

Hanna Heikinheimo

Koivu- ja kuusiuutteen puhdistaminen lakkaasientsyymillä

Metropolia Ammattikorkeakoulu
Insinööri (AMK)
Bio- ja elintarviketekniikka
Insinöörityö
3.5.2011

Tekijä Otsikko	Hanna Heikinheimo Koivu- ja kuusiuutteen puhdistaminen lakkaasientsyymillä
Sivumäärä Aika	67 sivua + 4 liitettä 3.5.2011
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaajat	tutkija, FM Petri Kilpeläinen lehtori Mikko Halsas
<p>Insinööriyössä tutkittiin lakkaasientsyymien vaikutusta paineistetulla kuumalla vedellä uutettuun (PHWE, Pressurized Hot Water Extraction) koivu- ja kuusiuutteeseen. Työssä tutkittiin myös kahden yleisesti käytössä olevan mediaattorin (1-HBT ja ABTS) vaikutusta lakkaasin toimintaan. Lakkaasilla pyrittiin poistamaan hemiselluloosaketjuun kiinnijääneet erilaiset ligniiniperäiset yhdisteet. Työn tarkoituksena oli löytää laboratoriotason puhdistusmenetelmä PHW-uutetulle puu-uutteelle, jota myöhemmin voitaisiin käyttää suuremmissa mittakaavassa uutteen puhdistuksessa.</p> <p>Puu-uutteita käsiteltiin kahdella eri lakkaasipitoisuudella, joita verrattiin lakkaasikäsittelemättömään puu-uutteeseen eli referenssiluokseen. Mediaattoreiden vaikutusta tutkittiin kolmella eri konsentraatiolla ja vakioentsyymipitoisuudella. Lakkaasin vaikutusta puun hiilihydraattipitoisuuksien muutoksiin tutkittiin kaasukromatografisesti. Vapaiden uuteaineiden pitoisuuksia määritettiin kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GC-MS) ja molekyylikokojen muutosta ajan suhteen seurattiin kokoeksklusiokromatografialla (Sec-Malls). GC-MS:lla seurattiin erityisesti ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuuksien ja rasvahappopitoisuuksien muutoksia entsyymikäsitteilyn aikana.</p> <p>Lakkaasi poisti ligniinin hajoamistuotteita ja aggregaatteja uutteista. Todennäköisesti se saosti ligniinin hajoamistuotteet suoraan eikä toiminut reaktioidensa kautta. Lakkaasikäsitteilyjen jälkeen jäljelle jäi rasvahappoja, joita entsyymi ei kokonaan pystynyt poistamaan. Käytetyillä lakkaasilla ei ollut lipaasiominaisuuksia, joten rasvahappojen ei kokonaan oletetakaan poistuvan. Lakkaasin todettiin pilkkovan aggregaatteja ajan kuluessa. Lakkaasi myös pilkkoi pieniä määriä hemiselluloosaketjuja monomeereiksi. Mediaattori 1-HBT vaikutti käytetyissä konsentraatioissaan ligniinin hajoamistuotteiden poistumiseen alentavasti. Käsitteilyjen jälkeen uutteissa havaittiin edelleen ligniinin hajoamistuotteita. ABTS-mediaattori poisti kaikki ligniinin hajoamistuotteet vain käytetyssä korkeimmassa konsentraatiossa. 1-HBT poisti kaikki rasvahapot uutteesta, kun taas ABTS ei niitä poistanut. Kokonaissokereiden pilkkoutumiseen monomeereiksi ei mediaattoreilla ollut vaikutusta. Käytetyillä lakkaasipitoisuuksilla ei juurikaan saavutettu eroja. Tulokset olivat lähes samoja riippumatta entsyymipitoisuudesta.</p>	
Avainsanat	entsyymi, lakkaasi, mediaattori, 1-HBT, ABTS, hemiselluloosa

Author Title	Hanna Heikinheimo Purification of birch and spruce extract using laccase enzyme
Number of Pages Date	67 pages + 4 appendices 3 May 2011
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	
Instructors	Petri Kilpeläinen, Researcher, M.Sc. Mikko Halsas, Senior Lecturer
<p>The aim of this thesis was to research the effect of laccase enzyme on birch and spruce extract extracted with pressurized hot water (PHWE). The effect of two generally used mediators (1-HBT and ABTS) in the function of laccase was also researched. The intention was to remove different lignin based compounds connected in hemicellulose chain. The aim was to find a laboratory-scale purification method for PHW-extracted wood extraction conditions, which could later be used on a larger scale for purification of extracts.</p> <p>The wood extracts were treated with two different laccase levels, which were compared with a wood extract not treated with laccase, i.e. reference solution. The effect of the mediators was researched with three different concentrations and constant enzyme content. The effect of laccase on the changes of the carbohydrate content was examined gas chromatographically. Contents of free extractives were defined with a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS), and the changes in molecule sizes in the course of time were followed by size exclusion chromatography (Sec-Malls). Especially the changes in the contents of the degradation products and fatty acid of lignin during enzyme treatment were followed with the GC-MS.</p> <p>Laccase removed degradation products and aggregates of lignin from the extracts. Most likely it precipitated the degradation products of lignin directly, and did not function through its reactions. After the laccase treatment, there remained fatty acids, which the enzyme had not been able to remove entirely. The used laccase did not have lipase properties, so the fatty acids were not even supposed to disappear entirely. The laccase was found to degrade aggregates in the course of time. Laccase also degraded small amounts of hemicellulose chains into monomers. The mediator 1-HBT, in the used concentrations, had a diminishing effect on the disappearance of the degradation products of lignin. After the treatments, degradation products of lignin were still found in the extract. The ABTS mediator removed all the degradation products of lignin only in the higher concentration, which was used. The mediator 1-HBT eliminated all the degradation products of lignin only in the highest concentrations used. 1-HBT eliminated all the fatty acids from the extract, while ABTS did not eliminate them. The mediators had no effect on the degradation of the total sugars into monomers. No notable differences were achieved with the used laccase contents. The results were nearly the same regardless the enzyme contents.</p>	
Keywords	enzyme, laccase, mediator, 1-HBT, ABTS, hemicellulose

Sisällys

Tiivistelmä

Abstract

Lyhenteet

1	Johdanto	1
Kirjallinen osa		
2	Puusolun soluseinän kerrokset	2
3	Puun rakenne	3
3.1	Selluloosa	3
3.2	Hemiselluloosa	5
3.3	Ligniini	8
3.4	Uuteaineet ja epäorgaaniset yhdisteet	12
4	PHWE-utettu puumateriaali	15
5	Entsyymeistä yleisesti	16
6	Lakkaasi ja sen mediaattorit	17
Kokeellinen osa		
7	Materiaalit ja menetelmät	20
7.1	Näytesarjat	20
7.2	MTBE-utto	23
7.3	Vapaiden uuteaineiden määrittäminen GC-MS:llä	24
7.4	Liunneen ligniinin määrittäminen UV/Vis-spektrofotometrisesti	25
7.5	Näytteiden käsittely kaasukromatografiaa varten	26
7.6	Sokereiden määrittäminen kaasukromatografisesti	28
7.7	Utteiden analysointi Sec-Mallsilla	30
8	Tulokset	30
8.1	GC-MS	30
8.2	UV/Vis-spektrofotometria	38

8.3	Kaasukromatografia	39
8.4	Sec-Malls	53
9	Tulosten tarkastelu	59
9.1	Ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuuksien muutokset	59
9.2	Rasvahappopitoisuuksien muutokset	61
9.3	Kaasukromatografia	62
9.4	Sec-Malls	63
10	Yhteenveto ja jatkotutkimusehdotukset	64
	Lähteet	66
	Liitteet	
	Liite 1. GC-MS-tuloksia	
	Liite 2. Liunneen ligniinin pitoisuudet eri näytesarjoilla	
	Liite 3. Kokonaissokeripitoisuudet eri näyteliuoksissa	
	Liite 4. Sokerimonomeeripitoisuudet eri näyteliuoksissa	

Lyhenteet

1-HBT	(<i>1-hydroxybenzotriazole</i>) 1-hydroksibentsotriatsoli; mediaatori
4-O-Me-GlcA	(<i>4-O-methylglucuronic acid</i>) 4-metyyliglukuronihappo
ϵ	(<i>dielectric constant</i>) dielektrisyysvakio
ABTS	(<i>2'2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)</i>) 2'2'-atsino-bis(3-etyylibentsotiatsoliini-6-sulfonaatti); mediaattori
Ara	(<i>arabinose</i>) arabinoosi
CML	(<i>compound middle lamella</i>) yhdistetty välilamelli; puusolun soluseinän kerros
DMSO	(<i>dimethyl sulfoxide</i>) dimetyylisulfoksidi; orgaaninen liuotin
DP	(<i>degree of polymerization</i>) polymerisaatioaste
FID	(<i>flame ionization detector</i>) liekki-ionisaatiodetektori
Gal	(<i>galactose</i>) galaktoosi
GalA	(<i>galacturonic acid</i>) galakturonihappo
GC-MS	(<i>gas chromatography - mass spectrometry</i>) kaasukromatografi-massaspektrometri
GlcA	(<i>glucuronic acid</i>) glukuronihappo
Glc	(<i>glucose</i>) glukoosi
Man	(<i>mannose</i>) mannoosi
ML	(<i>middle lamella</i>) välilamelli; puusolun soluseinän kerros
M_n	lukukeskimääräinen molekyylipaino
MTBE	(<i>methyl-tert-butyl ether</i>) metyyli- <i>tert</i> -butyylietteri; orgaaninen liuotin
M_w	painokeskimääräinen molekyylipaino
P	(<i>primary cell wall</i>) primäärisoluseinä; puusolun soluseinän kerros
PDI	polydispersiteettiarvo
PHWE	(<i>pressurized hot water extraction</i>) paineistettu kuumavesiuutto; uutto-menelmä
Rha	(<i>rhamnose</i>) rhamnoosi

S	<i>(secondary cell wall)</i> sekundääriseinä; puusolun soluseinän kerros
Sec-Malls	<i>(size-exclusion chromatography combined with multi-angle laser light scattering)</i> kokoekskluusiokromatografia-monikulmavalonsironta
UV/VIS	<i>(ultraviolet-visible spectrophotometry)</i> ultravioletti-näkyvävalospektrofotometri
W	<i>(warty layer)</i> kyhmykerros; puusolun soluseinän kerros
Xyl	<i>(xylose)</i> ksyloosi

1 Johdanto

Uutta biomassaa muodostuu luonnossa vuosittain 170 miljardia tonnia, josta 75 % on hiilihydraatteja. Muodostuvasta biomassasta vain pieni osa on ihmiskunnan käytössä. Hemiselluloosa on kolmanneksi yleisin biomassan osa selluloosan ja ligniinin jälkeen. Hemiselluloosasta voidaan fermentoida biopolttoaineita tai siitä voidaan tehdä peruskemikaaleja teollisuuden käyttöön. Eräs tehokkaimmista menetelmistä hemiselluloosien erottamiseksi puumateriaalista ja muista kasviperäisistä aineksista on paineistettu kuumavesiuutto (PHWE). Tällä uutolla saadaan puuaineksesta erotettua hemiselluloosat ja hieman muita veteen liukenevia komponentteja. Saadussa uutuksessa hemiselluloosat ovat vesiliukoisessa muodossa pääosin oligomeereinä ja polymeereinä. Uutuksessa ei ole enää kuin pieniä pitoisuuksia ligniinin hajoamistuotteita ja uuteaineita, jotka voidaan poistaa esimerkiksi lakkaasikäsittelyllä. Näin saatua lähes kokonaan puhdasta hemiselluloosaa voidaan jatkojalostaa muihin tarkoituksiin. Paineistettu kuumavesiuutto on tehokas uutomenetelmä, jossa ei tarvita orgaanisia liuottimia. Paineistetulla kuumavesiuutolla puumateriaalista saadaan erotetuksi hemiselluloosaa, ja se muokkaa vain vähän puun liukenemattomia komponentteja.

Tässä insinööriyössä tutkittiin ligniinin hajoamistuotteiden poistoa PHWE-uutetun puuaineksen hemiselluloosaketjuista lakkaasientsyymien avulla. Lakkaasin arveltiin muodostavan ligniinin hajoamistuotteista suurempia komplekseja, jolloin niiden suodattaminen pois liuoksesta tulisi mahdolliseksi. Käsittelystä toivottiin laboratoriotason puhdistusmenetelmää puu-uutteelle, jota voitaisiin myöhemmin käyttää myös suuremmalle mitta-kaavalle. Työssä tutkittiin lisäksi kahden lakkaasin kanssa yleisesti käytettävän mediaattorin vaikutusta hemiselluloosien puhdistamiseen.

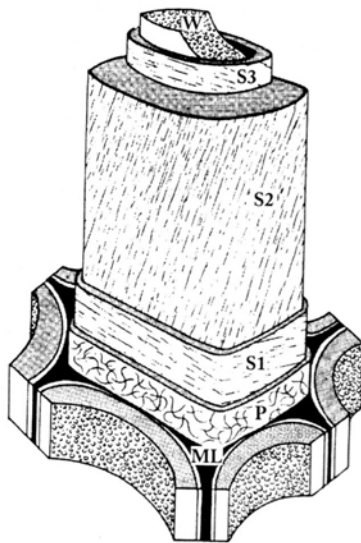
Puumateriaalista määritettiin ennen lakkaasikäsittelyä ja sen jälkeen sen sisältämät kokonaissokerien, sokerimonomeerien ja vapaiden uuteaineiden määrät sekä liuenneen ligniinin pitoisuus. Osa näytteistä määritettiin Åbo Akademiassa kokoeksklusiokromatografilla, jotta voitiin seurata ligniinin ja sokereiden molekyylikokojen muutoksia entsyymikäsittelyn aikana.

Työ suoritettiin Metsäntutkimuslaitoksella (Metla) kesällä 2010 ja sen kokeellinen osa tehtiin Metlan keskuslaboratoriossa Vantaalla. Tutkimussuunnitelman teki tutkija, FM Petri Kilpeläinen.

Kirjallinen osa

2 Puusolun soluseinän kerrokset

Puusolussa on useita eri soluseinän kerroksia, joista jokaisella on erilainen rakenne ja kemiallinen koostumus. Soluseinän koostumukseen vaikuttaa voimakkaasti puulaji ja solutyyppi. (10, s. 50; 20, s. 23.) Valtaosa havupuiden soluista on rungon suuntaisia trakeideja ja ydinsolujen suuntaisia ydinsädetrakeideja. Lehtipuiden yleisimmät solutyyppit ovat erilaiset kuidut. Näiden solutyyppien karkea esitys on kuvassa 1. (10, s. 36, 41.)



Kuva 1. Lehtipuun kuidun ja havupuun trakeidisolun soluseinän kaaviokuva. (10, s. 51.)

Välilamelli (ML) on yksittäisten puusolujen välissä sijaitseva rakenne. Sen tehtävä on sitoa solut toisiinsa, ja se koostuu pääasiassa ligniinistä ja pektiinistä. Primääriseinä (P) on puusolun uloin kerros. Se koostuu suurimmaksi osaksi selluloosasta, hemiselluloosasta, ligniinistä ja pektiineistä. Primääriseinän erottaminen välilamellista rakenneanalyysiä vasten on erittäin vaikeaa. Tästä johtuen näitä voidaan kutsua yhteisnimellä "yh-

distetty välilamelli" (CML). Tällä termillä tarkoitetaan siis vierekkäisten puusolujen välilamellien ja primääriseiniä muodostamaa kerrosta. (10, s. 50–51; 20, s. 24.)

Primääriseinän sisäpuolelle on sekundääriseinä (S), joka voidaan jakaa kolmeen kerrokseen: ulkokerrokseen (S1), keskikerrokseen (S2) ja sisäkerrokseen (S3). Eri kerroksista selkeästi paksuin on keskikerros. Sekundääriseinä muodostaa suurimman osan puusolun soluseinästä. (10, s. 51; 20, s. 24–26.)

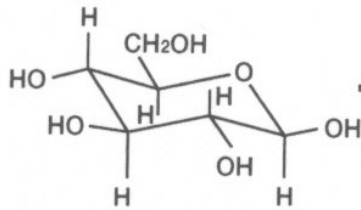
Joillakin lehtipuiden kuitusoluilla ja putkilosoluilla sekä havupuiden trakeidisoluilla on S3-kerroksen sisäpinnalla vielä niin sanottu kyhmykerros (W). Kyhmykerros on erittäin ohut pienten kyhmyjen kokonaan tai osittain peittävä kalvo. Kyhmyt sisältävät paljon ligniiniä. (10, s. 52; 20, s. 26.)

3 Puun rakenne

3.1 Selluloosa

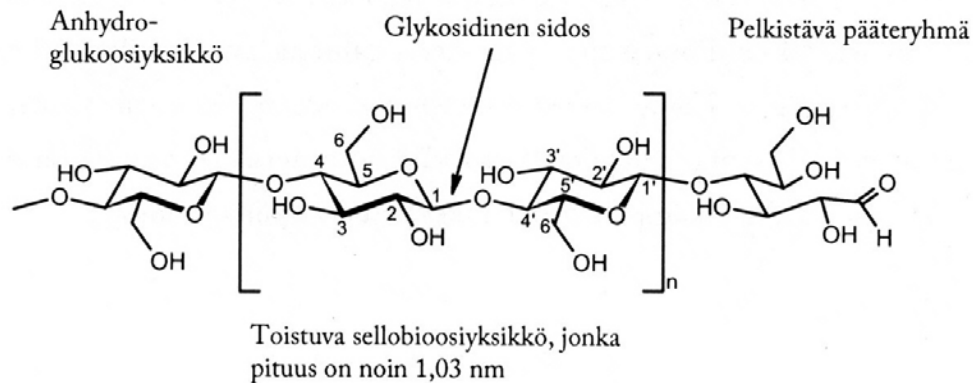
Suurin osa puun kuiva-aineen hiilihydraateista on selluloosaa. Sen määrä vaihtelee puun lajin ja kasvuolosuhteiden mukaan. Suomessa kasvavien puiden (koivu, kuusi ja mänty) kuiva-aineesta noin 40 % on selluloosaa. Eniten selluloosaa esiintyy puun sekundäärisessä kuorikerroksessa. (8, s. 27–28; 20, s. 55.)

Selluloosa on homopolysakkaridi, joka koostuu useista glukoosianhydrideistä ($C_6H_{10}O_5$) eli β -D-glukooseista. Nämä ovat kiinnittyneet toisiinsa β -glykosidisilla 1 \rightarrow 4 -sidoksilla. Jokaisella glukoosiosalla on kolme vapaata hydroksyyli ryhmää (-OH), jotka muodostavat vetysidoksia sekä saman ketjun eri glukoosiosien kanssa että muiden ketjujen glukoosiosien kanssa. Näistä sidoksista johtuu puuaineksen mekaaninen lujuus. β -D-glukoosit ovat tuolikonformaatiossa, jossa vetyatomit sijaitsevat aksiaalisissa asemassa ja hydroksyyli ryhmät ekvatoriaalisissa asemassa. Joka toinen β -D-glukoosi on kiertynyt 180 astetta akselinsa ympäri. Kuvassa 2 on esitetty D-glukoosin Fischer-projektio. (8, s. 29–30; 10, s. 65–67; 13, s. 301; 19, s. 25; 20, s. 55; 23, s. 615.)



Kuva 2. D-glukoosin Fischer-projektio. (8, s. 30.)

Selluloosamolekyylä on lineaarinen makromolekyylä, jossa useat β -D-glukoosit ovat liittyneet toisiinsa β -glykosidisilla 1 \rightarrow 4 -sidoksilla. Selluloosamolekyylä pitävät osaltaan myös koossa van der Waalsin voimat ja molekyyläien välillä olevat kovalenttiset sidokset. Kuvassa 3 on esitetty selluloosamolekyyläin Fischer-projektio, jossa nähdään β -D-glukoosien välinen glykosidinen sidos. (13, s. 301; 20, s. 56–57.)



Kuva 3. Selluloosan Fischer-projektio. Keskellä kuvaa näkyvä sellobioosiyksikkö toistuu selluloosamolekyylissä lukuisia kertoja. (10, s. 66.)

Selluloosamolekyyläin molekyylimassasta ei voida mitata tarkasti, ja siksi molekyyläin kokoa kuvataan polymerisaatioasteella (DP) ja polydispersiteettiärvolla (PDI). Polydispersiteettiärvolla tarkoitetaan molekyyläin painokeskimääräisen molekyyläipainon (M_w) ja lukukeskimääräisen molekyyläipainon (M_n) suhdetta. Selluloosan PDI-arvo on alhainen (<2), mikä on tyypillistä lineaarisille polymeereille. Polymerisaatioaste on selluloosalla tyypillisesti noin 10 000. Yhdessä selluloosamolekyylissä on siis 10 000 monomeeriyksikköä (glukoosia) ja molekyyläin pituus on noin 5 μ m. Polymerisaatioaste saattaa vaihdella puun eri osien ja eri soluseinämien välillä. Käsiteltäessä selluloosaa kemiallisesti sen ketjut pilkkoutuvat ja polymerisaatioaste pienenee. (8, s. 31; 10, s. 67–68; 20, s. 58; 23, s. 615.)

Selluloosamolekyylit muodostavat sidoksia toisten selluloosamolekyylien kanssa, joka kasaa ne yhteen kimpuiksi eli mikrofibrilleiksi. Nämä mikrofibrillit ovat osittain kiteisiä eli järjestäytyneitä ja osittain amorfisia eli epäjärjestäytyneitä. Puun selluloosa on suurimmaksi osaksi kiteistä. Selkeää rajaa kiteisen ja amorfisen alueen välillä ei ole havaittavissa. Kiteistä aluetta kutsutaan kristalliitiksi, ja yksi selluloosamolekyyli voi kuulua useaan eri kristalliittiin. (8, s. 31; 10, s. 68; 19, s. 25; 23, s. 615.) Kiderakenteen perusteella on eroteltavissa neljä erilaista polymorfista selluloosan muotoa, joita kutsutaan nimellä selluloosa I–IV. Puun kemian kannalta tärkeimpiä ovat selluloosa I ja selluloosa II. (10, s. 68; 19, s. 26–27; 20, s. 57.)

Selluloosa on veteen liukenematonta, vaikka sillä on paljon hydroksyyliiryhmiä. Liukenemattomuus johtuu selluloosaan tiivistä ja kiteisestä rakenteesta, jolloin vesi ei pääse mikrofibrillien väliin. Selluloosa kykenee kuitenkin imemään itseensä vettä sitoen sen amorfisten alueidensa vapaisiin hydroksyyliiryhmiin vetysidoksin, jolloin selluloosa turpoaa. (8, s. 32; 10, s. 71.)

Selluloosaketjun reaktiivisuus riippuu sen sisältämien vapaiden hydroksyyliiryhmien lukumäärästä ja sijainnista. Hydroksyyliiryhmät O6 ja O2 ovat reaktiivisimmat. Selluloosa on liukoinen sellaisiin kemikaaleihin, jotka pääsevät tunkeutumaan kiteisen rakenteen sisälle. Tällaisia ovat muun muassa erilaiset ioniset nesteet. (10, s. 71.)

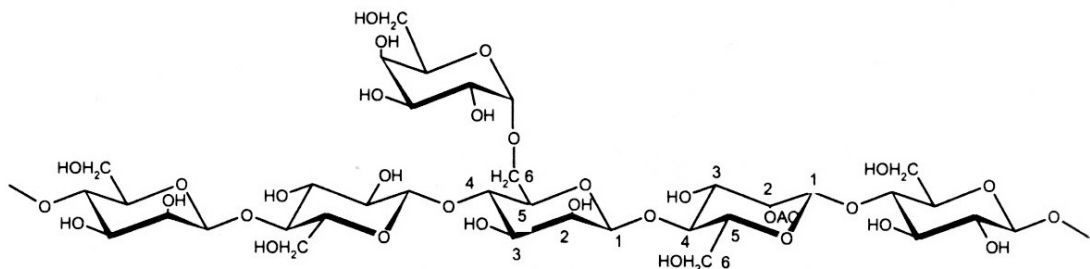
3.2 Hemiselluloosa

Puun kuiva-ainepitoisuudesta noin 20–30 % on hemiselluloosaa. Se on haaroittunut, amorfinen heteropolysakkaridi, joka koostuu erilaisista monosakkarideista, kuten mannoosista, glukoosista, ksyloosista ja galaktoosista. Hemiselluloosan pitoisuus vaihtelee lehti- ja havupuiden välillä sekä saman puun eri osien välillä. Havupuissa on paljon glukomannaania ja vähän ksyloosia, kun taas lehtipuissa ksyloosia on glukomannaania huomattavasti enemmän. Hemiselluloosa sijaitsee selluloosamikrofibrillien välissä ja vahvistaa siten puun rakennetta. (8, s. 35–36; 10, s. 73, 77, 82; 19, s. 22, 28–29; 20, s. 61–62, 68–69.)

Hemiselluloosat ovat hydrofiilisiä polysakkarideja. Osa hemiselluloosista on vesiliukoisia. Ligniiniin tai muihin hiilihydraatteihin sidoksissa oleva hemiselluloosa ei kuitenkaan juuri liukene veteen. (10, s. 82–83.)

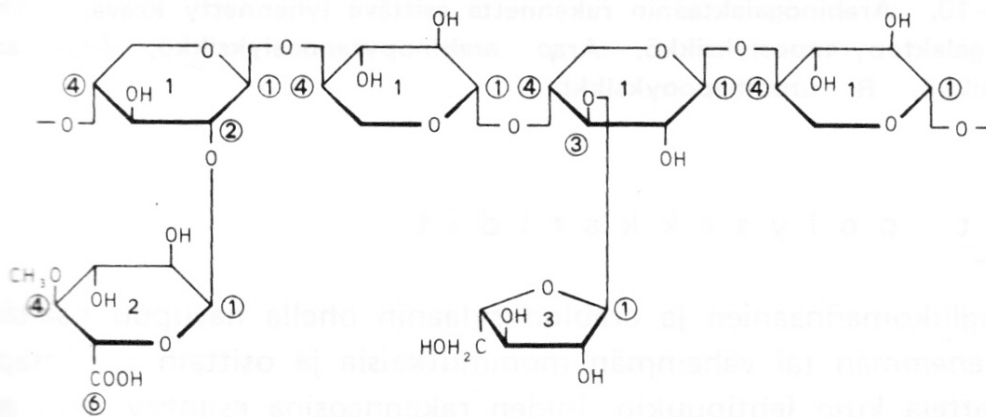
Selluloosamikrofibrilleihin hemiselluloosat tarttuvat vetysidoksin ja van der Waalsin voimilla. Vesimolekyylien kanssa ne muodostavat vetysidoksia. Ligniiniin hemiselluloosa puolestaan kiinnittyy kovalenttisin sidoksin. (10, s. 82–83; 20, s. 69.)

Havupuiden yleisin hemiselluloosa on O-asetyyligalaktoglukomannaani. Tästä käytetään usein nimitystä galaktoglukomannaani. Sen pitoisuus havupuussa on noin 10–15 %. Galaktoglukomannaaniketju koostuu glukoosi- ja mannoosiosista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa 1 → 4 -glykosididoksilla. Tähän ketjuun voi olla kiinnittyneenä asetyyli- ja galaktoosiryhmiä. Sivuryhmien galaktoosipitoisuuden mukaan havupuun hemiselluloosat voidaan jaotella vähägalaktoosisiin tai galaktoosisiin. Galaktoglukomannaanin rakenne on nähtävissä kuvasta 4. Galaktoglukomannaani on erityisesti happokäsittelyllä helposti pilkkoutuvaa ja sen asetyyliryhmät irtoavat helposti. (8, s. 35–37; 10, s. 75, 77–78; 20, s. 62–63.)



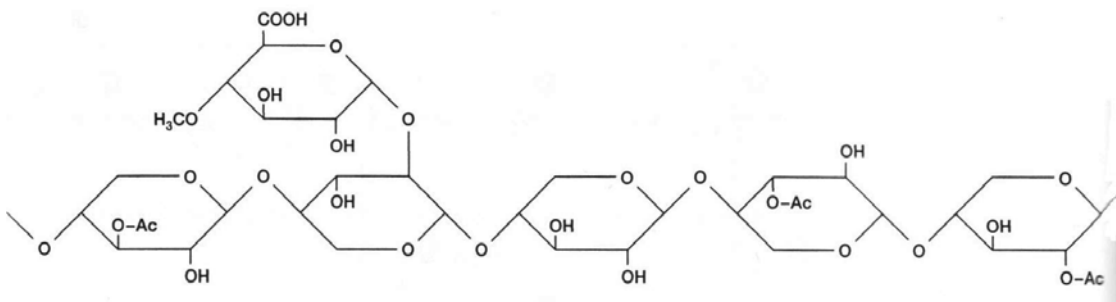
Kuva 4. Havupuun yleisimmän hemiselluloosan galaktoglukomannaanin Fischer-projektio. (10, s. 78.)

Havupuiden toiseksi yleisin hemiselluloosa on arabinoglukuroniksyylaani. Määrällisesti sitä ei kuitenkaan ole paljon, vain 7–10 %. (10, s. 75.) Arabinoglukuroniksyylaani on koostunut useista 1 → 4 -glykosididoksin toisiinsa kiinnittyneistä β-D-ksylopyranoosiyksiköistä. Tähän pääketjuun on lisäksi kiinnittynyt substituentteina α-L-arabinofuranoosiryhmiä ja 1 → 2 -glykosididoksin 4-O-metyyli-α-D-glukuronihapporyhmiä. Kiinnittyneet substituentit tekevät rakenteesta haaroittuneen. Rakennetta selventävä Fischer-projektio on esitetty kuvassa 5. (10, s. 76–77; 20, s. 63.)



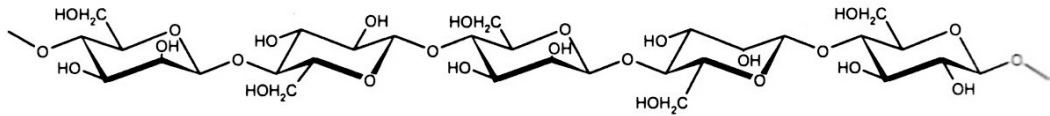
Kuva 5. Havupuun toiseksi yleisimmän hemiselluloosan arabinoglukuroniksytaanin Fischer-projektio. (20, s. 63.)

Lehtipuiden yleisin hemiselluloosa on O-asetyyli-4-O-metyyyliglukuroniksytaani, josta käytetään nimitystä glukuroniksytaani. Lehtipuiden kuivapainosta noin 15–30 % on glukuroniksytaania, jonka pääketju koostuu β -D-ksylopyranoosiyksiköistä. Nämä yksiköt ovat liittyneinä toisiinsa 1 \rightarrow 4 -glykosidisten sidosten avulla. Tähän pääketjuun liittyy eetterisidoksin asetyyli- ja metyyyliglukuronihapporyhmiä. Kuvassa 6 on esitetty glukuroniksytaanin Fischer-projektio. (8, s. 37–38; 10, s. 75–76; 19, s. 29; 20, s. 64–65.)



Kuva 6. Lehtipuun yleisin hemiselluloosan glukuroniksytaanin Fischer-projektio. (8, s. 38.)

Lehtipuiden toiseksi yleisin hemiselluloosa on glukomannaani. Sen pitoisuus puun kuiva-aineesta on kuitenkin vain 2–5 %. Se on suoraketjuinen, heikosti haaroittunut hemiselluloosa. Lehtipuiden glukomannaani koostuu 1 \rightarrow 4 -glykosididisidoksin toisiinsa kiinnittyneistä glukopyranoosi- ja β -D-mannopyranoosiyksiköistä. Näiden yksiköiden pitoisuudet vaihtelevat puulajista riippuen 1:1–1:2. Glukomannaaniketju on esitetty kuvassa 7. (10, s. 75, 77; 20, s. 66.)



Kuva 7. Lehtipuun toiseksi yleisimmän hemiselluloosan glukomannaanin Fiscer-projektio. (10, s. 78.)

Selluloosan ja hemiselluloosan lisäksi puussa on muitakin polysakkarideja, kuten tärkkelystä ja pektiiniä. Tärkkelys on puiden vararavintoa. Tärkkelysketju koostuu lineaarisesta amyloosista ja haaroittuneesta amylopektiinistä. Näillä molemmilla on α -glykosidisia sidoksia, jotka hajoavat helposti. Pekiinejä on puussa kolmea eri päätyyppiä: homogalakturnaania, ramnogalakturnaani I:tä ja ramnogalakturnaani II:ta. (10, s. 79–82; 13, s. 300; 19, s. 30; 23, s. 616–617.)

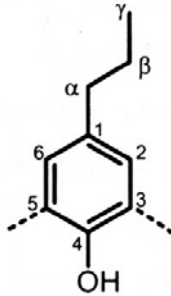
Hemiselluloosat voidaan helposti uutaa alkaliin vesiliuoksilla. Hapoilla käsitellessä ne hajoavat monosakkarideiksi. (8, s. 35; 20, s. 61.) Parempi ja yleisemmin käytössä oleva menetelmä näiden erottamiseksi on paineistettu kuumavesiuutto. Tällä menetelmällä ja sopivilla parametreilla saadaan lähes kaikki kasvimateriaalin hemiselluloosa uutettua ja siitä hydrolysoituu monomeereiksi vain pieni osa. (12.)

3.3 Ligniini

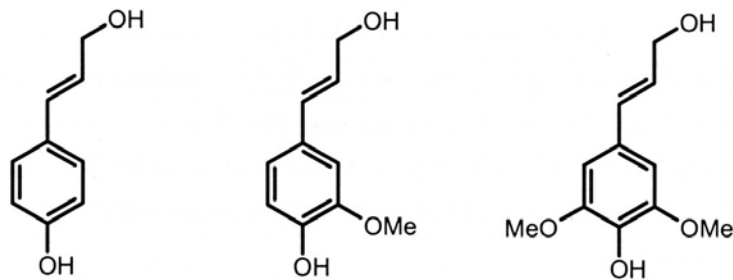
Puun ligniinipitoisuus on noin 20–30 % sen kuivapainosta. Ligniini ei ole tasaisesti jakautuneena puun soluseinien kerroksiin. Suhteellisesti eniten ligniiniä on puun sekundääriseinämissä ja yhdistetyssä välilamellissa. Ligniineillä on havaittavissa rakenneroja eri ilmenemispaikkojen välillä. Ligniinin tehtävänä on lujittaa puun rakennetta ja estää veden kulkeutumista soluseinämien läpi. (8, s. 41; 10, s. 93; 19, s. 30–31; 20, s. 81.)

Ligniini on rakenteeltaan monimutkainen polymeeri. Se on voimakkaasti haaroittunut ja kolmiulotteinen. Se koostuu aromaattisista fenyylipropaniyksiköistä, joka on esitetty kuvassa 8. Kasvien ligniini koostuu kolmenlaisista prekursoreista eli monomeeriyksiköistä. Näitä ovat *para*-kumaryylialkoholi, sinapyylialkoholi ja koniferyylialkoholi. Prekursorit eroavat toisistaan metoksyylisivuryhmien lukumäärän mukaan. *Para*-kumaryylialkoholissa ei ole lainkaan metoksyylisivuryhmiä, kun taas koniferyylialkoholissa

niitä on yksi ja sinapyylialkoholissa kaksi. Ligniinin prekursoreiden Fischer-projektio on esitetty kuvassa 9. (8, s. 41–42; 10, s. 84–85, 92; 19, s. 30–31; 20, s. 72, 74.)

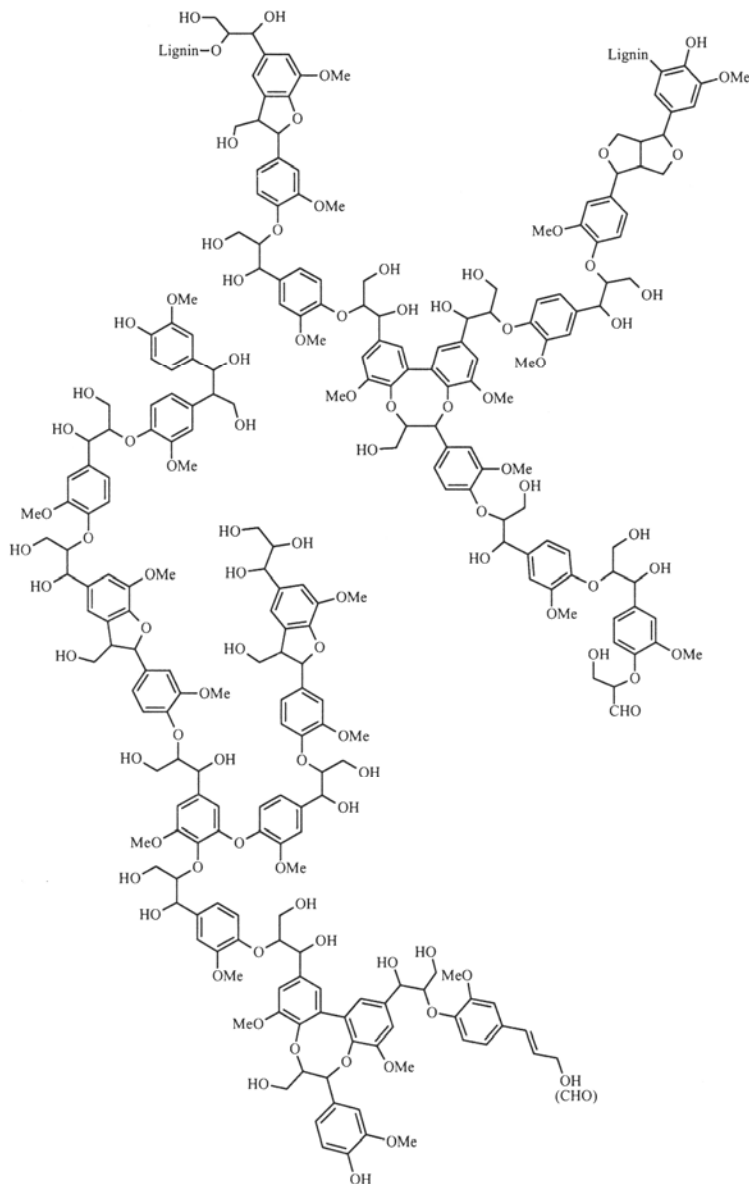


Kuva 8. Fischer-projektio fenyylipropaniyyksiköstä ja sen hiiliatomien nimeäminen. Fenyylipropaniyyksikkö on ligniinin rakenneyksikkö. (10, s. 85.)



Kuva 9. Ligniinin prekursorit Fischer-projektioina. Vasemmalla *para*-kumaryylialkoholi, keskellä koniferyylialkoholi ja oikealla sinapyylialkoholi, jotka eroavat toisistaan metoksyylisivuryhmien lukumäärän perusteella. (10, s. 85.)

Lehtipuiden ja havupuiden ligniinit eroavat toisistaan koostumukseltaan. Samoin näiden välillä on eroja ligniinipitoisuudessa – lehtipuiden ligniinipitoisuus on havupuita alhaisempi. Havupuiden ligniini on guajasyyliligniiniä, joka koostuu suurimmalta osaltaan koniferyylialkoholista. Havupuiden guajasyyliligniini pitoisuus on noin 24–33 %. Kuvassa 10 on esimerkki guajasyyliligniinin monimutkaisesta rakenteesta. Lehtipuiden ligniini puolestaan on koostunut suurimmalta osin koniferyylialkoholista ja sinapyylialkoholista. Näistä koostunutta ligniiniä kutsutaan guajasyyli-syringyyliligniiniksi. Lehtipuiden guajasyyli-syringyyliligniinipitoisuus on noin 16–25 %. (8, s. 44; 10, s. 84; 19, s. 22; 20, s. 81.)



Kuva 10. Yksinkertaistettu Fischer-projektio guajasyylliligniinistä. Kuvasta nähdään ligniineille tyypillinen monimutkainen ja haaroittunut rakenne. (10, s. 91.)

Ligniinin funktionaaliset ryhmät vaikuttavat sen ominaisuuksiin ja reaktiivisuuteen. Niiden merkitys näkyy erityisesti paperinvalmistuksessa. Ligniineillä on muutamia tyypillisiä funktionaalisia ryhmiä: fenolinen hydroksyyli ryhmä, alifaattinen hydroksyyli ryhmä, metoksyyliryhmä ja karbonyyli ryhmä (aldehydi ja ketoni). Havu- ja lehtipuiden välillä on eroja eri funktionaalisten ryhmien määrissä. (8, s. 44; 10, s. 90–92; 19, s. 31; 20, s. 79–80.)

Ligniinen laadullinen analysointi on vaikeaa. Eri menetelmillä saadaan toisistaan poikkeavia tuloksia, joten menetelmän ilmoittaminen tulosten yhteydessä onkin erityisen tärkeää. (8, s. 44.) Ligniinin molekyylikoon selvittäminen on hankalaa puutteellisista menetelmistä johtuen. Käytössä olevissa menetelmissä tapahtuu yleensä aina osittaista ligniinin hajoamista, jolloin saadut tulokset poikkeavat hieman toisistaan. Ligniinit koostuvat 5–500 monomeeriyksiköstä ja niiden molekyyllipainojakauma on siten 1000–100 000 g/mol. Havupuuligniinin molekyyli­massa (M_w on 15 000) on korkeampi kuin lehtipuuligniinin (M_w on 11 000). Sekä havu- että lehtipuun ligniinin PDI-arvo on 3–4, kun selluloosalla vastaava luku on alle 2. (10, s. 92; 20, s. 83.)

Natiivi ligniini ei liukene veteen eikä poolittomiin orgaanisiin liuottimiin. Jotkin tietyt liuottimet, kuten dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja dioksaani, saattavat kuitenkin osittain liuottaa ligniiniä. (10, s. 92; 17, s. 16.)

Ligniinen ja hiilihydraattien välillä uskotaan olevan erilaisia kemiallisia sidoksia ja fyysisiä voimia. Juuri kemiallisten sidosten uskotaan toimivan ligniinen ja hemiselluloosien yhdessä pitävänä voimana. Selluloosan kanssa ligniini ei juuri sitoudu. Kemiallisista sidoksista yleisimpiä ovat ester- ja eetterisidokset ligniinin α -hiilen ja hiilihydraatin välillä. Myös glykosidisia sidoksia on näiden välillä havaittu. Lehtipuiden ligniini on sitoutunut lähes pelkästään glukuronoksyalaaniin ja havupuiden ligniini kaikkiin sen hemiselluloosiin. (10, s. 94; 20, s. 83.)

Ligniinin eristäminen puumateriaalista on vaikeaa, ja se aina hieman muuttaa ligniinin rakennetta ja ominaisuuksia. Ligniinin eristämässä on käytössä kaksi pääkeinoa. Ensimmäisessä poistetaan puumateriaalista kaikki muu aines (hiilihydraatit), jolloin jäljelle jää liukenematon ligniini. Toisena keinona on ligniinin eristäminen liukoisine reaktiotuotteina, toisin sanoen poistetaan ligniini ja jäljelle jäävät hiilihydraatit. Muita keinoja ligniinen eristämässä on esimerkiksi uuttaminen. (16, s. 7–8; 17, s. 7; 20, s. 71–72.)

Ligniinin eristäminen poistamalla muu aines tapahtuu yleensä rikkihappohydrolyysillä. 72 m-% rikkihapolla saadaan uutetusta puumateriaalista poistettua hiilihydraatit. Tällöin saadaan niin sanottua Klason-ligniiniä. Eristämässä voidaan käyttää myös muita

happoja, esimerkiksi suolahappoa, fluorivetyhappoa, perkloorihappoa tai entsyymejä. (16, s. 8–13; 17, s. 6; 20, s. 71.)

Ligniinin eristämiseen liukoisina reaktiotuotteina voidaan käyttää joko orgaanisia tai epäorgaanisia kemikaaleja. Orgaanisista kemikaaleista käytössä ovat muun muassa erilaiset alkoholit, dioksaanit, fenolit ja DMSO. Epäorgaanisista kemikaaleista voidaan käyttää esimerkiksi erilaisia vahvoja alkaleja, kuten natriumhydroksidia. Alkaliin kanssa voidaan käyttää myös korkeaa painetta ja lämpötilaa ligniinin eristämisen edistämiseksi. (16, s. 13–19; 17, s. 6–7.)

Jotta eristetty ligniini olisi mahdollisimman puhdasta ja näin ollen mahdollisimman soveliaista tutkimuskäyttöön, on puumateriaalista on poistettava uuteaineet. Poistamatta jääneet uuteaineet saattavat myös häiritä seuraavia ligniinien eristämisvaiheita. Uuteaineet poistetaan usein uuttamalla erilaisilla liuottimilla. Sopivia liuottimia ovat muun muassa eetterit, bentseeni, etyylialkoholi ja näiden yhdistelmät. (16, s. 8; 17, s. 7.)

3.4 Uuteaineet ja epäorgaaniset yhdisteet

Uuteaineet koostuvat laajasta joukosta erilaisia yhdisteitä, joista suurin osa on syntynyt glukoosista monen välivaiheen kautta. Uuteaineiden määrä ja kemiallinen luokitus vaikuttavat puun kemiallisiin, biologisiin ja fysiologisiin ominaisuuksiin, joilla on suuri merkitys muun muassa paperin valmistuksessa. Uuteaineiden määrään vaikuttavat puulaji, puun kasvuolosuhteet ja maantieteellinen sijainti. Yleensä puu sisältää vain hyvin pieniä pitoisuuksia uuteaineita, alle 5 % puun kuivapainosta. (8, s. 45; 10, s. 96–97; 19, s. 33–35; 20, s. 87.)

Uuteaineet liukenevat orgaanisiin liuottimiin. Tällaisia uuteaineita ovat muun muassa erilaiset fenoliset yhdisteet, rasvahappojen triglyseroliesterit ja vahat. Neutraaleista orgaanisista liuottimista ovat yleensä käytössä asetoni, bentseeni ja dietyylieetteri. Tanniinit ja epäorgaaniset suolat liukenevat myös pelkkään kuumaan veteen. (8, s. 45; 10, s. 96; 19, s. 33; 20, s. 87.)

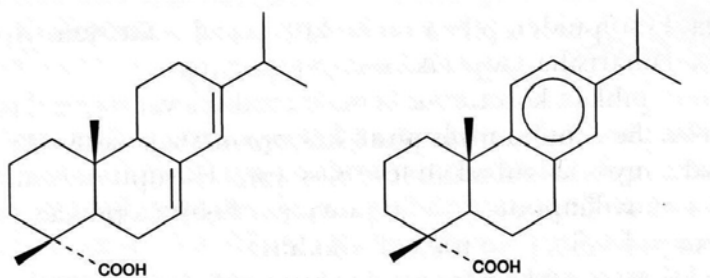
Uuteaineyhdisteet voidaan jaotella niiden kemiallisen rakenteen perusteella seuraavasti: a) terpeenit, terpenoidit ja sterolit, b) rasvat, vahat ja niiden komponentit ja c) feno-

liset yhdisteet. Koska varsinkin havupuiden pihka sisältää paljon uuteaineita, käytetään uuteaineista ajoittain hieman virheellistä kansankielistä nimitystä "pihka". Tämän sijain-
tiin perustuvan jaottelun mukaan uuteaineet voidaan jakaa kolmeen ryhmään: pato-
logiseen pihkaan, fysiologiseen pihkaan ja sydänpuupihkaan. (20, s. 87; 22.)

Terpeenit koostuvat yhdestä tai useammasta isopreeniyksiköistä (C_5H_8). Niiden luokit-
telu perustuukin isopreeniyksiköiden lukumäärään. Tarkempi nimeäminen on esitetty
taulukossa 1. Terpenoidi on terpeeni, johon on liittynyt happiatomin sisältävä funktio-
naalinen ryhmä. Terpeenit ja terpenoidit voivat olla syklisiä tai asyklisiä (avoketjuisia)
ja ovat lipofiilisiä. Hartsihapot kuuluvat diterpenoideihin. Sterolit esiintyvät puuainek-
sessa usein rasvahappojen estereinä eli vahoina, mutta on myös vapaita steroleja. Ku-
vassa 11 on kaksi esimerkkiä eri hartsihapoista ja niiden Fischer-projektiot.
(10, s. 98–101; 20, s. 94–96; 22.)

Taulukko 1. Terpeenien nimeäminen isopreeniyksiköiden lukumäärän mukaan.

nimi	isopreeniyksiköiden lkm
monoterpeeni	2
seskviterpeeni	3
diterpeeni	4
triterpeeni	6
tetraterpeeni	8
polyterpeeni	> 8

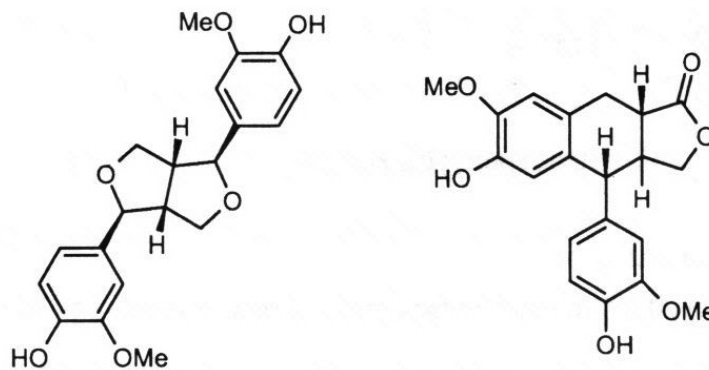


Kuva 11. Esimerkkejä hartsihapoista: vasemmalla abietiinihapon ja oikealla dehydroabietiiniha-
pon Fischer-projektio. Hartsihapot ovat diterpenoideja. (8, s. 46.)

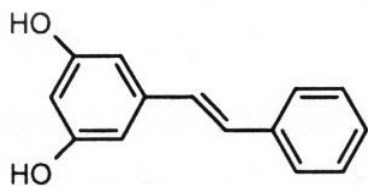
Rasvahappojen glyseridiestereitä kutsutaan yleisesti rasvoiksi. Niiden alkoholikompo-
nentti on glyseroli. Puuaines sisältää rasvoista eniten triglyseridejä. Vahat ovat myös
estereitä, mutta niiden alkoholikomponentti on pitkäketjuinen tyydyttynyt tai tyydytty-
mätön alkoholi, steroli tai terpenyylialkoholi. Havupuusta on löytynyt toistakymmentä

erilaista rasvahappoa, jotka yleensä ovat 12–24 hiiltä pitkiä ja voivat olla tyydyttyneitä tai tyydyttymättömiä. Yleisin rasvahappo on linolihappo. Uuteaineissa ei juuri ole vapaita rasvahappoja ja kaikki rasvat ja vahat ovat lipofiilisiä. (10, s. 102–103; 19, s. 35–36; 20, s. 92–94.)

Uuteaineisiin kuuluu myös lukuisia erilaisia fenolisia yhdisteitä, joita esiintyy varsinkin havupuissa. Niiden katsotaan olevan peräisin ligniinin biosynteesistä. Havupuiden yksinkertaisia fenolisia yhdisteitä ovat muun muassa vanilliini, koniferyyli aldehydi, konifeeriini ja syringin. Lignaanit (C_6C_3) ovat fenolisia yhdisteitä, joissa kaksi fenyylipropaniyyksikköä on liittynyt toisiinsa. Tällaisia ovat muun muassa kuvassa 12 esitetyt pinoresinoli ja konidendriini. Flavonoidit (esimerkiksi krysiini), stilbeenit (esimerkiksi kuvassa 13 esitetty pinosylviini) ja tanniinit kuuluvat myös uuteaineiden fenolisiin yhdisteisiin. (10, s. 104–105; 19, s. 36–37.)



Kuva 12. Esimerkkejä lignaaneista: vasemmalla pinoresinolin ja oikealla konidendriinin Fischer-projektio. (10, s. 104.)



Kuva 13. Esimerkki stilbeenistä: pinosylviinin Fischer-projektio. (10, s. 104.)

Patologiseksi pihkaksi luetaan puun kuoren ja sydänpuun uuteaineet. Myös havupuiden pihkarakkuloissa ja pihkatiehyissä olevat uuteaineet kuuluvat tähän ryhmään. Patologinen pihka koostuu suurimmaksi osin hartsihapoista (diterpenoidi), monoterpeeneistä ja erilaisista fenolisista yhdisteistä. Patologisen pihkan tarkoitus on suojata puun sisäosia ulkopuolisia uhkia kuten hyönteisiä ja sieniä vastaan. Tiehytipihka on patologista pih-

kaa, joka erittyy puun pihkatiehyistä paineen vaikutuksesta nopeasti, jos puuhun tulee ulkoinen vaurio. Huomattavaa on, että kaikilla havupuilla, esimerkiksi setrillä, ei ole pihkatiehyitä. (10, s. 97; 20, s. 87–89.)

Puun sisäosat eli sydänpuu sisältää usein muusta rungosta poikkeavia uuteaineita, joita kutsutaan sydänpuupihkaksi. Näidenkin tarkoitus on suojata puun sisäosia ulkoisilta uhkilta. (10, s. 97.)

Fysiologinen pihka sijaitsee puun ydinsäteiden tylppysoluissa eli parenkyymisoluiissa. Sitä kutsutaankin usein parenkyymipihkaksi. Fysiologinen pihka koostuu pääasiassa rasvahappoestereistä eli rasvoista ja vahoista, ja myös steroleja on havaittavissa. Fysiologisen pihkan merkitys elävässä puussa on toimia sen vararavintona. Lehtipuiden uuteaineet ovat lähes pelkästään fysiologista pihkaa. (10, s. 98; 20, s. 87–89.)

Havupuiden uuteaineet esiintyvät pääasiassa puun pihkassa. Yleisimpiä havupuun uuteaineita ovat erilaiset terpenoidit, hartsihapot, fenoliset yhdisteet, erilaiset pitkäketjuiset rasvahapot sekä vapaat rasvahapot. Lehtipuiden uuteaineet ovat pääasiallisesti rasvoja, vahoja ja steroleja. (8, s. 45; 10, s. 97; 20, s. 91.)

Epäorgaanisia yhdisteitä on Suomessa kasvavissa puissa hyvin vähän, vain noin 1 % puun kuivapainosta. Epäorgaanisten yhdisteiden pitoisuuksiin vaikuttaa eniten puun maantieteellinen kasvupaikka, ja myös muilla kasvuolosuhteilla on vaikutusta. Lauhkean alueen puissa ei epäorgaanisia yhdisteitä juuri esiinny, kun taas trooppisilla alueilla niiden pitoisuus voi olla jopa 5 % puun kuivapainosta. Yleisimpiä puussa esiintyviä epäorgaanisia alkuaineita ovat kalsium (Ca), kalium (K) ja magnesium (Mg). (10, s. 105–106; 19, s. 39–40.)

4 PHWE-utettu puumateriaali

Paineistetussa kuumavesiuutossa (PHWE) puuraaka-ainetta uutetaan sopivissa olosuhteissa. Tällöin puusta saadaan liuotettua veteen hemiselluloosa ja muita liukenevia komponentteja, kuten pieniä määriä ligniiniä. PHWE on tehokas, mutta samalla ympäristöystävällinen menetelmä. Vesi uutavana fluidina ei aiheuta käsittelijälleen tai ympä-

ristölle haittaa. PHWE-uutolla 220 °C:ssa saadaan Leppäsen ym. (12) mukaan uutettua jopa kaikki puun hemiselluloosat, joista vain 4–22 % hydrolysoituu monomeereiksi ja mukaan uuttuu vain noin 15 % puun ligniineistä. (1, s. 20–21; 7, s. 15; 12.)

Dynaamisessa uutossa paineistettu kuuma vesi ohjataan uuttokammiossa olevan hienoksi pilkotun puumateriaalin läpi halutulla virtausnopeudella. Yleensä lämpötila on yli 100 °C, mutta kuitenkin alle veden kriittisen pisteen. Paine nostetaan niin korkeaksi, että vesi pysyy uuton ajan nestemäisenä. PHWE-uuton lopputulokseen vaikuttavat uuttolämpötila, aika, paine ja mahdollisten kemikaalien lisäys. Näistä parametreista eniten lopputulokseen vaikuttaa uuttolämpötila. Yli 100 °C lämpötiloissa veden poolisuus pienenee ja sen kyky liuottaa poolittomia yhdisteitä kasvaa. Korkeissa lämpötiloissa ja paineissa veden dielektrisyysvakio (ϵ) pienenee. (1, s. 20–21; 7, s. 15–16, 18; 12.)

5 Entsyymeistä yleisesti

Kaikki entsyymit ovat proteiineja. Tästä tekee poikkeuksen vain katalyyttinen RNA. Entsyymien kolmiulotteinen rakenne on erittäin tärkeä niiden toiminnan kannalta. Varsinkin substraatin kiinnittymiskohdan rakenne on kriittinen. Yleisesti entsyymit tarvitsevat hyvin miedot olosuhteet toimiakseen: normaali ilmanpaine, alle 100 °C lämpötila ja pH 4–8. Väärät olosuhteet voivat inaktivoida entsyymin. Esimerkiksi liian korkea lämpötila denaturoi entsyymin proteiinirakenteen. (2; 4.)

Entsyymit ovat hyvin substraattiselektiivisiä. Entsyymin aktiiviseen keskukseen voi sopia useampi erilainen substraatti, mutta yleensä yksi näistä on muita huomattavasti parempi. Usein entsyymit nimetäänkin sen substraatin perusteella. (2; 4.) Substraatti sitoutuu entsyymissä sen aktiiviseen keskukseen vetysidosten ja ionisidosten avulla. Useat entsyymit tarvitsevat kofaktorin sitoakseen substraattinsa. Yleisimpiä kofaktoreita ovat epäorgaaniset metalli-ionit. Koentsyymeiksi kutsutaan orgaanisia kofaktoreita, jotka ovat usein pienimolekyylisiä vitamiinijohdannaisia. (4.)

Entsyymien tehtävänä on usein toimia jonkin reaktion katalyyttinä alentaen reaktioolosuhteita sekä parantaen reaktion spesifisyyttä ja sen astetta. (2; 4.) Eri reaktiotyyppejä käytetään entsyymien luokittelussa. Yleisin luokittelu jakaa entsyymit kuuteen eri

luokkaan: hydrolaaseihin, oksidoreduktaaseihin, lyaaseihin, ligaaseihin, transferaaseihin ja isomeraaseihin. (4.)

Entsyymien määrä ilmaistaan usein sen aktiivisuutena, eikä muutoin niin tyypillisinä grammoina, litroina ja niin edelleen. Aktiivisuuteen perustuvan määrän ilmaiseminen johtuu siitä, että entsyymit harvoin ovat absoluuttisen puhtaita ja osa siitä voi olla jopa inaktivoitunut. SI-järjestelmän yksikkö on katali [kat]. Tämä kertoo, kuinka monta moolia entsyymien katalysoimaa reaktiota tapahtuu sekunnissa. Nämä lukuarvot ovat usein hyvin pieniä, joten niiden sijasta voidaan käyttää yksikköä *unit* [U], jonka määrittely on entsyymien aiheuttama tuotteen muodostumisnopeus [$\mu\text{mol}/\text{min}$] standardiolosuhteissa. Yksi katali vastaa 60 000 000 U:a. Entsyymien aktiivisuuteen vaikuttavat muun muassa pH, lämpötila, substraattikonsentraatio sekä kofaktoreiden ja koentsyymien konsentraatio. (4.)

6 Lakkaasi ja sen mediaattorit

Lakkaasientsyymiä (*dioxygen oxidoreductases*; EC 1.10.3.2) esiintyy luonnossa eri lahohtajasisienissä, erityisesti valkolahohtajasisienessä, kasveissa ja joissakin mikrobeissa (2; 3; 14). Tyypillisesti sieniperäinen lakkaasi on solun ulkoinen proteiini, 60–70 kD kokoinen, ja sen isoelektrinen piste on noin pH:ssa 4. Valkolahottajasisienet erittävät lakkaasia pilkkoakseen puun tai muun kasvimateriaalin ligniiniä ja päästäkseen siten kosketukseen selluloosaan ja hemiselluloosaan. Lakkaasin ehkä tärkein kaupallinen tarkoitus on sellun puhdistaminen paperinvalmistuksessa. (2; 14.)

Oksidoreduktaasientsyymit toimivat katalyytteinä hapetus-pelkistysreaktioissa. Se siis katalysoi elektronin siirtoa luovuttajalta vastaanottajalle. EC-luokan 1.10.3 entsyymeillä, joihin lakkaasikin kuuluu, elektronin luovuttajana toimii difenoli tai vastaava yhdiste ja elektronin vastaanottajana on happi. (11; 14.)

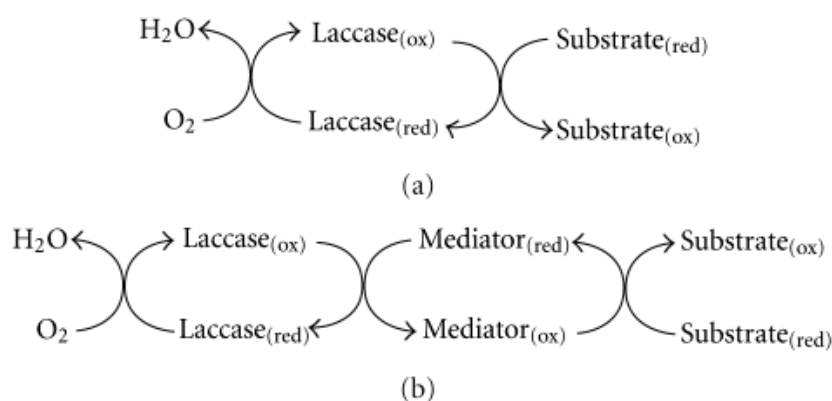
Lakkaasin kofaktorina toimivat kupariatomit, joita sillä on neljä kappaletta. Lakkaasi voi hapettaa niin fenolisia kuin ei-fenolisiäkin ligniiniyhdisteitä. Lakkaasi hapettaa substraattiaan, jolloin substraatti pelkistyy ja vapautuu vettä. Tätä voidaan vielä tehostaa käyttämällä pelkistysmediaattoreita. (3; 6; 14.)

Lakkaasin pääsubstraatti on ligniini, mutta se ei kuitenkaan ole kovin tarkka substraattinsa suhteen. Tämän takia esimerkiksi sienestä eristettyä lakkaasia voidaan käyttää tekstiiliteollisuudessa. Lisäksi käytettäessä mediaattoria saadaan lakkaasi hapettamaan muitakin substraatteja. (11; 14; 18.)

Mediaattoriksi kutsutaan pienimolekyylisiä komponentteja, jotka tehostavat entsyymien toimintaa. Ne voivat olla esimerkiksi vapaita radikaaleja. Luonnossa solut itse saattavat joissain tapauksissa tuottaa mediaattoreita entsyymireaktioidensa tueksi. (2; 3; 18.) Tällainen luonnollinen lakkaasimediaattori on esimerkiksi fenoli syringaldehydi (5).

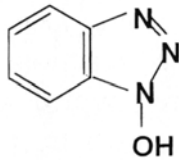
Hyvän pelkistysmediaattorin ominaisuuksia ovat alhainen käyttökustannus, hyvä toimivuus entsyymien substraattina sekä sen avulla syntyneiden hapettuneiden ja pelkistyneiden välimuotojen pysyvyys, joiden ei myöskään tule inaktivoida entsyymiä. (5.)

Lakkaasi tarvitsee mediaattoria siinä tapauksessa, että se ei suoraan pysty hapettamaan substraattiaan. Tällaisissa tilanteissa voi substraatin koko olla liian suuri tai sen hapetus-pelkistyspotentiaali on huomattavan korkea. Lakkaasin mediaattorit toimivat välillisenä substraattina, joiden hapetetut radikaalit voivat toimia hapetus-pelkistysreaktiossa kohdesubstraatin kanssa. Kuvassa 14 on esitetty tapahtuvat hapetus-pelkistysreaktiot mediaattorin kanssa ja ilman sitä. (3; 11; 14.)

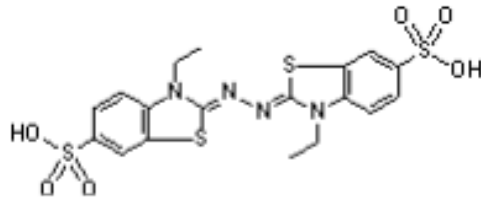


Kuva 14. Lakkaasin hapetus-pelkistysreaktiot a) ilman mediaattoria ja b) mediaattorin kanssa. (14.)

Tähän mennessä tehokkaimmaksi tutkituksi lakkaasin mediaattoriksi on havaittu 1-hydroksibentsotriatsoli (1-HBT). Myös muut N-OH-ryhmiä sisältävät N-heterosyklit ovat toimivia. (2; 21.) Toinen yleisesti käytetty lakkaasin mediaattori on 2'2-atsino-bis(3-etylibentsotriatsoliini-6-sulfonaatti) (ABTS). (3; 6.) Kuvissa 15 ja 16 on esitetty kahden tyypillisimmän mediaattorin Fischer-projektio.



Kuva 15. Mediaattori 1-HBT:n Fischer-projektio. 1-HBT:lla on lakkaasimediaattoreille tyypillinen N-heterosyklinen rakenne, jossa on N-OH-ryhmä. (2.)



Kuva 16. Mediaattori ABTS:n Fischer-projektio. (3.)

Kokeellinen osa

7 Materiaalit ja menetelmät

7.1 Näytesarjat

Työssä valmistettiin seitsemän 3–4 näyteliuoksen sarjaa, joissa käytettiin puuraaka-aineena vaihdellen koivua tai kuusta. Puuraaka-aine oli joko valmiiksi nestemäisenä konsentraattina tai kuivattuna uutteenä, jolloin se liuotettiin veteen halutussa konsentraatiossaan. Kaikki käytetyt puuraaka-aineet oli tehty PHWE-uutolla. Sarjoissa, joissa ei käytetty mediaattoria, yksi näyteliuoksista toimi referenssinä, eikä sitä siten käsitelty lakkaasilla lainkaan. Muut sarjan liuoksista käsiteltiin eri määrillä lakkaasia. Niissä sarjoissa, joissa käytettiin mediaattoria, oli lakkaasipitoisuus kaikissa näyteliuoksissa sama. Taulukossa 2 on esitetty jokaisen sarjan käytetty puulaji, koivu tai kuusi, sekä sen olomuoto. Eri sarjojen näyteliuosten lakkaasipitoisuudet on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 2. Tehtyjen näytesarjojen puulajit ja puu-uutteen olomuoto.

sarja	puulaji	olomuoto
1	koivu	nestemäinen
2	koivu	nestemäinen
3	koivu	nestemäinen
4	koivu	kuivattu
5	kuusi	nestemäinen
6	kuusi	nestemäinen
7	kuusi	nestemäinen

Taulukko 3. Tehtyjen näytesarjojen eri näyteliuosten lakkaasipitoisuudet.

sarja	lakkaasipitoisuus [til-%]			
	näyteliuos 1	näyteliuos 2	näyteliuos 3	näyteliuos 4
1	0	1	3	5
2	0	3	5	-
3	0	3	5	-
4	0	3	5	-
5	0	3	5	-
6	3	3	3	-
7	3	3	3	-

Entsyyminä työssä käytettiin nestemäistä Novozymes A/S:n Novozym® 51003, OMN07011 -lakkaasientsyymiä. Sen aktiivisuus oli noin 1000 LAMU/ml eli noin 17 µkat/ml ja kuiva-ainepitoisuus oli noin 16 %. Mediaattoreina työssä käytettiin Sigma-Aldrich Finland Oy:n kiinteitä 1-HBT:a ja ABTS:a.

Sarjassa 1 oli referenssiluokka ja kolme näyteliuosta. Puulähtöaineena käytettiin nestemäistä koivukonsentraattia. Koivukonsentraatti oli valmistettu PHWE-uutolla uuttoparametreilla: lämpötila 160 °C, virtausnopeus 4 ml/min ja uuttoaika 30 min.

Sarjassa 2 oli referenssiluokka ja kaksi näyteliuosta. Puulähtöaineena käytettiin nestemäistä koivukonsentraattia. Koivukonsentraatti oli valmistettu PHWE-uutolla uuttoparametreilla: lämpötila 170 °C, virtausnopeus 4 ml/min ja uuttoaika 30 min.

Sarjassa 3 oli referenssiluokka ja kaksi näyteliuosta. Puulähtöaineena käytettiin nestemäistä koivukonsentraattia. Koivukonsentraatti oli valmistettu PHWE-uutolla uuttoparametreilla: lämpötila 180 °C, virtausnopeus 4 ml/min ja uuttoaika 30 min.

Sarjassa 4 oli referenssiluokka ja kaksi näyteliuosta. Puulähtöaineena käytettiin Metlassa valmistettua PHWE-uutettua koivua, joka oli kuivattu. Kuivattua uutetta punnittiin 5 g yhden litran mittapulloon ja se laimennettiin merkkiin.

Sarjassa 5 oli referenssiluokka ja kaksi näyteliuosta. Puulähtöaineena käytettiin nestemäistä Metlassa valmistettua kuusikonsentraattia, joka laimennettiin ionivaihdetulla vedellä 1:10. Saatu laimennos sisälsi sokereita noin 20 g/l ja ligniiniä noin 3 g/l.

Sarjassa 6 käytettiin mediaattoria 1-HBT ja kuusikonsentraattina samaa kuin sarjassa 5. Mediaattorista valmistettiin konsentraatioltaan 0,01 mol/l vesiliuos. Näyteliuokset tehtiin 200 ml mittapulloihin. Näyteliuosta 1 varten mittapulloon pipetoitiin 20 ml kuusikonsentraattia ja 1 ml 1-HBT-liuosta, ja se täytettiin merkkiin ionivaihdetulla vedellä. Näyteliuosta 2 varten mittapulloon pipetoitiin 20 ml kuusikonsentraattia, 10 ml 1-HBT-liuosta, ja se täytettiin merkkiin ionivaihdetulla vedellä. Näyteliuosta 3 varten mittapulloon pipetoitiin 20 ml kuusikonsentraattia, ja pullo täytettiin merkkiin 1-HBT-liuksella. Näyteliuoksen 1 mediaattorikonsentraatio oli 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 mediaattorikonsentraatio 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 mediaattorikonsentraatio noin 10 mmol/l.

Sarjassa 7 käytettiin mediaattoria ABTS ja kuusikonsentraattina samaa kuin sarjassa 5. Mediaattorista valmistettiin konsentraatioltaan 0,01 mol/l vesiliuos. Näyteliuokset tehtiin 200 ml mittapulloihin. Näyteliuosta 1 varten mittapulloon pipetoitiin 20 ml kuusikonsentraattia ja 1 ml ABTS-liuosta, ja se täytettiin merkkiin ionivaihdetulla vedellä. Näyteliuosta 2 varten mittapulloon pipetoitiin 20 ml kuusikonsentraattia ja 10 ml ABTS-liuosta, ja se täytettiin merkkiin ionivaihdetulla vedellä. Näyteliuosta 3 varten mittapulloon pipetoitiin 20 ml kuusikonsentraattia ja pullo täytettiin merkkiin ABTS-liuoksella. Näyteliuoksen 1 mediaattorikonsentraatio oli 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 mediaattorikonsentraatio 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 mediaattorikonsentraatio noin 10 mmol/l.

Näytesarjat tehtiin yksi kerrallaan edellä kuvatussa järjestyksessä. Jokainen näyteliuos siirrettiin omaan 500 ml:n erlenmeyerpulloon, joka asetettiin magneettisekoittimen päälle. Sarjat tehtiin huoneenlämpötilassa. Näyteliuoksiin pipetoitiin halutut määrät lakkaasia, lisättiin magneetti ja pullo peitettiin alumiinifoliolla suurimman haihtumisen estämiseksi. Lakkaasikäsittelyä katsottiin alkavan entsyymien lisäshetkestä.

Näyteliuoksista otettiin näytteet pipetoimalla ne puhtaisiin 10 ml:n koeputkiin tai 2 ml:n eppendorf-putkiin haluttuina ajanhetkinä. Eri näyteliuoksista otetut näytteet ja niiden tilavuudet on esitetty taulukossa 4. Näytetilavuus oli 1–6 ml, riippuen siitä, oliko siitä tarkoitus analysoida pelkästään sokerit vai myös uuteaineet. Lakkaasin inaktivoimiseksi näyte laitettiin astiassaan 80 °C lämpöblokkiin 10 minuutiksi heti näytteenoton jälkeen. Kaikki näytteet säilöttiin jääkaappilämpötilassa niiden analysointiin asti. Kun haluttu entsyymikäsittely oli saatu suoritettua, ylijääneen näyteliuoksen lakkaasi inaktivoitiin vastaavasti ja se pakastettiin mahdollisia myöhempiä käyttötarkoituksia varten.

Taulukko 4. Eri näyteliuoksista otetut näytteet ja niiden tilavuudet eri ajan hetkinä.

	näyteliuos nro	aika [h]											
		0	0,25	0,5	0,75	1	2	3	4	5	24	48	72
sarja 1	1	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	-
	2	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	3 ml	3 ml	3 ml
	3	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	-
	4	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	3 ml	3 ml	3 ml
sarja 2	1	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	-
	2	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	-
	3	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	-
sarja 3	1	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml
	2	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml
	3	5 ml	-	1 ml	-	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml
sarja 4	1	5 ml	-	-	-	1 ml	-	1 ml	-	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml
	2	5 ml	-	-	-	1 ml	-	1 ml	-	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml
	3	5 ml	-	-	-	1 ml	-	1 ml	-	1 ml	5 ml	5 ml	5 ml
sarja 5	1	6 ml	-	-	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml
	2	6 ml	-	-	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml
	3	6 ml	-	-	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	6 ml
sarja 6	1	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	-
	2	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	-
	3	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	-
sarja 7	1	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	-
	2	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	-
	3	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	-	6 ml	6 ml	6 ml	-

7.2 MTBE-uutto

Metyyli-*tert*-butyylietteri (MTBE) on orgaaninen liuotin, jolla nestemäistä puunäytettä uutettaessa vapaat uuteaineet kerääntyvät MTBE-faasiin ja liennut ligniini vesifaasiin. Nämä faasit saadaan uuton jälkeen helposti erotettua, jolloin niiden analysointi mahdollistuu.

Nestemäistä näytettä pipetoitiin 1 ml puhtaaseen koeputkeen. Näyte laimennettiin 1:4 ionivaihdetulla vedellä. Poikkeuksena oli lakkaasinäytteiden laimentaminen, joka tehtiin 1:10. Näytelaimennokseen lisättiin pisara bromikresolivihreää pH-indikaattoriksi. Näytelaimennoksen pH:n haluttiin olevan noin 3. Tarvittaessa laimennosta voitiin happamoittaa lisäämällä siihen 0,05 M rikkihappoa pisaroittain.

Ensimmäinen uutto suoritettiin lisäämällä happamaan näyteliuokseen 0,02 mg/ml heneikosaanihappoa sisältävää MTBE:ä 2 ml. Heneikosaanihappo toimii GC-MS-analyseissä yhtenä sisäisistä standardeista. Koeputki suljettiin tiiviisti ja sitä vorteksoi-

tiin voimakkaasti yhden minuutin ajan. Faasien erottumisen nopeuttamiseksi näytteet sentrifugoitiin.

Erottuneista faaseista päällä oleva MTBE-faasi pipetoitiin puhtaaseen koeputkeen pasteuripetillä. Mahdollisen keskelle jääneen värillinen faasin katsottiin kuuluvaksi alimpaan faasiin eli vesifaasiin. Faasien erottaminen pyrittiin tekemään mahdollisimman tarkasti, jottei vesifaasia siirtynyt mukaan erotettuun MTBE-faasiin.

Seuraava uutto tehtiin lisäämällä vesifaasiin 0,02 mg/ml kolesterolia sisältävää MTBE:ä 2 ml. Kolesterolin toimii GC-MS-analyysissä toisena sisäisenä standardina. Koeputki suljettiin tiiviisti, ja se käsiteltiin kuten ensimmäisessä uutossa. MTBE-faasi pipetoitiin samaan koeputkeen kuin ensimmäisellä kerralla.

Viimeinen uutto tehtiin lisäämällä vesifaasiin pelkkää MTBE:ä 2 ml ja toistamalla muut vaiheet kuten edellä. Uuttojen avulla näyte saatiin jaettua kahdeksi eri koeputkissa oleviksi näytteiksi.

7.3 Vapaiden uuteaineiden määrittäminen GC-MS:llä

Kaasukromatografi-massaspektrometrillä (GC-MS) määritettiin näytteiden vapaat uuteaineet ja niiden määrät. Näytteistä oli ensin erotettava MTBE-faasi kohdassa 7.2 esiteltävällä tavalla.

Koeputkessa oleva näyte haihdutettiin kuivaksi typpivirran ja lämpöblokin avulla. Lämpöblokin lämpötila säädettiin 60 °C:seen ja typpivirran voimakkuus mahdollisimman suureksi kuitenkin niin, ettei näyte roiskunut. Kun näyte oli haihtunut kokonaan, se silyloitiin, jotta analysoitavat yhdisteet saatiin haihtuvaan muotoon.

Näytteisiin lisättiin 100 µl pyridiiniä ja silylointireagensseiksi 100 µl N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluoroasetamidia (BSTFA) sekä 50 µl trimetyylikloorisilaania (TMCS). Näytteitä inkuboitiin lämpöblokkissa 70 °C:ssa 20 minuuttia. Tämän jälkeen näytteiden lämpötilan annettiin tasoittua huoneenlämpötilaan. Silyloidut näytteet pipetoitiin kokonaisuudessaan sisäputkellisiin kaasukromatografianäyteastioihin. Näyteastiat suljettiin tiiviisti niihin kuuluvilla korkeilla.

Näytteet analysoitiin GC-MS-laitteistolla, joka koostui HP 6890 -kaasukromatografista ja massaselektiivisestä HP 5970 -detektorista. Kaasukromatografian detektorina käytettiin Agilent Technologiesin DB-5MS-kolonnia (30 m, 250 µm, 0,25 µm). Injektorin lämpötila oli 280 °C. Kantajakaasuna oli helium vakioaineessa 150 kPa.

Saatuja kaasugromatografian kromatogrammeja voitiin verrata Metlan käytössä oleviin kirjastoihin. Tietyllä ajanhetkellä esiintyvä piikki vastaa tiettyä ainetta. Piikin pinta-alan ja sisäisen standardin pinta-alan avulla voitiin laskea esiintyvän aineen pitoisuus näytteessä kaavalla 1.

$$c = \frac{A_1}{A_{STD}} \times c_{STD} \times lk \quad (1)$$

Kaavassa c on laskettavan aineen pitoisuus,

A_1 on laskettavan aineen piikin pinta-ala,

A_{STD} on standardin piikin pinta-ala,

c_{STD} on sisäisen standardin pitoisuus näytteessä (0,04 mg/ml) ja

lk on näytteen laimennoskerroin.

7.4 Liuenneen ligniinin määrittäminen UV/Vis-spektrofotometrisesti

Kohdan 7.2. mukaan tehdyn MTBE-uuton vesifaasista määritettiin näytteen liuenneen ligniinin pitoisuus ultraviolettinäkyvävalo (UV/Vis) -spektrofotometrillä. Määrittämisessä käytettiin Shimadzu UV-2401PC -laitteistoa.

Mittausta varten näytettä laimennettiin ionivaihdetulla vedellä siten, että sen mitattu absorbanssi tuli välille 0,3–0,7. Näytteestä riippuen laimennos oli 1:5–1:20. UV/Vis-spektrofotometri nollattiin ionivaihdetulla vedellä ja kaikki mittaukset tehtiin ionivaihdettua vettä vasten. Näytettä pipetoitiin kyvetiin riittävästi ja sen absorbanssi mitattiin aallonpituudella 280 nm. Kyvetinä käytettiin soveltuvaa kvartsikyvetiä, jossa valon kulkema matka on 1 cm. Vähäinen määrä MTBE:ä näytteen mukana ei aiheuta virhettä tuloksiin, sillä MTBE:llä ei ole absorptiota käytetyllä aallonpituudella.

Saatu numeerinen absorbanssiarvo muutettiin ligniinipitoisuudeksi (mg/l) käyttämällä kaavaa 2.

$$c = A * vastetekijä * \frac{lk}{b} \quad (2)$$

Kaavassa c on ligniinipitoisuus,

A on mitattu absorbanssi,

vastetekijä on koivulle 49 mg cm l⁻¹ ja kuuselle 56 mg cm l⁻¹,

lk on laimennoskerroin ja

b on valon tie [cm].

7.5 Näytteiden käsittely kaasukromatografiaa varten

Kaikista näytteistä haluttiin määrittää niiden sisältämät kokonaissokerit ja sokerimonomeerit. Käytetty menetelmä näiden määrittämiseksi oli hapan metanolyysi yhdistettynä kaasukromatografiaan. Kaasukromatografia varten näytteet oli ensin silyloitava. Silyloinnissa muuten kromatografiassa detektoimatta jäävät, huonosti haihtuvat yhdisteet saatetaan kaasuuntuvaan muotoon, jolloin ne tulevat havaittaviksi.

Nestemäistä näytettä pipetoitiin 10 ml:n päärynäpulloon sopiva määrä siten, että sen sisältämien kokonaissokereiden ja sokerimonomeerien aiheuttamat suurimmat piikit kromatogrammissa olivat hieman pienempiä kuin sisäisen standardin piikki. Käytännössä eri näytteiden laimennoksina käytettiin 1:1–1:5 sokerimonomeerinäytteille ja 1:1–1:10 kokonaissokerinäytteille. Sokerimonomeerinäytteiden tilavuutena käytettiin 0,5–3 ml ja kokonaissokerinäytteiden 0,5–1 ml. Poikkeuksena olivat lakkaasinäytteistä otetut sokerimonomeeri- ja kokonaisnäytteet, joiden laimennossuhde oli kaikissa 1:5 ja näytetilavuus 1 ml. Päärynäpulloissa oleva näyte pakastettiin ja kuivattiin yön yli pakaskuivurissa.

Kokonaissokerinäytteet

Kokonaissokereiden määrittelyksellä selvitettiin kaikki näytteen sisältämät hiilihydraatit monomeereina: vapaat sokerimonomeerit sekä oligomeerisista ja polymeerisista hiilihydraateista metanolysoidut monomeerit.

Kuivuneeseen kokonaissokerinäytteeseen lisättiin 2 ml metanolyysireagenssia, jotta kokonaissokereiden sisältämät oligo- ja polymeerisokerit saatiin hajotettua monomeeri- en metyyli glykosideiksi. Metanolyysireagenssina käytettiin vedetöntä 2 M suolahappoa metanolissa. Metanolyysireagenssin lisäyksen jälkeen päärynäpullon korkki suljettiin, näytettä vorteksoitiin ja se laitettiin 100 °C:seen uuniin 3 tunniksi. Tunnin välein näytettä vorteksoitiin huolellisesti. Pullon korkki tuli sulkea tiiviisti, jottei näyte haihtunut uunissa. Tarvittavan lämpökäsittelyn jälkeen näytteen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan, jolloin päärynäpullon paine tasoittui.

Huoneenlämpöiseen näytteeseen lisättiin 200 µl pyridiiniä HCl-ylimäärän neutraloimiseksi ja näytettä vorteksoitiin huolellisesti. Tämän jälkeen näytteeseen lisättiin käytettävää sisäistä standardia 1 ml. Standardina kokonaissokerimäärityksessä käytettiin 0,1 mg/ml sorbitolia vesi-metanoliseoksessa (1:9 v/v). Näyte haihdutettiin kuivaksi typpivirran ja 60 °C:n lämpöblokin avulla. Näytteessä mahdollisesti oleva vesi pilaa silyloinnin. Vedettömyyden varmistamiseksi näyte laitettiin vielä 15 minuutiksi 40 °C:seen vakuumiuniin. Vakuumiunista ottamisen jälkeen näytteeseen lisättiin 100 µl pyridiiniä kuivuneen näytteen liuottamiseksi ja sitä sekoitettiin vorteksilla.

Kokonaissokerinäytteen silylointi tapahtui lisäämällä sen joukkoon 150 µl heksametyyldisilatsaania (HMDS) sekä 70 µl TMCS:a ja sekoittamalla sitä. Näyte jätettiin yön yli silyloitumaan huoneenlämpötilaan. Seuraavana päivänä sakan yläpuolella oleva kirkas näyte pipetoitiin varovasti sisäputkelliseen GC-näyteastiaan, joka suljettiin tiiviisti.

Näytteiden analysointiin kaasukromatografilla tarvittavat kalibrintiliuokset (2 kpl) tehtiin vastaaviin 10 ml:n päärynäpulloihin. Näihin pipetoitiin 1 ml valittua sokereiden kalibrintiliuosta. Käytetyssä kalibrintiliuoksessa oli 0,1 mg/ml valittuja sokereita ja uronihappoja vesi-metanoliseoksessa (1:9 v/v). Käytetyt sokerit olivat mannoosi, glukosi, galaktoosi, ksyloosi, arabinoosi sekä rhamnoosi ja käytetyt uronihapot glukuronihappo, galakturonihappo sekä 4-O-metyyliglukuronihappo. Päärynäpullossa oleva kalibrintiliuos haihdutettiin kuivaksi 60 °C:n lämpöblokin ja typpivirran avulla. Kuivuneeseen kalibrintiliuokseen lisättiin 2 ml samaa metanolyysireagenssia kuin näytteisiin, sekoitettiin vorteksilla ja laitettiin 100 °C:seen uuniin kolmeksi tunniksi. Tästä eteenpäin kalibrintiliuokset käsiteltiin kuten näytteetkin.

Sokerimonomeerinäytteet

Sokerimonomeerien määrittelyä selvitettiin näytteiden sisältämät vapaat sokerimonomeerit.

Kuivattuun sokerimonomeerinäytteeseen lisättiin 1 ml sisäistä standardia, jona käytettiin 0,1 mg/ml ksylitolia vesi-metanoliseoksessa (1:9 v/v). Näyte haihdutettiin kuivaksi lämpöblokkissa (60 °C) typpivirran avulla. Tämän jälkeen näytteeseen lisättiin 100 µl pyridiiniä ja sitä sekoitettiin vorteksilla. Näytteen silylointi ja sitä seuraavat toimenpiteet suoritettiin kuten kokonaissokerinäytteen kohdalla.

Sokerimonomeerien määrittelyä tarvittavat kalibrintiliuokset tehtiin 10 ml:n päärynäpulloihin pipetoimalla niihin 1 ml sokereiden kalibrintiliuosta ja 1 ml samaa sisäistä standardia kuin näytteisiin. Kalibrintiliuoksena käytettiin 0,1 mg/ml valittuja sokereita ja uronihappoja sisältävää vesi-metanoliseosta (1:9 v/v). Valitut sokerit olivat mannoosi, glukoosi, galaktoosi, ksyloosi, arabinoosi, rhamnoosi sekä fruktoosi ja käyetyt uronihapot glukuronihappo sekä galakturonihappo. Kalibrintiliuokset haihdutettiin kuiviksi 60 °C:n lämpöblokkissa ja typpivirran avulla. Kuivuneisiin liuoksiin lisättiin 100 µl pyridiiniä ja sekoitettiin vorteksilla. Kalibrintiliuosten silylointi ja sitä seuraavat käsitteilyt tehtiin kuten kokonaissokerinäytteille.

7.6 Sokereiden määrittely kaasukromatografisesti

Sekä kokonaissokeri- että sokerimonomeerinäytteet analysoitiin Shimadzu GC-2010 -kaasukromatografilla. Kolonnina käytettiin Agilent Technologiesin HP-1-kolonnia (0,25 m, 0,2 mm, 0,11 µm). Kaasukromatografissa oli automaattinen Shimadzu AOC-20s -näytteenäyttävä ja Shimadzu AOC-20i -autoinjektorin. Injektointityyppinä käytettiin jakoinjektointia (1:20), ja injektorin lämpötila oli 260 °C. Injektointilavuus oli 1 µl. Detektorina käytettiin liekki-ionisaatioteknologiaa (FID), jonka lämpötila oli 290 °C. Kolonnissa oli vakioaineena 100 kPa.

Kohdassa 7.5 valmistetut kokonaissokerinäytteet määritettiin lämpötilaohjelmalla 100 °C → 170 °C (2 °C/min) → 290 °C (12 °C/min, 5 min) ja sokerimonomeerinäytteet lämpötilaohjelmalla 100 °C → 175 °C (4 °C/min) → 290 °C (12 °C/min, 5 min).

Näytteiden sisältämät sokeri- ja uronihappopitoisuudet laskettiin kromatogrammien kalibroitiliuosten ja sisäisen standardin piikkien pinta-aloista. Kalibroitiliuoksien kromatogrammeista laskettiin jokaisen sokerin ja uronihapon aiheuttama vaste. Se saatiin selville jakamalla erikseen jokaisen sokeri- ja uronihappopiikin pinta-ala sisäisen standardin pinta-alalla. Vasteet laskettiin keskiarvona molemmista kalibroitiliuoksista. Vaste oli syytä laskea joka kerta uudelleen, sillä kaasukromatografian toiminnassa saattoi olla vaihtelua.

Näytteen sisältämät sokeri- ja uronihappopitoisuudet laskettiin kaavojen 3 ja 4 mukaan.

$$c_{STD} = \frac{c \times V_{STD}}{V_{näyte}} \quad (3)$$

Kaavassa c_{STD} tarkoittaa sisäisen standardin pitoisuutta näytteessä, c on sisäisen standardin liuoksen pitoisuus (0,1 mg/ml), V_{STD} on lisätty tilavuus sisäistä standardia (1 ml) ja $V_{näyte}$ on näytteen tilavuus.

$$c_a = \frac{A_1}{A_2} \times c_{STD} \times lk \quad (4)$$

Kaavassa c_a on sokerin tai uronihapon a pitoisuus, A_1 on a:n piikin pinta-ala, A_2 on sisäisen standardin piikin pinta-ala, c_{STD} tarkoittaa sisäisen standardin pitoisuutta näytteessä, vasteella tarkoitetaan a:n vastetta ja lk on näytteen laimennoskerroin.

7.7 Uutteiden analysointi Sec-Mallsilla

Tämän insinööriyön näytteiden kokoeksklusiokromatografia-monikulmavalonsironta (Sec-Malls) -määritykset teetettiin Åbo Akademiassa tutkija Andrey Pranovichilla. HP-Sec-laitteistossa käytettiin Watersin Ultrahydrogel-kolonnia (6 mm x 40 mm) ja kahta Ultrahydrogel TM linear -kolonnia (8.9 mm x 300 mm). Malls-detektorina käytettiin Wyatt Technologyn miniDAWN- ja Shimadzu Corporationin RI-detektoria.

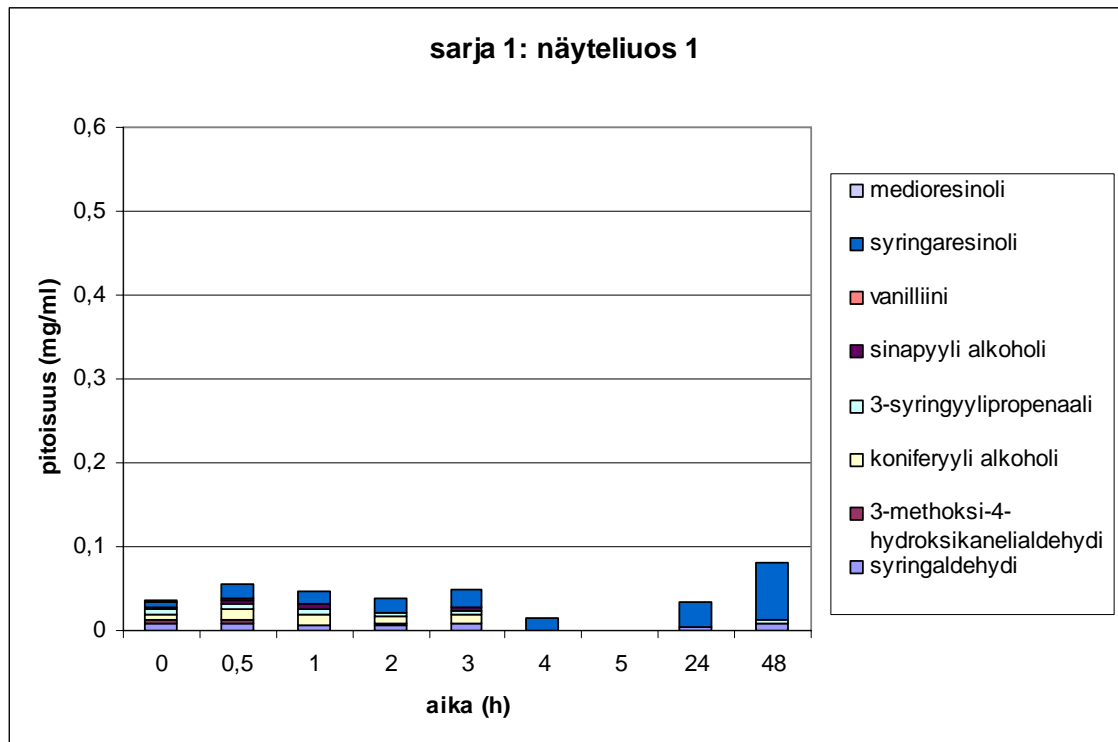
8 Tulokset

8.1 GC-MS

Ligniinin hajoamistuotteet

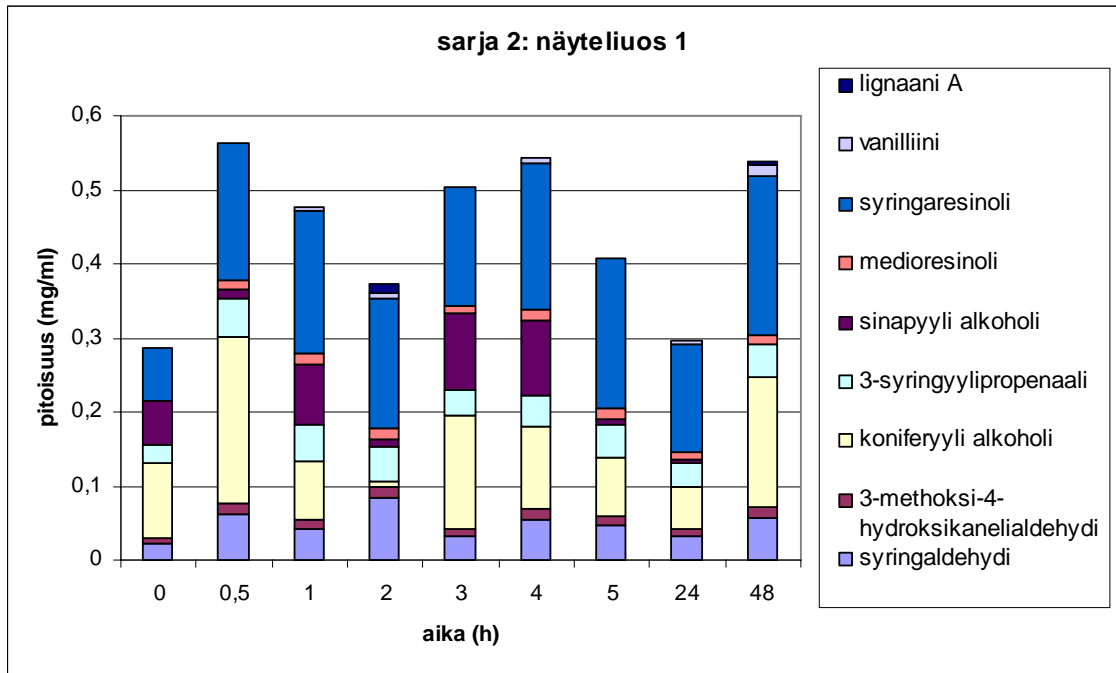
Ligniinin hajoamistuotteet hävisivät suurimmaksi osaksi lakkaasikäsittelyn aikana. GC-MS-määritysten tuloksista seurattiin vanilliinin, vanilliinihapon, lignaani A:n, 3-methoksi-4-hydroksikanelialdehydin, koniferyylialkoholi, hydroksimatairesinolin, pinoresinolin, syringaresinolin, 3-syringyyliresinoli, syringaldehydinin, medioresinolin ja sinapyylialkoholin pitoisuuksia ajan funktiona.

Sarjan 1 näyteliuksessa oli kuvan 17 mukaiset määrät eri ligniinin hajoamistuotteita eri ajanhetkillä. Sarjan muista näyteliuksista ei ligniinin hajoamistuotteita löydetty lainkaan.

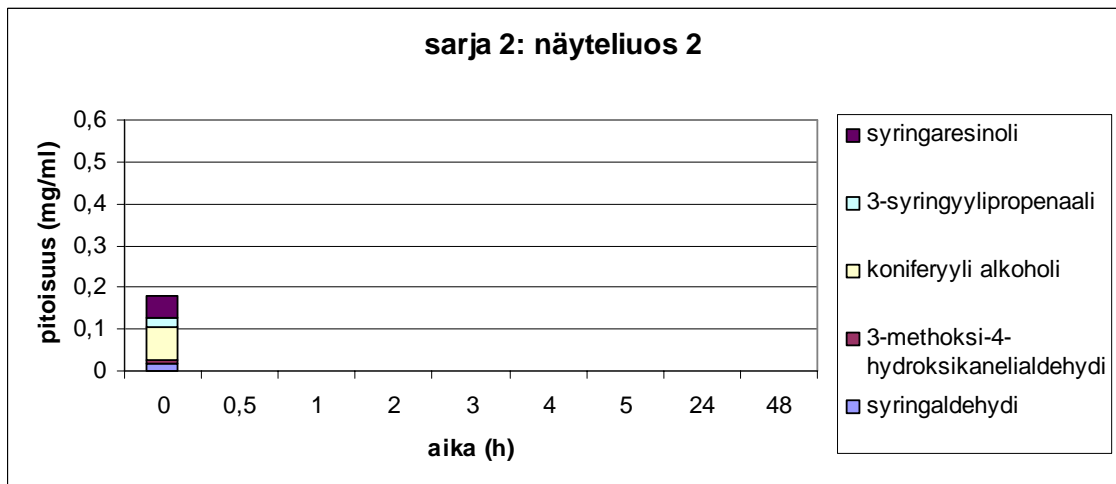


Kuva 17. Sarjan 1 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute, jota ei ole lakkaasikäsitelty (referenssiliuos). Ajan hetkeltä 5 tuntia ei saatu tuloksia.

Sarjan 2 eri näyteliuosten 1 ja 2 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona ovat esitetty kuvissa 18 ja 19. Näyteliuoksesta 3 ei löydetty lainkaan ligniinin hajoamistuotteita.

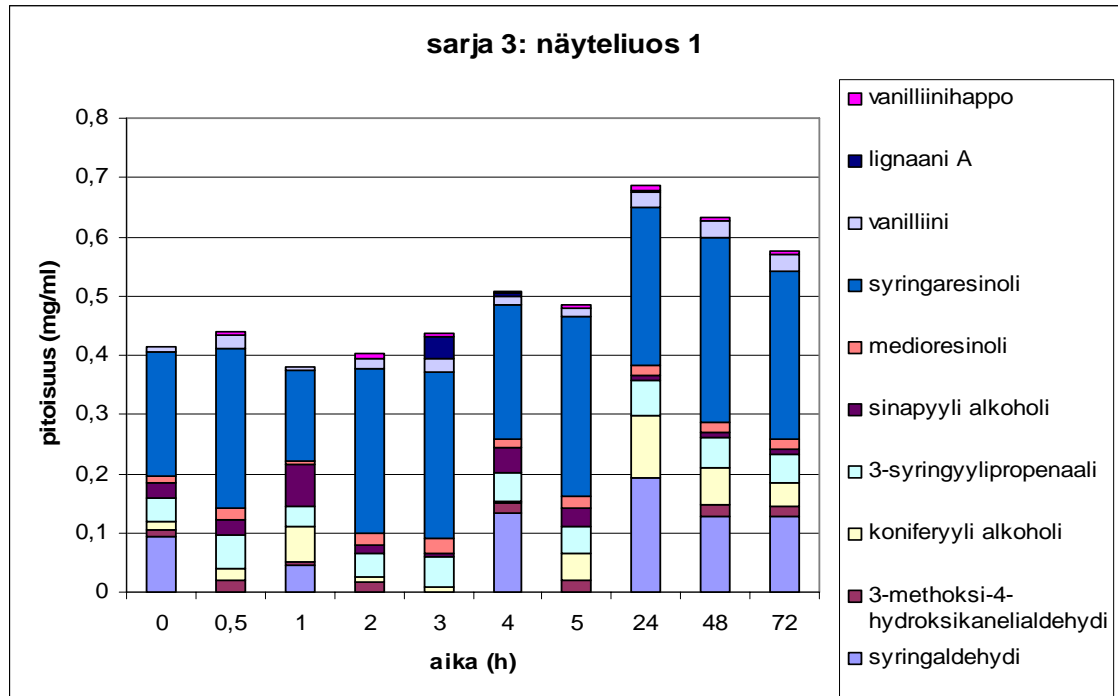


Kuva 18. Sarjan 2 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute, jota ei ole lakkaasikäsitelty (referenssiuutos).



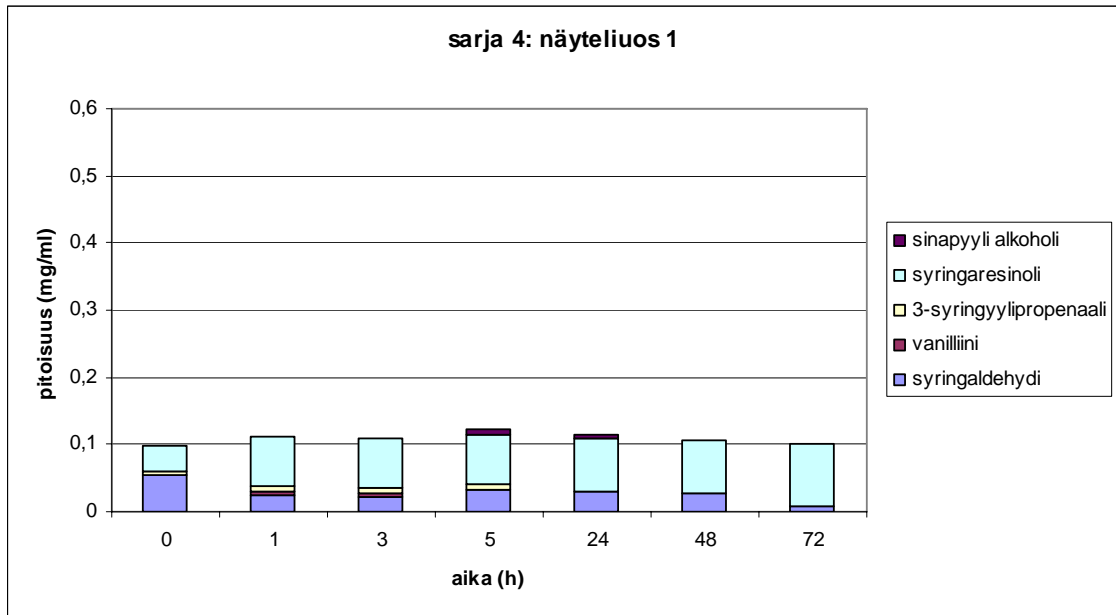
Kuva 19. Sarjan 2 näyteliuoksen 2 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute, johon on lisätty 3 til-% lakkaasia. Ajan hetkiltä 0,5–48 tuntia ei löydetty ligniinin hajoamistuotteita.

Sarjan 3 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona on esitetty kuvassa 20. Näyteliuoksista 2 ja 3 ei löydetty lainkaan ligniinin hajoamistuotteita.



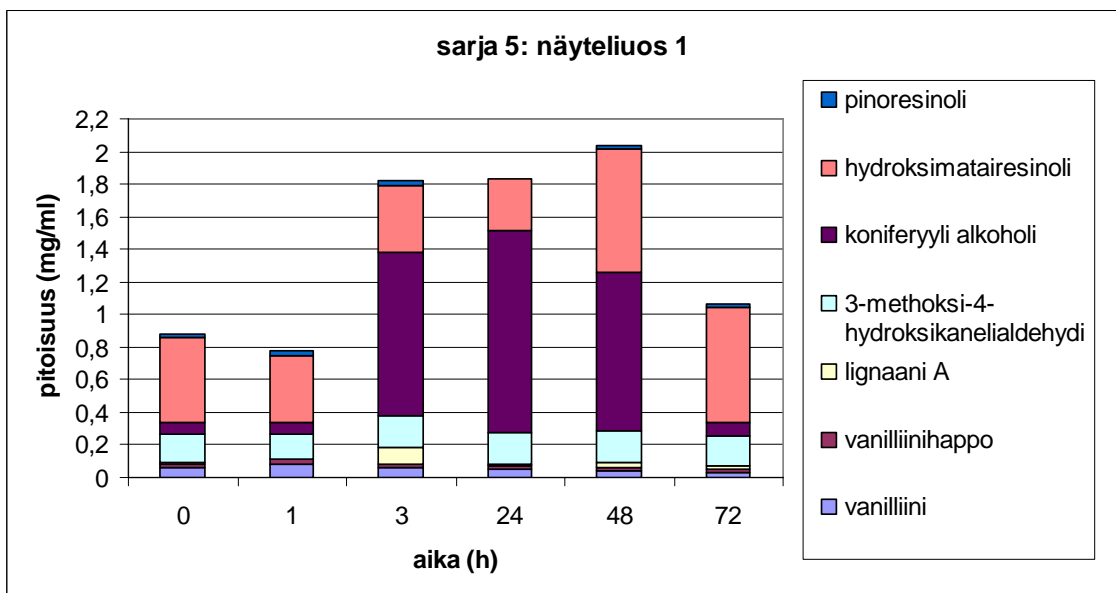
Kuva 20. Sarjan 3 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute, jota ei ole lakkaasikäsitelty (referenssiuute).

Sarjan 4 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona on esitetty kuvassa 21. Muista tämän sarjan näyteliuoksissa ei löydetty ligniinin hajoamistuotteita.



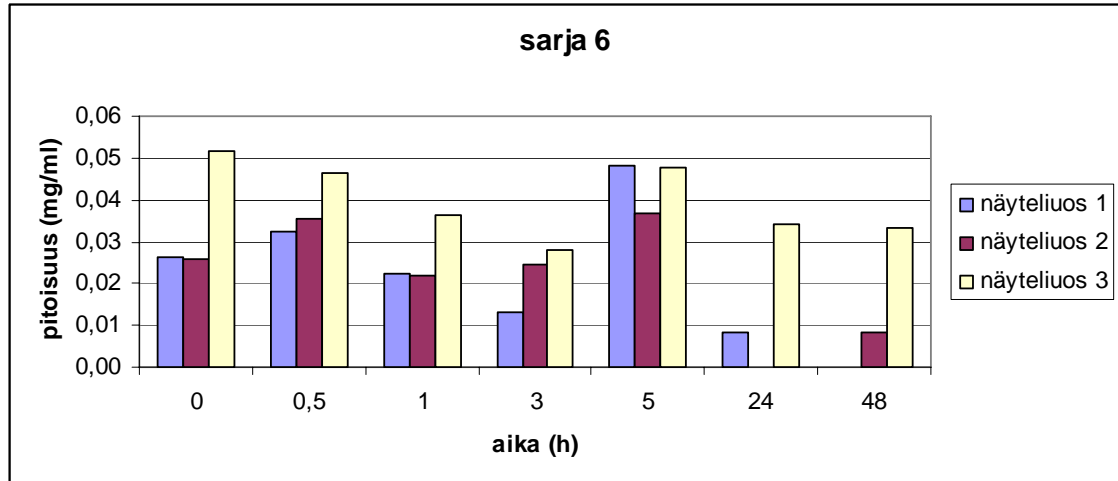
Kuva 21. Sarjan 4 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE-utettu koivu-uute, jota ei ole lakkaasikäsitelty (referenssiluos).

Sarjan 5 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona on esitetty kuvassa 22. Näyteliuoksista 2 ja 3 ei löydetty lainkaan ligniinin hajoamistuotteita.



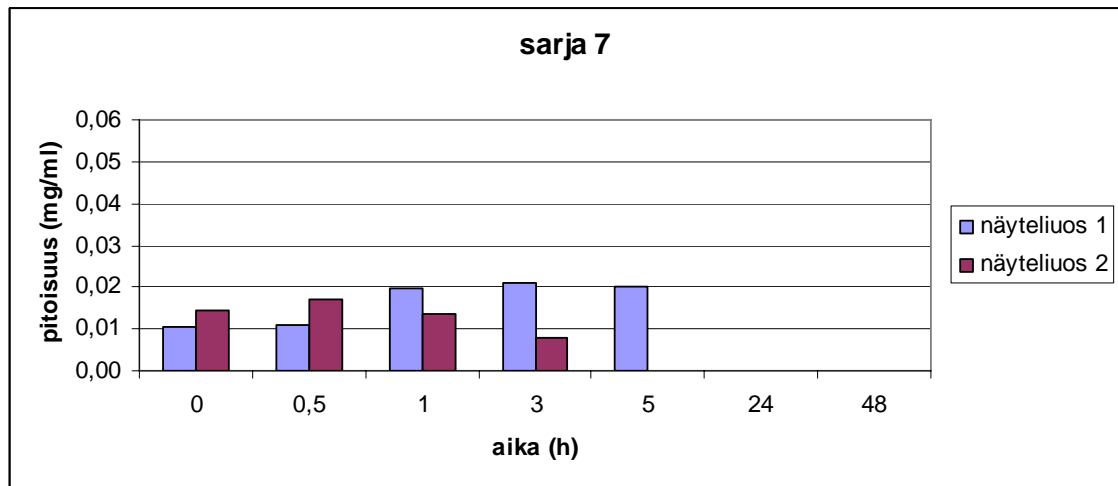
Kuva 22. Sarjan 5 näyteliuoksen 1 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE-utettu kuusi-uute, jota ei ole lakkaasikäsitelty (referenssiluos).

Sarjan 6 näyteliuosten ligniinin hajoamistuotteiden yhteen lasketut pitoisuudet on esitetty kuvassa 23. Näyteliuoksista tavattiin vain vanilliinia ja vanilliinihappoa, joiden numeeriset arvot on esitetty liitteen 1 taulukoissa 1 ja 2.



Kuva 23. Sarjan 6 näyteliuosten ligniinin hajoamistuotteiden yhteen lasketut pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on vakiolakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuos 1 1-HBT-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 1-HBT-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 1-HBT-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

Sarjan 7 näyteliuosten 1 ja 2 ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuudet on esitetty kuvassa 24. Näyteliuoksista tavattiin ligniinin hajoamistuotteista vain vanilliinia. Näyteliuoksesta 3 ei löydetty lainkaan ligniinin hajoamistuotteita. Pitoisuudet ovat tarkemmin esillä liitteen 1 taulukossa 3.

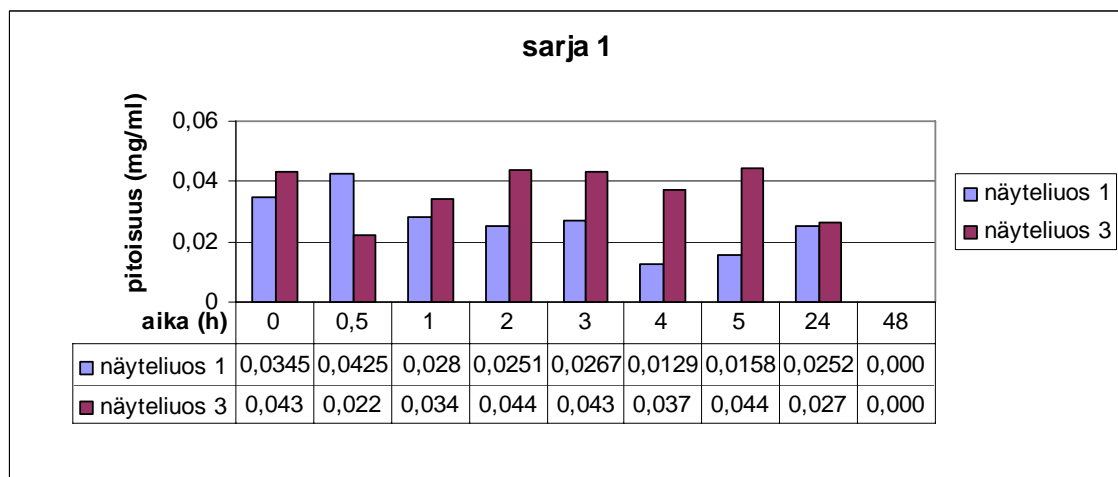


Kuva 24. Sarjan 7 näyteliuosten vanilliinipitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on vakiolakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusi-uute. Näyteliuos 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l. Ajan hetkiltä 24 ja 48 tuntia ei tavattu lainkaan ligniinifrakmentteja.

Rasvahapot ja niiden hapetustuotteet

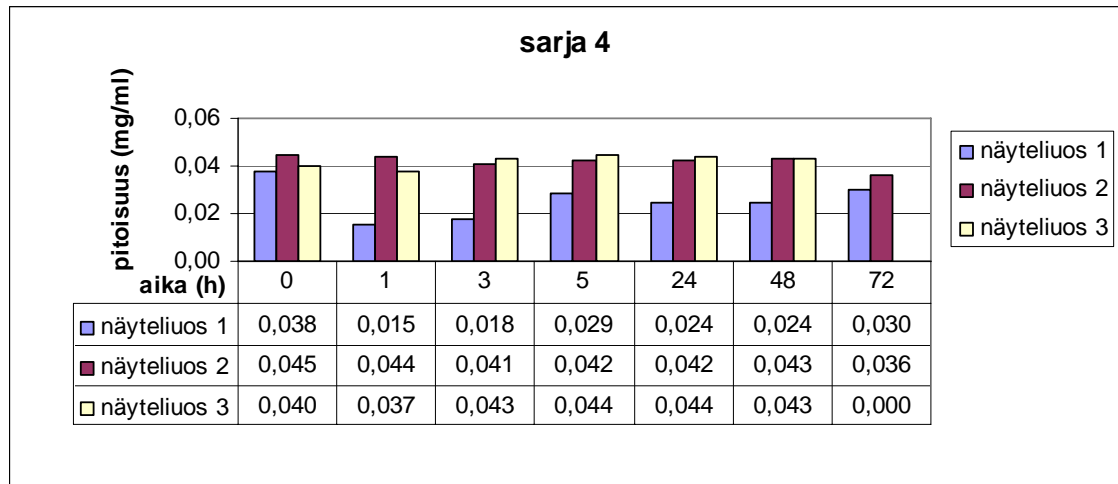
Uutetussa puuaineessa tavataan rasvahappoja ja niiden hapetustuotteita. GC-MS-määritysten tuloksista seurattiin rasvahappojen ja niiden eri hapetustuotteiden (atselaiinihappo, monosteariini ja monopalmitiini) pitoisuuksia ajan funktiona.

Sarjassa 1 rasvahappoja ja niiden hapetustuotteita löytyi näyteliuoksista 1 ja 3 kuvan 25 esittämät määrät. Liitteessä 1 kuvissa 1 ja 2 on esitetty näiden tuloksia tarkemmin.



Kuva 25. Sarjan 1 näyteliuosten 1 ja 3 eri rasvahappojen ja niiden hapetustuotteiden yhteen lasketut pitoisuudet. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-uutettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssiluos eikä siinä ole lakkaasia. Näyteliuos 3 sisältää lakkaasia 3 til-%.

Sarjoissa 2 ja 3 ei rasvahappoja tai niiden hapetustuotteita ollut referenssiuoksissa eikä muissakaan näyteliuoksissa. Sarjan 4 eri näyteliuoksilla havaittiin kaikilla vain monopalmitiinia ja monosteariinia. Näiden yhteen lasketut pitoisuudet eri näyteliuoksilla on esitetty kuvassa 26.



Kuva 26. Sarjan 4 näyteliuosten monosteariinin ja monopalmitiinin yhteen laskettu pitoisuus eri ajan hetkillä. Näytteenä on kuivattu PHWE-uutettu koivu-uute, jonka lakkaasipitoisuudet ovat näyteliuoksessa 2 3 til-% ja näyteliuoksessa 3 5 til-%. Näyteliuos 1 on referenssiuute eikä siihen ole lisätty lakkaasia.

Sarjoissa 5 ja 6 ei rasvahappoja tai niiden hapetustuotteita ollut missään näyteliuoksista. Sarjasta 7 löydettiin rasvahappoja ja niiden hapetustuotteita taulukon 5 osoittamat pitoisuudet. Tämän sarjan näyteliuoksessa 1 oli rasvahappoja vain ajan hetkillä 0 ja 0,5 tuntia ja näyteliuoksissa 2 ja 3 niitä tavattiin vain ajan hetkellä 0 tuntia.

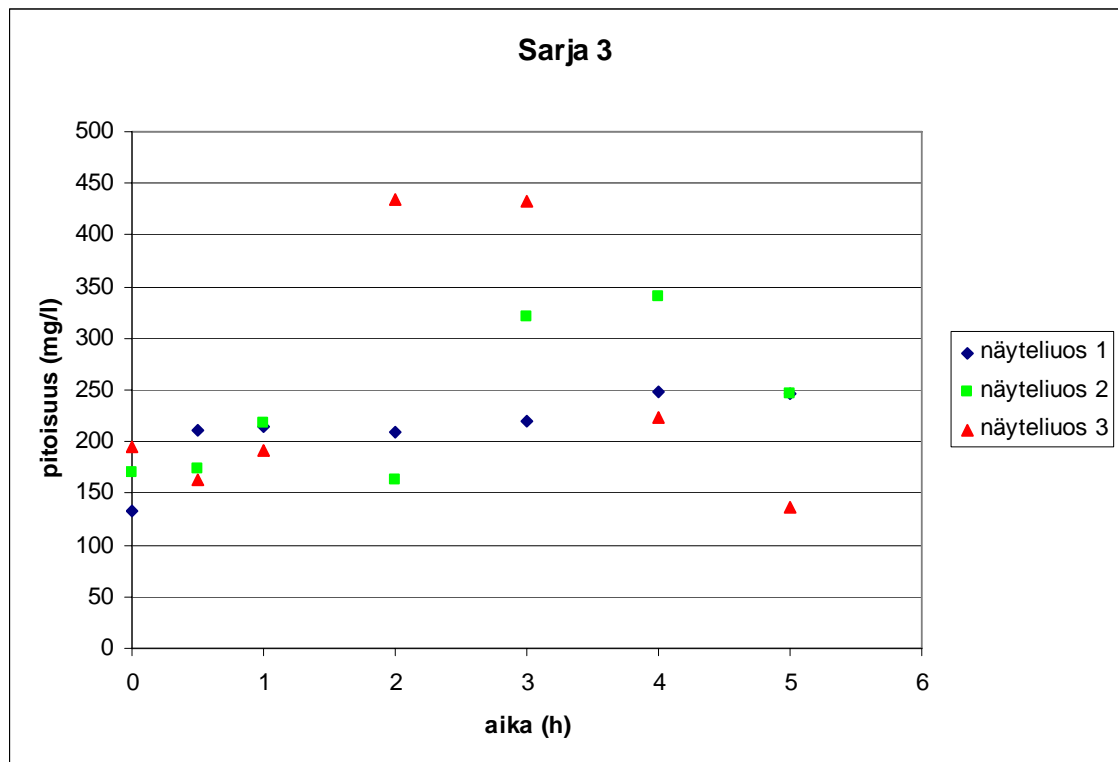
Taulukko 5. Sarjan 7 kaikkien näyteliuosten rasvahappopitoisuudet ajan hetkillä 0 ja 0,5 tuntia. Näytteenä on PHWE-uutettu kuusi-uute, jota on käsitelty vakio lakkaasipitoisuudella (3 til-%) ja eri mediaattorikonsentraatioilla. Näyteliuoksen 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

		näyteliuos 1		näyteliuos 2	näyteliuos 3
aika [h]		0	0,5	0	0
[mg/ml]	monosteariini	1,39	0,58	0,63	0,58
	monopalmitiini	0,78	0,85	0,96	0,86
	rasvahappo 18:2	0	0,01	0	0
	rasvahappo 18:3	0	0,01	0	0
	rasvahappo 18:0	0,03	0,03	0,04	0,03
	rasvahappo 22:0	0,03	0	0	0
	rasvahappo 16:0	0	0	0,05	0,03

8.2 UV/Vis-spektrofotometria

Kaikki tehdyt näyteliuokset olivat sameita, joten ne aiheuttivat UV/Vis-spektrofotometrisessä liuenneen ligniinipitoisuuden määrittämisessä reflektanssia. Lisäksi käytetty lakkaasi, kuten proteiinit yleensäkin, absorboi voimakkaasti käytetyllä aallonpituudella (280 nm). Näin ollen saadut tulokset vaihtelivat voimakkaasti eikä niitä voida pitää kovinkaan luotettavina.

Kuvassa 27 on esimerkki saaduista vapaan ligniinin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuuksista eri näyteliuoksissa. Kuvasta huomataan tulosten vaihtelevan voimakkaasti lyhyen ajan sisällä. Vastaavaa oli nähtävissä muissakin sarjoissa. Loput UV/Vis-tulokset on esitetty liitteen 2 kuvissa 1–6.



Kuva 27. Sarjan 3 eri näyteliuosten vapaan ligniinin ja sen hajoamistuotteiden pitoisuus ajan funktiona aikavälillä 0–5 tuntia. Kyseinen sarja on tehty 180 °C:ssa PHWE-uutetusta koivu-uutteesta käsitellen sitä kahdella eri entsyymipitoisuudella. Näyteliuos 1 on referenssi, eikä sitä ole lakkaasikäsitelty. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 sitä on 5 til-%. Näytteiden absorptanssit on mitattu UV/Vis-spektrofotometrillä ja muutettu laskennallisesti vapaan ligniinin pitoisuuksiksi kaavalla 2.

8.3 Kaasukromatografia

Käytetty lakkaasi sisälsi glukoosia taulukossa 6 ilmoitetut määrät. Näiden perusteella laskettiin lakkaasin glukoosipitoisuuden keskiarvoksi 110 mg/l. Glukoosipitoisuudet määritettiin 1:100, 3:100 ja 5:100 tehdyistä lakkaasi-vesi-liuoksista kohdassa 7.5 esitetyllä sokerimomeerinäytteiden määrittymenettelmällä. Lisätty lakkaasimäärä oli kaikissa tapauksissa suhteessa näyteliuoksen tilavuuteen niin pieni (enintään 5 til-%), että sen aiheuttama virhe sokerimäärityksissä on olematon.

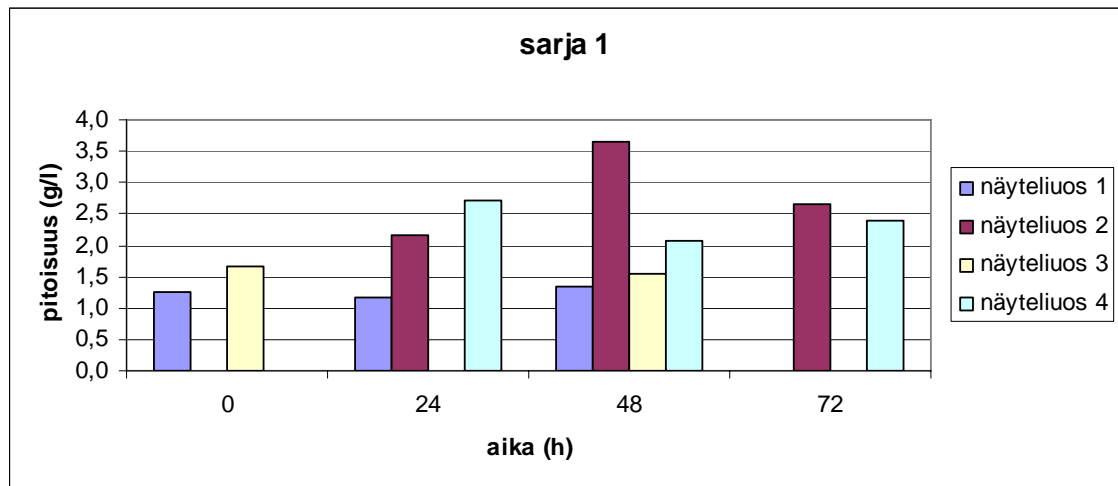
Taulukko 6. Lakkaasin sisältämä glukoosimonomeerien pitoisuus eri laimennoksilla.

lakkaasipitoisuus [til-%]	glukoosipitoisuus [mg/l]
1	137
3	336
5	403

Taulukossa 7 on esitetty sarjan 1 kokonaissokerimäärityksen tulokset. Jokaisen sarjan 1 näyteliuoksen yhteen lasketut kokonaissokereiden pitoisuudet on esitetty kuvassa 28 ajan funktiona. Tarkempia tuloksia on esitetty liitteen 3 kuvissa 1–4.

Taulukko 7. Sarjan 1 kokonaissokerimäärityksen tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä sitä ole käsitelty lakkaasilla. Näyteliuoksessa 2 on 1 til-% lakkaasia, näyteliuoksessa 3 sitä on 3 til-% ja näyteliuoksessa 4 sitä on 5 til-%.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]									
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	4-O-Me-GlcA	total
0	1	135	323	46	536	86	25	0	76	30	1255
24	1	127	297	43	486	85	23	0	65	46	1174
48	1	141	342	48	587	93	28	0	81	33	1354
72	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	2	273	596	99	851	108	46	21	119	44	2157
48	2	454	1091	160	1392	168	73	32	199	79	3649
72	2	969	0	351	233	349	154	42	436	135	2670
0	3	305	588	70	500	62	24	0	76	30	1654
24	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	3	303	547	68	440	59	23	0	74	25	1539
72	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	4	498	1127	122	647	93	36	45	102	48	2718
48	4	564	331	151	724	93	41	22	117	33	2077
72	4	656	405	163	836	108	47	3	138	37	2395

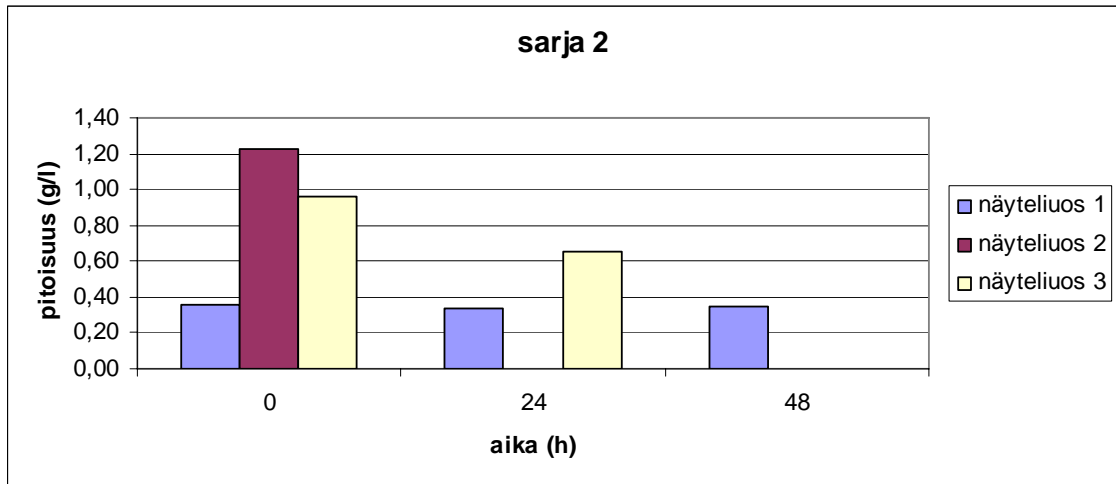


Kuva 28. Sarjan 1 kokonaissokereiden pitoisuuksien yhteen lasketut tulokset. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 1 til-% lakkaasia, näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 4 on 5 til-% lakkaasia.

Taulukossa 8 on esitetty sarjan 1 eri näyteliuosten sokerimonomeerien pitoisuudet. Jokaisen sarjan 1 näyteliuoksen yhteen lasketut sokerimonomeerien pitoisuudet on esitetty ajan funktiona kuvassa 29. Tarkempia tuloksia on esitetty liitteen 4 kuvissa 1–4.

Taulukko 8. Sarjan 1 sokerimonomeerien pitoisuudet eri näyteliuoksissa. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 1 til-% lakkaasia, näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 4 on 5 til-% lakkaasia.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]								total
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	
0	1	6	33	8	23	28	7	1	18	123
24	1	5	36	8	24	28	7	2	9	119
48	1	5	34	8	23	27	7	2	8	115
72	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	2	12	0	9	19	20	10	0	0	69
48	2	25	0	8	24	17	6	0	0	81
72	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	3	16	0	7	9	6	7	4	10	58
72	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	4	16	0	4	10	7	4	0	0	41
48	4	24	0	17	35	36	14	0	0	126
72	4	27	0	9	28	15	7	3	0	89

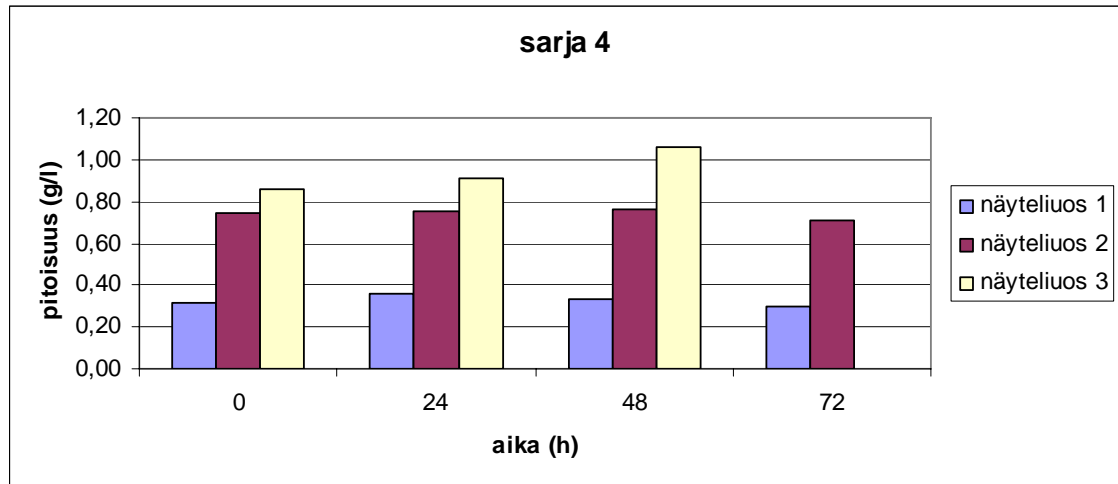


Kuva 31. Sarjan 2 näyteliuoksien sokerimonomeerien yhteen lasketut pitoisuudet eri ajanhetkinä. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 on 5 til-% lakkaasia.

Taulukossa 11 on sarjan 3 kokonaissokerimäärittelyn tulokset. Jokaisen sarjan 3 näyteliuoksen yhteen lasketut kokonaissokereiden pitoisuudet on esitetty kuvassa 32 ajan funktiona. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteen 3 kuvissa 8–10.

Taulukko 11. Sarjan 3 kokonaissokerimäärittelyn tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 on 5 til-% lakkaasia.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]									total
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	4-O-Me-GlcA	
0	1	461	611	203	5603	131	124	21	258	148	7559
24	1	415	549	192	4915	119	110	25	234	136	6696
48	1	426	566	196	5115	122	114	19	243	137	6939
72	1	459	619	204	5503	135	123	26	266	153	7487
0	2	542	932	199	4045	105	96	21	194	98	6232
24	2	582	998	202	4312	103	102	14	206	102	6620
48	2	557	958	191	4088	95	98	18	197	111	6314
72	2	570	976	189	4229	97	100	19	203	102	6485
0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	3	685	1226	207	3851	89	96	15	192	87	6447
48	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	3	693	1262	203	3994	89	98	20	198	95	6652

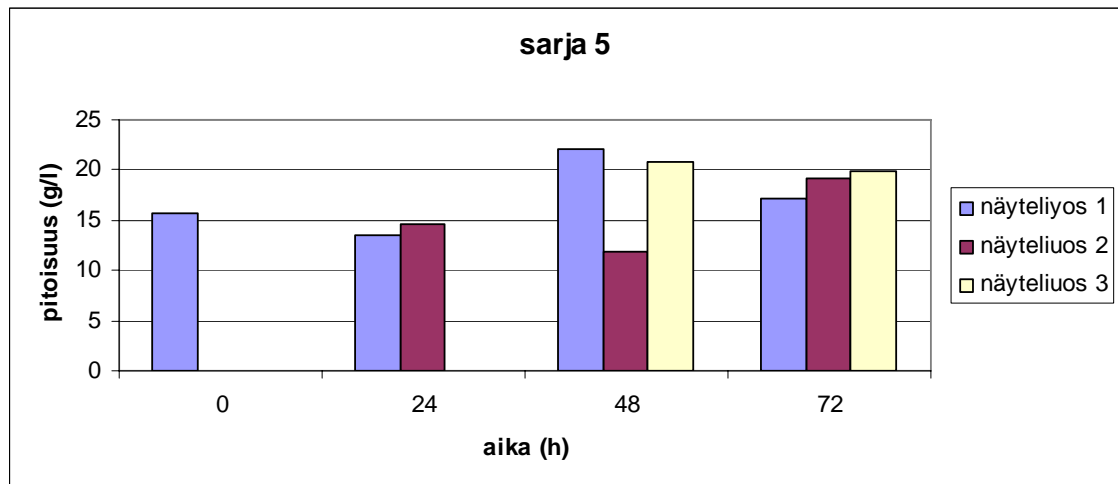


Kuva 35. Sarjan 4 näyteliuoksien yhteen lasketut sokerimonomeeripitoisuudet eri ajan hetkinä. Näytteenä on kuivattu PHWE-uutettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 on 5 til-% lakkaasia.

Taulukossa 15 on sarjan 5 kokonaissokerimäärityksen tulokset. Jokaisen sarjan 5 näyteliuoksen yhteen lasketut kokonaissokereiden pitoisuudet on esitetty kuvassa 36 ajan funktiona. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteen 3 kuvissa 14–16.

Taulukko 15. Sarjan 5 kokonaissokerimäärityksen tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on PHWE-uutettu kuusiute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 on 5 til-% lakkaasia.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]									total
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	4-O-Me-GlcA	
0	1	8065	1928	1374	2590	931	133	57	557	123	15757
24	1	6862	1617	1175	2170	849	97	75	470	98	13413
48	1	11333	2563	1909	3701	1465	197	72	692	188	22121
72	1	775	2188	8757	3142	1176	160	146	584	156	17086
0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	2	7338	2080	1242	2350	812	124	0	495	104	14545
48	2	2560	2473	2297	2630	934	137	228	576	117	11951
72	2	9610	2822	1700	2987	1034	151	107	657	157	19226
0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	3	10345	3259	1746	3219	1067	177	114	655	158	20739
72	3	9889	3247	1709	3036	955	155	40	658	155	19844

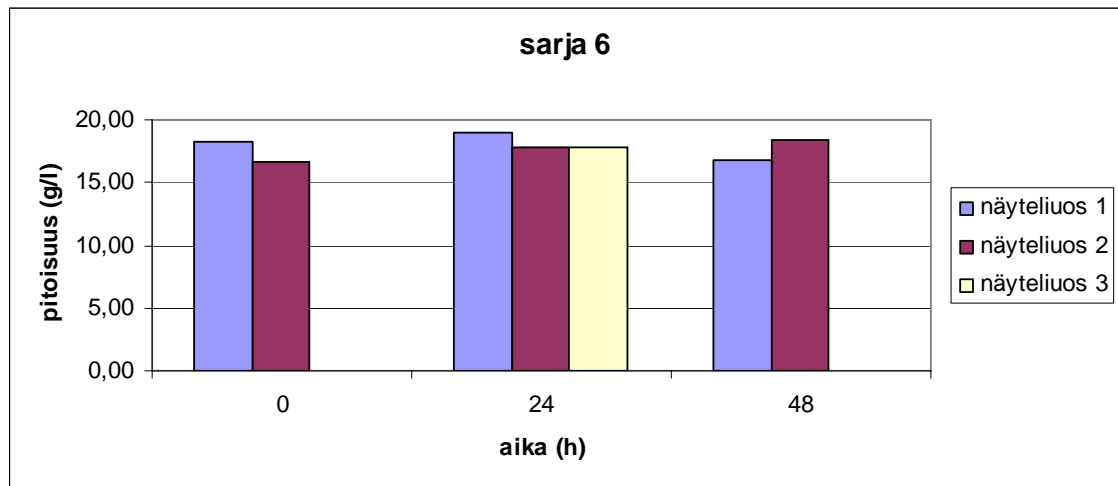


Kuva 36. Sarjan 5 näyteliuoksien yhteen lasketut kokonaissokeripitoisuudet eri ajanhetkinä. Näytteenä on PHWE-uutettu kuusiute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 on 5 til-% lakkaasia.

Taulukossa 16 on esitetty sarjan 5 eri näyteliuosten sokerimonomeerien pitoisuudet. Jokaisen sarjan 5 näyteliuoksen yhteen lasketut sokerimonomeerien pitoisuudet on esitetty kuvassa 37 ajan funktiona. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteen 4 kuvissa 14–16.

Taulukko 16. Sarjan 5 sokerimonomeerimääritysten tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on PHWE-uutettu kuusiute. Näyteliuos 1 on referenssi eikä siihen ole lisätty lakkaasia. Näyteliuoksessa 2 on 3 til-% lakkaasia ja näyteliuoksessa 3 on 5 til-% lakkaasia.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]								total
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	
0	1	127	45	264	477	1169	31	0	61	2175
24	1	134	41	277	473	1000	18	0	0	1943
48	1	149	58	309	540	488	33	12	51	1639
72	1	190	76	396	621	769	45	16	84	2196
0	2	128	801	233	387	882	18	0	0	2449
24	2	145	1173	426	409	804	19	0	0	2977
48	2	135	1079	419	379	752	17	0	0	2780
72	2	139	1105	462	394	777	17	0	33	2929
0	3	136	1265	222	326	656	16	0	0	2622
24	3	149	1554	394	366	707	18	0	0	3189
48	3	144	1532	401	359	675	27	0	0	3139
72	3	151	1599	463	386	714	18	0	0	3331

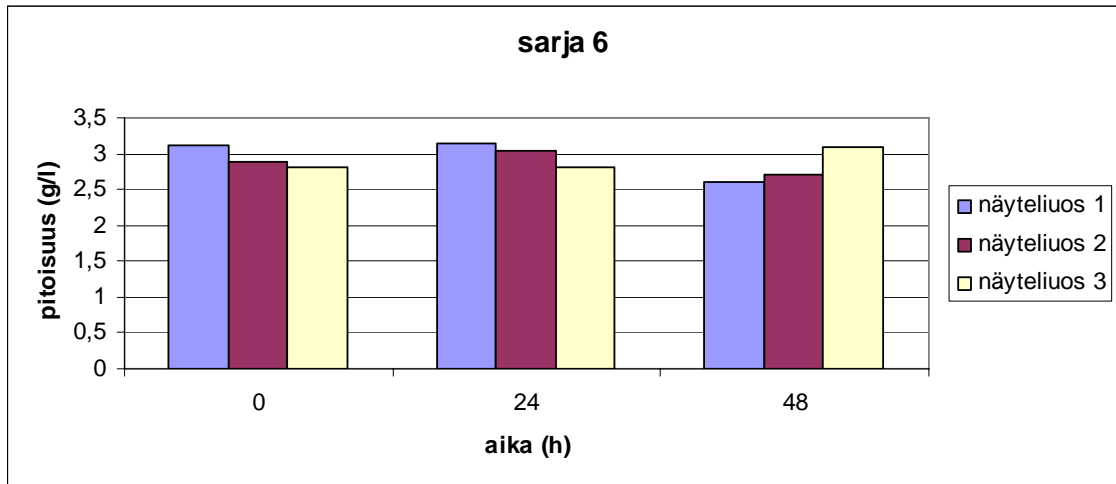


Kuva 38. Sarjan 6 näyteliuoksien yhteen lasketut kokonaissokeripitoisuudet eri ajanhetkinä. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuos 1 1-HBT-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 1-HBT-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 1-HBT-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

Taulukossa 18 on esitetty sarjan 6 eri näyteliuosten sokerimonomeerien pitoisuudet. Jokaisen sarjan 6 näyteliuoksen yhteen lasketut sokerimonomeerien pitoisuudet on esitetty kuvassa 39 ajan funktiona. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteen 4 kuvissa 17–19.

Taulukko 18. Sarjan 6 sokerimonomeerimääritysten tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuoksen 1 1-HBT-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 1-HBT-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 1-HBT-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]								
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	total
0	1	139	1034	265	391	844	19	31	401	3123
24	1	150	1157	442	410	835	18	47	82	3141
48	1	127	988	403	344	688	15	45	0	2611
0	2	137	1040	258	380	803	17	30	231	2898
24	2	145	1133	443	396	806	17	50	59	3047
48	2	132	1042	425	354	692	15	48	0	2707
0	3	142	1037	271	382	807	17	30	123	2809
24	3	140	1100	415	370	734	16	44	0	2819
48	3	151	1199	483	402	780	27	53	0	3094

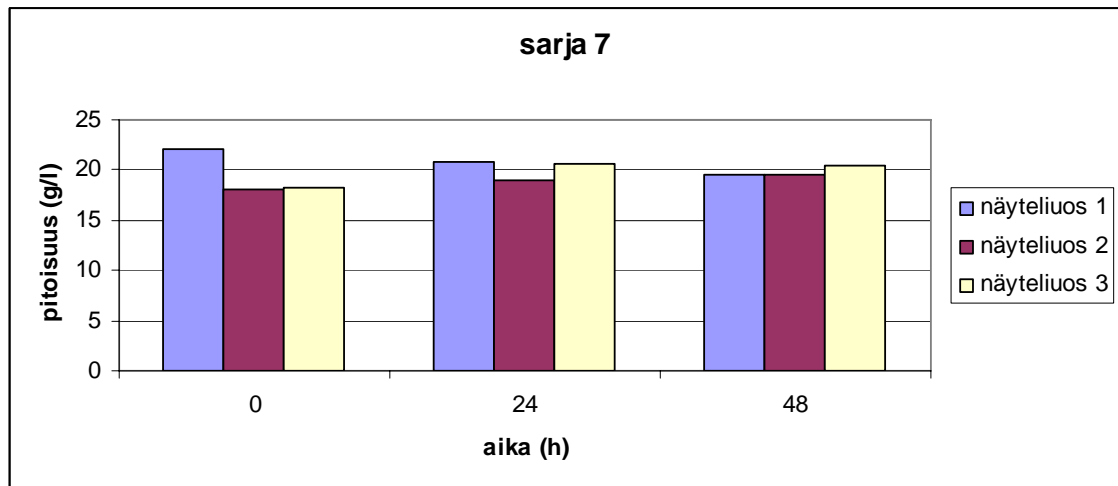


Kuva 39. Sarjan 6 näyteliuoksien yhteen lasketut sokerimonomeeripitoisuudet eri ajanhetkinä. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiuute. Näyteliuoksen 1 1-HBT-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 1-HBT-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 1-HBT-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

Taulukossa 19 on sarjan 7 kokonaissokerimäärittäytysten tulokset. Jokaisen sarjan 7 näyteliuoksen yhteen lasketut kokonaissokereiden pitoisuudet on esitetty kuvassa 40 ajan funktiona. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteen 3 kuvissa 20–22.

Taulukko 19. Sarjan 7 kokonaissokerimäärittäytysten tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiuute. Näyteliuoksen 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]								
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GaIA	4-O-Me-GlcA
0	1	11174	3166	1926	3547	1167	183	81	795	116
24	1	10463	2990	1835	3286	1080	170	77	741	111
48	1	9820	2806	1729	3091	1039	160	77	698	99
0	2	9006	2547	1598	2803	1002	149	107	637	185
24	2	9519	2721	1669	2979	1016	156	92	662	191
48	2	9831	2824	1698	3062	1024	157	94	687	102
0	3	9265	2600	1645	2767	968	150	79	534	207
24	3	10365	2972	1806	3227	1037	170	90	722	200
48	3	10308	2957	1779	3220	1028	168	86	730	103

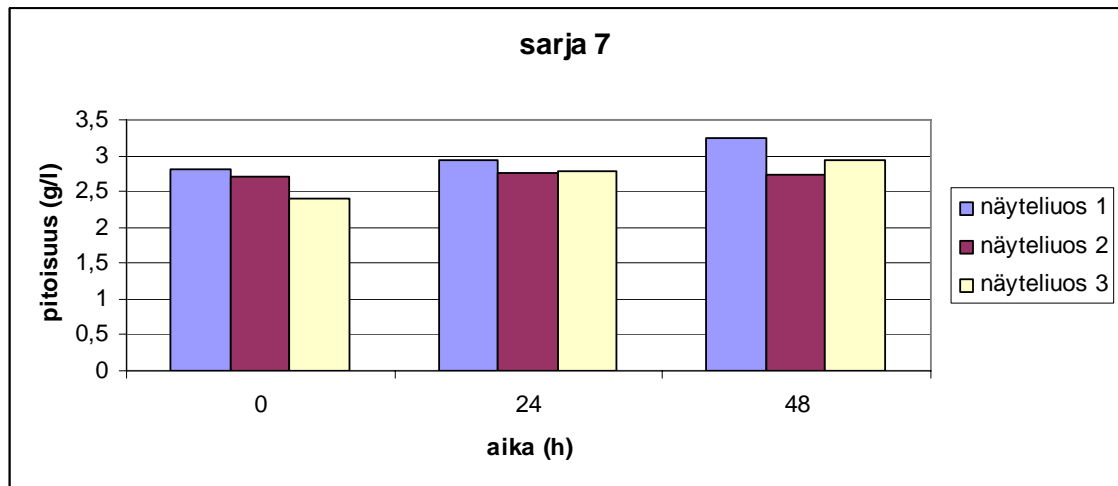


Kuva 40. Sarjan 7 näyteliuoksien yhteen lasketut kokonaissokeripitoisuudet eri ajanhetkinä. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuoksen 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

Taulukossa 20 on esitetty sarjan 7 eri näyteliuosten sokerimonomeerien pitoisuudet. Jokaisen sarjan 7 näyteliuoksen yhteenlasketut sokerimonomeerien pitoisuudet on esitetty kuvassa 41 ajan funktiona. Tarkemmat tulokset on esitetty liitteen 4 kuvissa 20–22.

Taulukko 20. Sarjan 7 sokerimonomeerimääritysten tulokset eri näyteliuoksissa. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuoksen 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

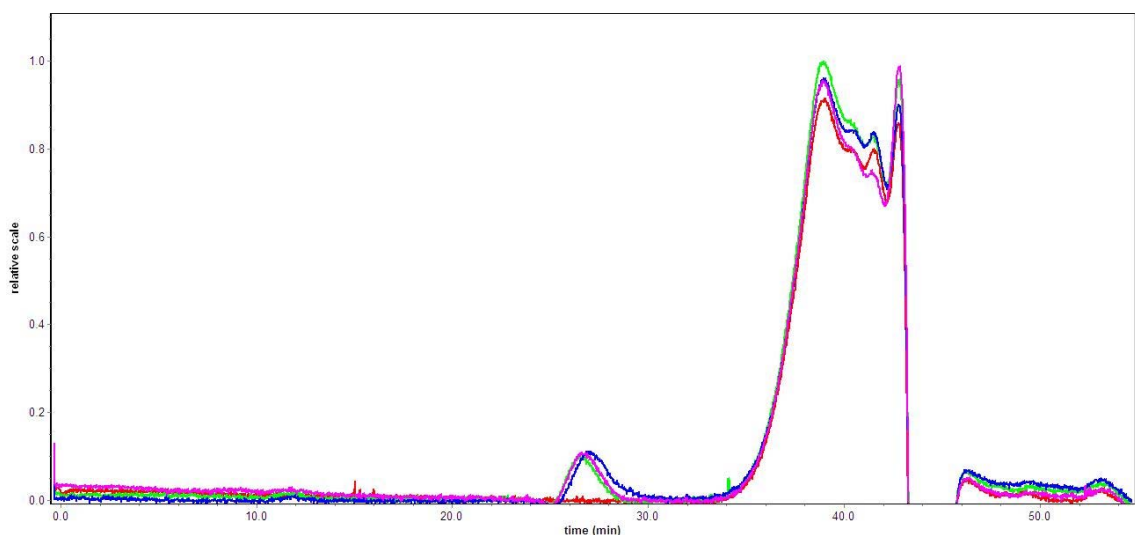
aika [h]	näyteliuos	pitoisuus [mg/l]								
		Man	Glc	Gal	Xyl	Ara	Rha	GlcA	GalA	total
0	1	138	993	281	417	896	29	8	40	2802
24	1	141	1043	405	423	874	29	8	18	2941
48	1	150	1113	475	466	970	32	0	35	3241
0	2	133	960	267	407	890	29	0	18	2704
24	2	131	984	378	395	819	29	0	16	2752
48	2	127	957	398	388	802	28	0	31	2730
0	3	121	888	228	359	766	27	0	8	2397
24	3	136	1026	361	406	829	28	0	10	2796
48	3	141	1074	394	423	862	30	0	19	2944



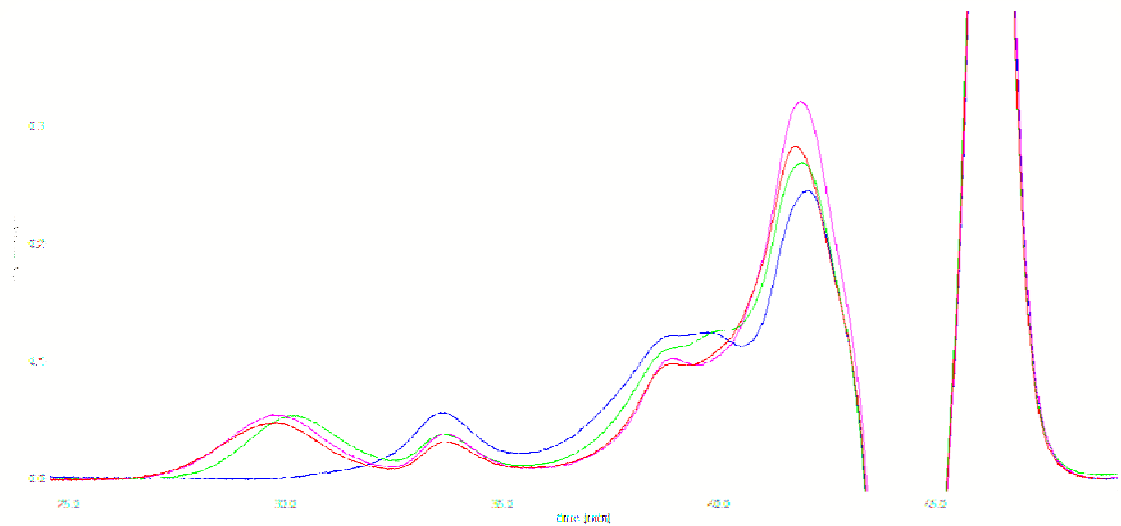
Kuva 41. Sarjan 7 näyteliuoksien yhteen lasketut sokerimoomeeriipitoisuudet eri ajanhetkinä. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuoksen 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

8.4 Sec-Malls

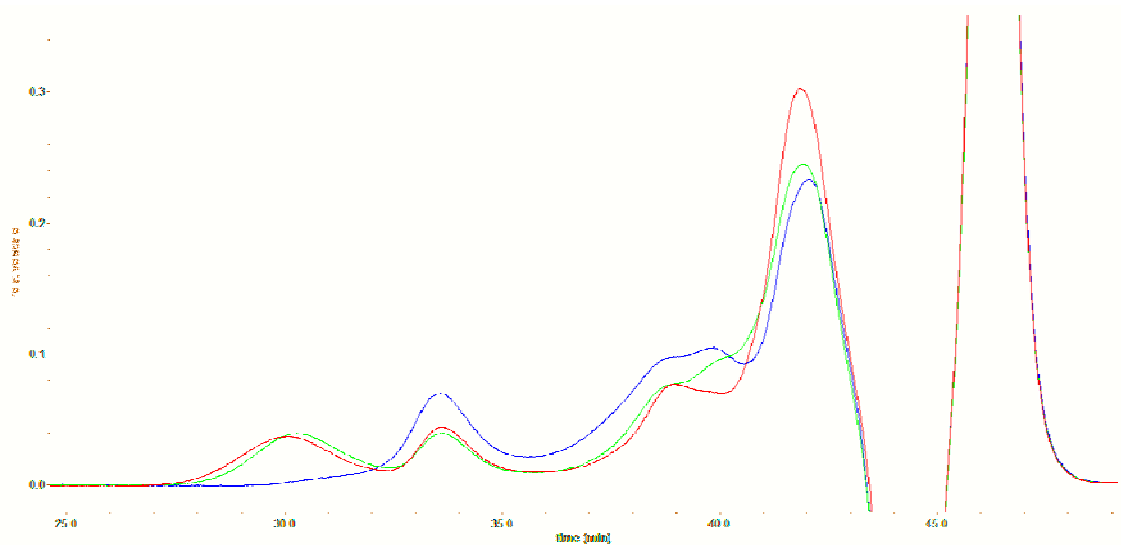
Tässä esitetyt tulokset ovat kaikki detektoitu RI-detektorilla. Sec-Malls-tulostuksissa x-akselilla on aika minuutteina ja y-akselilla skaala. Aikavälille 25–30 minuuttia tulevat agrigaateista aiheutuneet piikit ja aikavälille 35–55 minuuttia sokereista aiheutuneet piikit. Koivu-uutteesta tehdyn sarjan 4 Sec-Malls-tulokset on esitetty kuvissa 42–44.



Kuva 42. Sarjan 4 näyteliuoksen 1 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on kuivattua PHWE-uutettua koivu-uutetta, jota ei ole lakkaasikäsitelty. Kuvassa sininen viiva on näyte ajan hetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 24 tuntia, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 48 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 72 tuntia.

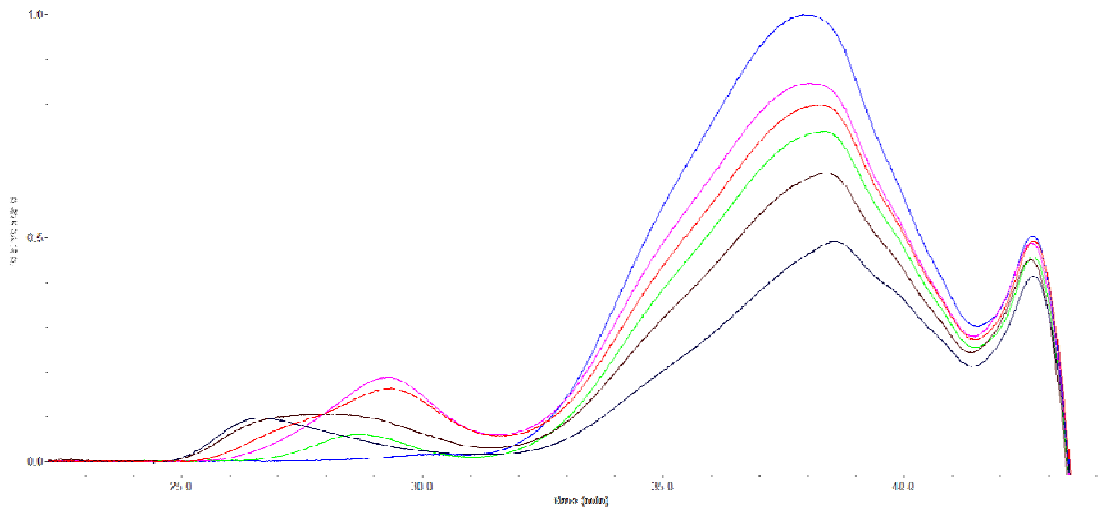


Kuva 43. Sarjan 4 näyteliuoksen 2 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on kuivattua PHWE-uutettua koivu-uutetta, johon on lisätty 3 til-% lakkaasia. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 24 tuntia, vaaleanpunainen ajan hetkeltä 48 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 72 tuntia.

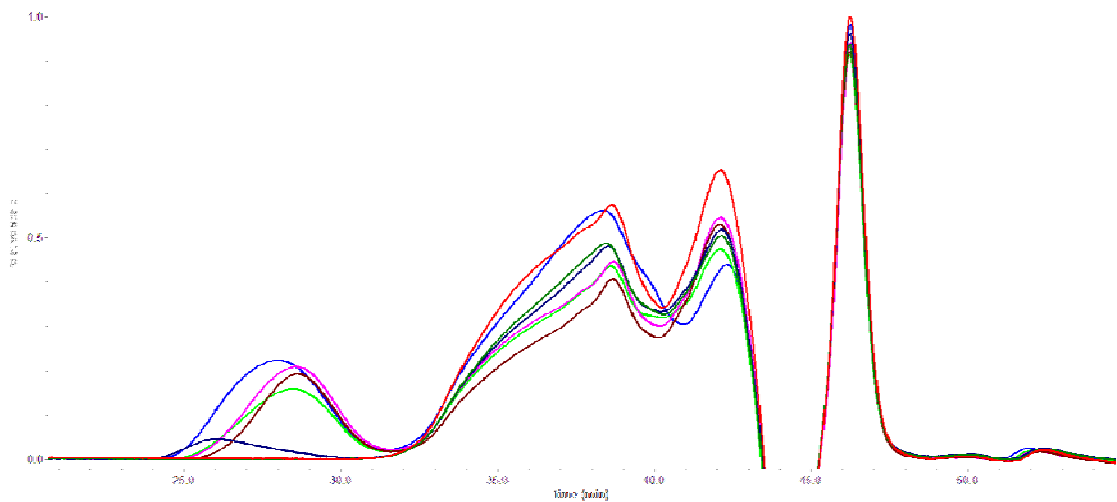


Kuva 44. Sarjan 4 näyteliuoksen 3 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on kuivattua PHWE-uutettua koivu-uutetta, johon on lisätty 5 til-% lakkaasia. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 24 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.

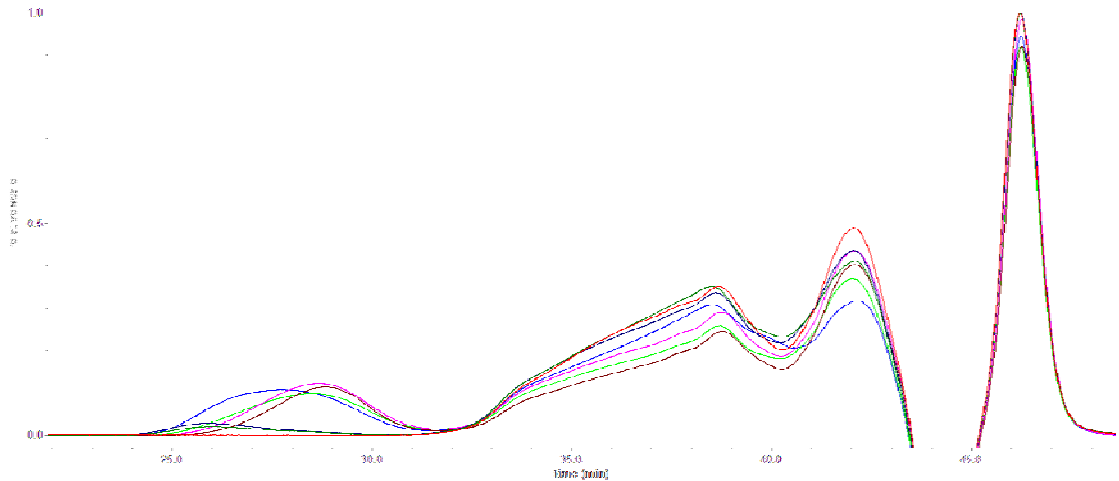
Kuusiutteesta tehdyn sarja 5 Sec-Malls-tulostukset on esitetty kuvissa 45–47.



Kuva 45. Sarjan 5 näyteliuoksen 1 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusiutetta, jota ei ole lakkaasikäsittely. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 1 tunti, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 3 tuntia, ruskea ajanhetkeltä 5 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 24 ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.

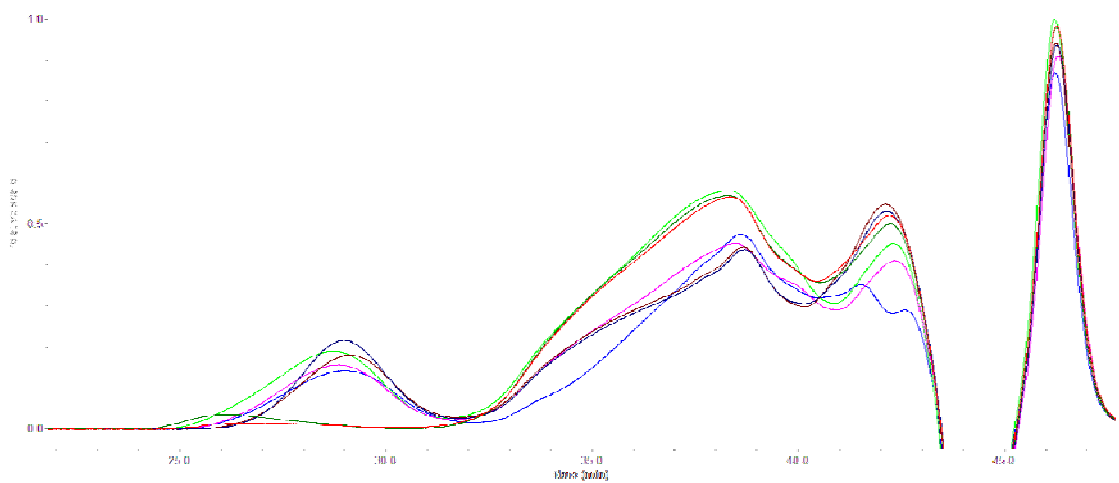


Kuva 46. Sarjan 5 näyteliuoksen 2 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusiutetta, johon on lisätty 3 til-% lakkaasia. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 1 tunti, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 3 tuntia, ruskea ajanhetkeltä 5 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 24, tumman vihreä ajanhetkeltä 48 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 72 tuntia.

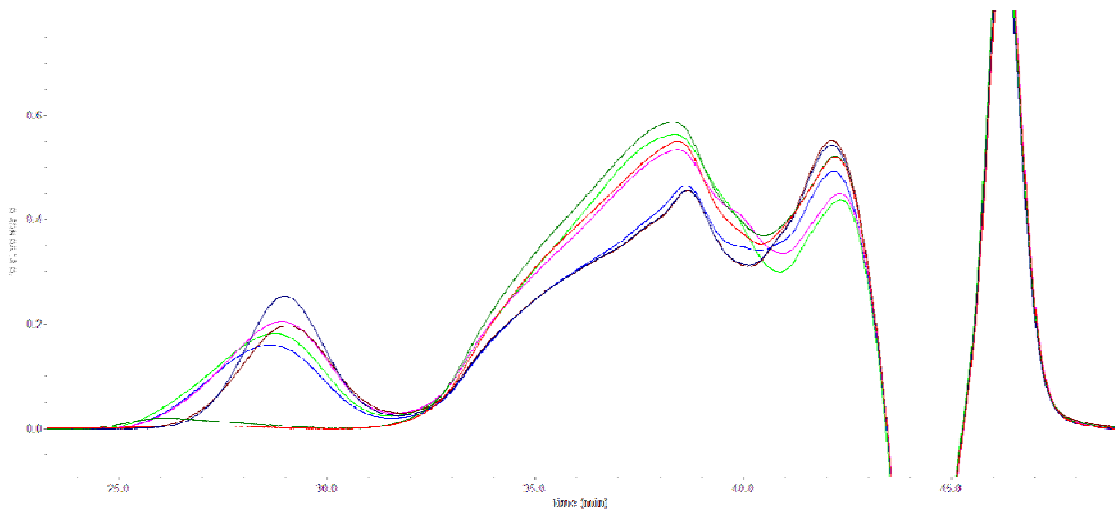


Kuva 47. Sarjan 5 näyteliuoksen 3 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusiutetta, johon on lisätty 5 til-% lakkaasia. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 1 tunti, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 3 tuntia, ruskea ajanhetkeltä 5 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 24, tumman vihreä ajanhetkeltä 48 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 72 tuntia.

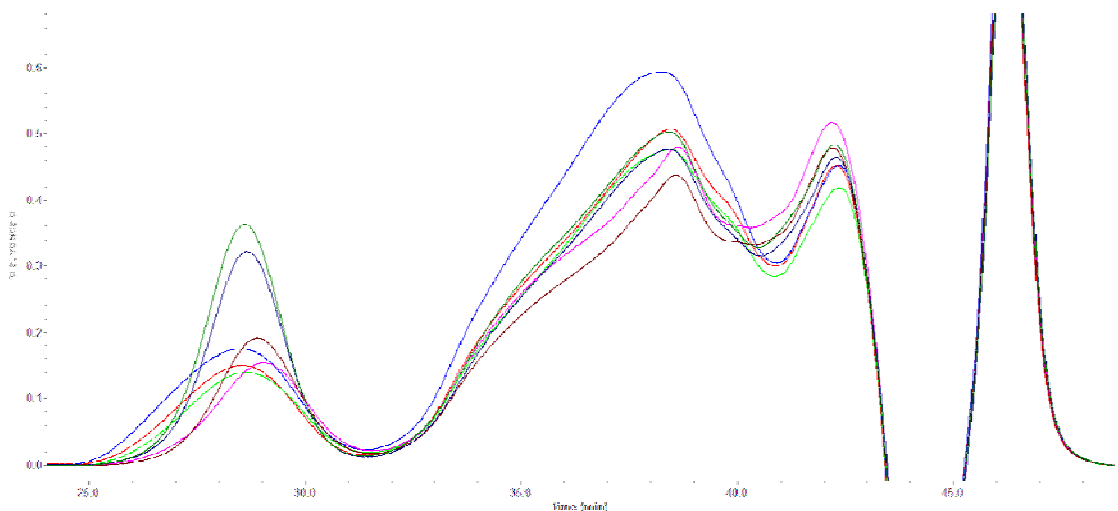
Kuvissa 48–50 on esitetty sarjan 6 Sec-Malls-tulostukset.



Kuva 48. Sarjan 6 näyteliuoksen 1 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusiutetta, jota on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 0,05 mmol/l. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 0,5 tuntia, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 1 tunti, ruskea ajanhetkeltä 3 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 5, tummanvihreä ajanhetkeltä 24 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.

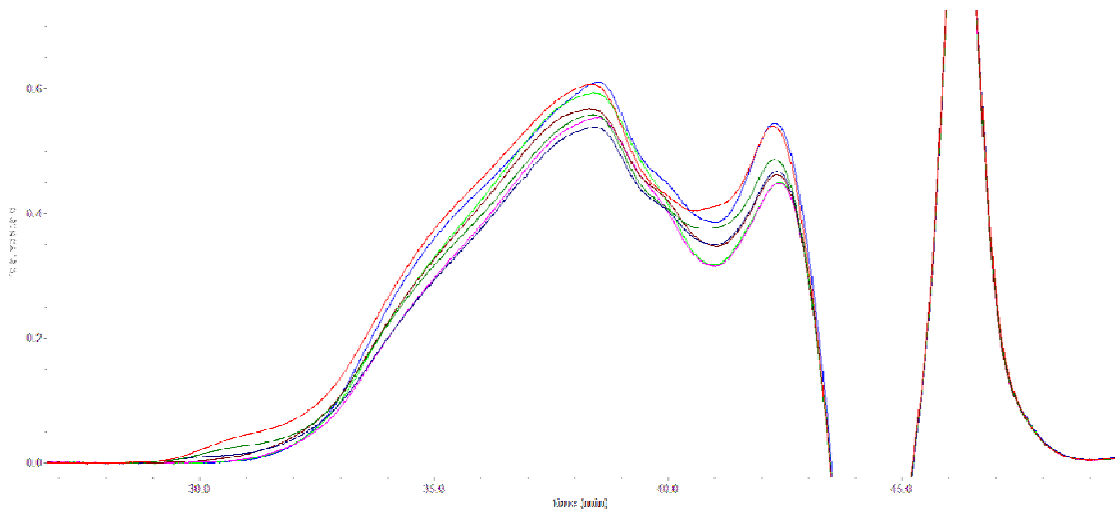


Kuva 49. Sarjan 6 näyteliuoksen 2 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusiutetta, jota on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 0,5 mmol/l. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 0,5 tuntia, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 1 tunti, ruskea ajanhetkeltä 3 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 5, tummanvihreä ajanhetkeltä 24 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.

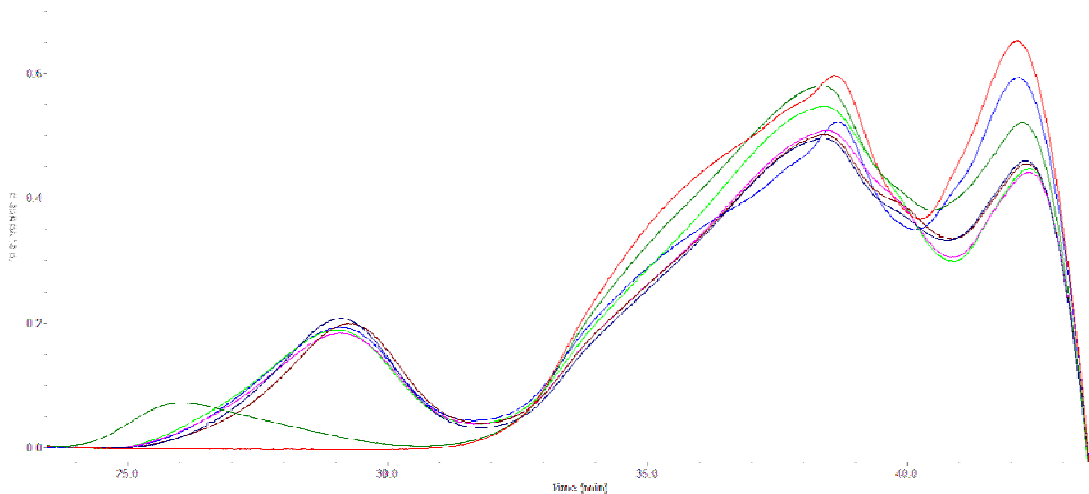


Kuva 50. Sarjan 6 näyteliuoksen 3 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusiutetta, jota on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 10 mmol/l. Kuvassa punainen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, sininen ajanhetkeltä 0,5 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 1 tunti, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 3 tuntia, ruskea ajanhetkeltä 5, tummansininen ajanhetkeltä 24 tuntia ja tummanvihreä ajanhetkeltä 48 tuntia.

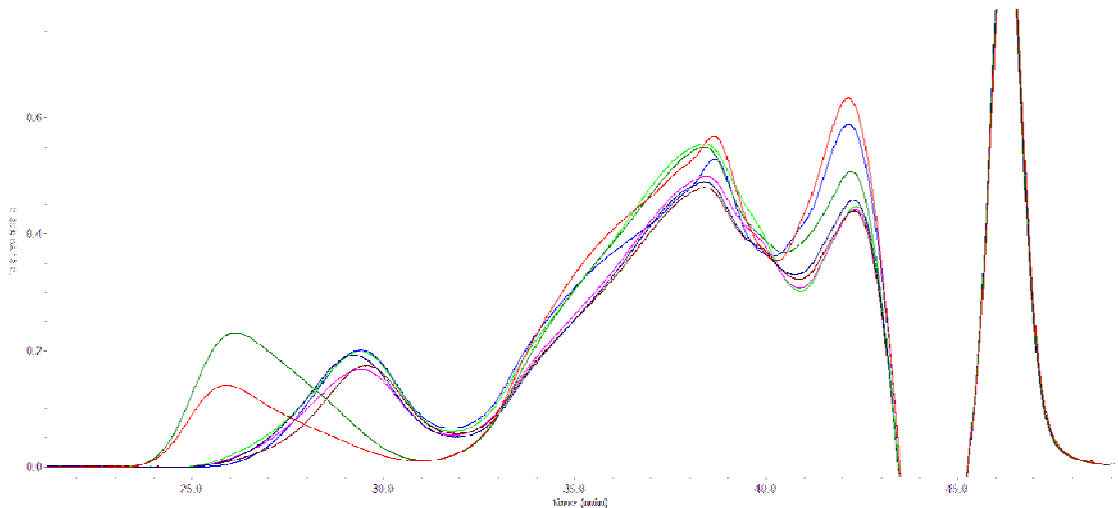
Kuvissa 51–53 on esitetty sarjan 7 Sec-Malls-tulostukset.



Kuva 51. Sarjan 7 näyteliuoksen 1 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE- uutettua kuusiutetta, jota on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 0,05 mmol/l. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 0,5 tuntia, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 1 tunti, ruskea ajanhetkeltä 3 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 5, tummanvihreä ajanhetkeltä 24 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.



Kuva 52. Sarjan 7 näyteliuoksen 2 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE- uutettua kuusiutetta, jota on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 0,5 mmol/l. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 0,5 tuntia, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 1 tunti, ruskea ajanhetkeltä 3 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 5, tummanvihreä ajanhetkeltä 24 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.



Kuva 53. Sarjan 7 näyteliuoksen 3 Sec-Malls-tulostus. Tutkittu uute on PHWE-utettua kuusi-uutetta, jota on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 10 mmol/l. Kuvassa sininen viiva on näyte ajanhetkeltä 0 tuntia, vihreä ajanhetkeltä 0,5 tuntia, vaaleanpunainen ajanhetkeltä 1 tunti, ruskea ajanhetkeltä 3 tuntia, tummansininen ajanhetkeltä 5, tummanvihreä ajanhetkeltä 24 tuntia ja punainen ajanhetkeltä 48 tuntia.

9 Tulosten tarkastelu

9.1 Ligniinin hajoamistuotteiden pitoisuuksien muutokset

Sarjojen 1–3 matalissa lämpötiloissa PHWE-utetut koivupurut sisälsivät ligniinin hajoamistuotteita vaihtelevan määrän, kuten kuvista 17, 18 ja 20 nähdään. Sarjojen 1 ja 3 kohdalla voidaan todeta kaikkien ligniinin hajoamistuotteiden poistuneen heti lakkaasikäsittelyn alkamisen jälkeen. Eroa tuloksissa ei ollut eri lakkaasipitoisuuksien välillä. Sarjan 2 kohdalla 3 ml entsyymilisäys poisti ligniinin hajoamistuotteet vasta puolen tunnin kuluttua (kuva 19). Lakkaasi ei pystynyt välittömästi poistamaan ligniinin hajoamistuotteita, joten niiden voidaan todeta sakkautuneen muista syistä heti entsyymin lisäämisen jälkeen.

Sarjan 4 koivu-uute oli selvästi puhtain tutkittava uute ja siten tutkimuskäyttöön parhaiten soveltuva. Kuvasta 21 nähdään, kuinka tämän sarjan referenssiliuos sisälsi määrällisesti ja laadullisesti vähemmän ligniinin hajoamistuotteita kuin muiden sarjojen referenssiliuokset.

Sarjan 5 nestemäisen kuusiuutteen sisältämät ligniinin hajoamistuotteet saatiin lakkaasikäsitteilyn aikana välittömästi poistettua, kuten kuvasta 22 voidaan todeta. Eri lakkaasipitoisuuksilla ei saavutettu eroja. Sarjojen 1–4 koivu-uutteen ja sarjan 5 kuusiuutteen ligniinin hajoamistuotteet olivat toisistaan eroavia, kuten eri puulajeista johtuen oletettiin. Kuusiuutteesta löydettiin esimerkiksi pinoresinolia, jota ei koivu-uutteesta tavattu.

Sarjassa 6 käytettiin PHWE-uutettua kuusta ja mediaattoria 1-HBT. Lakkaasikäsitteily yhdistettynä tähän mediaattoriin ei poistanut kaikkia ligniinin hajoamistuotteita. Kuten kuvasta 23 ja liitteen 1 taulukoista 1 ja 2 nähdään, vanilliini ja vanilliinihappo jäivät käsittelystä huolimatta jäljelle. Näyteliuksissa 1 ja näyteliuksessa 2 vasta 24 tunnin kuluttua vanilliinin ja vanilliinihapon yhteenlaskettu pitoisuus väheni selvästi alkutilanteeseen verrattuna. Näyteliuksissa 3 ei suurta muutosta näiden pitoisuuksissa tavattu.

Sarjan 6 kaikkia tuloksia tulee verrata sarjan 5 näyteliuksen 2 tuloksiin. Näillä käytetty uute ja lakkaasipitoisuus olivat samoja. Oletettavasti käytetyt 1-HBT-mediaattorikonsentraatiot olivat niin suuria, että ne osittain inhiboivat lakkaasin toimintaa. Kuitenkin käsittelyt kaikkien näyteliusten kohdalla poistivat muut ligniinin hajoamistuotteet, joita sarjan 5 referenssiliuksessa tavattiin. 1-HBT:n käyttö ei tuottanut parannusta lakkaasin toimintaan. Päinvastoin se esti lakkaasin toimintaa sitä enemmän, mitä sitä oli lisätty.

Sarjassa 7 käytettiin PHWE-uutettua kuusta ja mediaattoria ABTS. Käytetyillä lakkaasi- ja mediaattorikäsitteilyillä jäi vanilliinia näyteliuksen 1 ja näyteliuksen 2 näytteisiin kuvan 24 sekä liitteen 1 taulukon 3 mukaisesti. Näyteliuksen 1 käsittelyn aikana ligniinin hajoamistuotteet poistuivat kokonaan vasta 24 tunnin kuluttua käsittelyn aloittamisesta. Näyteliuksen 2 käsittelyn aikana sama tulos saavutettiin nopeammin ja kaikki ligniinin hajoamistuotteet hävisivät 5 tunnin kuluttua käsittelyn aloittamisesta. Näyteliuksessa 3 ei ligniinin hajoamistuotteita löydetty lainkaan.

Sarjan 7 tuloksia tulee verrata sarjan 5 näyteliuksen 2 tuloksiin, jolloin puu-uute ja lakkaasipitoisuus ovat samoja. Korkein käytetty ABTS-konsentraatio ei aiheuttanut muutoksia lakkaasin toimintaan. Tätä alhaisemmat ABTS-konsentraatiot hidastivat lakkaasin toimintaa, vaikka niilläkin saavutettiin täysin ligniinitöntömät tulokset. Korkein

ABTS-konsentraatio tuotti siis saman tuloksen kuin pelkän lakkaasin lisääminen käytettyyn kuusiuutteeseen.

Sarjan 7 tuloksia voidaan verrata myös sarjan 6 tuloksiin, jolloin nähdään eri mediaattorin aiheuttama muutokset. Verrattuna 1-HBT:iin ABTS toimi paremmin. Sen jäljiltä ei jäänyt lainkaan vanilliinihappoa, mitä sarjan 6 näyteliuoksessa 3 tavattiin. Lisäksi ABTS inhiboi lakkaasia sitä vähemmän, mitä suurempi sen konsentraatio oli. Kaikilla ABTS-konsentraatioilla havaittiin samat pelkän lakkaasikäsittelyn aikana saavutetut ligniinin hajoamistuotteista vapaat tulokset, joita 1-HBT:lla ei saavutettu lainkaan.

9.2 Rasvahappopitoisuuksien muutokset

Rasvahappopitoisuuksien ja rasvahappojen hapetustuotteiden pitoisuuksien muutokset eivät johtuneet lakkaasista, koska sillä ei ole lipaasiominaisuuksia. Näiden häviämiset käsittelyn aikana johtuivat muista tekijöistä. Näitä määriä kuitenkin seurattiin saaduista GC-MS-tuloksista mielenkiinnosta PHWE-uutetta kohtaan.

Sarjan 1 referenssi liuoksessa oli kuvan 25 ja liitteen 1 kuvan 1 perusteella keskimäärin 0,023 mg/ml rasvahappoja. Lakkaasikäsittely ei oletettavasti poistanut näitä vaan jopa hieman lisäsi näiden pitoisuutta. Näyteliuoksessa 3 oli kuvan 25 ja liitteen 1 kuvan 2 perusteella keskimäärin 0,032 mg/ml rasvahappoja. Sarjojen 2 ja 3 referenssiliuoksissa ja muissa näyteliuoksissa ei tavattu rasvahappoja.

Sarjassa 4 löydettiin vain monopalmitiinia ja monosteariinia. Oletettavasti nämä olivat syntyneet rasvahappojen hapettumisessa. Kuvan 26 mukaisesti ei lakkaasikäsittelyllä saatu rasvahappopitoisuuksia putoamaan. Näyteliuoksissa 2 ja 3 oli keskimääräisesti enemmän rasvahappoja kuin referenssiliuoksessa.

Sarjoissa 5 ja 6 ei löydetty lainkaan rasvahappoja. Sarjassa 7 niitä löytyi taulukon 5 mukaisesti vain näytteistä, jotka otettiin heti entsyymin lisäämisen jälkeen. Kaikista sarjan 7 näyteliuoksista löytyi rasvahappoa 18:0, monopalmitiinia ja monosteariinia.

Lakkaasikäsitteily ei siis ole varma keino rasvahappojen poistamiseksi koivu-uutteesta. Mediaattoreista 1-HBT tuottaa saman tuloksen kuin pelkkä lakkaasikäsitteily. ABTS näyttäisi heikentävän lakkaasin ominaisuuksia.

9.3 Kaasukromatografia

Niin kokonaissokeri- kuin sokerimonomeeripitoisuudet vaihtelevat kaikilla näytesarjoilla eri näytesarjojen kesken. Optimaalisessa ja halutussa tuloksessa lakkaasi ei vaikuttaisi uutteen hiilihydraatteihin. Kuitenkin saatujen tulosten perusteella joudutaan toteamaan lakkaasikäsitteilyn aiheuttaneen kokonaissokereiden pilkkoutumista monomeereiksi. Monomeeripitoisuudet nousivat 0,2–1,0 g/l suuremmiksi verrattuna referenssiuoksiin lakkaasikäsitteilystä johtuen.

Koivu-uutteen osalta on tämä selvimmän nähtävissä sarjojen 2 ja 4 tuloksista (taulukot 9, 10, 13 ja 14 sekä kuvat 30, 31, 34 ja 35). Sarja 1 antoi samansuuntaisia tuloksia, kuten kuvista 28 ja 29 sekä taulukoista 7 ja 8 nähdään. Sarjan 1 tuloksissa oli kuitenkin liikaa vaihtelua tulosten varmistamiseksi. Vaihtelu johtui mitä luultavimmin inhimillisistä erehdyksistä. Sarjan 3 kuvissa 32 ja 33 sekä taulukoissa 11 ja 12 on havaittavissa vastaavaa kokonaissokereiden pilkkoutumista. Käytetyt eri lakkaasipitoisuudet tuottivat hieman toisistaan poikkeavia tuloksia. Suurempi lakkaasipitoisuus pilkkoi sokereita enemmän kuin pienempi pitoisuus. Erot olivat kuitenkin vain muutaman gramman kymmenyksen suuruisia. Vastaavia tuloksia kuin koivu-uutteella saatiin myös kuusiuutteella sarjassa 5 (taulukot 15 ja 16 sekä kuvat 36 ja 37). Kuten liitteiden 3 ja 4 kuvista nähdään eri sokereiden ja sokerimonomeerien suhteet pysyivät melko muuttumattomina, vain glukoosipitoisuus hieman kasvoi.

Sarja 6 kokonaissokeri- ja sokerimonomeerituloksista kuvissa 38 ja 39 ja taulukoissa 17 ja 18 ei ole nähtävissä trendejä. Käytetty mediaattori ei estänyt kokonaissokereiden pilkkoutumista monomeereiksi.

Kuvien 40 ja 41 sekä taulukon 21 perusteella sarjan 7 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuus väheni ajan funktiona ja näytesarjojen 2 ja 3 pitoisuudet kasvoivat. Näyteliuoksen 1 kokonaissokerimäärityksen tuloksiin tulee suhtautua varauksellisesti, sillä kokonaissokeripitoisuuden ei tulisi laskea. Kaikkien tämän sarjan näyteliuosten sokeri-

monomeeripitoisuudet kasvoivat ajan suhteen, kuten taulukosta 20 ja kuvasta 41 nähdään. Käytetty mediaattori ei siis auttanut stabiloimaan hiilihydraatteja.

9.4 Sec-Malls

Koivu-utteen Sec-Malls-tulostuksista kuvista 42–44 on havaittavissa sokereista aiheutuneiden piikkien pienenemistä eli niiden molekyylikoon pienenemistä. Kuvissa 43 ja 44 nähdään lakkaasin aiheuttama piikki aikavälillä 33–35 minuuttia. Samaisista kuvista voidaan todeta aggregaattien määrän kasvavan ajan funktiona.

Kuusiutteen Sec-Malls-tulostuksissa kuvissa 45–47 näkyy vastaava sokeripiikkien pieneneminen. Pienimmällä lakkaasipitoisuudella aggregaattien määrä kasvaa, kun taas suuremmilla lakkaasipitoisuuksilla aggregaatit häviävät kokonaan. Aggregaattien häviäminen on merkki halutusta lakkaasin toiminnasta: ligniinien hajoamistuotteiden poistamisesta.

Kuten kuvista 48–50 nähdään, sarjan 6 näyteliuosten 1 ja 2 näytteiden ajanhetkiltä 24 ja 48 tuntia aggregaatit saatiin häviämään kokonaan. Lakkaasi toimi siis halutulla tavalla. Tässä sarjassa suurin käytetty mediaattorikonsentraatio (kuva 50) näyttäisi kasvattavan aggregaattipiikkejä suhteessa muihin mediaattorikonsentraatioihin.

Sarjan 7 näyteliuosten 1 ja 2 (kuvat 51 ja 52) ajanhetkien 24 ja 48 tuntia näytteiden aggregaattipiikit eroavat selvästi lyhyemmän käsittelyn saaneista näytteistä. Näistä voidaan päätellä aggregaattien hävinnan ajan funktiona. Näyteliuoksen 3 Sec-Malls-tulostuksesta kuvasta 53 nähdään, että suurin ABTS-konsentraatio ei poistanut aggregaatteja.

10 Yhteenveto ja jatkotutkimusehdotukset

Insinöörityössä selvitettiin lakkaasientsyymien vaikutusta lähinnä ligniinin hajoamistuotteiden poistamiseen hemiselluloosaketjuista. Jäljelle jäänyt ligniini ja sen hajoamistuotteet haittaavat hemiselluloosan tutkimuskäyttöä ja muuta jälkikäsitelyä. Saavutetut tulokset pelkällä lakkaasilla olivat oletettuja, mutta mediaattoreiden heikko teho oli yllättävä.

Lakkaasikäsitelyn aikana saatiin halutusti poistettua kaikki ligniinin hajoamistuotteet sekä koivu- että kuusiuutteesta. Mediaattorit eivät kumpikaan tehostaneet lakkaasin toimintaa. 1-HBT inhiboi lakkaasin toimintaa sitä enemmän, mitä sitä oli lisätty. Suurimmalla ABTS-konsentraatiolla saavutettiin samat tulokset ligniinin hajoamistuotteiden häviämisen suhteen kuin pelkällä lakkaasikäsitelyllä. Alhaisemmat ABTS-konsentraatiot hidastivat huomattavasti lakkaasin toimintaa. Ligniinin hajoamistuotteiden poistamiseksi pelkkä lakkaasi ilman mediaattoria toimi parhaiten. Lakkaasin ei tulisi poistaa ligniinin hajoamistuotteita välittömästi entsyymien lisäämisen jälkeen, joten on oletettavaa, että lakkaasi saosti hajoamistuotteet eikä toiminut haluttujen reaktioiden kautta.

Rasvahappoja ei lakkaasi kyennyt oletettavasti kokonaan poistamaan. Käytetyllä lakkaasilla ei ole lipaaseille tyypillisiä toimintoja. Varsinkin koivu-uutteen rasvahapot eivät välittäneet lakkaasikäsitelystä. Kuusiuutteen kohdalla ei voida yksiselitteisesti sanoa lakkaasin poistaneen rasvahapot sillä sen referenssiliuoksessa (sarja 5, näyteliuos 1) ei löytynyt lainkaan rasvahappoja. Kuusiuutteissa pelkällä lakkaasikäsitelyllä saatiin samat tulokset kuin yhdistetyllä lakkaasi ja 1-HBT -käsitelyllä. ABTS-käsitellyt näyteliuokset sisälsivät kaikki rasvahappoja.

Sekä kuusi- että koivu-uutteilla lakkaasi aiheutti kokonaissokereiden pilkkoutumista monomeereiksi. Ajan funktiona sokeripitoisuudet eivät juuri muuttuneet, vaan muutos tapahtui lähes välittömästi lakkaasin lisäämisen jälkeen. Mediaattoreiden käytöllä ei huomattu olevan vaikutusta sokereiden pilkkoutumiseen. Eri sokereiden ja sokerimonomeerien suhteet pysyivät melko muuttumattomina.

Työssä käytettiin jokaisessa sarjassa kahta eri entsyymipitoisuutta ja yhtä referenssiliuosta. Käytettyjen entsyymipitoisuuksien välillä ei havaittu juurikaan eroja. Suurempi lakkaasimäärä pilkkoi hieman enemmän sokereita, mutta muuten saavutettiin samat

tulokset. Esimerkiksi ligniinin hajoamistuotteet hävisivät molempien eri lakkaasipitoisuuksilla tehtyjen käsittelyjen aikana yhtä hyvin.

Käytetyistä puu-uutteista sarjan 4 kuivattu koivu-uute soveltui parhaiten tähän tutkimukseen. Se sisälsi rasvahappoja, riittävästi ligniinin hajoamistuotteita ja oli laadullisesti tasaisinta. Käytetyssä kuusuutteessa oli määrällisesti eniten ligniinin hajoamistuotteita ja hiilihydraatteja.

Jatkotutkimuksissa voitaisiin mitata käytettävä entsyymien aktiivisuus ja samalla myös mitata sen lipaasi-, hemisellulaasi- ja sellulaasiaktiivisuudet. Tulevaisuudessa voitaisiin tutkia mediaattorien vaikutusta koivu-uutteeseen yhdessä lakkaasientsyymien kanssa. Myös muita mediaattorikonsentraatioita voitaisiin testata. 1-HBT-konsentraatiota voitaisiin laskea ja ABTS-konsentraatiota nostaa tulosten parantamiseksi. Myös eri lakkaasipitoisuuksia voitaisiin testata. Tässä työssä saatiin hyviä tuloksia 3 til-% ja 5 til-% lakkaasista, mutta pienempikin määrä saattaisi hyvin riittää. Pienempi entsyymipitoisuus olisi taloudellisempaa ainakin siinä tapauksessa, kun käsittelyn skaalaa kasvatetaan. Entsyymikäsitellyn uutteen ligniinipolymeerien suodattamista pois ei tässä työssä kokeiltu. Erilaisten suodattimien soveltuvuutta voitaisiin tutkia.

Lähteet

- 1 Andersson, Terhi. 2007. Parameters Affecting the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Pressurised Hot Water. Helsingin yliopisto: väitöskirja.
- 2 Call, H.P & Mücke I. 1997. Minireview. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym ® -process). *Journal of Biotechnology* 53 (1997), s. 163–202.
- 3 Camarero, Susana, Ibarra, David, Jesús Martínez, María & Martínez, Ángel T. Lignin-Derived Compounds as Efficient Laccase Mediators for Decolorization of Different Types of Recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 2005, Vol. 71 , No. 4, s. 1775–1784.
- 4 Enzyme Technology. Verkkodokumentti. London South Bank University. <<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/>> 20.12.2004. Luettu 10.3.2011.
- 5 Fillat, Amanda, Colom, Joseph F. & Vidal, Teresa. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource Technology* 101 (2010), s. 4104–4110.
- 6 Grönqvist, S., Buchert, J., Rantanen, K., Viikari, L. & Suurnäkki A. Activity of laccase on unbleached and bleached thermomechanical pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003), s. 439–445.
- 7 Haggrén, Markus. 2010. Rahkasammalten paineistetun kuumavesiuuton uuttoparametrien optimointi, uutteiden hydrolysointi ja hydrolysaattien fermentointi. Insinööriö Metropolia Ammattikorkeakoulu.
- 8 Isotalo, Kaija. 1996. Puu- ja sellukemia. Helsinki: Opetushallitus.
- 9 IUBMB Enzyme Nomenclature. Verkkodokumentti. International Union of Biochemistry and Molecular Biology. <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/10/3/2.html>> Luettu 10.3.2011.
- 10 Jääskeläinen, Anna-Stiina & Sundqvist Henna. 2007. Puun rakenne ja kemia. Helsinki: Otatieto.
- 11 Kurniwati, Selvia & Nicell, James A. Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 41 (2007), s. 353–361.
- 12 Leppänen, Kaisu, Spetz, Peter, Pranovich, Adrey, Hartonen, Kari, Kitunen, Veikko & Ilvesniemi Hannu. 2010. Pressurized hot water extraction of Norway spruce hemicelluloses using a flow-through system. Springer-Verlag.
- 13 Napari, Pirjo. 2001. Orgaaninen kemia. 2.–5. painos. Helsinki: Oy Edita Ab.

- 14 Osma, Johann F., Toca-Herrera, José & Rodríguez-Couto, Susana. 2010. Review Article. Uses of Laccases in the Food industries. Spanish Ministry on Science and Innovation.
- 15 Parsons, Andrew F. 2003. Keynotes in Organic Chemistry. Oxford: Blackwell Publishing.
- 16 Pearl, Irwin A. 1967. The Chemistry of Lignin. New York: Marcel Dekker, Inc..
- 17 Schubert, Walter J. 1965. Lignin Biochemistry. New York: Academic Press Inc.
- 18 Shleev, Sergey, Persson, Per, Shumakovich, Galina, Mazhuga, Yulia, Yaropolov, Alexander, Ruzgas, Tautgirdas & Gorton, Lo. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006), s. 841–847.
- 19 Sixta, Helbert (ed.). 2006. Handbook of Pulp. Volume 1. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
- 20 Sjöström, Eero. 1989. Puukemia: Teoreettiset perusteet ja sovellutukset. Helsinki: Otakustantamo.
- 21 Valls, Cristina, Vidal, Teresa & Roncero, M. Blanca. 2009. Boosting the effect of a laccase-mediator system by using a xylanase stage in pulp bleaching. *Journal of Hazardous Materials* 177 (2010), s. 586–592.
- 22 Vuorinen, Tapani. 2007. Puun uuteaineet. Verkkodokumentti. Teknillinen Korkeakoulu. <http://puukemia.tkk.fi/fi/opinnot/kurssit/19-1000/luennot/19.210Uuteaineet_v3.pdf> Luettu 10.3.2011.
- 23 Yarema, Kevin J. (ed.). 2005. Handbook of Carbohydrate Engineering. Florida: Taylor & Francis Group.

GC-MS-tuloksia

Taulukko 1. Sarjan 6 näyteliuosten vanilliinipitoisuudet eri ajanhetkillä. Näytteenä on vakiolakkaasipitoisuudella (3 til-%) ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuos 1 1-HBT-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 1-HBT-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 1-HBT-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

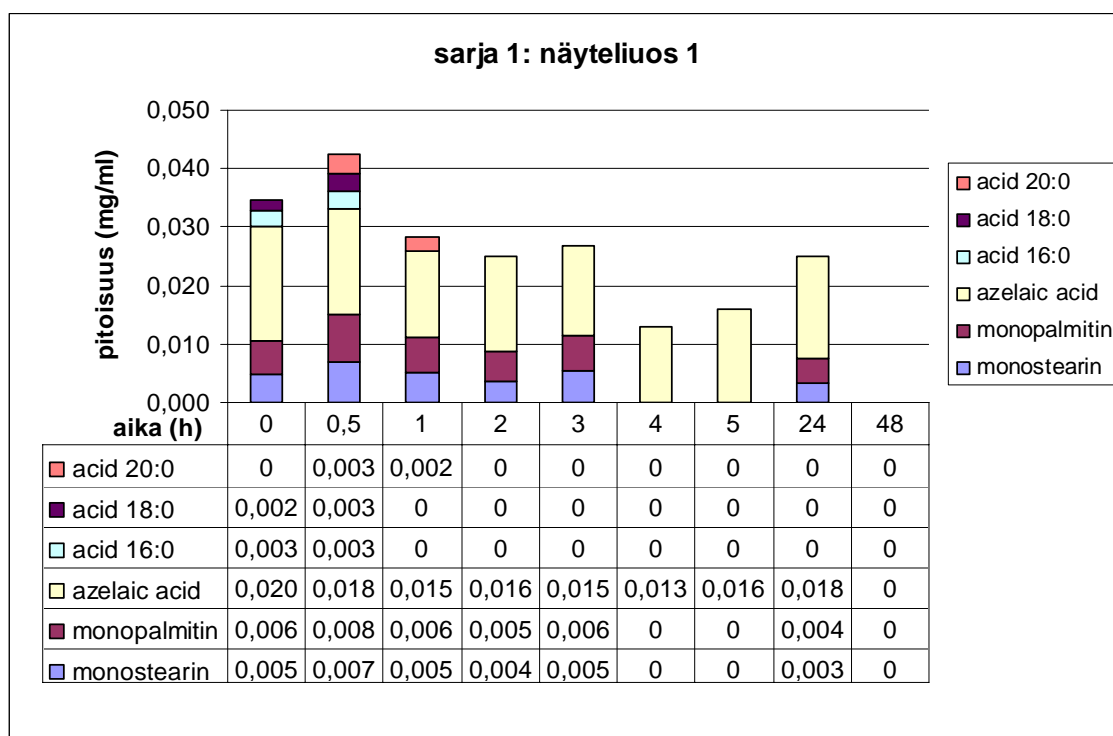
aika [h]	vanilliinipitoisuus [mg/ml]		
	näyteliuos 1	näyteliuos 2	näyteliuos 3
0	0,03	0,03	0,03
0,5	0,03	0,04	0,03
1	0,02	0,02	0,02
3	0,01	0,02	0,02
5	0,05	0,04	0,05
24	0,01	0,00	0,03
48	0,00	0,01	0,03

Taulukko 2. Sarjan 6 näyteliuoksen 3 vanilliinihappopitoisuus eri ajan hetkinä. Näytteenä on kuusiute, jota on käsitelty lakkaasilla ja mediaattorin 1-HBT konsentraatiolla 10 mmol/l.

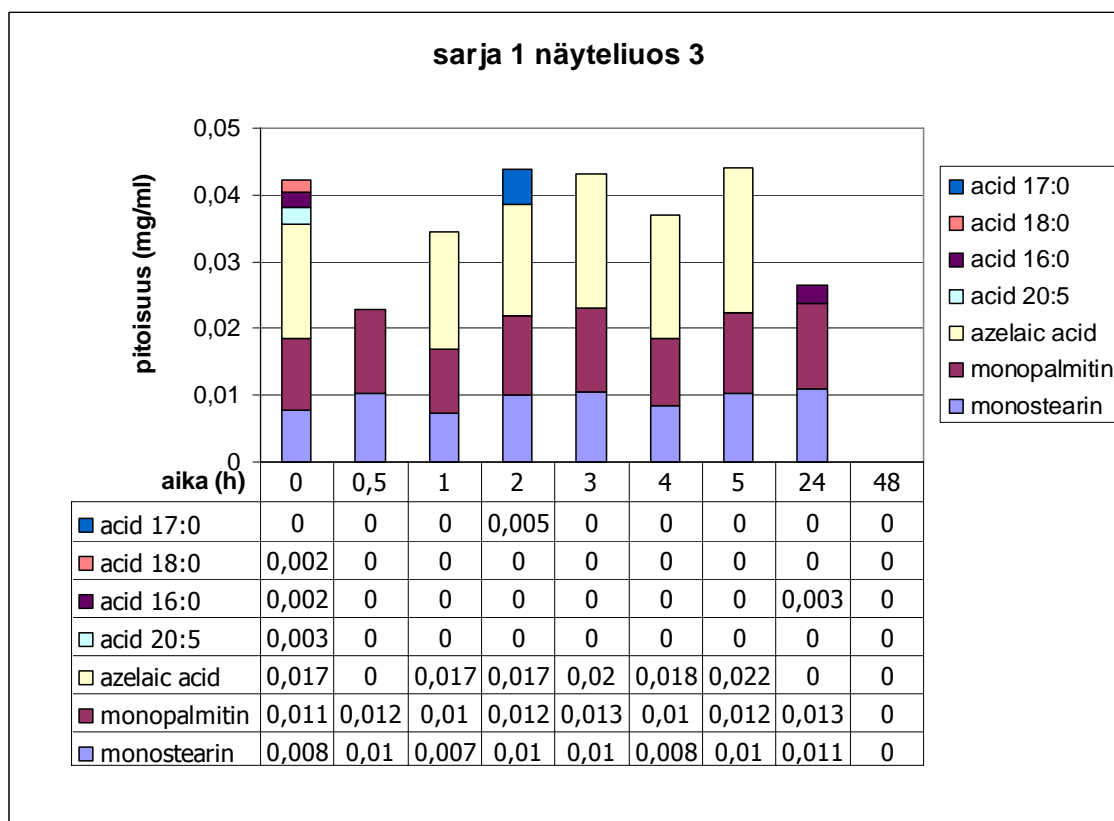
aika [h]	vanilliinihappopitoisuus [mg/ml]
0	0,02
0,5	0,01
1	0,01
3	0,01
5	0
24	0
48	0

Taulukko 3. Sarjan 7 näyteliuosten vanilliinipitoisuudet eri ajan hetkinä. Näytteenä on vakio lakkaasipitoisuudella (3 til-%) ja eri mediaattorikonsentraatioilla käsitelty kuusiute. Näyteliuos 1 ABTS-konsentraatio on 0,05 mmol/l, näyteliuoksen 2 ABTS-konsentraatio on 0,5 mmol/l ja näyteliuoksen 3 ABTS-konsentraatio on noin 10 mmol/l.

aika [h]	vanilliini pitoisuus [mg/ml]		
	näyteliuos 1	näyteliuos 2	näyteliuos 3
0	0,01	0,01	0
0,5	0,01	0,02	0
1	0,02	0,01	0
3	0,02	0,01	0
5	0,02	0,00	0
24	0	0	0
48	0	0	0

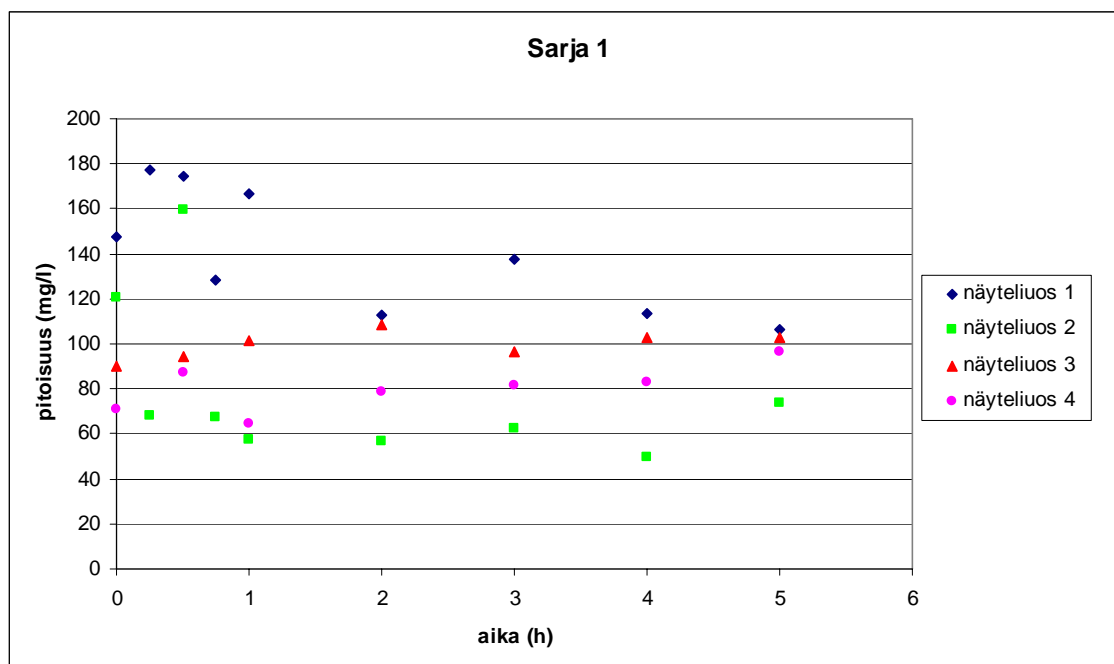


Kuva 1. Sarjan 1 näyteliuoksen 1 rasvahappopitoisuudet ja rasvahappojen hapetustuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute, jota ei ole lakkauskäsittely (referenssiluosis).

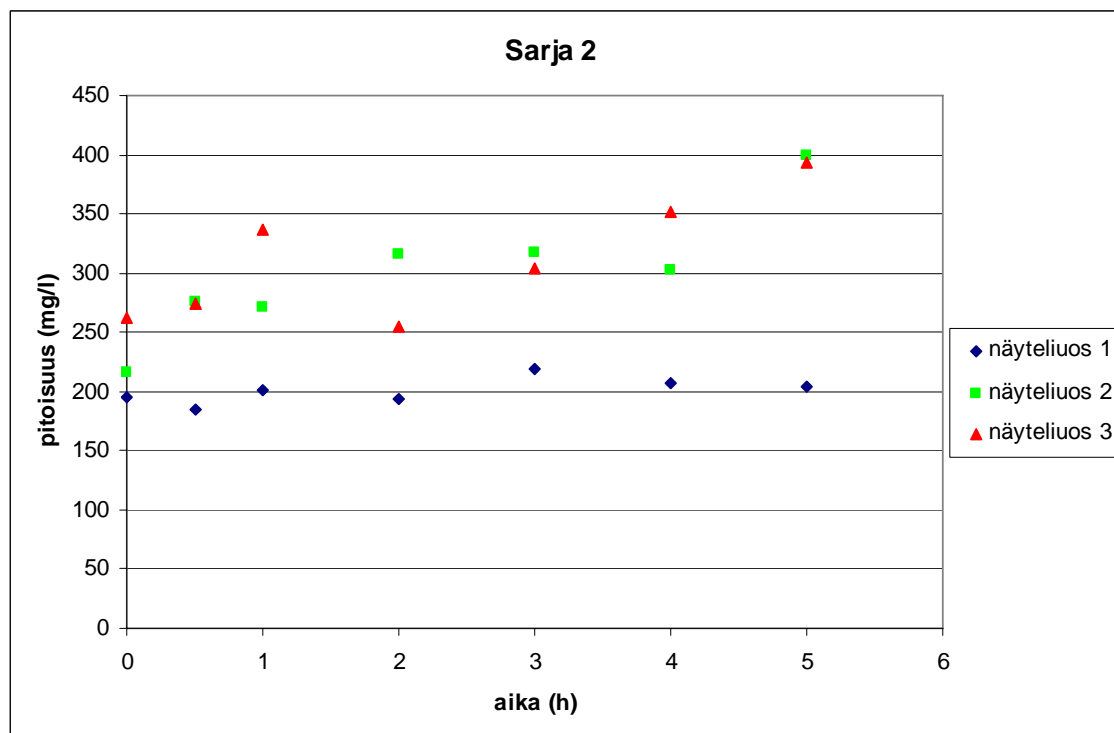


Kuva 2. Sarjan 1 näyteliuoksen 3 rasvahappopitoisuudet ja rasvahappojen hapetustuotteiden pitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-uutettu koivu-uute, johon on lisätty 3 til-% lakkaasia.

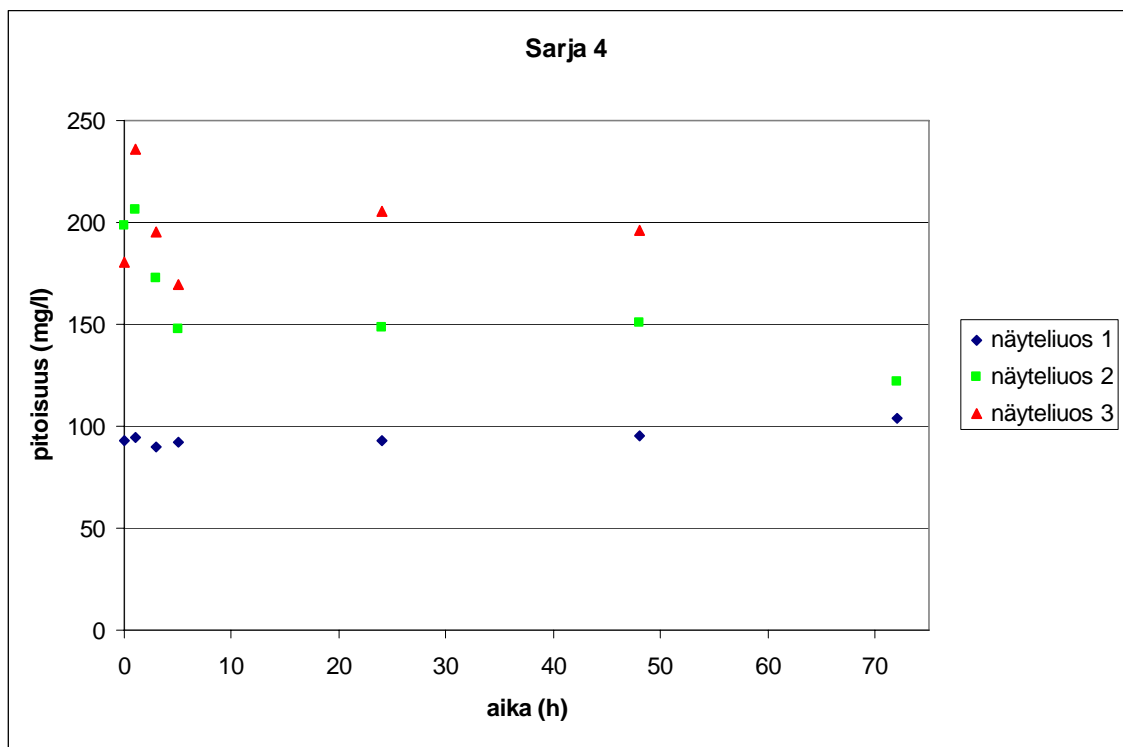
Liunneen ligniinin pitoisuudet eri näytesarjoilla



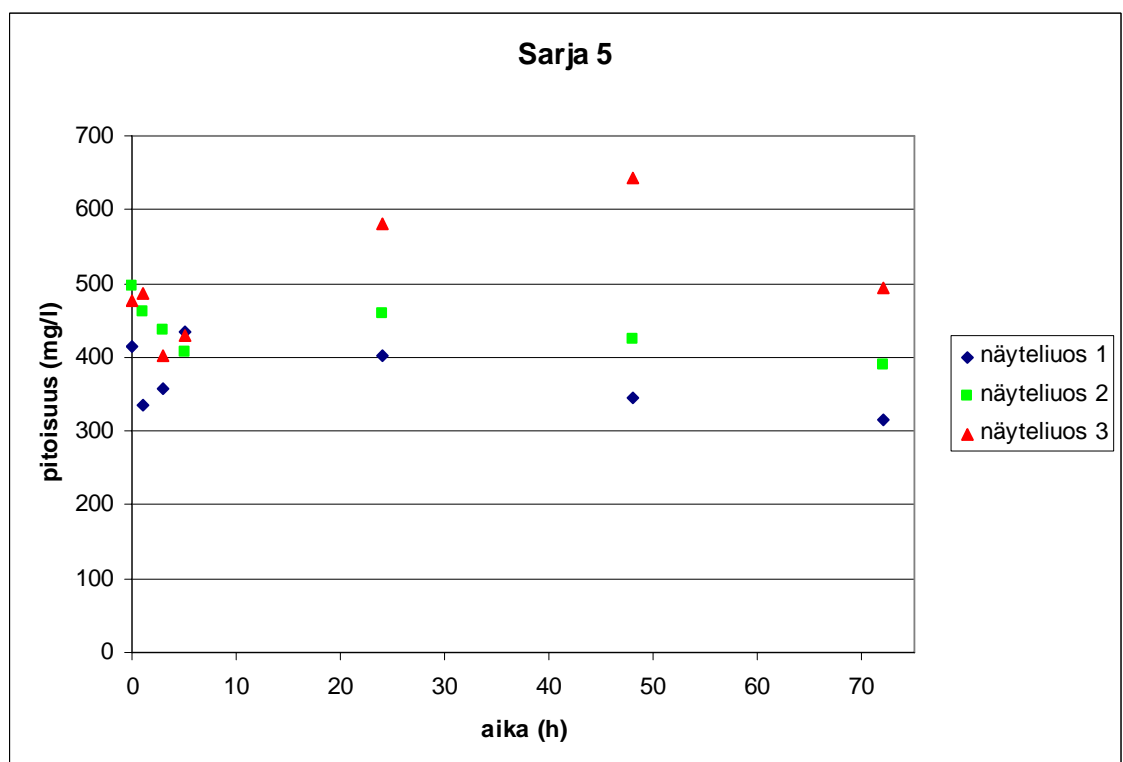
Kuva 1. Sarjan 1 vapaan ligniinin pitoisuudet aikavälillä 0–5 tuntia. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu.



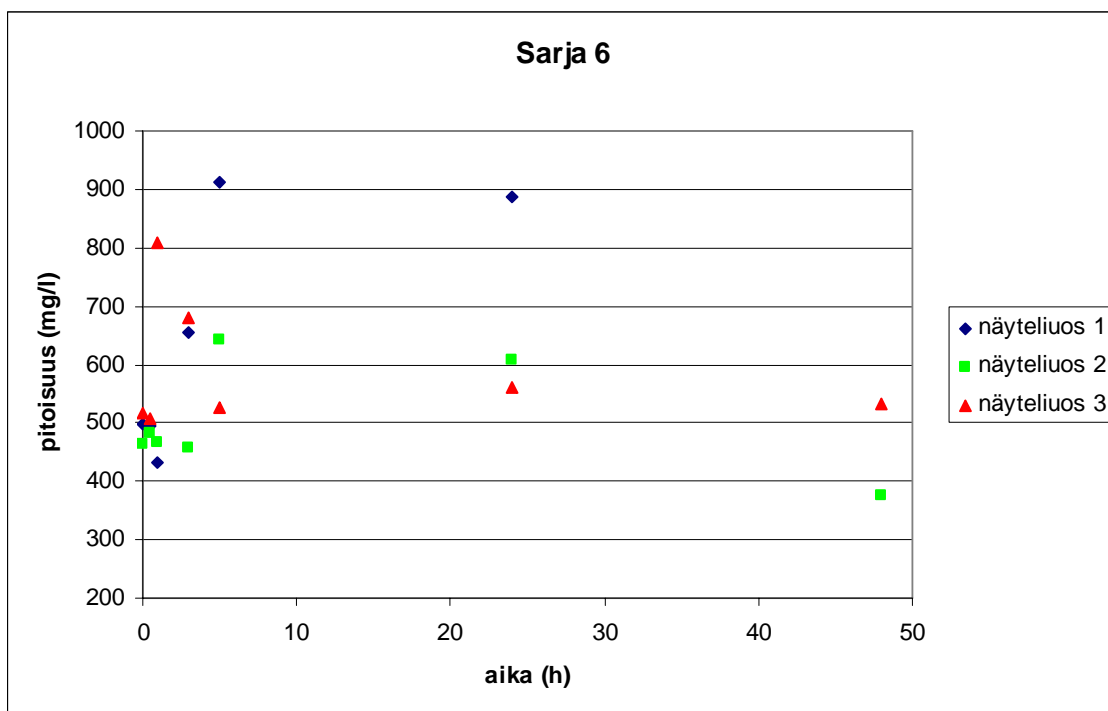
Kuva 2. Sarjan 2 vapaan ligniinin pitoisuudet aikavälillä 0–5 tuntia. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu.



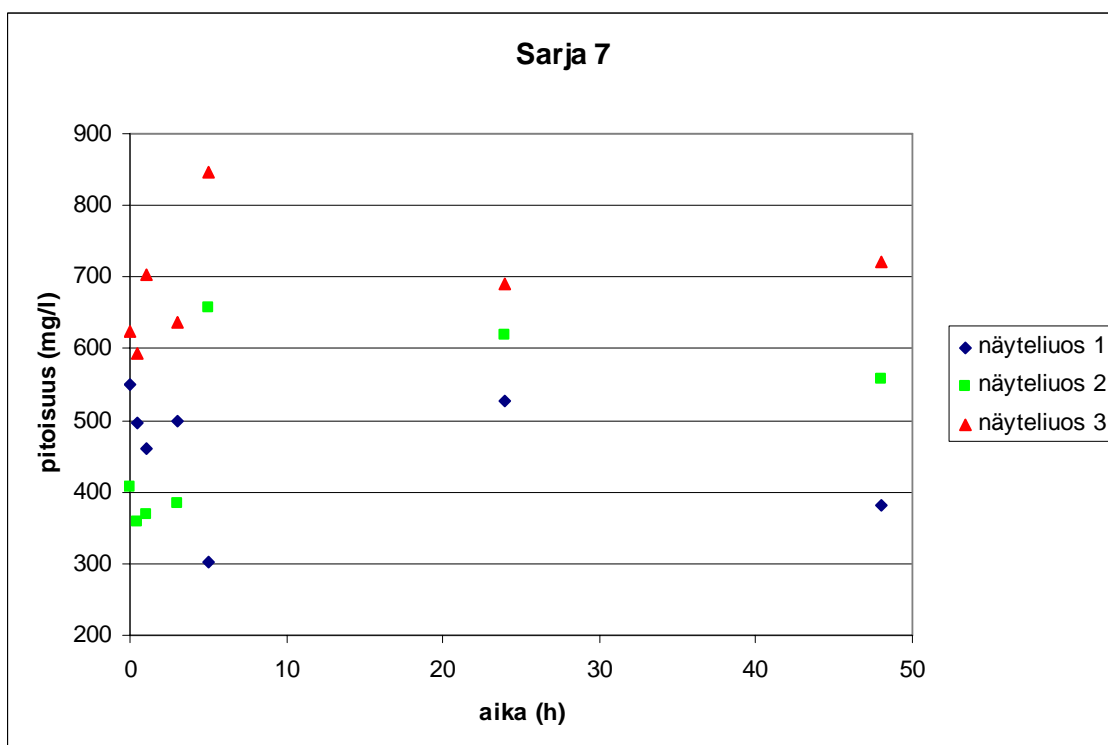
Kuva 3. Sarjan 4 vapaan ligniinin pitoisuudet aikavälillä 0–72 tuntia. Näytteenä on kuivattu PHWE-utettu koivu.



Kuva 4. Sarjan 5 vapaan ligniinin pitoisuudet aikavälillä 0–72 tuntia. Näytteenä on PHWE-utettu kuusi.

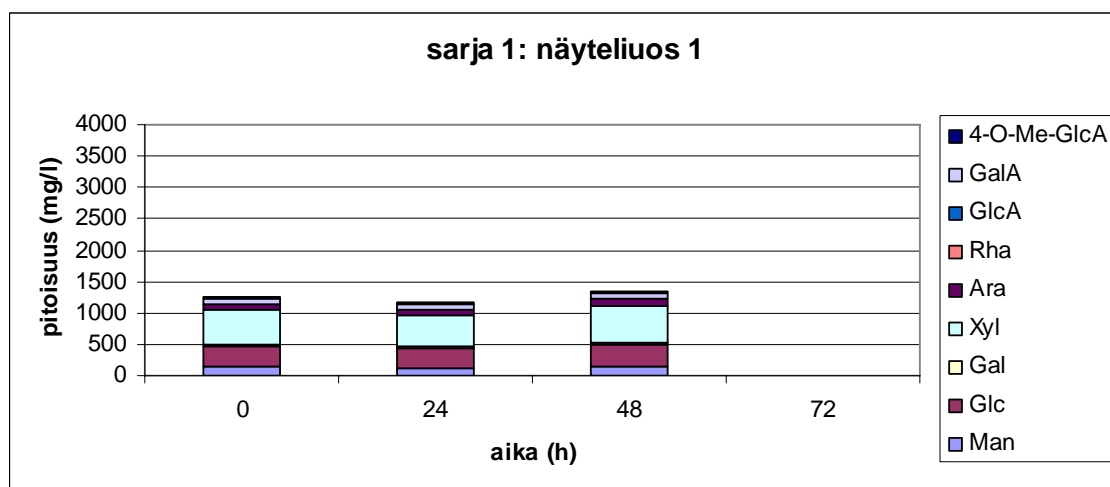


Kuva 5. Sarjan 6 vapaan ligniinin pitoisuudet aikavälillä 0–48 tuntia. Näytteenä on PHWE-
uutettu kuusi, jota on käsitelty 1-HBT:lla ja lakkaasilla.

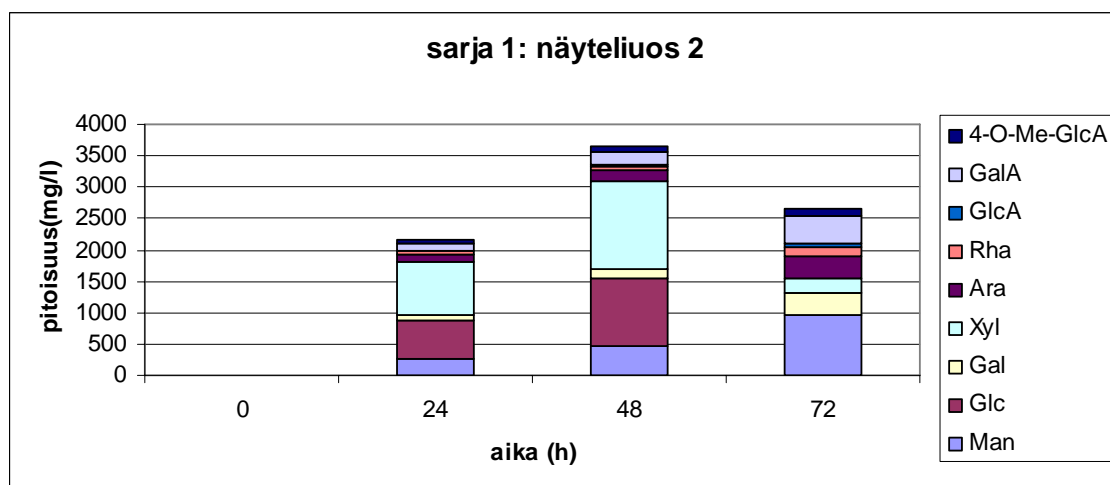


Kuva 7. Sarjan 7 vapaan ligniinin pitoisuudet aikavälillä 0–48 tuntia. Näytteenä on PHWE-
uutettu kuusi, jota on käsitelty ABTS:lla ja lakkaasilla.

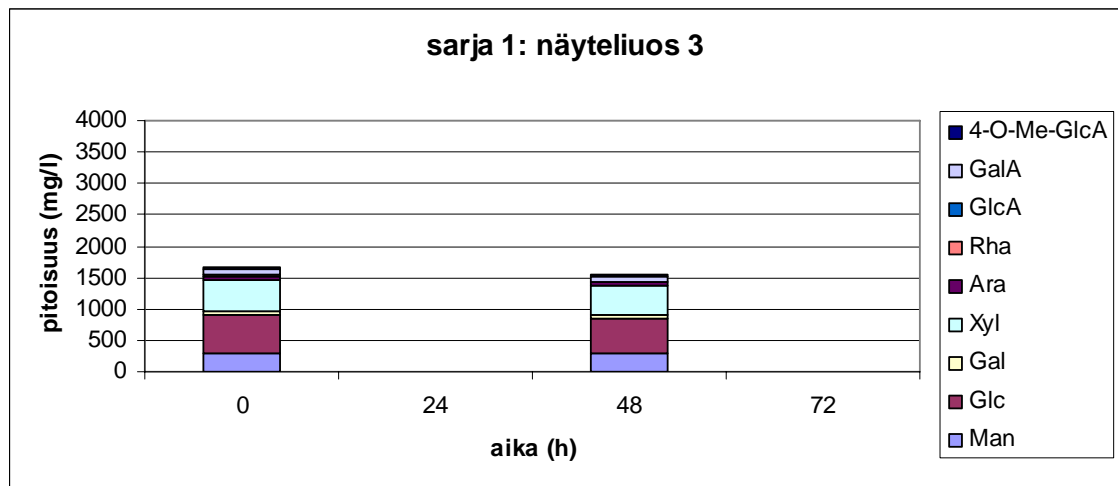
Kokonaissokeripitoisuudet eri näyteliuoksissa



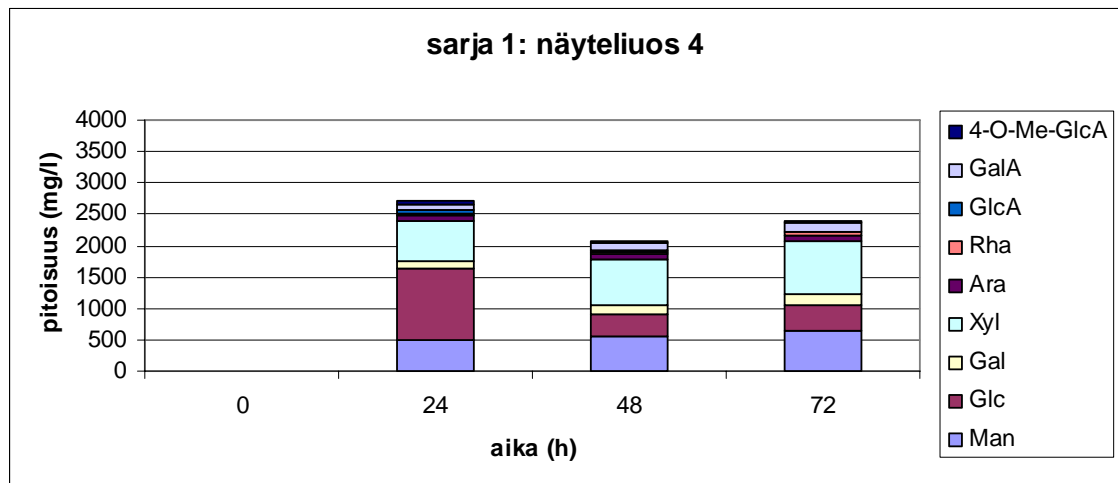
Kuva 1. Sarjan 1 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssiluos, johon ei ole lisätty lakkaasia.



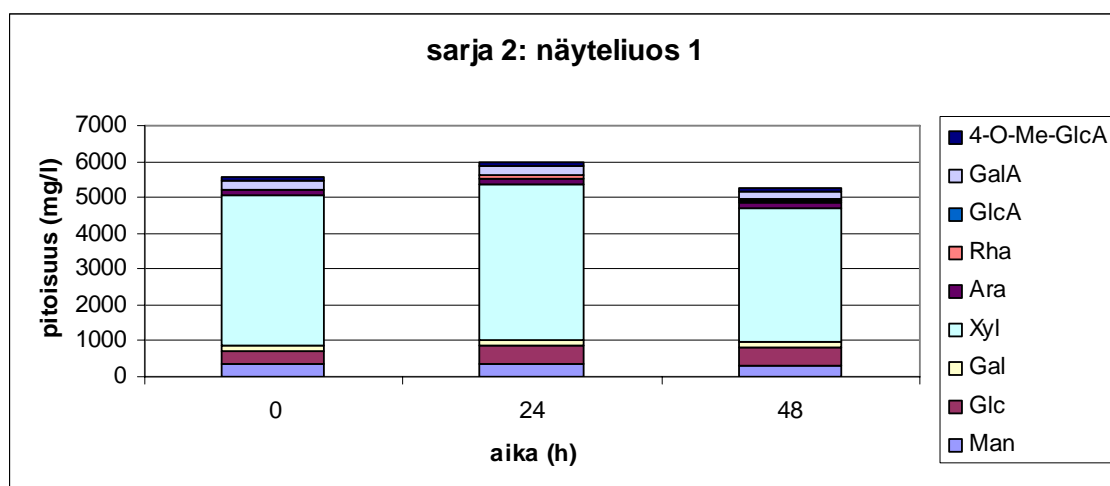
Kuva 2. Sarjan 1 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 1 til-% lakkaasia.



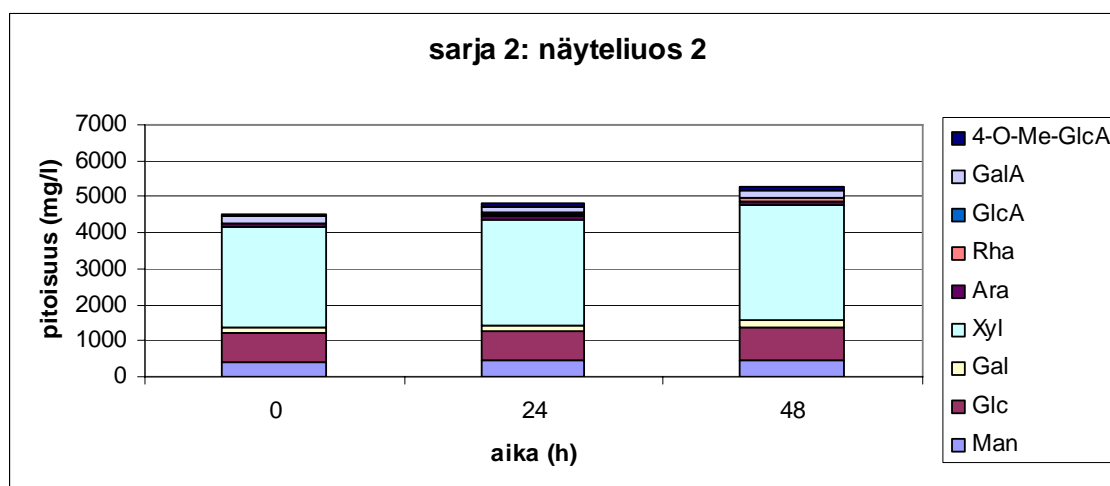
Kuva 3. Sarjan 1 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



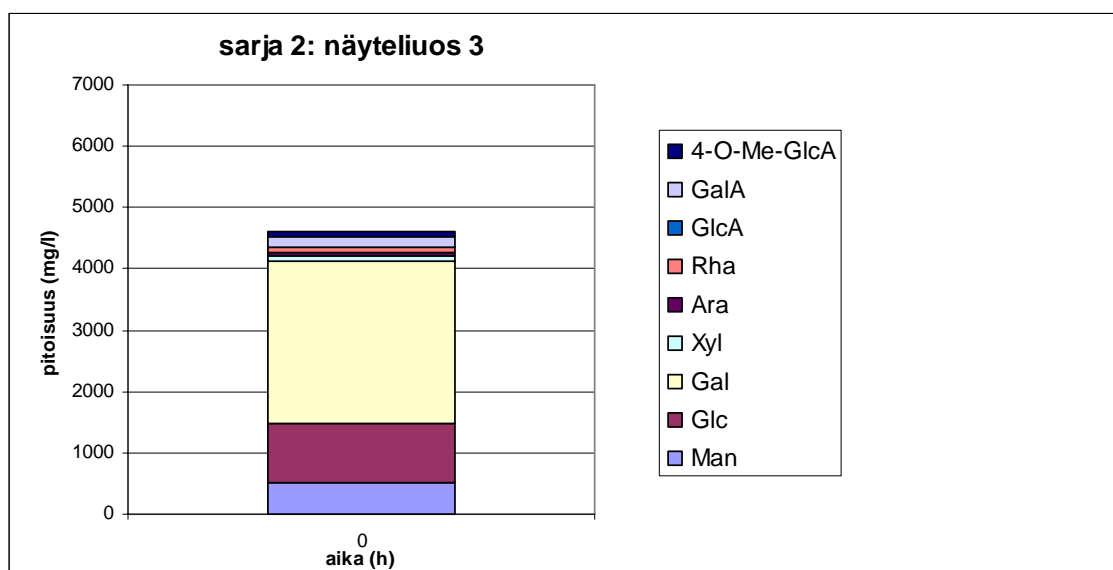
Kuva 4. Sarjan 1 näyteliuoksen 4 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 4 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



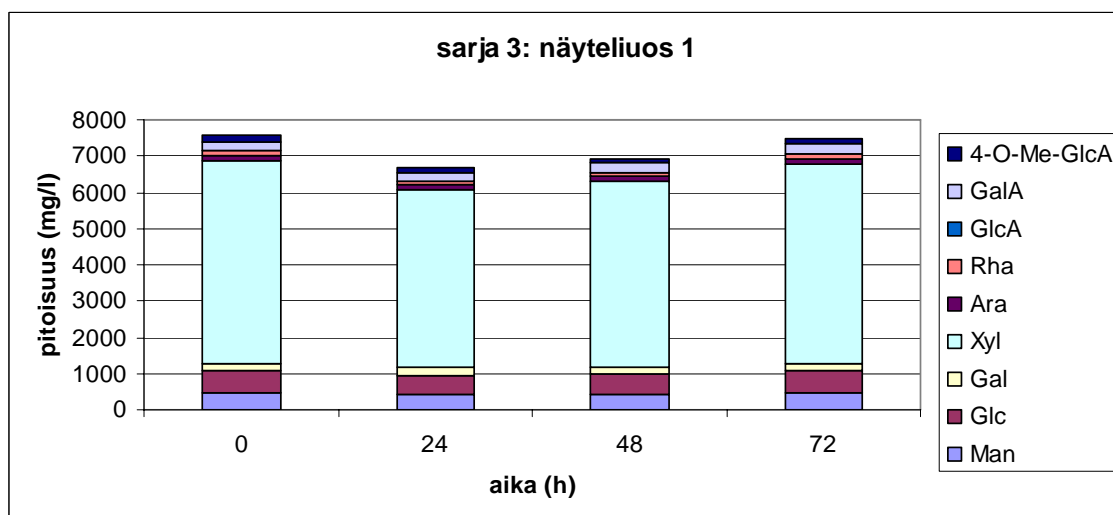
Kuva 5. Sarjan 2 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi, johon ei ole lisätty lakkaasia.



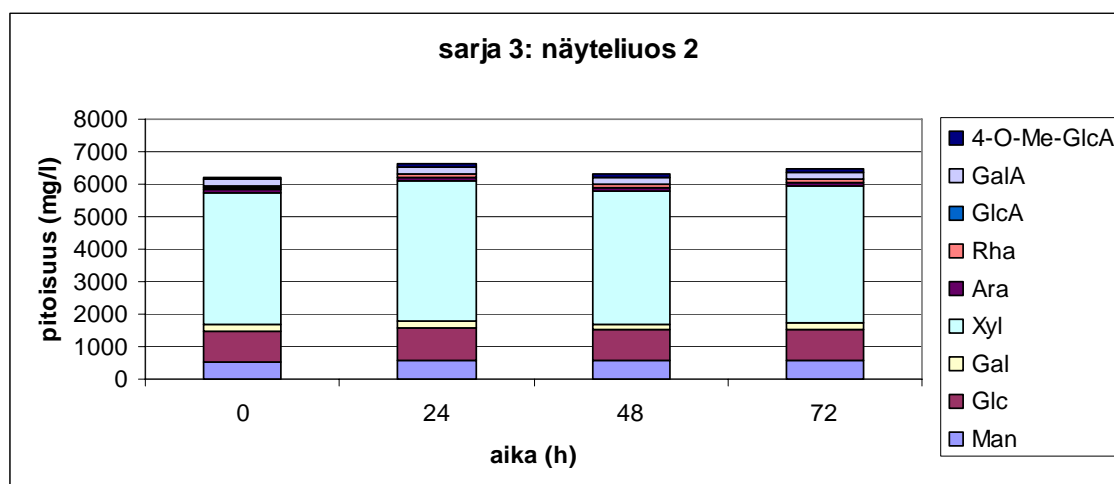
Kuva 6. Sarjan 2 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



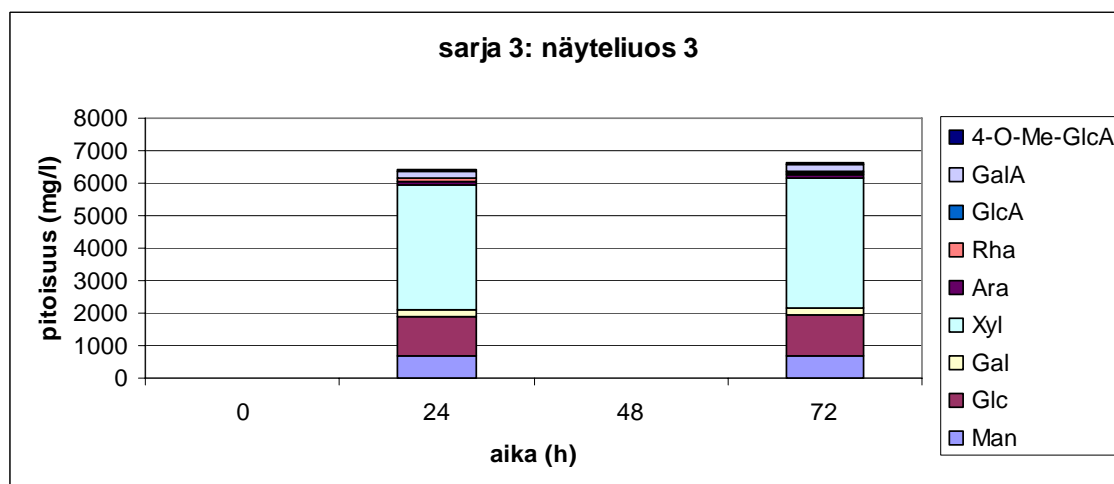
Kuva 7. Sarjan 2 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



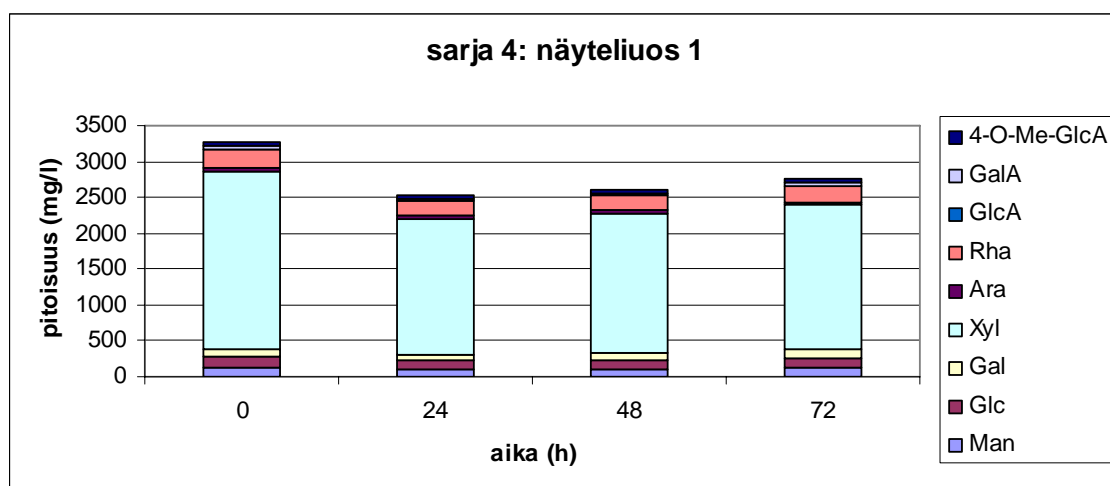
Kuva 8. Sarjan 3 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi, johon ei ole lisätty lakkaasia.



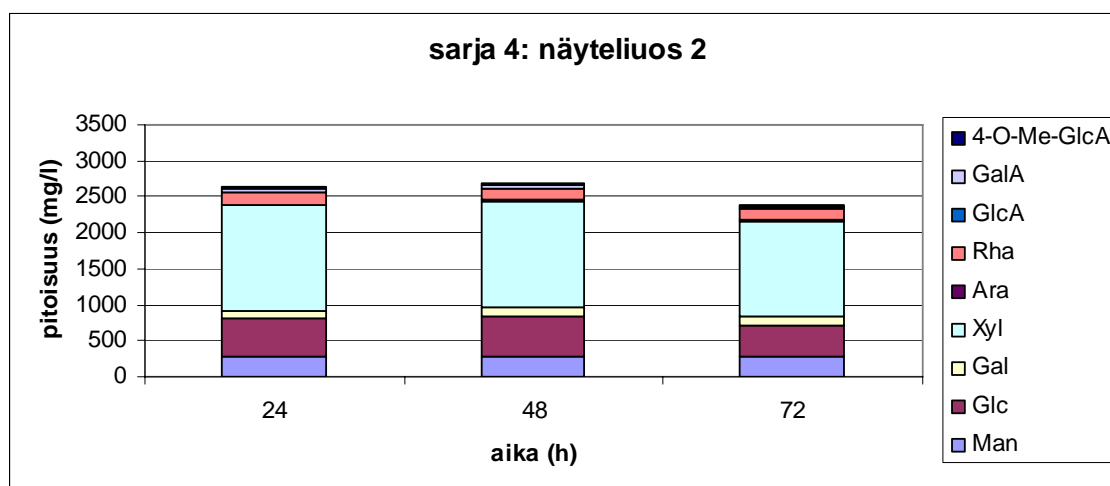
Kuva 9. Sarjan 3 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



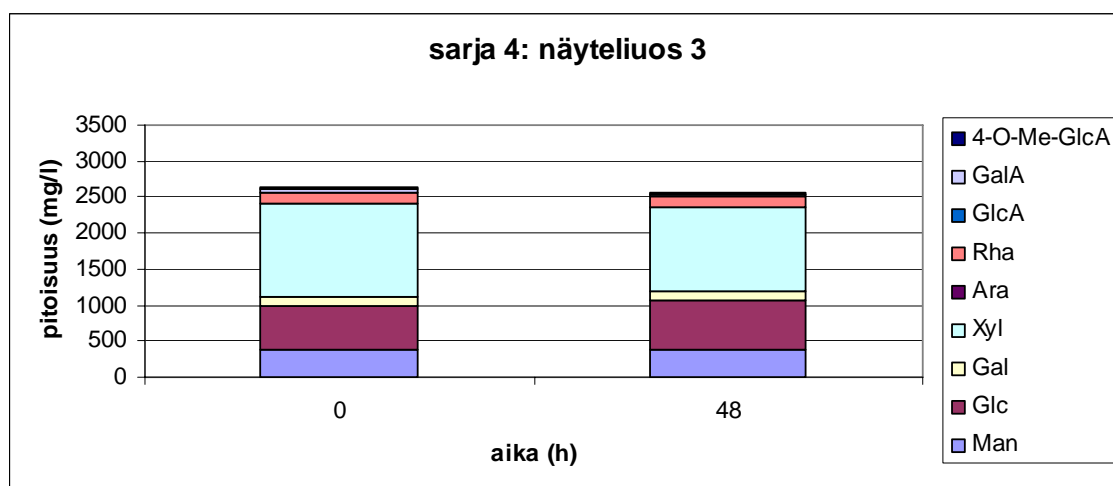
Kuva 10. Sarjan 3 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



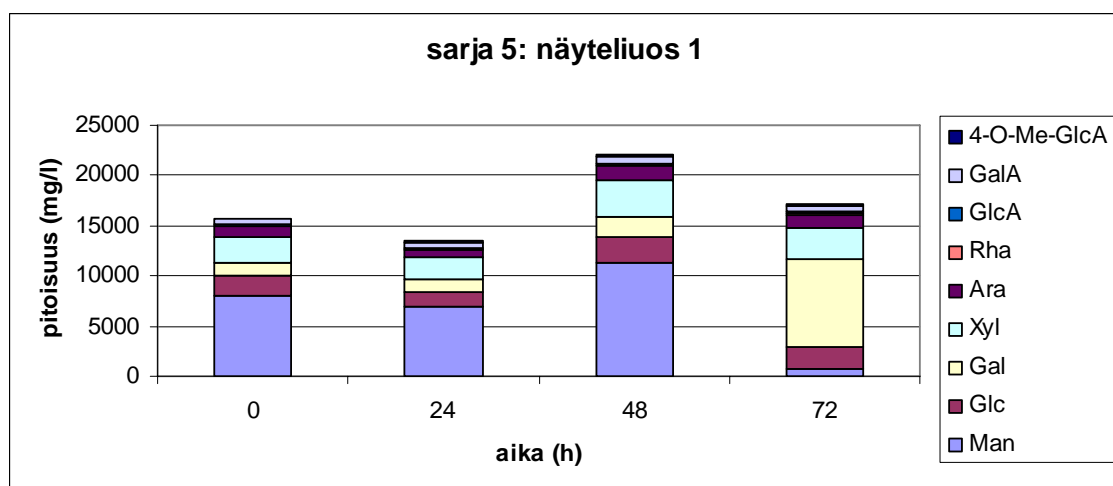
Kuva 11. Sarjan 4 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE- uutettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssiluos, johon ei ole lisätty lakkaasia.



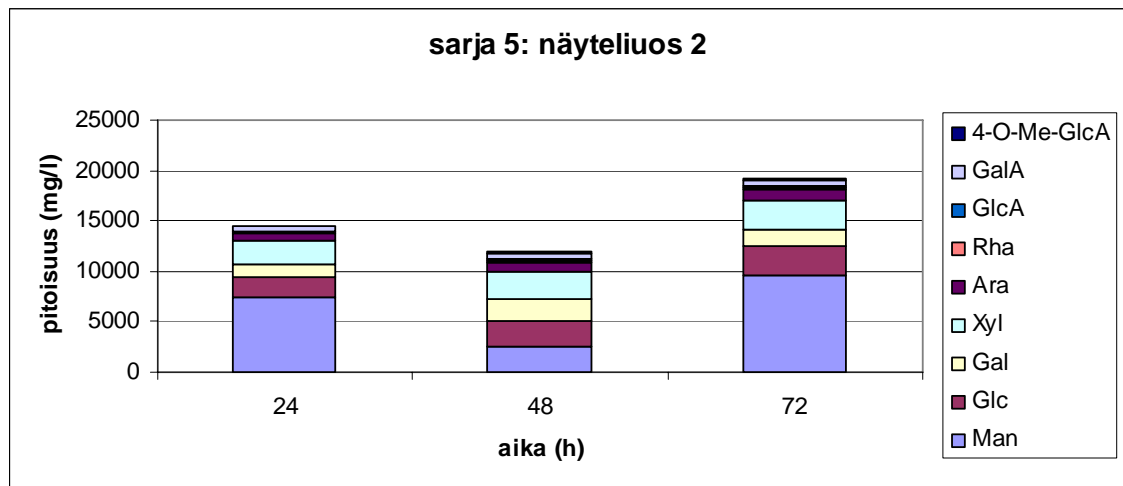
Kuva 12. Sarjan 4 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE- uutettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



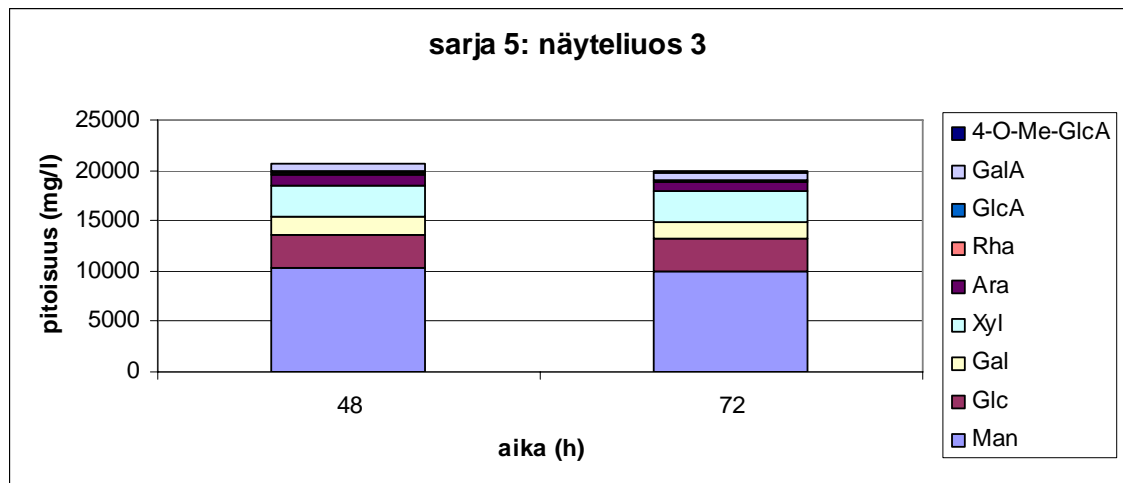
Kuva 13. Sarjan 4 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE- uutettu koivu-uute. Näyteliuokseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



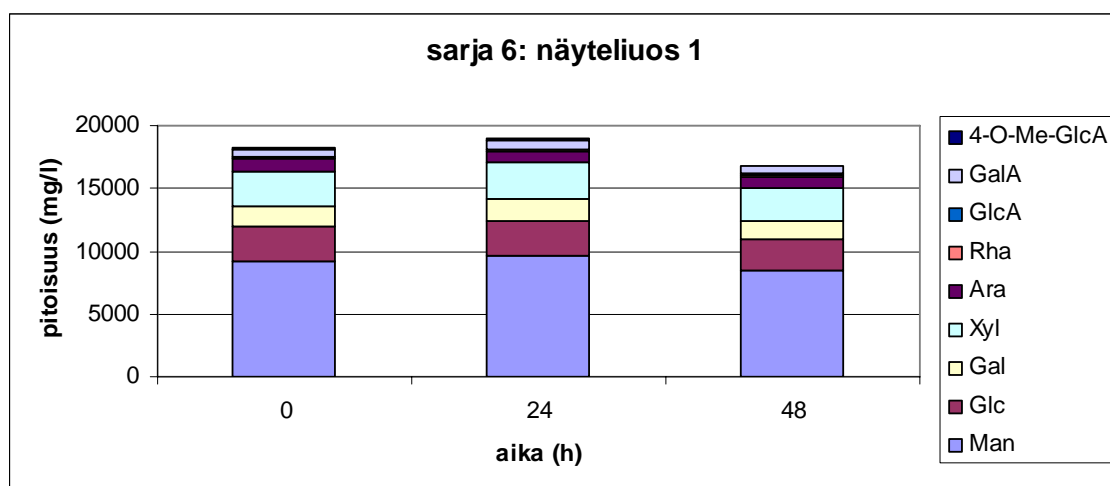
Kuva 14. Sarjan 5 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE- uutettu kuusuute. Näyteliuos 1 on referenssiluos, johon ei ole lisätty lakkaasia. Aja hetkellä 72 tuntia on mannoosipitoisuus laskenut selvästi ja galaktoosipitoisuus kasvanut selvästi tuntemattomista syistä.



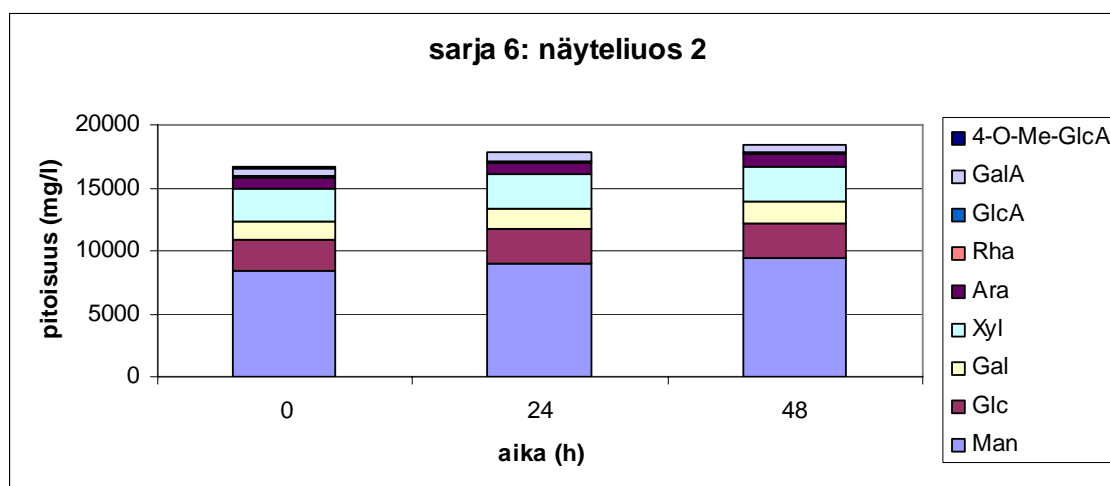
Kuva 15. Sarjan 5 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE-utettu kuusiute. Näyteliukseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



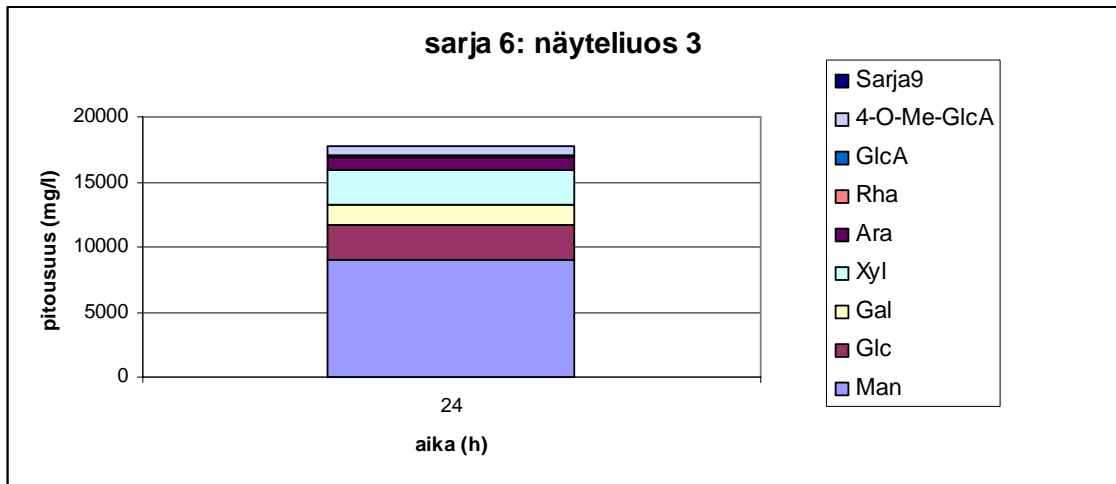
Kuva 16. Sarjan 5 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE-utettu kuusiute. Näyteliukseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



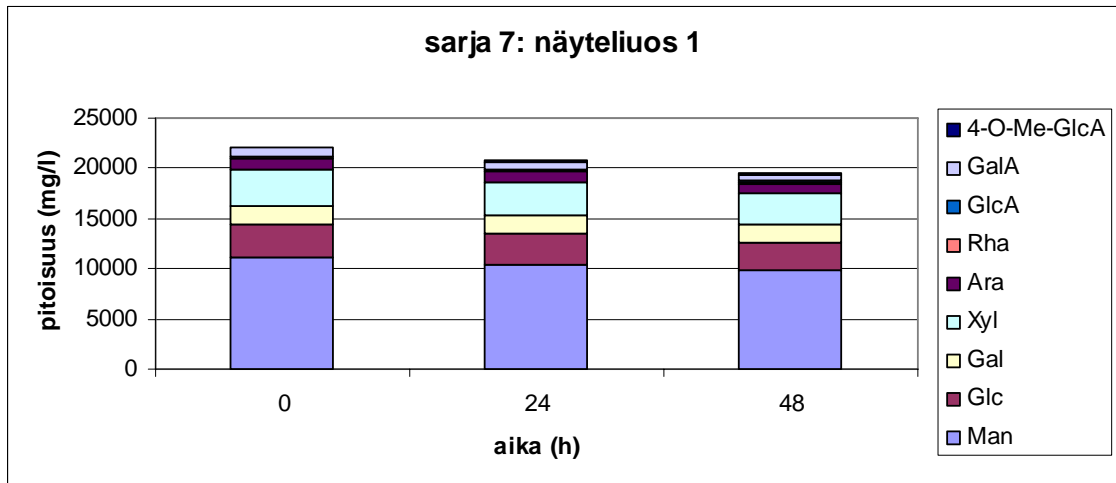
Kuva 17. Sarjan 6 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 0,05 mmol/l.



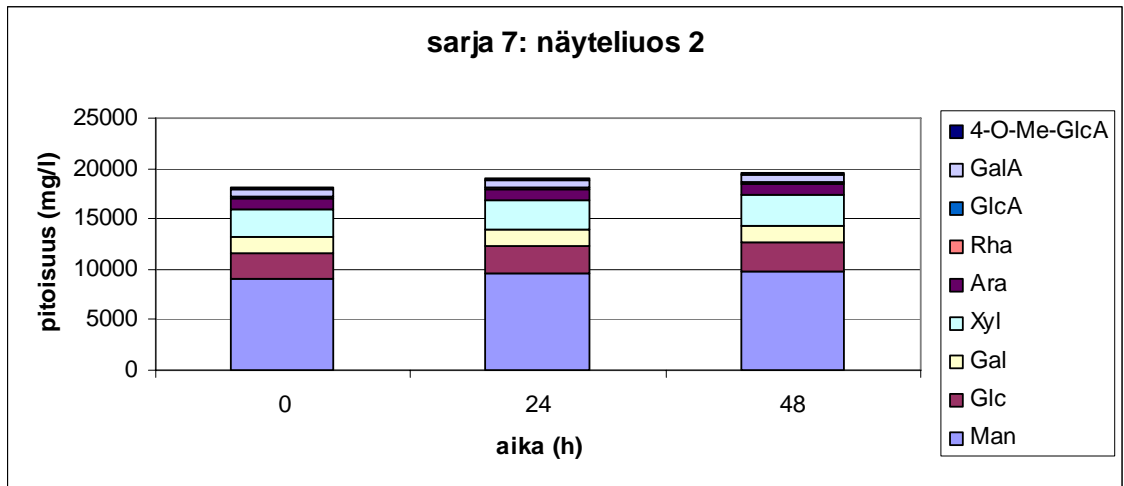
Kuva 18. Sarjan 6 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 0,5 mmol/l.



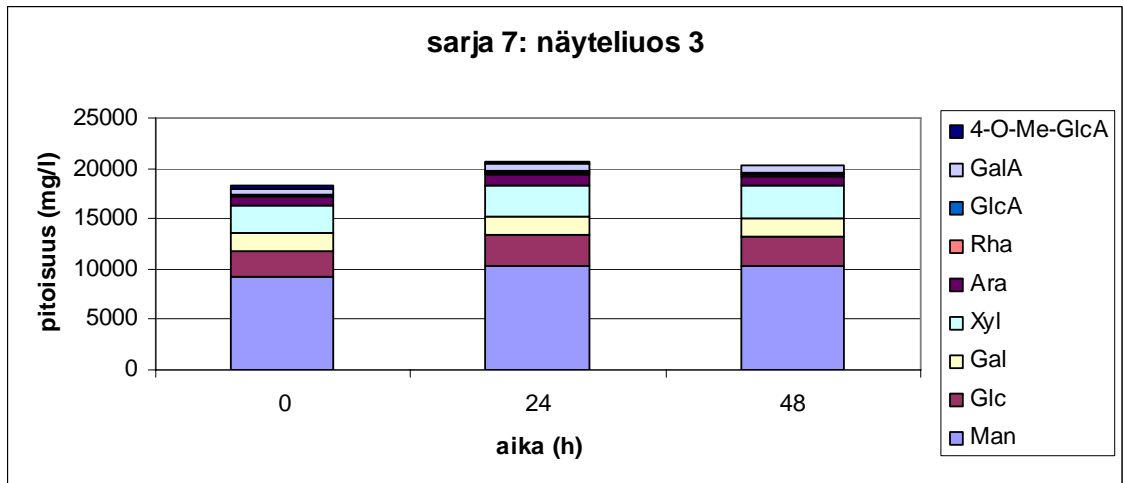
Kuva 19. Sarjan 6 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan hetkellä 24 tuntia. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 10 mmol/l.



Kuva 20. Sarjan 7 näyteliuoksen 1 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 0,05 mmol/l.

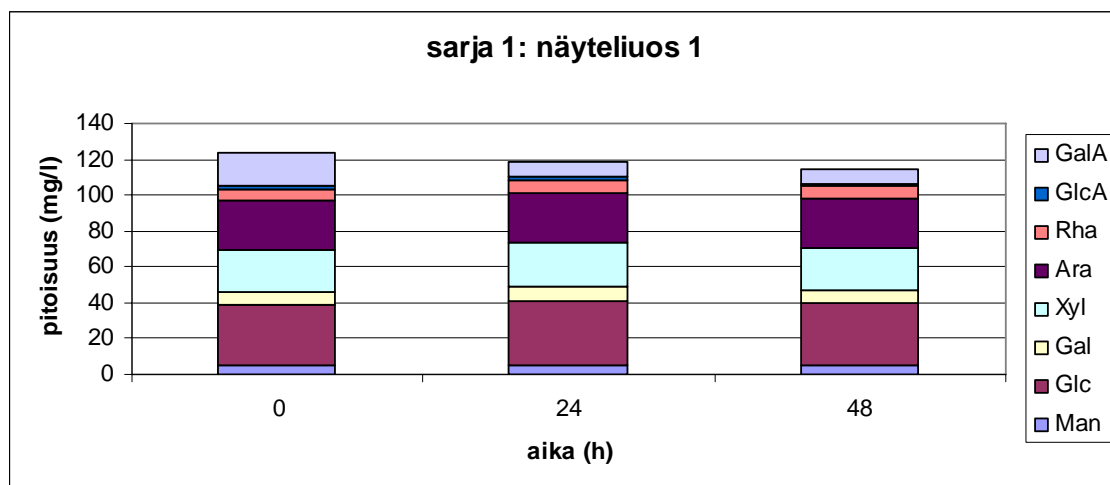


Kuva 21. Sarjan 7 näyteliuoksen 2 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 0,5 mmol/l.

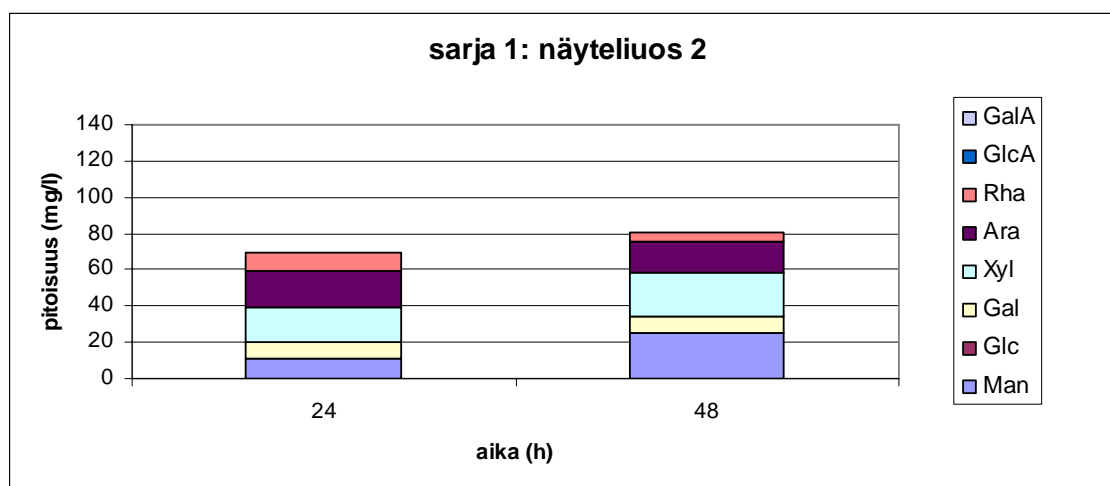


Kuva 22. Sarjan 7 näyteliuoksen 3 kokonaissokeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 10 mmol/l.

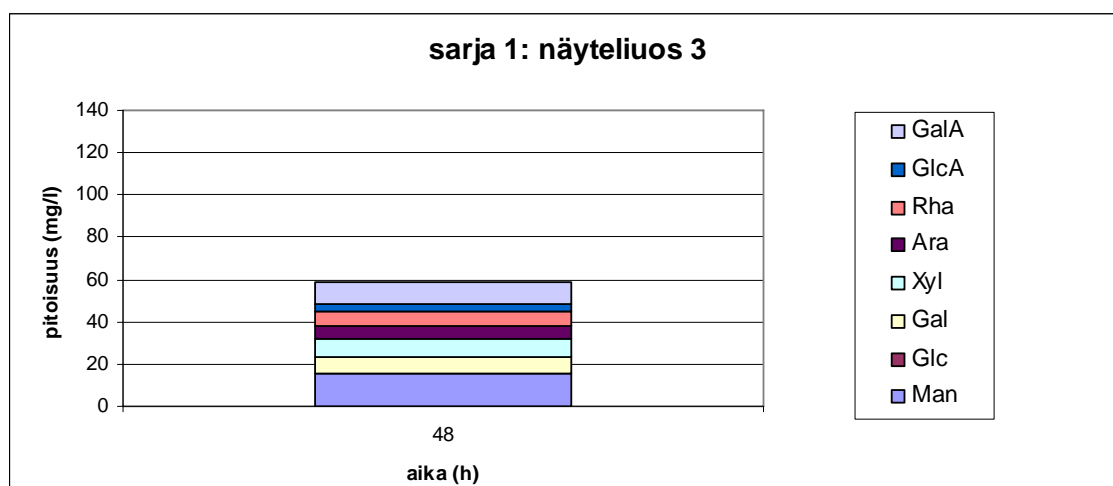
Sokerimonomeerien pitoisuudet eri näytesarjoissa



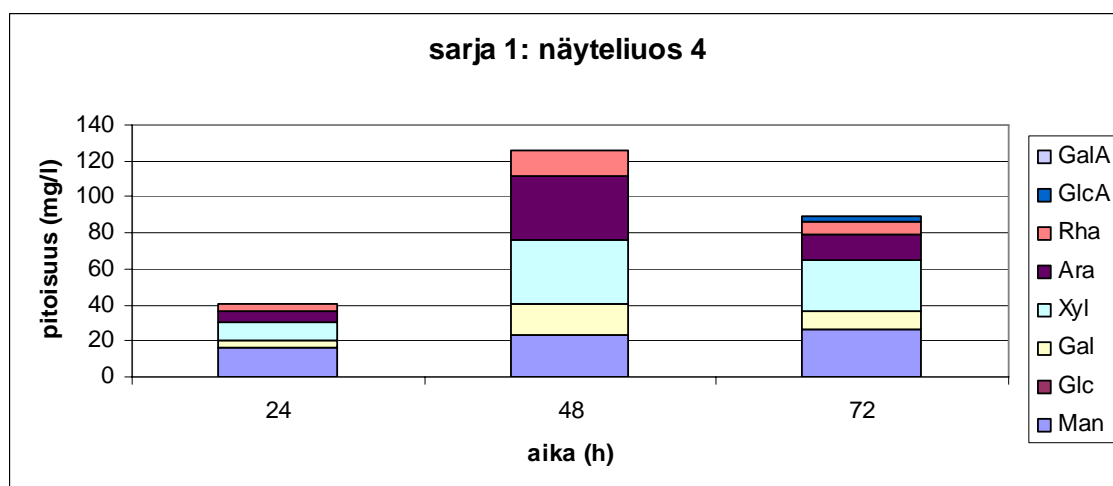
Kuva 1. Sarjan 1 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssiluos, johon ei ole lisätty lakkaasia.



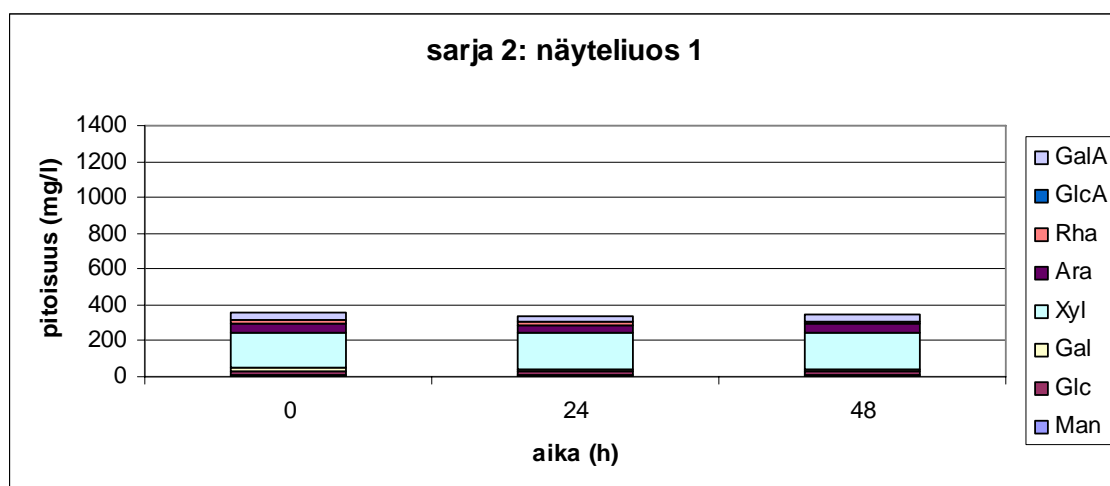
Kuva 2. Sarjan 1 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 1 til-% lakkaasia.



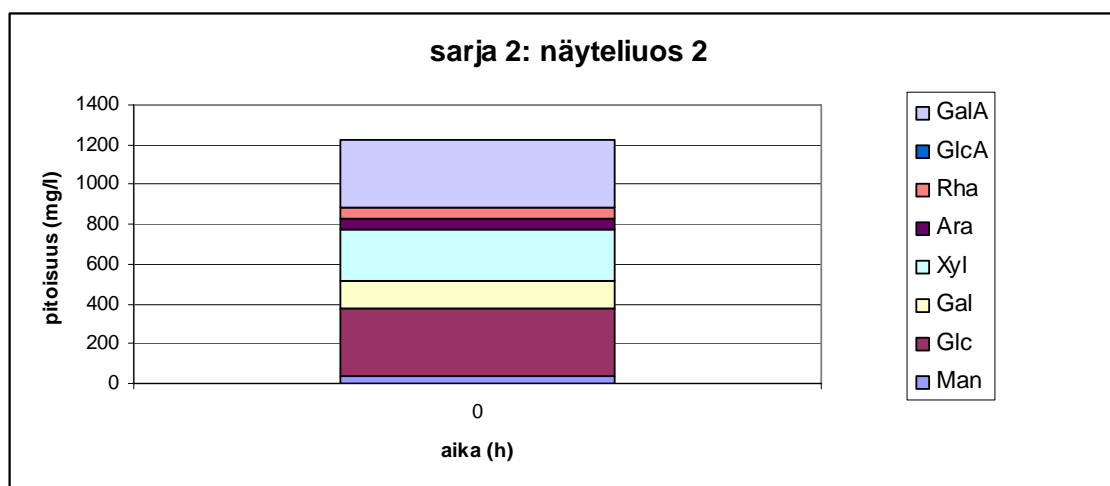
Kuva 3. Sarjan 1 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-uutettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



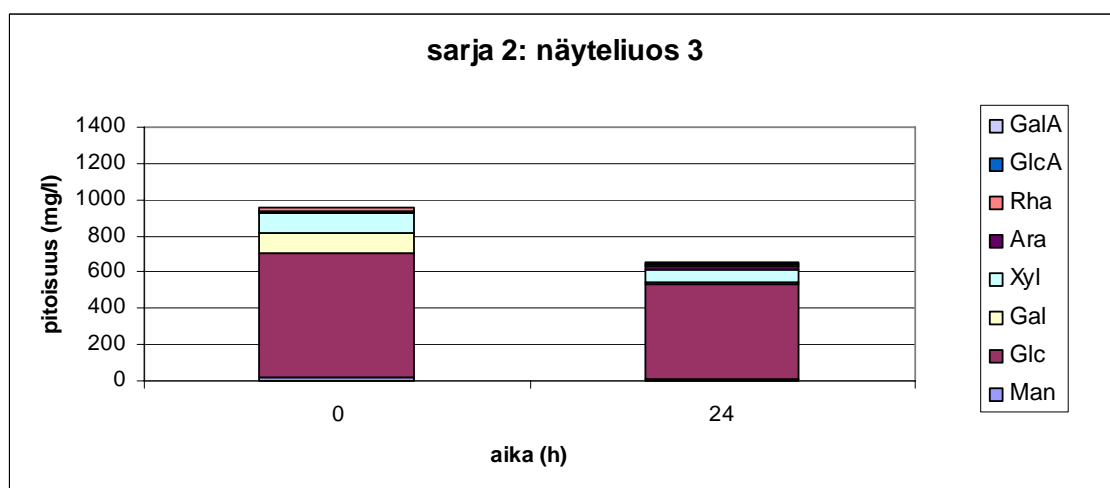
Kuva 4. Sarjan 1 näyteliuoksen 4 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 160 °C:ssa PHWE-uutettu koivu-uute. Näyteliuokseen 4 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



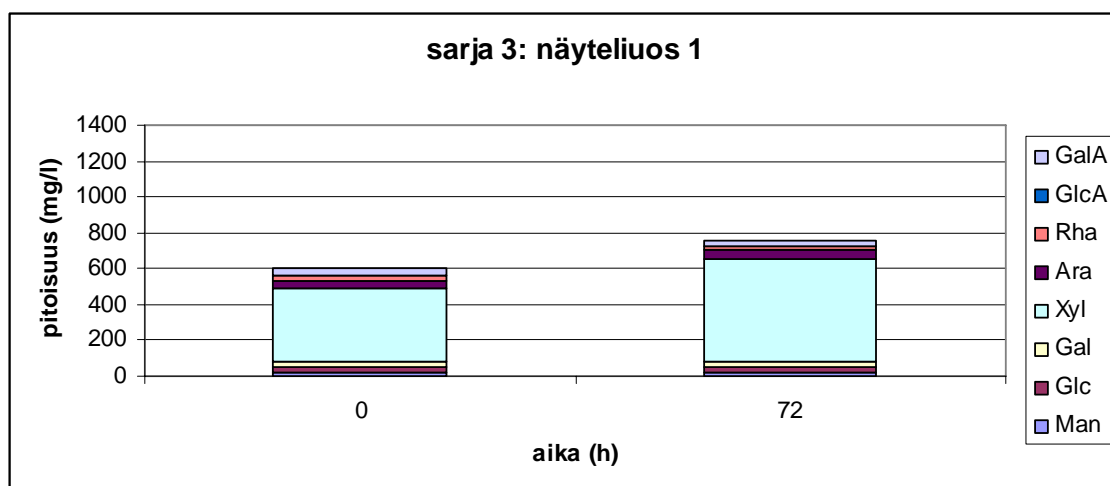
Kuva 5. Sarjan 2 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi, johon ei ole lisätty lakkaasia.



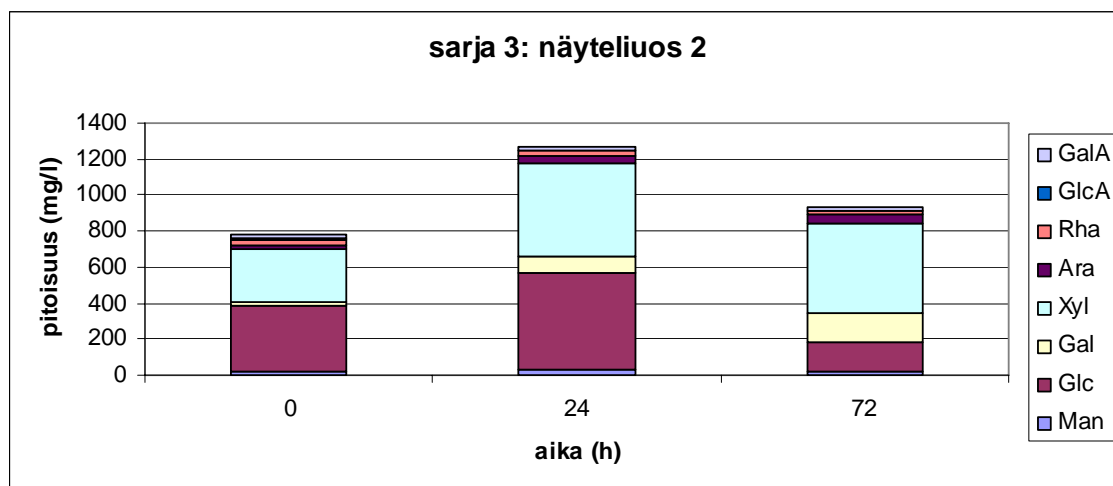
Kuva 6. Sarjan 2 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



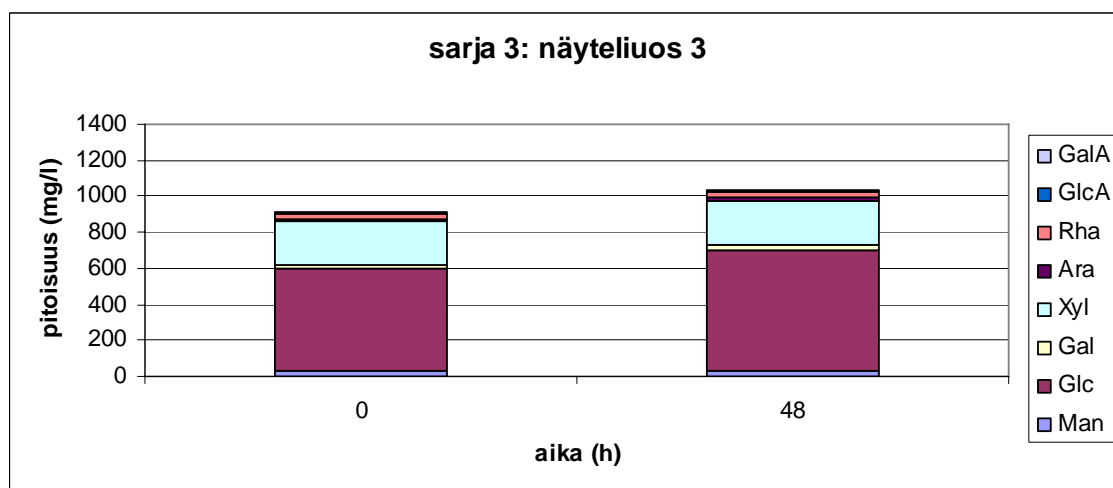
Kuva 7. Sarjan 2 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 170 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



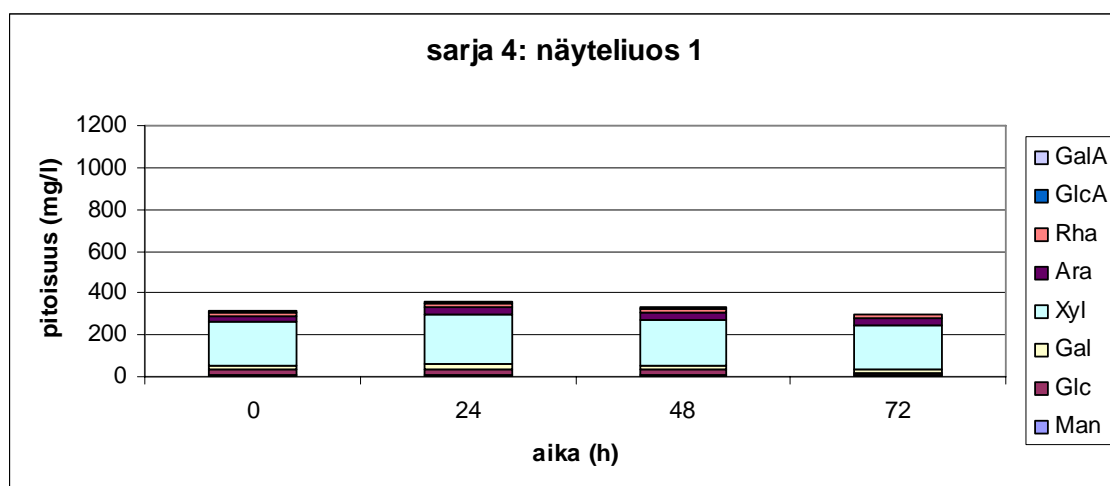
Kuva 8. Sarjan 3 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssi, johon ei ole lisätty lakkaasia.



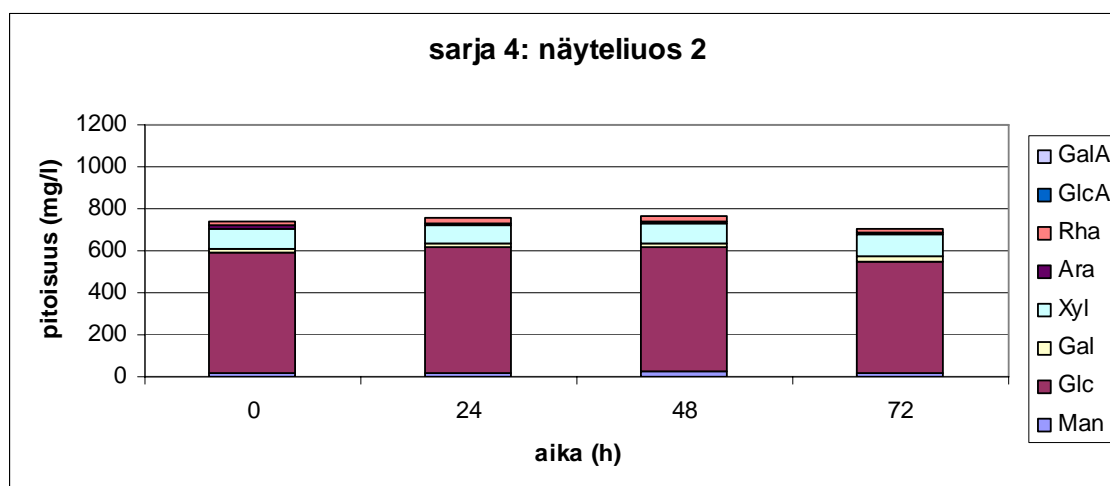
Kuva 9. Sarjan 3 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia. Tässä näytesarjassa on havaittavissa galaktoosin pitoisuuden kasvua ja galakturonihapon pitoisuuden laskua. Oletettavasti galakturonihappo on pilkkoutunut.



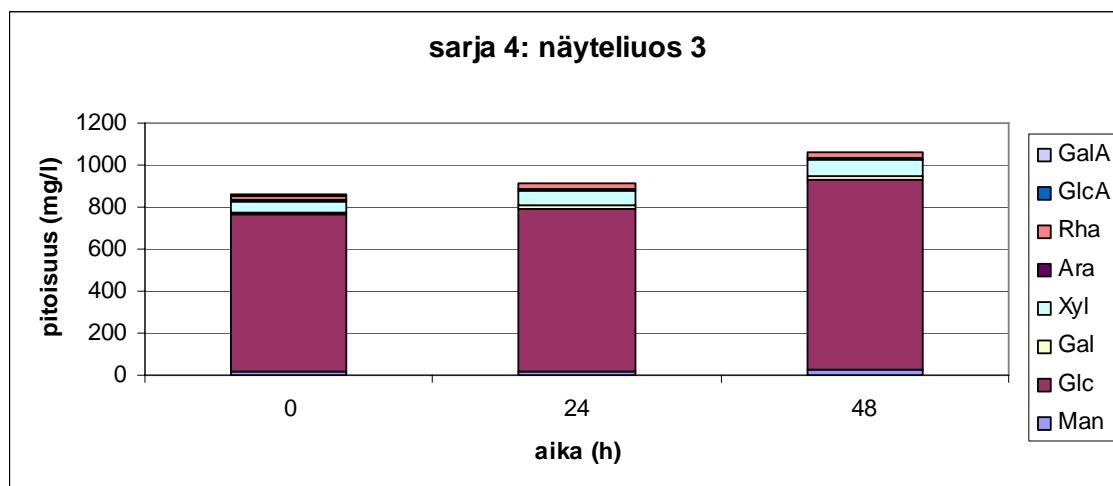
Kuva 10. Sarjan 3 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on 180 °C:ssa PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



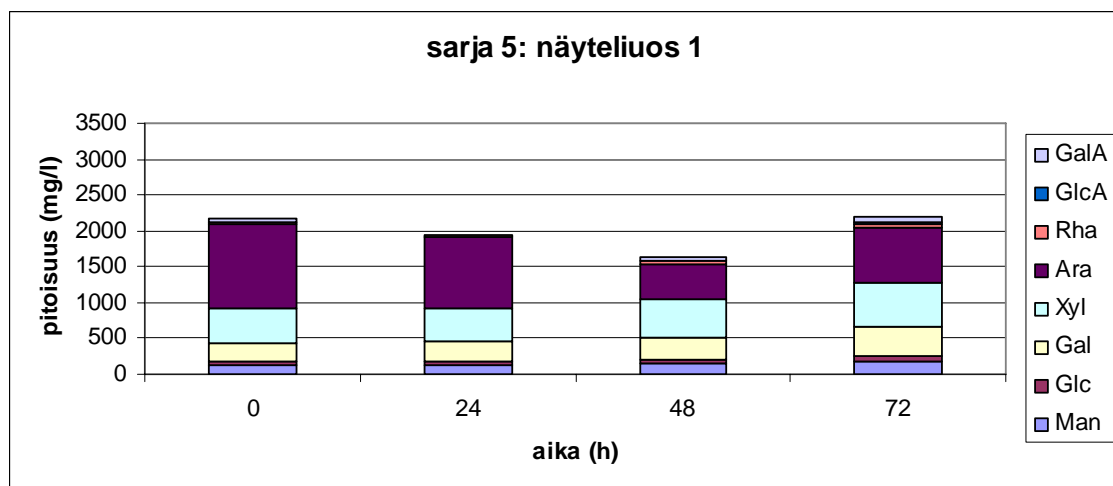
Kuva 11. Sarjan 4 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE-uutettu koivu-uute. Näyteliuos 1 on referenssiluos, johon ei ole lisätty lakkaasia.



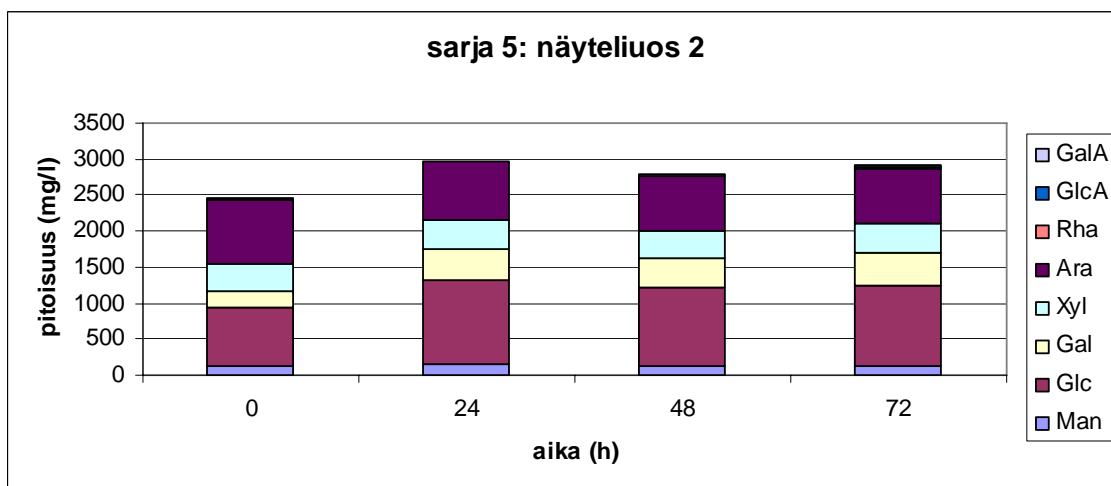
Kuva 12. Sarjan 4 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE-uutettu koivu-uute. Näyteliuokseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



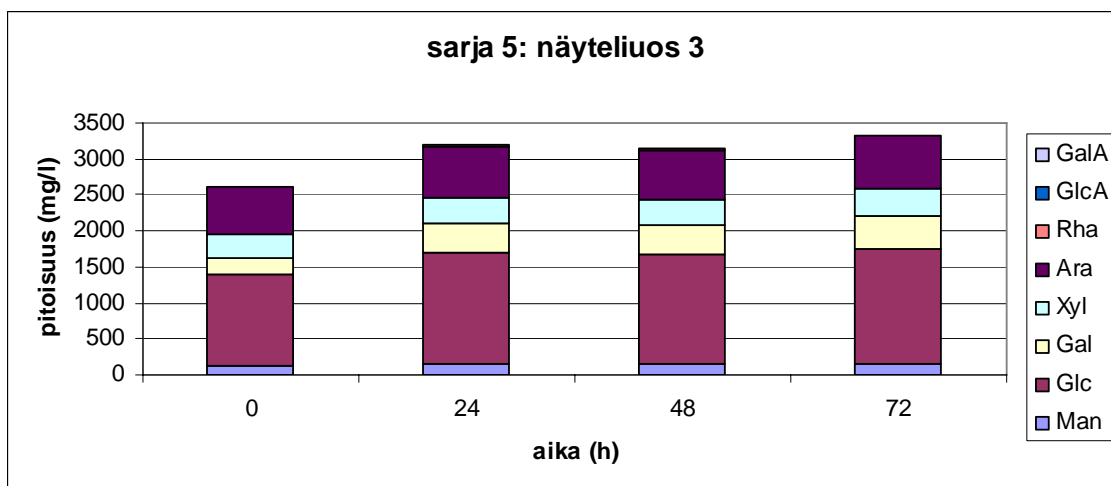
Kuva 13. Sarjan 4 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on kuivattu PHWE-utettu koivu-uute. Näyteliuokseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



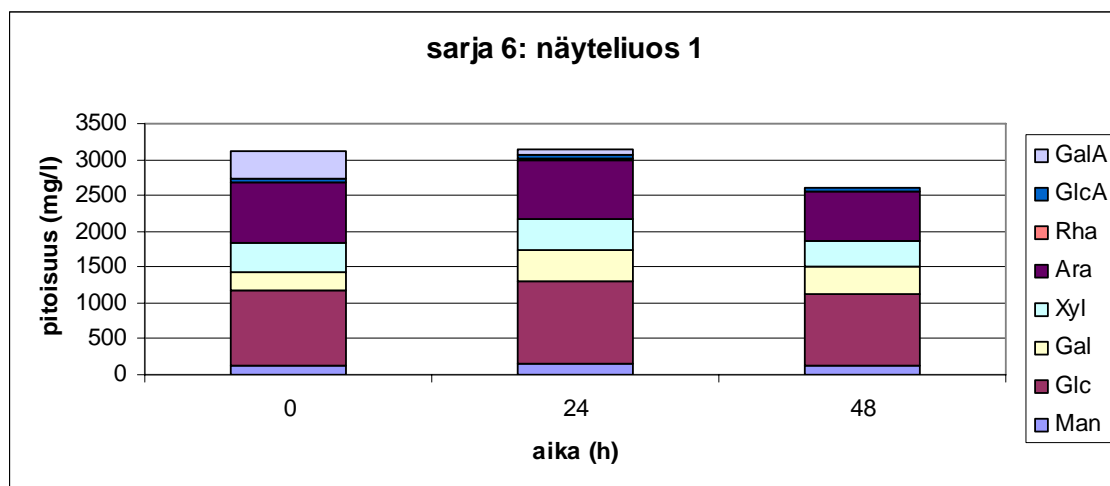
Kuva 14. Sarjan 5 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE-utettu kuusuute. Näyteliuos 1 on referenssiluos, johon ei ole lisätty lakkaasia.



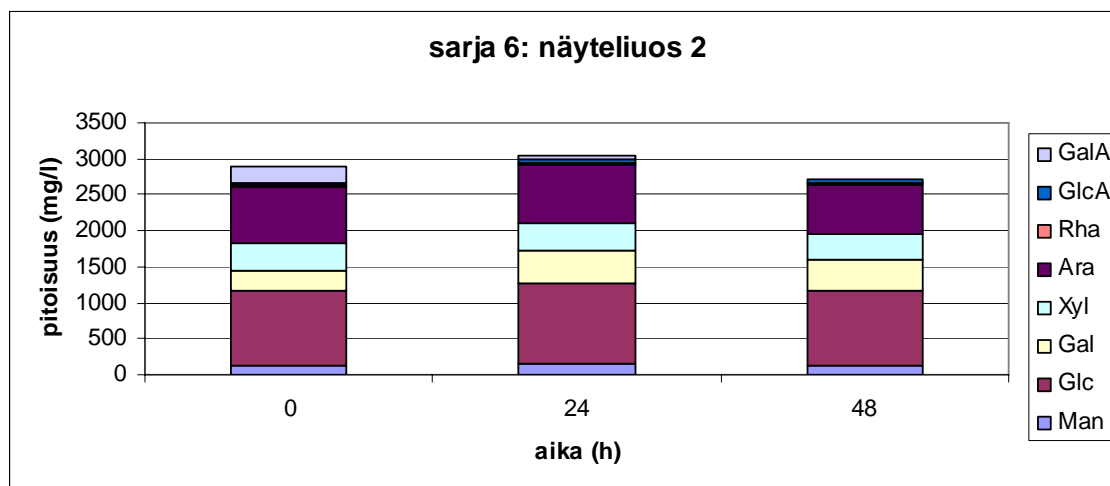
Kuva 15. Sarjan 5 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE-utettu kuusiute. Näyteliukseen 2 on lisätty 3 til-% lakkaasia.



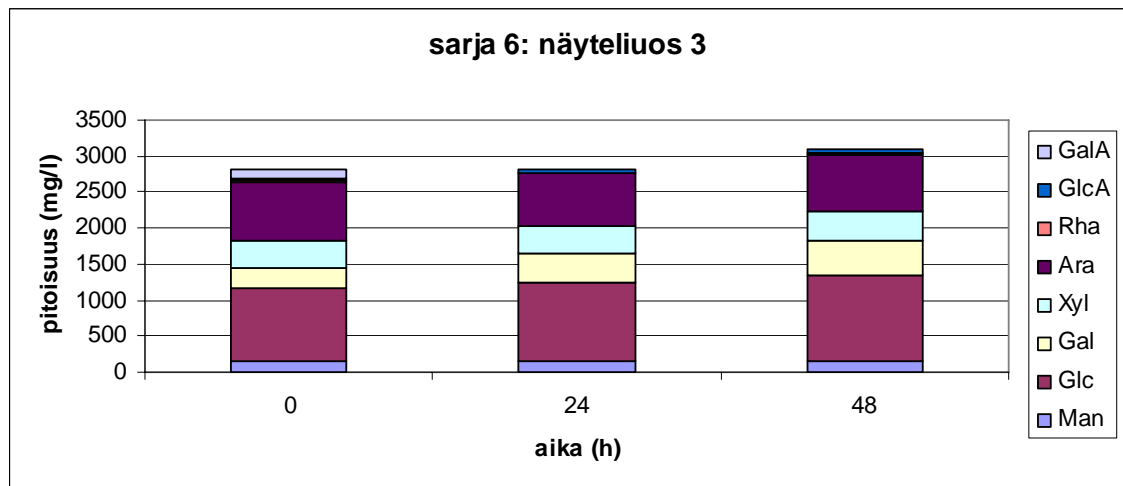
Kuva 16. Sarjan 5 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Näytteenä on PHWE-utettu kuusiute. Näyteliukseen 3 on lisätty 5 til-% lakkaasia.



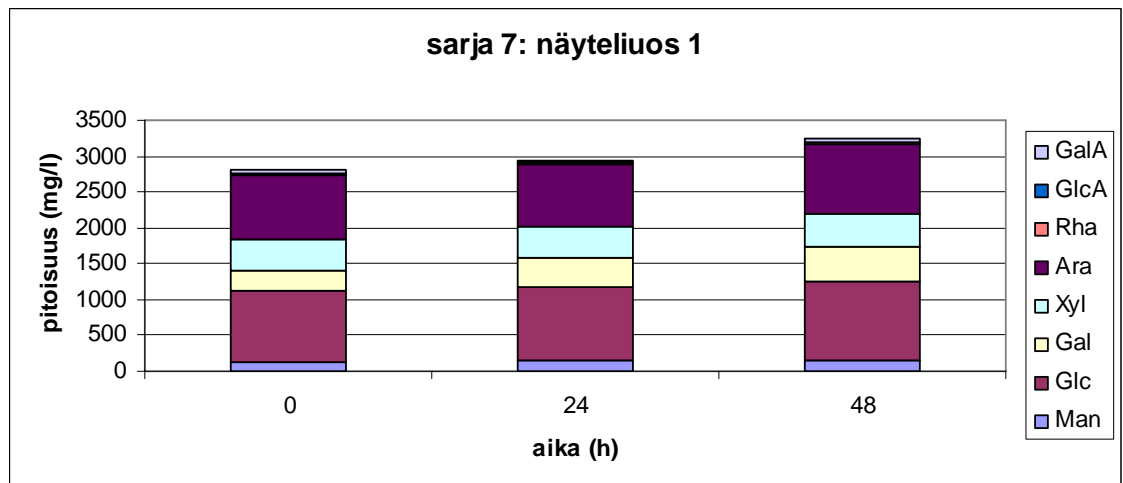
Kuva 17. Sarjan 6 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusi-utetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 0,05 mmol/l.



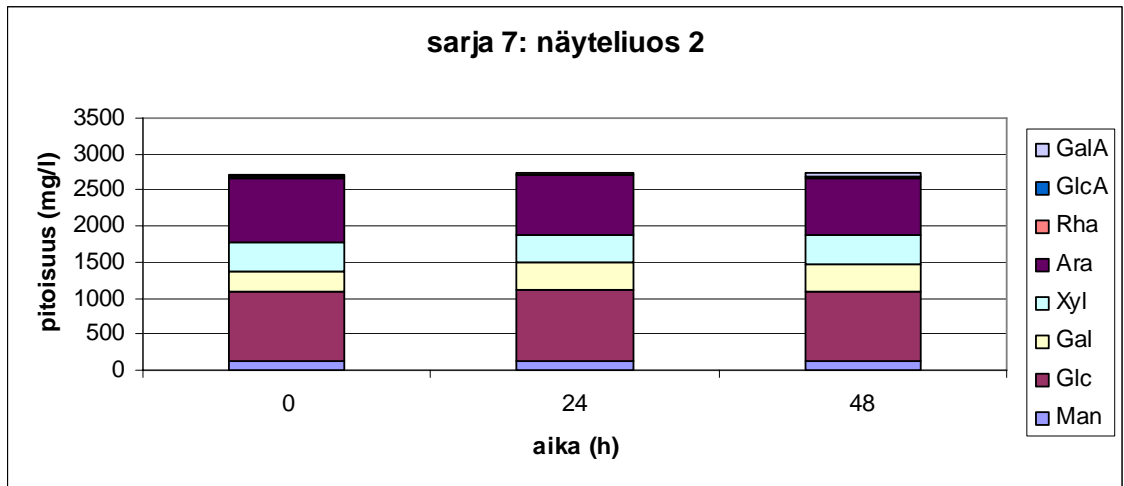
Kuva 18. Sarjan 6 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusi-utetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 0,5 mmol/l.



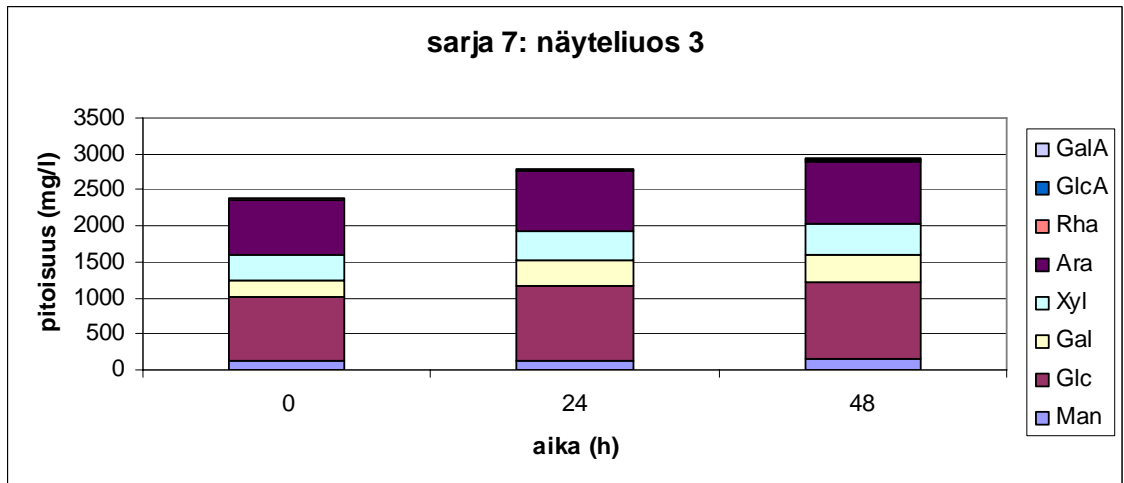
Kuva 19. Sarjan 6 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan hetkellä 24 tuntia. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja 1-HBT-konsentraatiolla 10 mmol/l.



Kuva 20. Sarjan 7 näyteliuoksen 1 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusiutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 0,05 mmol/l.



Kuva 21. Sarjan 7 näyteliuoksen 2 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusi-
uutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 0,5 mmol/l.



Kuva 22. Sarjan 7 näyteliuoksen 3 sokerimonomeeripitoisuudet ajan funktiona. Kyseistä kuusi-
uutetta on käsitelty lakkaasipitoisuudella 3 til-% ja ABTS-konsentraatiolla 10 mmol/l.