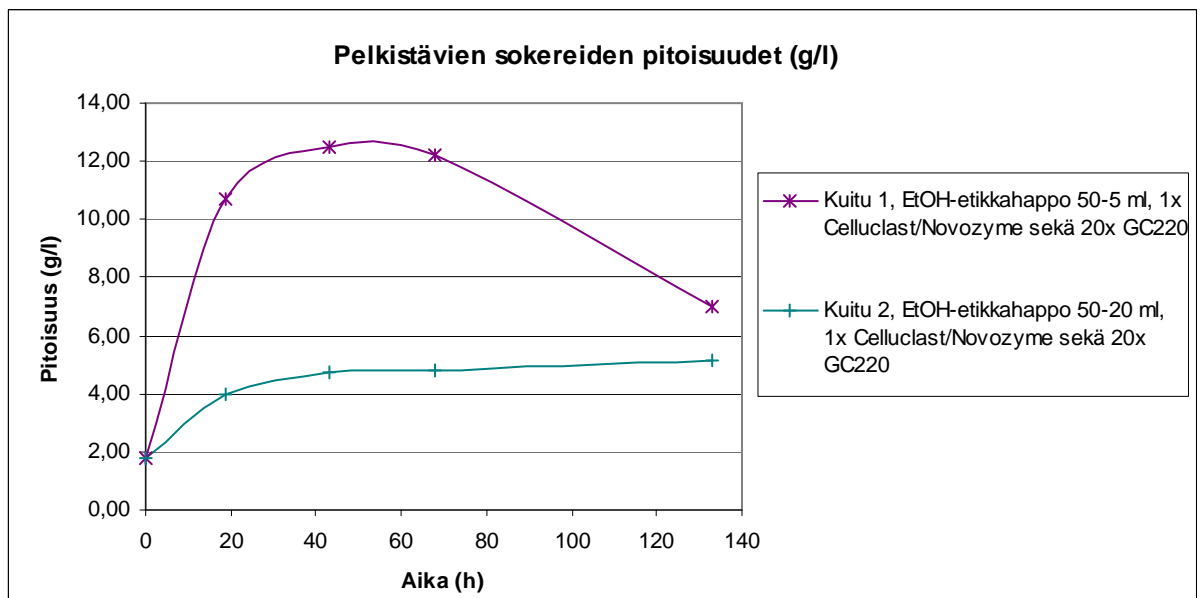
Kuva 22. GC220:n vaikutus rikkihappokokeen aikana pelkistävien sokereiden pitoisuuksiin eri Celluclastin[®] ja Novozyme 188:n pitoisuuksilla.

6.3 Etanoli-etikkahappo

Kokeita tehtiin myös etanoli-etikkahapposeoksella esikäsitelyssä rikkihapon sijaan. Esikäsitely suoritettiin joko uunissa tai refluksioimalla kolvissa. Uuniesikäsitely kesti 24 tuntia lämpötilan ollessa 105 °C ja refluksiointiesikäsitely 4 tuntia. Refluksiointikokeesta enemmän myöhemmin. Uunikokeissa etanoli-etikkahapposeoksen suhde oli kuitu 1:n kohdalla 10:1 (50 ml EtOH: 5 ml etikkahappo) ja kuitu 2:n kohdalla 2,5:1 (50 ml EtOH: 20 ml etikkahappo). Entsyymiannostuksina käytettiin kaikissa koepulloissa: Celluclast[®] 0,9 ml/koepullo, Novozyme 188 240 µl/koepullo ja GC220 56 µl/5,0 g kuiva-ainetta. GC 220:n entsyymiannostus on tällä kertaa 20-kertainen, kahden muun entsyymin 1-kertainen. Kuiva-ainepitoisuudet olivat samat kuin aikaisemmissa kokeissa eli kuitu 1:n koepulloissa 5,0 g (= 50 g/l) ja kuitu 2:n koepulloissa 10,0 g (= 100 g/l).

Taulukko 16. Etanoli-etikkahappo-uunikokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

NÄYTTEET	Pelkistävien sokereiden pitoisuus (g/l)				
	18,5				
	0 h	h	43 h	68 h	133 h
Kuitu 1, EtOH-etikkahappo 50:5 ml, 1x Celluclast [®] /Novozyme 188 sekä 20x GC220	1,79	10,70	12,48	12,23	6,98
Kuitu 2, EtOH-etikkahappo, 50:20 ml, 1x Celluclast [®] /Novozyme 188 sekä 20x GC220	1,79	3,99	4,71	4,83	5,15



Kuva 23. Etanoli-etikkahappo-uunikokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

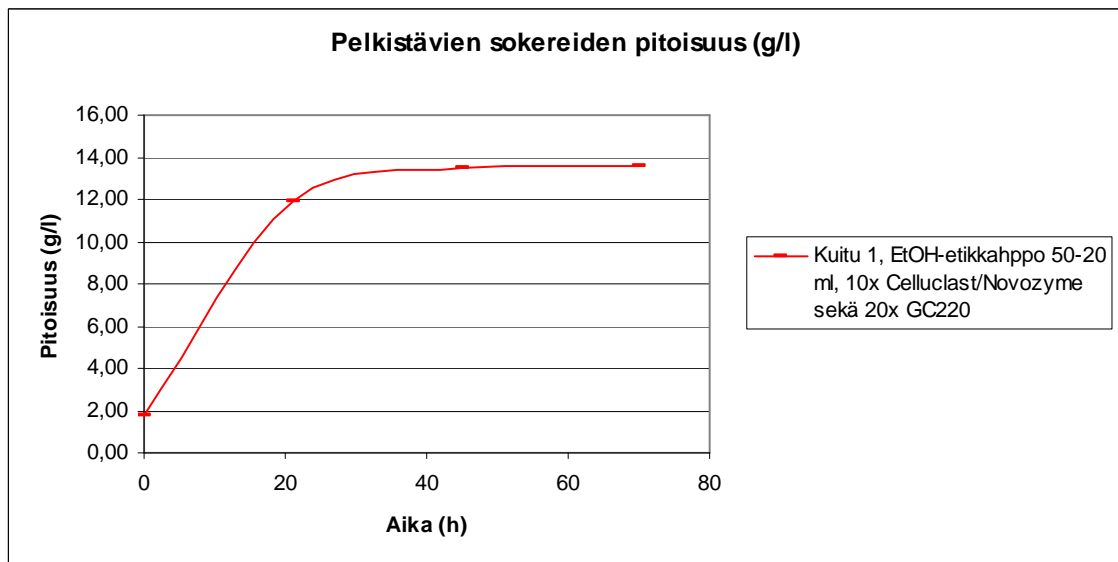
Tuloksista nähdään, että etanoli-etikkahapon käyttö esikäsitelyssä antaa hiukan paremman saannon kuin 5-tilavuusprosenttinen rikkihappo kuidulla 1, ks. taulukot 13 ja 16. Kuvassa 23 näkyvä pelkistävien sokereiden pitoisuuden lasku 68 tunnin kohdalla johtuu luultavimmin näytteenottotilanteesta (t(133 h)) tai analyysivaiheessa tapahtuneesta virheestä.

Refluksointi & kuitumassan mekaaninen hajotus

Refluksointikokeen tulokset näkyvät taulukossa 17 ja kuvassa 24.

Taulukko 17. Refluksointikokeen pelkistävien sokereiden pitoisuus.

NÄYTTEET	Pelkistävien sokereiden pitoisuus (g/l)			
	0 h	21 h	45 h	70 h
Kuitu 1, EtOH-etikkahappo 50:20 ml, 10x Celluclast [®] /Novozyme 188 sekä 20x GC220	1,79	11,94	13,53	13,54



Kuva 24. Refluksointikokeen pelkistävien sokereiden pitoisuus.

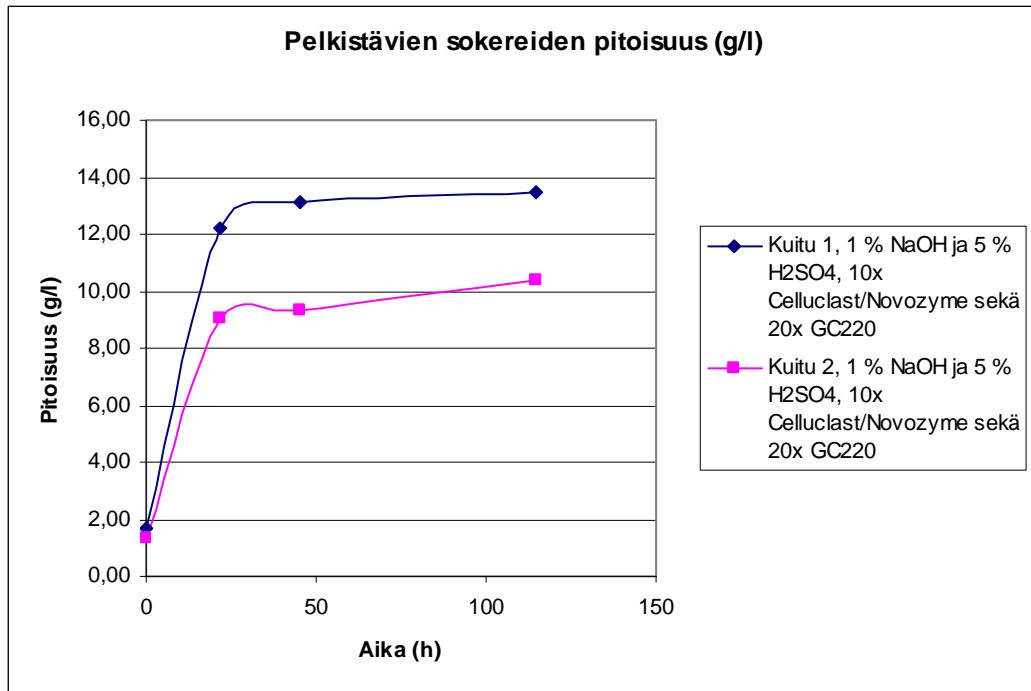
Kuvaajasta nähdään taas sama ilmiö kuin aikaisemmin: maksimisaanto saavutetaan noin vuorokauden kuluttua entsyymaattisen hydrolyysin aloittamisesta. Parhaimmillaan saanto on noin 19 % (13,54 g/l suhteutettuna 71,4 g/l). Verrattaessa etanoli-etikkahappokokeissa seossuhteita 50:5 ml (ks. taulukko 16) ja 50:20 ml (ks. taulukko 17) huomataan, että saanto on 1 g/l enemmän, kun etikkahapon määrä on 20 ml 5 ml:n sijaan. Ultra Turrax -käsittely ei merkittävästi siis lisännyt lopullisten pelkistävien sokereiden saantoa.

6.4 Natriumhydroksidi-rikkihappo

Koesarjassa tutkittiin NaOH:n vaikutusta esikäsitteilyvaiheessa. Aluksi näyte esikäsiteltiin 1-tilavuusprosenttisella NaOH-liuoksella autoklaavissa (121 °C/20 min), minkä jälkeen näyte pestiin tislattulla vedellä imusuodatuksena ja esikäsiteltiin uudelleen 5-tilavuusprosenttisella rikkihapolla autoklaavissa samoissa olosuhteissa. Tämän jälkeen näyte pestiin uudelleen ja laitettiin entsyymaattiseen hydrolyysiin. Jokaisen pesun jälkeen otettiin suodokset talteen DNS-analyysiä varten. Entsyymiannostuksina olivat Celluclast[®] (9 ml/näyte) ja Novozyme 188 (2,4 ml/näyte). GC 220:n annostus oli 20-kertainen eli 56 µl/5,0 g kuiva-ainetta. Kuiva-ainetta oli kokeen alussa aikaisempien kokeiden tavoin 5,0 g (=50 g/l). Entsyymaattisen hydrolyysin tulokset on koottu taulukkoon 18.

Taulukko 18. NaOH/H₂SO₄-kokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

NÄYTTEET	Pelkistävien sokereiden pitoisuus (g/l)			
	0 h	22 h	45 h	114,5 h
Kuitu 1, 1 % NaOH ja 5% H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] /Novozyme 188 sekä 20x GC220	1,69	12,24	13,11	13,50
Kuitu 2, 1 % NaOH ja 5% H ₂ SO ₄ , 10x Celluclast [®] /Novozyme 188 sekä 20x GC220	1,35	9,04	9,36	10,38



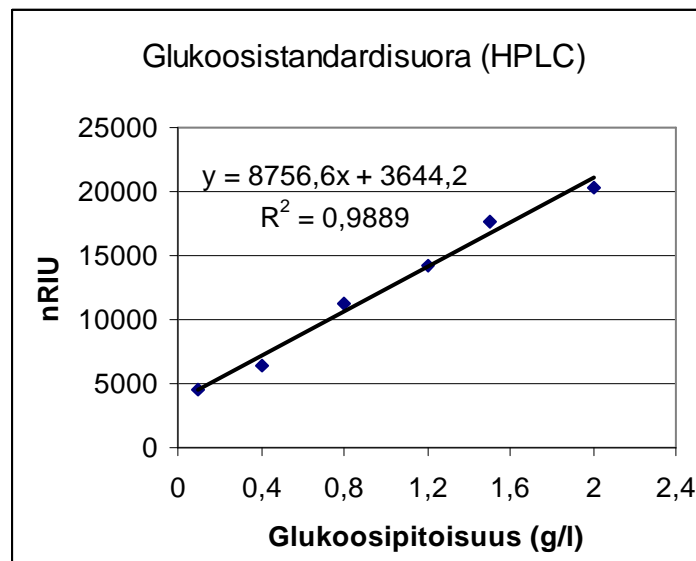
Kuva 25. NaOH/H₂SO₄-kokeen pelkistävien sokereiden pitoisuudet.

6.5 Kokonaishiilihydraattipitoisuus

Kokeen tarkoitus oli selvittää, kuinka paljon kuitunäytteistä oli mahdollista saada irti pelkistäviä sokereita. Kokonaishiilihydraattimääritys, jossa tutkittiin maksimisaantoa ainoastaan glukoosin suhteen, suoritettiin HPLC:llä. Koe suoritettiin NREL:n standardoidun ohjeen mukaan.

Analysoitavien kuitunäytteiden selluloosapitoisuus tulee olla tiedossa, jotta voidaan käsitellä HPLC:n antamia glukoosituloksia. Kuidun 1 selluloosapitoisuus oli kokeen alussa 2,79 g/l ja 2,11 g/l kuidulla 2. Selluloosapitoisuuksissa on otettu huomioon näytteen kuiva-aine- ja tuhkapitoisuudet sekä muut tiedot, kuten kuidun 2 kuiva-aineen epäorgaanisen aineksen määrä. Kuidulla 1 on oletettu vastoin parempaa tietoa, että kaikki muu paitsi tuhka on selluloosaa ja kuidun 2 kohdalla on oletettu, että kaikki näytteen sisältämä orgaaninen massa on selluloosaa. Tuhkaksi lasketaan palamaton aines, eli epäorgaaninen aines.

Mitattu glukoosistandardisuora on esitetty kuvassa 26. R^2 -arvo on hyvä (0,9889), joten suoran avulla saatuja arvoja voitiin pitää luotettavana. Kuvassa 26 y-akselilla olevalla nRIU:lla kuvataan HPLC:n RID:n analysoiman piikin korkeutta ja x-akselilla vastaavasti näytteen sokeripitoisuutta (g/l). Näiden arvojen avulla voitiin määrittää kuitu 1:n ja kuitu 2:n kokonaishiilihydraattipitoisuudet. Suora leikkaa y-akselin kohdassa $y = 3644,2$ kun $x = 0$. HPLC-ajon tuloksista nähtiin, että glukoosistandardipiikit tulivat ajanhetkellä $11 \text{ min } 11 \text{ s} \pm 10 \text{ s}$ (ei näy kuvassa 26).



Kuva 26. HPLC-analyysin glukoosistandardisuora käytetyillä ajoparametreilla.

Koesarjassa tehtiin myös koe, jossa samat sokeristandardit käsiteltiin autoklaavissa (1 h / 121 °C / 4-tilavuusprosenttisessa H_2SO_4 :ssä) yhdessä kuitunäytteiden kanssa. Näiden sokeristandardien HPLC-tulokset viittasivat myös glukoosin hajoamiseen happamassa (rikkihappo) ympäristössä, sillä suurimman piikin antaman yhdisteen retentioaika oli pienempi kuin käsittelemättömän sokeristandardin ajossa. Alkuperäiset glukoosipitoisuudet olivat samat molemmissa analyyseissä. Autoklavoitujen sokeristandardien HPLC-ajon suurimmat piikit saatiin lähes samoilla retentioajoilla kuin näyteajoissakin kuiduilla 1 ja 2, mikä myös tuki sitä faktaa, että kuitunäytteiden sisältämät sokerit olivat hajonneet hapon vaikutuksesta autoklaavikäsitelyn aikana.

Kuitu 1:n ja kuitu 2:n ajanhetkellä 11 min 49 s \pm 5 s (= sokereiden oletettu ulostuloaika kolonnista sokeristandardianalyysin mukaan) saadut glukoosipitoisuudet olivat kuidulla 1 0,24 g/l ja kuidulla 2 0,16 g/l. Tuloksissa on otettu huomioon hapon vaikutus glukoosisaantoon (eli tulokset, jotka saatiin autoklavoitujen sokeristandardien HPLC-ajosta). Jokaisen näytteen kohdalla oli kuitenkin suuri piikki ajanhetkellä 7 min 43 s \pm 3 s. Toisin sanoen happohydrolyysi oli mennyt ikään kuin yli (lämpötila ollut väärä tai käsittelyaika liian pitkä). Näin toteaa myös NREL ohjeessaan, jonka mukaan ennen glukoosipiikkiä näkyvät piikit viittaisivat sokereiden hajoamistuotteisiin. Näin ollen kokonaishiilihydraattipitoisuutta ei voitu varmasti sanoa näiden näytteiden kohdalla. Koesarja olisi pitänyt tehdä alusta asti uudelleen toisenlaisilla esikäsittelyillä ja uusilla HPLC:n ajoparametreilla. Ajanpuutteen vuoksi tämä ei kuitenkaan ollut mahdollista. (Sluiter *et al.*, 2008)

7 Johtopäätökset

Saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että paperiteollisuuden jättemateriaalista on mahdollista saada irti monomeerisokereita eli tässä tapauksessa glukoosia suhteellisen helpoilla ja yksinkertaisilla esikäsitteilyillä. Saanto oli parhaimmillaan KUIDULLA 1 noin 27,0 % ja KUIDULLA 2 noin 21,0 %. Toisin sanoen kuidusta 1 saataisiin näillä käsitteilymenetelmillä irti 270 kg glukoosia per tonni kuitumassaa ja kuidulla 2 210 kg glukoosia per tonni kuitumassaa. Suurimpaan glukoosisaantoon päästiin yhdistetyllä refluksointi- ja etanoli-etikkahappokäsittelyllä. Tosin ero 5-tilavuusprosenttisella rikkihapolla saatuun lopulliseen glukoosisaantoon oli pieni. Samaan tulokseen päästiin yhdistetyllä NaOH-rikkihappokäsittelyllä, jolloin saantoprosentiksi saatiin myös 27,0 %. Pelkällä rikkihappoesikäsitteilyllä päästiin parhaimmillaan 26,6 %:n glukoosisaantoon. Saadut tulokset ovat linjassa aiemmin saatujen tulosten kanssa. Samankaltaisia kokeita on tehty mm. VTT:llä.

Tämän tutkimuksen kokeet tehtiin kuitupitoisuudella 50 g/l, joten isompaa mittakaavaa ajatellen pitoisuutta pitäisi kasvattaa, jotta tuotanto olisi järkevää. Tämä vaatisi tosin uusien kokeiden tekemistä, jolloin varmistuttaisiin uusien annossuhteiden toimivuudesta. Tämän lisäksi tulisi ehdottomasti soveltaa jatkuvatoimista prosessia, jossa rikkihappo kerättäisiin talteen ja kierrätettäisiin prosessissa. Se tosin luo omat vaativat haasteensa, mutta teoriassa se olisi kuitenkin mahdollista.

LIEJUSTA ei juuri sokereita irti saa pelkällä entsymaattisella hydrolyysillä, vaan suuren kosteus- ja tuhkapitoisuuden sekä muiden lisäainepitoisuuksien takia lopullinen sokerisaanto jää alle 2,5 %:n. Tämä on siis hylättävä mahdollisena isomman mittakaavan glukoosintuottoraaka-aineena.

Näytteiden osalta tulee olla hyvin kriittinen, koska täsmälleen tarkkaa näytteidenottoa ei ollut tiedossa. Sen lisäksi kaikkien näytteiden täsmälliset tiedot niiden koostumuksista olivat hatarat. Tämä johtui siitä, ettei kyseisille näytteille ollut tehty kattavaa koostumusmäärittystä tehtaalla, eikä se myöskään ollut mahdollista

Metropolia Ammattikorkeakoulun tiloissa. Muualla, esim. VTT:llä, kokeiden teettäminen olisi ollut taloudellisesti liian suuri rasite.

Samankaltaisia kokeita tämän tyyppisillä näytteille voisi tehdä mm. korkeammissa esikäsitteilylämpötiloissa. Esimerkiksi höyryräjäytystä ja mikroaaltojen hyödyntämistä voisi kokeilla. Höyryräjäytys tapahtuu noin 170–180 °C:een lämpötiloissa. Tällöin selluloosan rakenne voisi hajota tehokkaammin ja se voisi edesauttaa jopa merkittävästi glukoosin tuottoa entsymaattisesti. Rikkihapon käyttö lignoselluloosan hydrolyysissä on erittäin potentiaalinen vaihtoehto. Jos rikkihapon talteenotto ja kierrätys prosessissa saadaan optimoitua, on prosessi luultavimmin taloudellisesti kannattavaa.

Mitä tulee tällaisten kokeiden analyysipuoleen, niin ehdottomasti tulisi jatkossa tehdä DNS-analyysin sijasta esimerkiksi glukoosikittimäärityksellä (Boehringer-Mannheim) glukoosin määrittäminen. Tällöin saadaan selville paljon tarkemmin näytteen sisältämä glukoosipitoisuus. Ongelma DNS:llä on se, että analyysillä saadaan selville kaikki pelkistävät sokerit, niin mono-, di-, oligo- kuin polymeerisokeritkin, vaikka useimmiten halutaan tietää vain tietyn tai tiettyjen monomeerisokereiden pitoisuus. Tässä työssä DNS-analyysijä tehtiin pelkästään taloudellisten seikkojen takia. DNS-analyysi on käytännössä halvempi toteuttaa kuin Boehringer-Mannheim -kittianalyysi.

Lähteet

AB-Enzymes 2008 = *Enzymes for other applications*, (WWW-dokumentti), <<http://www.abenzymes.com/index.php?section=202&sub=56&page=2342>>, luettu 11.8.2008.

Alén, R., *Basic chemistry of wood delignification*, kirjassa: Stenius, P., (toim.), *Forest Products Chemistry*, s. 58–104, Gummerus, Jyväskylä, 2000.

Altintas, M.M., Kirdar, B., Önsan, Z.I., Ülgen, K., *Cybernetic modelling of growth and ethanol production in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain secreting a bifunctional fusion protein*, *Process Biochemistry*, 37th edition, p.1439–1445, 2002.

Avain 2006 = *Avain Suomen metsäteollisuuteen*, Metsäteollisuus ry., Libris Oy, Helsinki, 2006.

Bailey, M. J., *Pelkistävät sokerit dinitrosalisylihappomenetelmällä*, VTT:n menetelmäohje, menetelmätunnus VTT-3783-93, versio 21.9.2000.

Biochemicals 2008 = *Biochemicals*, (WWW-dokumentti), <<http://www.science-college.co.uk/SC/biochemicals.html>>, luettu 30.7.2008.

Cardona, C.A & Sánchez, Ó.J. *Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities*, *Bioresource Technology*, Volume 98, Issue 12, p. 2415–2457, 2007.

Casey, J.P. (toim.), *Pulp and paper chemistry and chemical technology*, Volume 1, 3rd edition, Wiley & Sons, New York, 1980.

Cui, S., W., *Food carbohydrates*, Taylor & Francis Group, p. 70–73, 2005.

de Vos, W.M., Kengen-Serve, W.M., Voorhorst-Wilfried, G.B., Van der Oost, J., *Sugar utilization and its control in hyperthermophiles*, *Microbiology*, Volume 2, Issue 3, p. 201–202, 1998.

Den Haana, R., McBride, J.E., La Grange, D.C., Lynd, L.R., Van Zyl, W.H., *Functional expression of cellobiohydrolases in *Saccharomyces cerevisiae* towards one-step conversion of cellulose to ethanol*, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 40, p.1291–1299, 2007.

Galbe, M., Zacchi, G., *A review of the production of ethanol from softwood*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 59, 6th edition, p. 618–628, 2002.

Glukoosin hajoaminen 2008 = *Kinetics of glucose decomposition during dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass*, (WWW-dokumentti), <<http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/34728.pdf>>, luettu 31.7.2008.

Haarla, A. *Paper and board grades*, Papermaking Science and Technology Book 18, s. 13-53, Toim. H. Paulapuro, Fapet Oy, Jyväskylä, 2000.

Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C., Schülein, M., *Synergism of cellulases from Trichoderma reesei in the degradation of cellulose*, Bio/Technology, 3rd edition, p. 722, 1985.

Imai, M., Ikari, K., Suzuki, I., *High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment*, Biochemical Engineering Journal 17, p. 79–83, 2003.

Isotalo, K., *Puu- ja sellukemia*, Opetushallitus, Edita Prima Oy, Kemi, 1996.

Isotalo, K., *Puu- ja sellukemia*, Opetushallitus, Edita Prima Oy, Kemi, 2004.

Kierto 2008 = *Kiertokulku*, (WWW-dokumentti), <<http://www.paperinkerays.fi/951>>, luettu 25.7.2008.

Kim, K.H. & Hong, J., *Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis*, Bioresource Technology, Volume 77, p. 139–144, 2001.

Kumar, R. & Wyman, C.E., *An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids*, Enzyme and Microbial Technology, Volume 42, p. 426–433, 2008.

Laatikainen, M. *Selluloosa- ja paperiteknologia*, opetusmoniste 3, Lappeenrannan Teknillinen Korkeakoulu, Lappeenranta, 1987, s. 92–93.

Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdahl, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. Nilvebrant, N.O., *Generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood*, Enzyme Microbiology Technology, Volume 24, p. 151–159, 1999.

Linde, M., Galbe, M., Zacchi, G., *Bioethanol production from non-starch carbohydrate residues in process streams from a dry-mill ethanol plant*, Lund University, Department of Chemical Engineering, Lund, Ruotsi, 2008.

Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M., *Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update*, Biotechnology, Volume 16, p. 577–583, 2005.

Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., den Haan, R., *Consolidated bioprocessing for bioethanol production by using Saccharomyces cerevisiae*, Advanced Biochemical Engineering Biotechnology, Volume 108, p. 205–235, 2007.

Massa 2007 = *Massa- ja paperiteollisuuden tuotanto, päästöt ja jätteet Suomessa 2007*, (WWW-dokumentti), <<http://www.metsateollisuus.fi/tilastopalvelu/Tilastotaulukot/Ymparisto/Julkinen-FI/Tuotanto,paastot,jatteet2007.xls>>, luettu 29.7.2008.

Materiaali 2008 = *Materiaalin testaaminen (sellu)*, (WWW-dokumentti), <http://www.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/teollisuusnayteanalyysit_materiaalin_testaaminen.html>, luettu 26.5.2008.

McMillan, J.D., *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P., *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, p. 292–324. 1994.

Metsä 2007 = *Metsäteollisuuden vuosikirja 2007*, Metsäteollisuus ry., 2007.

Metsä 2008 = *Metsäteollisuuden osavuosikatsaus 14.2.2008*, Metsäteollisuus ry., 2008.

Miettinen, R. *Biotekninen sellunvalkaisu kansallisessa innovaatioverkossa*, Osa 1. Edellytysten muodostuminen, VTT-tiedote 1643, VTT Offset Paino, Espoo, 1995, s. 64–88.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M., *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, *Bioresource Technology*, Volume 96, p. 673–686, 2005.

Newton-Sendich, E., Laser, M., Kim, S., Alizadeh, H., Laureano-Perez, L., Dale, B., Lynd, L., *Recent process improvements for the ammonia fiber expansion (AFEX) process and resulting reductions in minimum ethanol selling price*, *Bioresource Technology*, Volume 99, p. 8429–8435, 2008.

Nidetzky, B., Hayn, M., Macarron, R., Steiner, W., *Synergism of Trichoderma reesei cellulases while degrading different celluloses*, *Biotechnology Letter*, Volume 15, p. 71–76, 1993.

Nuortila-Jokinen, J., *Massanvalmistuksen kemiaa*, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, Teknillinen polymeerikemia, opetusmateriaali, 2004.

Nörgård, J., *Ethanol production from biomass - optimization of simultaneous saccharification and fermentation with respect to stirring and heating*, Lund University, Department of Chemical Engineering, Lund, Ruotsi, 2005.

Palonen, H. & Viikari, L., *Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood*, *Biotechnology and Bioengineering*, Volume 86, 5th edition, p. 550–557, 2004.

Perry, R. H. & Green, D.W., *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 8th edition, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2007.

Pollard, G., *Catalysis in renewable feedstocks*, A Technology Roadmap, Report Number CR 7656, 2005.

Rosgaard, L., Pedersen, S., Langston, J., Akerhielm, D., Cherry, J.R., Meyer, A.S. *Evaluation of minimal Trichoderma reesei cellulase mixtures on differently pretreated*

barley straw substrates, Biotechnology Programme, Volume 23, Issue 6, p. 1270–1276, 2007.

Rehrl, T. & Friedrich, R. *Modelling long-term oil prize and extraction with a Hubbert approach: The LOPEX model*, IER University of Stuttgart, Stuttgart, 2005.

Reinikainen, T., *The cellulose-binding domain of cellobiohydrolase I from Trichoderma reesei*, VTT publications 206, VTT, Espoo, 1994.

Sellulaasi 2008 = *Cellulase*, (WWW-dokumentti), <<http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase>>, luettu 31.7.2008.

Selluloosan tuhkapitoisuus 2008 = *Selluloosamassan tuhkapitoisuus*, (WWW-dokumentti), Opetushallitus, <http://www.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/teollisuus-nayteanalyysit_selluloosamassan_tuhkapitoisuus.html>, luettu 12.8.2008.

Seppälä, M. J., Klemetti, U., Kortelainen, V.-M., Lyytikäinen, J., Siitonen, H., Sironen, R., *Paperimassan valmistus*, Opetushallitus, Jyväskylä, 2001.

St1 2008 = *St1 aloittaa kotimaisen etanolin tuotannon VTT:n kehittämällä menetelmällä*. (WWW-dokumentti.) <<http://www.st1.fi/index.php?id=321>>. Luettu 22.7.2008.

Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K., Galge, M., Zacchi, G., *Effect of substrate concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production*, Biotechnology and Bioengineering, Volume 68, 2nd edition, p. 204–210, 2000.

Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton D., Crocker, D., *Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass*, Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42618, tarkistettu 25.4.2008, luettu 20.5.2008.

Teollisuus 2003 = *Teollinen ekologia ja kierrätystekniikka*, (WWW-dokumentti), <<http://www.cc.oulu.fi/~polamwww/SellPap.pdf>>, Prosessi- ja ympäristötekniikan osasto, luentomateriaali, Oulun yliopisto, 2003.

Tuoteseloste AcceleraseTM 1000 2007 = AcceleraseTM 1000 product information, Genencor, Danisco US Inc., 2007.

Tuoteseloste Celluclast[®] 2007 = Celluclast[®] product information, Novozymes A/S, 2007.

Tuoteseloste GC220 2007 = GC220 product information, Genencor, Danisco US Inc., 2007.

Tuoteseloste Novozymes 188 2007 = Novozymes 188 product information, Novozymes A/S, 2007.

- Tuulos-Tikka, S., *Puumateriaalin kemiallinen käyttäytyminen sulfaattikeiton alkalisessa etanolesikäsitelyssä*, Licensiaattityö, Jyväskylä, 2002.
- Virtanen, S., *Lignoselluloosan hydrolyysi*, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, kirjallisuustyö, 2006.
- Vlasenko, E.Y., Ding, H., Labavitch, J.M., Shoemaker, S.P., *Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw*, Bioresearch Technology, Volume 59, p. 109–119, 1997.
- Wood, T.M. & Garcia-Campayo, V., *Enzymology of cellulose degradation*, Biodegradation, Volume 1, p. 147–161, 1990.
- Yarema, K.J., *Handbook of carbohydrate engineering*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2005.
- Ye, S. & Jiayang, C., *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. Bioresource Technology, Volume 83, p. 1–11, 2002.
- Zheng, Y.Z., Lin, H.M., Tsao, G.T., *Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion*, Biotechnology Programme, Volume 14, p. 890–896, 1998.
- Zhu, S., Yuanxin, W., Yu, Z., Zhang, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Zhao, Y., Tu, S., Xue, Y., *Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pretreated rice straw to ethanol*, Biosystems Engineering, Volume 92, 2nd edition, p. 229–235, 2005.
- Öhgren, K., Bura, R., Lesnicki, G., Saddler, J., Zacchi, G., *A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover*, Process Biochemistry, 42th edition, p. 834–839, 2007.