

Biomassojen mädätys haihtuviksi rasvahapoiksi

Happofermentaatiokokeiden menetelmäkehitys



Ylemmän ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Biotalousliiketoiminnan kehittäminen

Syyskuu 2021

Markku Vainio

Tekijä	Markku Vainio	Vuosi 2021
Työn nimi	Biomassojen mädätys haihtuviksi rasvahapoiksi–Happofermentaatiokokeiden menetelmäkehitys	
Ohjaajat	Tuija Pirttijärvi ja Saija Rasi	

TIIVISTELMÄ

Orgaanisia jätteitä on hyödynnetty biokaasuna jo pitkään, mutta viime vuosina on herätty pohtimaan, voisiko jätteistä erotella nykyistä enemmän arvojakeita. Mädätyksen välituotteina syntyvät orgaaniset rasvahapot tuovat lisäarvoa jätteille ja näin ollen lisäävät resurssitehokkuutta biotalouden näkökulmasta. Tällä työllä kehitetään Luonnonvarakeskuksen (Luke) laboratoriotointa luomalla ohjeistus koetoimintaan, jonka tarkoituksena on tutkia mädätyksessä syntyviä orgaanisia rasvahappoja.

Työssä tehtyjen kokeiden perusteella voidaan todeta, että metaanintuottopotentialin mittaukseen tarkoitettua laitteistoa voidaan käyttää myös happofermentaatiokokeissa. Reaktoreina käytetyissä pulloissa muodostui orgaanisia haihtuvia rasvahappoja ja tuloksissa havaitut hajonnat rinnakkaisten koejäsenten välillä eivät olleet merkittäviä. Orgaanisten happojen muodostumiseen vaikutti eniten kokeissa käytetyn mikrobiympin esikäsittely sekä syötteen koostumus.

Kokeiden fyysinen suorittaminen yhtenäisten ohjeiden mukaisesti mahdollistaa entistä toistettavamman koejärjestelyn, mutta suurin huomio happofermentaatiokokeissa tulee kuitenkin kiinnittää kokeiden suunnitteluun. Tässä työssä tehty ohjeistus antaa peruslähötiedot kokeiden suunnitteluun ja suorittamiseen.

Avainsanat happofermentaatio, biokaasu, mädätys

Sivut 70 sivua ja liitteitä 11 sivua

Author	Markku Vainio	Year 2021
Subject	Digesting biomasses to volatile fatty acids-Developing experiment methodology for acidogenic fermentation	
Supervisors	Tuija Pirttijärvi ja Saija Rasi	

ABSTRACT

Organic waste has been digested into biogas for a long time, but in recent years, questions have been raised about whether it would be possible to separate more value-added compounds from waste. Organic fatty acids created as intermediates of digestion can add value to waste and consequently increase resource efficiency from a bioeconomy perspective. This thesis will develop the laboratory activities of the Natural Resources Institute (Luke) by creating a guideline for experimental activities designed to study organic fatty acids produced in digestion.

Based on the experiments in the thesis, it can be established that the equipment for measuring methane yield potential can also be used in acidogenic fermentation experiments. Organic volatile fatty acids were formed in the bottles used as reactors and the standard deviation observed in the results between the parallel trial members were not significant. The formation of organic acids was most affected by the pre-treatment of the microbial inoculum used in the experiments, as well as the composition of the feed.

Physical conduct of experiments in accordance with uniform guidelines allows for a more repeatable test arrangement, however, the greatest attention in acidogenic fermentation experiments should be paid to the design of experiments. The instruction carried out in this thesis provides basic information for the design and execution of experiments.

Keywords Acidogenic fermentation, biogas, anaerobic digestion

Pages 70 pages and appendices 11 pages

Sisälllys

1	Johdanto	1
2	Työn tavoite ja tutkimuskysymykset	2
3	Haihtuvien rasvahappojen valmistus mädätyksessä	3
3.1	Mädätysprosessi	3
3.2	Haihtuvat rasvahapot ja niiden käyttökohteet	7
3.3	Haihtuvien rasvahappojen keräys, konsentrointi ja puhdistus	10
3.4	Prosessin käyttäytymiseen vaikuttavat tekijät	11
3.4.1	Lämpötila	12
3.4.2	pH	13
3.4.3	Orgaaninen kuormitus ja hydraulinen viipymäaika	13
3.4.4	Syötteen	16
3.4.5	Esikäsittelyt	17
3.4.6	Laboratoriossa käytettäviä ympörien esikäsittelymenetelmiä	17
4	VFA-tuottopotentiaalin mittaamisen menetelmän kehitys	19
4.1	Laitteisto	19
4.2	Mikrobiympörien esikäsittely	21
4.3	Metaanintuottopotentiaali-laitteiston käyttö happofermentaatiokokeissa	23
4.4	Analyysit	28
4.5	Kokeiden kulku	28
4.5.1	Koe 1 koejärjestelyn keston määrittämiseksi	28
4.5.2	Koe 2 sopivien näytteenottopäivien valitsemiseksi	29
4.5.3	Koe 3 prosessilämpötilan vaikutusten havaitsemiseksi haastavalla syötteellä	30
4.5.4	Koe 4 erilaisen syöteen ja mikrobiympörien käyttäytymisen selvittämiseksi	32
4.5.5	Koe 5 erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle	33
4.5.6	Koe 6 erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle	34
5	Tulokset	35
5.1	Kokeiden suunnittelun ja toteuttamisen onnistuminen	35
5.1.1	Koe 1 koejärjestelyn keston määrittämiseksi	36
5.1.2	Koe 2 sopivien näytteenottopäivien valitsemiseksi	40

5.1.3	Koe 3 prosessilämpötilan vaikutusten havaitsemiseksi haastavalla syötteellä	43
5.1.4	Koe 4 erilaisen syötteen ja mikrobiympin käyttäytymisen selvittämiseksi	45
5.1.5	Koe 5 erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle	46
5.1.6	Koe 6 erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle	49
6	Johtopäätökset	52
7	Pohdinta	54
	Lähteet.....	56

Liitteet

Liite 1	Laboratorio kokeiden suunnittelu ja suoritus ohjeet
---------	---

1 Johdanto

Uusiutumattomien luonnonvarojen vähentyminen pakottaa ihmiskunnan etsimään resurssiviisaita ratkaisuja tulevaisuudessa. Resurssien tarve kasvaa kiihtyvällä vauhdilla ja luo yhä suurempaa kilpailua vähenevien luonnonvarojen ympärille. Euroopan komissio on vuonna 2011 luonut tienviitat kohti resurssitehokasta taloutta vuoteen 2050 mennessä. Tienviittojen tarkoituksena on luoda polku, jota pitkin Eurooppa voi saavuttaa resurssitehokkaan ja kasvavan biotalouden. Resurssitehokkaassa materiaalien käytössä raaka-aineet kiertävät ja niiden arvo säilyy. Jätettä ei enää synny, kun yhden prosessin sivuvirrat ovat raaka-aineita uusille tuotteille. (KOM/2011/0571 lopullinen)

Biokaasuteknologia on hyväksi todettu tapa tuottaa orgaanisista jätteistä energiaa.

Hapettomassa eli anaerobisessa tilassa tapahtuva mädätys tuottaa lopputuotteena hiilidioksidia ja metaania, joista metaania voidaan käyttää energiana esimerkiksi lämpökattiloissa tai liikennepolttoaineena (Kinnunen & Rintala, 2015 ss. 17–18).

Biokaasulaitosten haasteena on kuitenkin toiminnan taloudellinen kestävyys. Suurimmalle osalle biokaasulaitoksista pääosa tuloista tulee porttimaksuista ja lämmönmyynnistä (Rantala & Kari, 2020). Maatalouden biomassoista ei usein saada porttimaksuja, joten tällaisia massoja käyttävien laitosten kannattavuus riippuu energian hinnasta ja laitokselle saatavien tukien määrästä (Winqvist ym., 2015, s. 31). Toinen biokaasulaitoksen taloudelliseen kestävyteen vaikuttava asia on vallitseva energian hinta. Mikäli laitoksen energiasta saama hinta on alhainen, saattaa laitoksen takaisinmaksuaika venyä pidemmäksi kuin tekniikan käyttöikä (Carlini ym., 2017).

Biokaasuprosessin välituotteina syntyy erilaisia aineita kuten esimerkiksi haihtuvia rasvahappoja (VFA). Jakamalla perinteinen mädätysprosessi kahteen osaan, happo- ja kaasumädätykseen, pystytään näitä välituotteita muodostamaan päätuotteena ja poistamaan prosessista arvokkaampaan käyttöön (Kleerebezem ym., 2015). Näin toimien pystytään kasvattamaan jätteistä saatavaa lisäarvoa.

2 Työn tavoite ja tutkimuskysymykset

Tämän työn tarkoituksena oli kehittää Luonnonvarakeskuksen (Luke) laboratoriossa suoritettavien happofermentaatiokokeiden menetelmää. Työssä selvitettiin, pystytäänkö käytössä olevilla laitteistoilla suorittamaan happofermentaatiokokeita luotettavasti. Työssä suoritettavat kokeet pyrittiin suunnittelemaan niin, että kulloisenkin materiaalin VFA-potentiaali siihen määrätyillä olosuhteilla saatiin selville. Työssä käsiteltiin myös menetelmän kehitysvaiheessa ilmenneitä haasteita ja onnistumisia vertaillen tuloksia muualla raportoituihin kokeisiin.

Työn tuloksena muodostui menetelmäohjeistus, jonka avulla voidaan suunnitella ja toteuttaa erilaisten orgaanisten materiaalien happofermentaatiokokeita. Menetelmää tullaan hyödyntämään Luonnonvarakeskuksen bioenergialaboratorion, Biopajan, kokeissa. Menetelmän perusteella tehdyistä kokeista tullaan tekemään artikkeleja tieteellisiin julkaisuihin, jotka tuovat koeasettelulle näkyvyyttä myös kansainvälisessä tiedemaailmassa. Kokeiden avulla saatiin tietoa prosessin vaiheista laboratoriomittakaavassa. Tätä tietoa voidaan myöhemmin käyttää taustatietona jatkuvatoimisissa kokeissa ja mahdollisesti myös isommissa happofermentaatiolaitoksissa.

Tässä työssä käytettiin hyväksi kokeita, jotka oli suunniteltu jo loppuneisiin BioVFA ja LantaVFA sekä edelleen käynnissä oleviin Luonnonvarakeskuksen hankkeisiin AVARE ja PASS-BIO. Avare on ylikansallinen ERA-NET SUSFOOD2 projekti, jonka on rahoittanut sekä kansallinen lähde (MMM, Dnro 56/03.01.02/2018) että Euroopan Unionin Horisontti 2020 tutkimus ja innovaatio ohjelma. PASS-BION rahoittajana toimii Horizon 2020 FACCE JPI sekä kansallinen lähde (MMM, Dnro 1959/03.01.02/2017). Opinnäytetyön tilaajan (Luonnonvarakeskus, Luke) opinnäytetyölle nimettynä ohjaajana toimi johtava tutkija tohtori Saija Rasi Luonnonvarakeskuksesta.

Tämän opinnäytetyön tutkimuskysymykset:

1. Voidaanko biologiseen metaanintuottopotentialiin mittaukseen käytettyä laitteistoa ja koejärjestelyjä käyttää metaanintuotto-prosessin välituotteiden, rasvahappojen (VFA) tuoton tutkimisessa?

2. Millainen on testausmenetelmän luotettavuus saman kokeen rinnakkaisissa koejäsenissä?
3. Miten panosmalliset happofermentaatiokokeet tulee suunnitella ja toteuttaa, jotta raaka-aineesta tuotettujen haihtuvien rasvahappojen määrä saadaan mahdollisimman suureksi koejakson aikana?

3 Haihtuvien rasvahappojen valmistus mädätyksessä

3.1 Mädätysprosessi

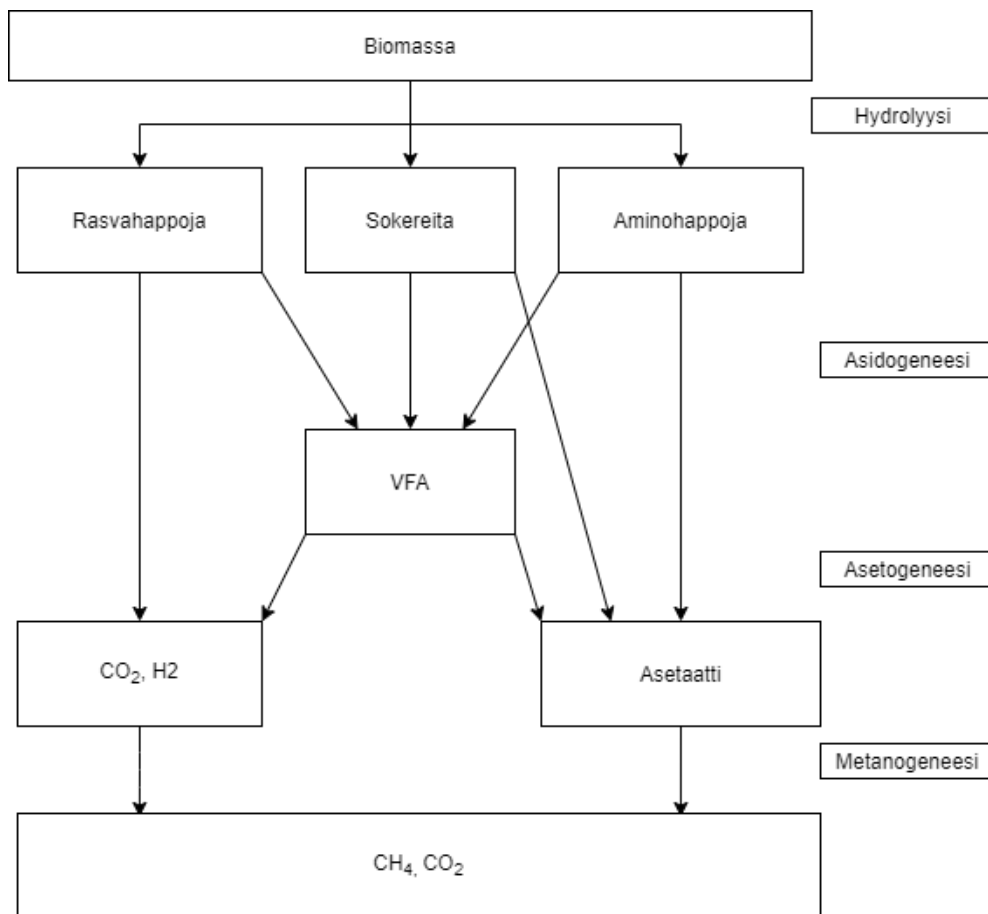
Mädätysprosessi (Kuva 1) on yleisesti käytössä oleva orgaanisten jätteiden hapeton käsittelymenetelmä. Tällä hetkellä tyypillisimpiä orgaanisia jätteitä kotitalouksilta ovat ruokajäte ja yhdyskuntaliete. Maatilat taas tuottavat suuria määriä erilaisia lantoja sekä pilaantunutta rehua. Anaerobinen biokaasuprosessi mahdollistaa esimerkiksi näiden orgaanisten jätteiden käsittelyn uusiksi tuotteiksi.

Biokaasuprosessissa orgaanisesta jätteestä muodostuu biokaasua ja mädätettä. Biokaasu sisältää pääosin hiilidioksidia ja metaania, mutta mukana on myös pieniä määriä vetyä, rikkivetyä, vesihöyryä ja ammoniakkaa (Rasi ym., 2007). Mädäte sisältää suurimman osan jätteen sisältämistä ravinteista ja sitä voidaan käyttää lannoitteena sellaisenaan tai jatkojalostaa ravinteet lannoitteiden eri muotoihin (Tampio ym., 2018, ss. 19–24; Zirkler ym., 2014).

Haihtuvien rasvahappojen muodostuminen biokaasuprosessin välituotteena mahdollistaa jo valmiina olevan biokaasuteknologian hyväksikäytön haihtuvien rasvahappojen valmistuksessa. Sen etuna verrattuna hapettamalla tai karboksyloimalla valmistettaviin rasvahappoihin on raaka-aineiksi soveltuvien materiaalien monipuolisuus ja se, että prosessi ei vaadi aseptisiä olosuhteita. (Wainaina ym., 2019) Tavoiteltaessa biokaasun sijaan haihtuvia rasvahappoja pitää biokaasuprosessia muokata niin, että viimeinen vaihe eli metanogeneesi jää tapahtumatta.

Kuva 1

Mädätysprosessi (modifioitu Zupančič & Grilc, 2012)



Mädätysprosessi on sarja erilaisten mikro-organismien ketjureaktioita, jossa ensimmäisen reaktion tuotteet toimivat syötemateriaaleina seuraaville vaiheille. Anaerobisen reaktorin syötteissä oleva orgaaninen aines on usein isoina pitkäketjuisina yhdisteinä kuten hiilihydraatteina tai rasvoina. Bakteerit hajottavat entsyymien avulla näitä makromolekyylisiä rakenteita dimeereiksi ja monomeereiksi, joita toiset mikrobit kykenevät hajottamaan eteenpäin. (Zupančič & Grilc, 2012)

Reaktiosarja voidaan jakaa karkeasti neljään osaan: hydrolyysi, asidogeneesi, asetogeneesi ja metanogeneesi. Nämä neljä vaihetta on käyty pääpiirteittäin läpi alla reaktiokaavoineen. Reaktiokaavoja tutkiessa on hyvä muistaa, että hajoamispolut muuttuvat syötteiden ja

olosuhteiden mukaan, jonka takia alla olevat kaavat ovat hyvin pelkistettyjä (Sikora ym., 2018, ss. 49–63).

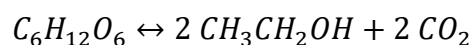
Hydrolyysissä toimivat bakteeriryhmät riippuvat reaktoreiden syötemateriaalista ja usein hydrolyysissä toimivat bakteerisuvut toimivat myös seuraavassa mädätysvaiheessa asidogeneesissä. Hydrolyysissä toimivia bakteereja ovat ainakin *Alphaproteo- Clostridium-Rumminococcus* ja *Bacteroides*-suvun bakteerit (Cirne ym., 2007; Argyropoulos ym., 2013, s. 264; Kymäläinen, 2015, s. 61). Hydrolyysissä hajottajina toimivat bakteerien solun ulkopuoliset entsyymit, hajottaen syötteen solujen pintamateriaalia bakteereille sopivaan muotoon. Osassa hydrolyysin reaktioissa muodostuu vetyä sekä asetaatteja, joita arkeonit, kuten metanogeenit, pystyvät käyttämään suoraan hyväkseen, muodostaakseen metaania. Suurimmaksi osaksi hydrolyysissä bakteerit kuitenkin hajottavat orgaanisen syötemateriaalin makroravinteet rasvahapoiksi, sokereiksi ja aminohapoiksi (Zupančič & Grilc, 2012). Hydrolyysissä tapahtuvat reaktiot voidaan kuvata seuraavalla reaktioyhtälöllä (Kaava 1), jossa erilaisista polysakkarideista, kuten selluloosasta ($C_6H_{10}O_5$) sekä vedestä (H_2O) muodostuu glukoosia ($C_6H_{12}O_6$) ja vetyä (H_2) (Anukam ym., 2019).

Kaava 1



Asidogeneesissä bakteerit, kuten *Micrococcus*, *Peptococcus*, *Streptococcus*, *Desulfomonas* and *Escherichia coli*, muodostavat, hydrolyysissä valmistuneista liukoisista orgaanisista materiaaleista, haihtuvia rasvahappoja, vetyä, rikkivetyä, hiilidioksidia sekä erilaisia alkoholeja (Anukam ym., 2019; Biarnes, n.d.). Asidogeneesissä (Kaava 2, Kaava 3 ja Kaava 4) tapahtuvia reaktioyhtälöissä glukoosista muodostuu alkoholeja (CH_3CH_2OH), hiilidioksidia (CO_2) ja etikkahappoa (CH_3COOH) samalla glukoosista ja vedystä muodostuu propionihappoa (CH_3CH_2COOH) ja vettä.

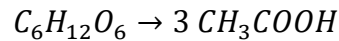
Kaava 2



Kaava 3

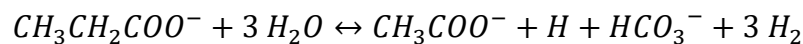


Kaava 4

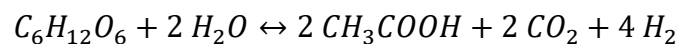


Kaavojen 5, 6 ja 7 reaktioyhtälöt kuvaavat asetogeneesissä tapahtuvia reaktioita, joissa propionaatista ($CH_3CH_2COO^-$), glukoosista, vedestä ja alkoholeista (CH_3CH_2OH) muodostuu asetaatteja, etikkahappoa, vetyä, vetykarbonaattia (HCO_3^-) ja hiilidioksidia (Anukam ym., 2019; Zupančič & Grilc, 2012). Metaanintuotannossa tämän vaiheen toimivuuden kannalta on tärkeää, että vetyä käyttävät metanogeenit ovat toiminnassa, sillä osa asetogeneesivaiheen bakteereista inhiboituvat vedystä (Anukam ym., 2019). Suurin osa asetogeneeseistä, kuuluu *Firmicutes* pääjaksoon (Blasco ym., 2020; Argyropoulos ym., 2013, s. 264).

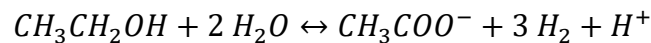
Kaava 5



Kaava 6



Kaava 7

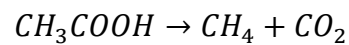


Metaaniprosessin viimeinen vaihe, metanogeneesi, käyttää hyväkseen edellisissä vaiheissa muodostuneita rasvahappoja, asetaattia sekä vetyä muodostaen näistä metaania.

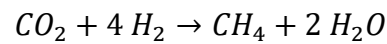
Metanogeneesi vaiheessa toimivat mikrobit muuttuvan syötteen mukaan, mutta yhteisenä nimittäjänä voidaan pitää hapettomuutta. Suurin osa metaania muodostavista arkeoneista kuuluu pääjaksoon *Euryarchaeota* (Argyropoulos ym., 2013, s. 264). Metanogeneesi vaiheessa toimivat mikrobit ovat herkimpiä reagoimaan olosuhteiden muutoksiin, jolloin

biokaasuprosessit usein optimoidaan toimimaan metanogeneille suotuisilla olosuhteilla. Metanogeesissä tapahtuvat reaktiot kuvaavat miten etikkahaposta muodostuu metanogeesissä metaania ja hiilidioksidia (Kaava 8). Hiilidioksidista ja vedystä muodostuu metaania ja vettä (Kaava 9) ja kahdesta alkoholista sekä hiilidioksidista muodostuu metaania ja etikkahappoa (Kaava 10) (Anukam ym., 2019).

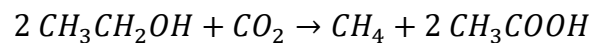
Kaava 8



Kaava 9



Kaava 10



3.2 Haihtuvat rasvahapot ja niiden käyttökohteet

Haihtuvat rasvahapot eli VFA:t, ovat 2–6 hiiliatomia sisältäviä karboksyylihappoja, joihin kuuluu etikkahappo, propionihappo, voi happo, isovoi happo, valeriaanahappo, isovaleriaanahappo, kapronihappo. Taulukko 1 on lueteltuna vuoden 2015 yleisiä hintoja teollisuuden tuottamista rasvahapoista (Calt, 2015).

Taulukko 1

Haihtuvat rasvahapot ja niiden hinta sekä hiilimäärä (Calt, 2015; Wainaina, ym., 2019)

VFA	Hiiliatomeita	Molekyylikaava	Hinta \$/t
Etikkahappo	C2	CH ₃ COOH	600
Propionihappo	C3	CH ₃ CH ₂ COOH	2000
Isovoihappo	C4	(CH ₃) ₂ CHCOOH	2163
Voihappo	C4	CH ₃ CH ₂ CH ₂ COOH	3210
Isovaleriaanahappo	C5	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COOH	4251
Valeriaanahappo	C5	CH ₃ (CH ₂) ₃ COOH	3387
Kapronihappo	C6	CH ₃ (CH ₂) ₄ COOH	3815

Etikkahappo on yksi yleisimmin käytetyistä karboksyylihapoista. Sitä käytetään yleisesti teollisessa tuotannossa muovisten pullojen, valokuvafilmien, puuliiman ja erilaisten synteettisten kuitujen valmistuksessa. Ruokateollisuudessa etikkahappoa käytetään happamuuden säätelyssä ja kotitalouksissa puhdistusaineissa. Etikkahaposta johdettavissa oleva asetyyliryhmään perustuu käytännössä kaikenlaisen elämän biokemia. Vapaan etikkahapon määrä soluissa on kuitenkin hyvin maltillinen, jottei sen myötä laskeva pH häiritse solujen toimintaa. Etikkahappoa muodostaa varsinkin Acetobakteerien suku ja *Clostridium acetobutylium* bakteeri. Luonnossa etikkahappoa muodostuu hedelmien pilaantuessa. (National Center for Biotechnology Information, 2021a)

Propionihappo on puhtaana väritön syövyttävä happo, jonka haju on epämiellyttävä. Propionista valmistetaan kasvinsuojeluaineita, kemikaalisia väliaineita, keinotekoisia hedelmämakuja, lääkeaineita ja säilöntäaineita ruoka ja rehuteollisuuteen (Kumar & Babu, 2006). Propionihappoa on luonnollisesti läsnä monissa maitotuotteissa (esim. juustoissa) ja

esiintyy yhdessä muiden lyhytketjuisten rasvahappojen kanssa nisäkkäiden ruuansulatuskanavissa hiilihydraattien hajoamisen lopputuotteena (National Center for Biotechnology Information, 2021b).

Isovoihappo esiintyy luonnostaan pieniä määriä suolistossa sekä joissakin ruuissa tai käymisteitse valmistetuissa juomissa. Se kykenee osittain liukenemaan veteen, mutta on huomattavasti liukenevaisempi etanoliin, eetteriin tai orgaanisiin nesteisiin.

Ihokosketuksesta voi seurata palovammoja ihoon ja silmiin eikä sen hengittämistä suositella sillä se voi kaasuna ärsyttää keuhkoja ja kurkkua. Isovoihappoa käytetään hajusteiden, väriaineiden, makuaineiden, kasvinsuojeluaineiden ja lääkkeiden valmistuksessa. (National Center for Biotechnology Information, 2021c)

Voihappo on pilaantuneessa voissa, parmesaanissa ja oksennuksessa. Siinä on epämiellyttävä tuoksu ja katkera maku. Sitä on myös estereinä eläinten rasvassa ja öljykasveissa. Koska osalla näistä estereistä on miellyttävä tuoksu tai maku, voidaan näitä käyttää myös ruokien ja hajusteiden lisäaineina. Puhtaana happona voihappo on nestemäistä väritöntä, syövyttävää ja aiheuttaa iholla vakavia palovammoja. (National Center for Biotechnology Information, 2021d) Voihaposta voidaan valmistaa myös muovia tai biopolttoaineita (Dwidar ym., 2012).

Isovaleriaanahappo esiintyy luonnossa monissa kasveissa ja öljyissä. Se on väritön ja osittain veteen liukeneva neste. Sen tiedetään aiheuttavan sveitsiläisille juustoille tyypillisen tuoksun. (Thierry ym., 2004). Isovaleriaana happoa voidaan käyttää yhdessä muiden haihtuvien rasvahappojen kanssa typenpoistossa anaerobisessa reaktorissa (Elefsiniotis ym., 2004).

Valeriaanahappo esiintyy luonnossa Rohtovirmajuuressa (*Valeriana officinalis*) josta se on saanut myös nimensä. Siitä saatavia estereitä pidetään yleensä hyväntuoksuina ja tästä syystä niitä yleisesti käytetään hajusteissa sekä ruokien ja juomien maustamisessa. (National Center for Biotechnology Information, 2021e). Valeriaanahapon muita käyttökohteita ovat voiteluaineet ja kasvien tuholaistorjunta-aineet (Jänisch ym., 2019).

Kapronihappo on väritön neste, joka tuoksuu juustolta. Luonnostaan sitä löytyy monien eläimien rasvoista ja öljyistä (National Center for Biotechnology Information, 2021f).

Kapronihappoa voidaan käyttää lisäaineena eläinten ruuassa, makuaineena ruuassa sekä biopolttoaineiden ja kemikaalien valmistusmateriaalina (Cavalcante ym., 2017).

Happomädätyksestä saatavat hapot ovat kuitenkin epäpuhtaita eivätkä sellaisenaan sovi suoraan edellä mainittuihin käyttökohteisiin. Siitä syystä houkuttelevimmat vaihtoehdot näille haihtuville rasvahapoille onkin sellaisia, joissa happoja voidaan käyttää erilaisina seoksina. Mädätyksellä muodostettuja haihtuvia rasvahappoja voidaan käyttää esimerkiksi kalanruokateollisuudessa, jossa niitä voidaan tarjota hiilenlähteiksi erilaisille leville, joista valmistetaan DHA:ta sisältävää kalanruokaa tai ne voivat toimia myös lähtöaineina biomuoviteollisuudessa käytettävän polyhydroksialkanoaattien (PHA) valmistuksessa (Bartek ym., 2021; Chalima ym., 2017). Toinen mahdollinen käyttökohde haihtuville rasvahapoille on biopolttoaineet, kuten biodiesel (Fortela ym., 2016). Happomädätyksen yhteydessä prosessissa syntyy myös kaasua, joka koostuu pääosin vedystä ja hiilidioksidista. Vetyä voidaan käyttää hyödyksi energiana esimerkiksi liikenteessä ja teollisuudessa (Kauranen ym., 2013, s. 70). Jäljelle jäävässä biomassassa on vielä hajoamatonta orgaanista ainetta jäljellä, joten happofermentaation jälkeen voidaan biomassaa syöttää vielä perinteiseen biokaasureaktoriin ja hyödyntää siitä saatava metaani energiana (Valentino ym., 2019).

3.3 Haihtuvien rasvahappojen keräys, konsentroidi ja puhdistus

Haihtuvat rasvahapot ovat liuenneena mädätteessä. Koska liian alhainen pH inhiboi kaikkea mikrobitoimintaa, on sen kerääminen reaktorista tärkeää, mikäli happomädätystä halutaan suorittaa jatkuvatoimisesti (Wainaina, ym., 2019). Keräämistä voidaan tehdä myös reaktorista poistuvasta mädätteestä, jolloin reaktorissa vallitsevien olosuhteiden on oltava sellaisia, ettei happoja ehdi kumuloitumaan reaktoriin liikaa. Biokaasureaktorissa olosuhteet luodaan sellaiseksi, ettei rasvahappojen poistoon ole tarvetta, koska liian korkeat happopitoisuudet inhiboivat metanogeneesiä (Siegert & Banks, 2005).

Yleisimmin tutkitut VFA keräilymenetelmät ovat elektrodialyysi tai kalvosuodatus.

Elektrodialyysiä on onnistuneesti käytetty mm. oliivimyllyn jätevesien mädätteessä, jossa elektrodialyysillä saatiin 1,5-kertainen VFA konsentraatio (Scoma ym., 2016). Myös Jones ym., (2015) totesi tutkimuksessaan elektrodialyysin olevan toimiva varsinkin etikkahapon ja voiapon konsentroidinnissa erotuksen onnistuessa 94–99 % tarkkuudella. Kalvosuodatusta on

onnistuneesti käyttänyt kokeissa ainakin Longo ym., (2015) ja Wainaina, Parchami, ym., (2019). Ennen painepohjaista kalvosuodatusta on käytettävä esisuodatusta muuten ongelmaksi saattaa muodostua kalvojen tukkeutuminen.

Myös tislaamalla on mahdollista konsentroida haihtuvia rasvahappoja. Etikkahapon (118 °C) ja veden (100 °C) kiehumispisteet ovat kuitenkin niin lähellä toisiaan, että tavallista tislausta suositeltavampi metodi on käyttää atseotrooppitislausta esimerkiksi N-propyyliasetaatinkin kanssa (Galli ym., 2017).

Adsorbointi on osoittautumassa lupaavaksi tekniikaksi haihtuvien rasvahappojen talteenottoon. Adsorbointiin voidaan käyttää erilaisia adsorbentteja kuten hartseja tai aktiivihiiltä, mutta ongelmaksi saattaa muodostua desorbtiio sekä adsorbenttien uudelleen käyttö (da Silva & Miranda, 2013; Reyhanitash ym., 2017).

Mädätteistä saatavien haihtuvien rasvahappojen konsentroidintia ja keräilyä on yhä tutkittava lisää. Mädätteistä saatava rasvahappopitoisuus on usein korkeintaan muutamia prosentteja ja teollisuuskäyttöä varten happopitoisuutta olisi nostettava selkeästi (Galli ym., 2017; Tampio ym., 2018). Mikäli happopitoisuus mädätteessä onnistutaan nostamaan, on myös puhdistusteknologian oltava riittävän tehokasta, jotta jatkokäyttö olisi mahdollista.

3.4 Prosessin käyttäytymiseen vaikuttavat tekijät

Vaikka happojen muodostamisessa voidaan hyödyntää jo olemassa olevaa biokaasutekniikkaa, poikkeavat prosessit toisistaan selvästi. Tässä kappaleessa käydään läpi yleisiä prosessimuuttujia ja miten ne eroavat tarkoituksen mukaan. Myös happomädätyksessä prosessiparametrien ja syötteiden muutoksilla voidaan hallita siitä saatavien tuotteiden laatuun ja määrään.

Laboratorio-olosuhteissa selvitetään erilaisten syötteiden biologisia metaanintuotto potentiaaleja (BMP) ja näillä syötteille tai niiden seoksille sopivia prosessiparametrejä: Orgaanista kuormitusta (organic loading rate, OLR), syötteen viipymää (hydraulic retention time, HRT) ja lämpötilaa (T). Tällaisten tutkimusten avulla pyritään löytämään sopivia lähtökohtia suuremman kokoluokan biokaasureaktorin toimintaan. Samankaltaisia kokeita

tehdään myös happomädätyksestä. Seuraavissa kappaleissa on tuotu esille, miten koetoiminnassa perinteiset biokaasukokeet ja happomädätyskokeet poikkeavat toisistaan.

3.4.1 Lämpötila

Anaerobinen mädätysprosessi suoritetaan yleensä mesofiilisella 35–43 °C tai termofiilisella 50–55 °C lämpötila-alueella (Kymäläinen, 2015, ss. 63–64). On kuitenkin mahdollista suorittaa mädätysprosessia myös psykrofiilisella alueella, jolloin lämpötila pidetään alle 25 °C (El-Mashad ym., 2004). Psykrofiilisella alueella tapahtuva mädätys on kuitenkin niin hidasta, ettei sitä juurikaan käytetä.

Suurin osa Suomessa toimivista biokaasureaktoreista toimii mesofiilisessa lämpötilassa. Termofiilisiä reaktoreita käytetään lähinnä biokaasulaitoksissa, joiden syötteenä on massoja, joita pitää lämmittää hygienisoinnin johdosta (Kangas ym., 2011, s. 18). Vaikka termofiilisella prosessilla on todettu monia etuja verrattuna mesofiiliseen prosessiin, kuten tehostunut hydrolyysi ja suurempi metaanisaanto korkeilla kuormituksilla, on niiden käyttö vähäistä johtuen lämmitykseen tarvittavasta energian määrästä sekä prosessin epävakauksesta (Kougias & Angelidaki, 2018; Labatut ym., 2014). Mikäli kuitenkin termofiilisen reaktorin energian tuotto kasvaa suhteessa mesofiiliseen enemmän kuin prosessin vaatima energian kulutus, saattaa termofiilinen biokaasureaktori olla parempi ratkaisu kuin mesofiilinen, sillä esimerkiksi reaktorikokoa saadaan pienemmäksi.

Termofiilisen biokaasureaktorin epävakaisuus aiheutuu usein suuresti kumuloituvasta VFA määrästä (Speece ym., 2006). Lämpötilalla on vaikutusta myös haihtuvien rasvahappojen kokonaistuottoon ja niiden koostumukseen. Sekä He ym., (2012) että Jiang ym., (2013) huomasi voihapon määrän kasvavan termofiilisessa lämpötilassa verrattuna mesofiiliseen. Ilman mikrobiympäristä tehdyissä tutkimuksissa termofiilisessa lämpötilassa saatiin suurempi VFA-tuotto kuin mesofiilisessa lämpötilassa (Hao & Wang, 2015). Hao & Wang, (2015) käytti syötteenä yhdyskuntalietettä toisin kuin He ym. (2012) ja Jiang ym. (2013), joiden syötteenä oli ruokajätettä. Ruokajätteellä tehdyssä kokeessa, jossa sekä termofiiliselle että mesofiiliselle lämpötilalle oli omat lämpötilaan tottuneet ympäristöt, sai Shin ym., (2004) suuremmat VFA pitoisuudet mesofiilisessa lämpötilassa kaikilla testatuilla pH-arvoilla.

Vaikka termofiilisilla lämpötiloilla on selkeästi joitakin prosessia nopeuttavia ominaisuuksia, ei kuitenkaan pystytä toteamaan yksiselitteisesti niitä paremmiksi, kuin matalammat prosessilämpötilat. Nopea hydrolyysi aiheuttaa nopeaa ja mahdollisesti hallitsematonta VFA-tuottoa, jolloin reaktorin toiminta saattaa kaatua liiallisen happamuuden takia. Prosessin muilla, jäljessä käsiteltävillä ominaisuuksilla, on suuri vaikutus optimilämpötilaan, joten jokaisen prosessin lämpötila on valittava yksilöllisesti.

3.4.2 pH

Biokaasureaktorin mikrobitoiminta tapahtuu yleensä pH arvon ollessa 7,3–7,8. Prosessi kuitenkin pysyy toiminnassa vaihteluvälillä 6,5–8,0 (Cioabla ym., 2012). Panostoimisissa reaktoreissa panoksen alkuperäinen pH vaikuttaa merkittävästi metaanintuottoon ja Zhai ym., (2015) tutkimuksessa paras metaanintuotto saatiin panoksen alkuperäisen pH:n ollessa 7,5. Myös Yang ym., (2015) kokeessa sekä biokaasun tuotto että metaani saanto parani pH:n noustessa 7,0:sta 7,5:een. Kun pH nousi 8:aan, laski biokaasun tuotto jo selvästi.

Metanogeneesi vaiheen mikrobit ovat herkkiä pH muutoksille ja metaanintuotannon vaihtelu eri pH alueilla voidaan selittää eri mikrobien toiminnalla tietyissä olosuhteissa (Zhou ym., 2013).

VFA-kokeissa pH:n säädön 5–6 on todettu toimivan ruokajätteellä parhaiten, kun taas liian alhainen pH häiritsee myös VFA:ta tuottavia mikrobeita ja ehkäisee näin happojen muodostumisen (Jiang ym., 2013). Dogan ym., (2009) kuitenkin toteaa etikkahappoa ja voi-happoa muodostuneen alle 4 pH-arvossa vaikka dominanssi olikin etanolin tuotannolla. Vaihtoehtoisesti pH voidaan nostaa emäksiseksi, jolloin on huomattu varsinkin etikkahapon muodostumisen tehostuvan tietyillä materiaaleilla (Jankowska ym., 2017). Toimiva pH rasvahappojen tuotolle on jossakin 5 ja 11 välillä, mutta täsmällinen arvo riippuu syötteestä, OLR:stä, HRT:stä ja lämpötilasta.

3.4.3 Orgaaninen kuormitus ja hydraulinen viipymäaika

Orgaaninen kuormitus kuvaa kuinka paljon reaktoriin syötetään orgaanista ainesta päivässä suhteessa reaktorin tilavuuteen (Kaava 11). OLR määrittelee, kuinka paljon hajoamistuotetta reaktoriin syötetään päivässä, joten sillä on suuri vaikutus koko prosessiin. Panostyylisissä

reaktoreissa orgaaninen kuormitus kerrotaan syötettynä VS määränä massana. Näiden kokeiden orgaanisen kuormituksen yhteydessä kerrotaan usein I/S-suhde (inoculum to substrate). Tämän suhteen avulla selviää, kuinka paljon orgaanista ainetta laitetaan kooreaktoriin suhteessa näytteessä olevaan orgaaniseen aineeseen. Vaikka suuri kuormitus mahdollistaa korkeammat VFA- ja metaanisaannot, on kuitenkin huomioitavaa, että prosessi saattaa muuttua epävakaksi, kun kuormitus nousee liikaa (Jiang ym. 2013). Jatkuvatoimisen reaktorin OLR pystytään laskemaan kaavan 11 mukaisella yhtälöllä, jossa OLR on orgaaninen kuormitus (g VS/l d), S_0 =orgaanisen aineen määrä syötteessä (g VS/l), HRT=hydraulinen viipymäaika (d), Q on syöttömäärä (l/d) ja V on reaktorin tilavuus (l).

Kaava 11

$$OLR = S_0/HRT = S_0 * Q/V$$

Kuten kaavasta voidaan päätellä, pystytään orgaanisen kuormituksen määrään vaikuttamaan muuttamalla kokonaissyöttömäärää tai orgaanisen aineen määrää syötteessä (Labatut & Pronto, 2018).

Sopivaan orgaanisen kuormituksen määrään vaikuttaa suurimmaksi osaksi syötemateriaalin kemiallinen koostumus, reaktorin malli ja se, millaisiin olosuhteisiin mikrobisto on tottunut. Sokerijuurikkaan sivuvirtojen ja sian lietelannan yhteismädätyksessä Aboudi ym., (2015) saivat sopivaksi kuormitukseksi metaanintuotantoon 11,2 g VS/l d. Kun taas ruokajätteen ja naudnan lietelannan yhteismädätyksessä paras metaanintuotto on saatu kuormituksen ollessa 2 g VS/l d (Agyeman & Tao, 2014). Myös syötteen viipymällä reaktorissa on merkitys kokonaiskuormitukseen. Suurella syötemäärällä ja lyhyellä viipymällä saattaa osa käytettävissä olevasta orgaanisesta aineesta jäädä hyödyntämättä (Lim ym., 2008).

Happomädätyksessä OLR vaikuttaa VFA:n kokonaistuoton lisäksi myös rasvahappojen koostumukseen (Wijekoon ym., 2011). Sekä Lim ym., (2008) että Wijekoon ym., (2011) tutkimuksissa todettiin etikkahapon määrän kasvavan suhteessa eniten kuormituksen kasvaessa. Mahdollisesti säätämällä orgaanista kuormitusta voidaan manipuloida prosessia sen mukaan, minkälaisia rasvahappoja tahdotaan tuottaa. Happomädätykseen sopivaan kuormitukseen vaikuttaa reaktorissa oleva ja syötteen mukana sinne kulkeutuva mikrobisto. Kuormituksen on oltava korkea, mikäli reaktorissa on happoja kuluttavia mikrobeita.

Korkealla kuormituksella pystytään pitämään happojen määrä niin ylhäällä, että esimerkiksi metanogeenit eivät pysty toimimaan.

Hydraulinen viipymäaika kuvastaa syötteen viipymäaika reaktorissa päivinä. Panosmallisissa reaktoreissa voidaan puhua pelkästä viipymästä RT (retention time) tai kiinteän aineen viipymästä SRT (solid retention time), ne kuvastavat panoksen tai kiinteän aineen aikaa reaktorissa. Hydraulinen viipymäaika lasketaan Kaava 12 mukaisesti, jossa HRT on hydraulinen viipymäaika (d), V reaktorin koko (l) ja Q syötteen määrää (l).

Kaava 12

$$HRT = V/Q$$

Biokaasuprosessissa HRT pyritään optimoimaan syntyvän syötemäärän mukaan niin, että prosessi pysyy vakaana ja metaanin tuotanto korkeana. Vehnän oljella tehdyssä kokeessa vertaillen kolmea eri viipymää (20, 40, 60 d) on huomattu, että metaanitasot ja pH pysyivät hyvinä 40 ja 60 päivän viipymällä. Kun taas 20 päivän viipymä aiheutti rasvahappojen ja varsinkin propionihapon kumuloitumisen reaktoriin. Tämä alensi pH:ta ja laski metaanintuottoa muihin viipymiin verrattuna. (Shi ym., 2017).

Koska happoreaktorissa ei suoriteta metaanogeneesiä, on niissä HRT usein huomattavasti lyhyempi kuin biokaasureaktoreissa. Oliivipuristamon ja juustolan sivuvirtojen sekä naudan lietelannan mädätystä kaksivaiheisessa reaktorissa tutkittaessa optimi HRT:ksi Dareioti & Kornaros, (2014) totesi happoreaktorilla 0,75 d ja metaanireaktorilla 25 d. Ruokajätteillä Lim ym., (2008) suorittivat kokeen 4, 8 ja 12 päivän viipymillä, todeten happojen koostumuksen muuttuvan eri pituisilla viipymillä. Suurin kokonaishappopitoisuus saavutettiin 12 d viipymällä.

On huomioitava, että reaktorissa oleva mikrobipopulaatio ja sen elinvoimaisuus vaikuttaa reaktorin toimintakykyyn samoin kuin muut prosessiparametrit. Helposti hajoavien syötteiden hydrolyysi saattaa olla hyvinkin nopea mesofiilisissäkin lämpötiloissa, jolloin happoreaktorin toiminnan kannalta hyvinkin lyhyt HRT saattaa olla toimiva ratkaisu. Lyhyt HRT kuitenkin lisää mikrobiston poistumista reaktorista ja tästä syystä prosessin vakaus saattaa horjua.

3.4.4 Syötteet

Anaerobiseen reaktoriin voidaan syöttää lähes mitä tahansa orgaanista materiaalia kuten lantaa, yhteiskunnan jätteitä, elintarvikeseivuvirtoja tai energiakasveja (Chynoweth ym., 2001). Erilaisten syötteiden yhteiskäsittelyllä voidaan optimoida syötteen hyödynnettävyys prosessissa. Erilaisten kasviperäisten jakeiden lisääminen märkäreaktoriin syötettävien lietteiden sekaan on todettu lisäävän metaanintuottoa biokaasulaitoksissa (Luostarinen, 2013, s. 91). Suurimmaksi synergiaeduksi erilaisten syötteiden sekoittamisesta mainitaan hiilen ja typen suhde (C/N) reaktorissa (Hills, 1979).

Myös happoprosessien yhteydessä on syötteiden yhteiskäsittelystä todettu olevan hyötyä. Tutkimuksessa puhtaan hiilihydraatin (glukoosi), proteiinin (peptoni) ja rasvan (glyseroli) VFA tuotosta happomädätyksessä suurimmat VFA pitoisuudet saatiin suurimmasta pienimpään hiilihydraateista, proteiinista ja rasvasta. Kuitenkin sekoittamalla näitä kolmea näytettä, saatiin suuremmat VFA saannot kuin erillisten syötteiden summa. (Yin ym., 2016)

Happomädätyksessä syötteiden sekoittamisesta saattaa olla erilaisia synergiaetuja kuin biokaasuprosessissa. Biokaasuprosessi saattaa inhiboitua, kun proteiinipitoinen syöte vapauttaa ammoniakkia (Plácido & Zhang, 2018). Mutta happofermentaatioissa VFA:ta käyttävien mikrobeiden inhiboituminen on vain suotavaa. Mikäli syötteessä yhdistetään runsaasti VFA:ta tuottavia hiilihydraattipitoisia syötettä ja paljon proteiineja tai typpeä sisältävää, metanogeneeniä inhiboivaa, syötettä, voidaan näiden yhteisvaikutuksesta saada tuotettua enemmän VFA:ta kuin yksinään. Syötemateriaalilla voidaan kuitenkin nähdä vaikutus rasvahappojen koostumukseen, kun prosessiparametrejä (pH, lämpötila) muutetaan (Esteban-Gutiérrez ym., 2018).

Jankowska ym., (2017) tutkimuksessa todettiin kuitenkin materiaalien koostumuksen vaikuttavan rasvahappojen tuottoon hyvin vähän, verrattuna pH muutoksiin prosessissa. Tämä tulos on osittain ristiriidassa Yin ym., (2016) tulosten kanssa, jossa hiilihydraateista saatiin selkeästi enemmän VFA:ta kuin lipideistä.

3.4.5 Esikäsitteilyt

Biokaasulaitoksessa esikäsitteilyllä yleensä tarkoitetaan syötteen käsitteilyä ennen sen siirtämistä reaktoriin. Yleensä tavoitteena on syötteen metaanintuoton ja hygieenisyyden parantaminen (Tampio ym., 2015). Esikäsitteily usein myös homogenisoi syötteen, jolloin biokaasuprosessista tulee helpommin hallittava syötteen pysyessä tasalaatuisena. Biokaasulaitoksessa syötettä voidaan mm. esikäsitellä mekaanisesti, kemiallisesti tai termisesti (Kangas ym., 2011, s. 19).

Mekaaninen esikäsitteily tarkoittaa usein murskausta, jossa palakokoa pienennetään. Palakoon pienentyessä sen pinta-ala kasvaa ja samalla vapautuu solun sisäisiä aineita helpommin liukoiseen muotoon (Kangas ym., 2011, s. 19). Palakoko ei kuitenkaan vaikuta metaanintuottoon kuin tiettyyn pisteeseen saakka, eivätkä murskauskokeista saadut tulokset optimaalisesta palakoosta ole täysin yhdenmukaisia (Lehtomäki, 2006).

Kemiallisessa esikäsitteilyssä syötettä käsitellään erilaisilla kemikaaleilla. Emäksisillä esikäsitteilyllä ja entsyymikäsitteilyllä on huomattu selkeää etua, kun syötteenä oli säilörehua (Lehtomäki, 2006). Myös happokäsitteily rikkoo ligniinisen syötteen sidoksia lisäten metaanintuottoa (Li ym., 2010).

Terminen esikäsitteily tarkoittaa lähinnä lämpökäsitteilyä. Laitoksissa, jossa on hygienisointivaatimuksia, tapahtuu lämmitys samalla kuin hygienisointi. Suomessa hygienisoinnilta vaaditaan vähintään 1 h 70 °C partikkelikoon ollessa alle 12 mm (Luostarinen, 2013, s. 14). Yhdyskuntalietteilä lämpökäsitteilyn on todettu vaikuttavan positiivisesti sekä biokaasun päiväkohtaiseen tuottoon että metaanipitoisuuteen (Ennouri ym., 2016). Kuitenkin lämpökäsitteily saattaa vapauttaa myös mädätysprosessia inhiboivia tuotteita, kuten Maillard yhdisteitä (Tampio ym., 2014).

3.4.6 Laboratoriossa käytettäviä ympyrien esikäsitteilymenetelmiä

Käytettäessä biokaasulaitoksen mädätettä happomädätyksen ympyrinä, on sen mikrobipopulaatiota muokattava happojentuotantoon sopivaksi. Se onnistuu esimerkiksi erilaisilla esikäsitteilyillä tai muokkaamalla reaktorissa olevia olosuhteita sellaiseksi, että siellä pärjäävät vain tietyntyyppiset mikrobit. Tavoitteena on estää mädätysprosessia etenemästä

metaanogeenisivaiheeseen ja näin estää metanogeenijä käyttämästä rasvahappoja metaaniksi. Esikäsitteilyjä voidaan tehdä joko näytteelle, ympille tai molemmille. Tyypillisimpiä esikäsitteilyjä ympille on lämpö, pH-säätö, ilmastus, jäädytys ja ultraäänikäsitteily. Ymppien käsittelyt saattavat kuitenkin vaikuttaa myös syötteiden hajoamispolkuihin, jolloin saman syötteen lopputuotteet poikkeavat toisistaan sen mukaan, minkälaista esikäsitteilyä on käytetty (Ghimire ym., 2015).

Ymppiä voidaan muokata lämmöllä, jolloin lämpöön herkästi reagoivat metanogeenit tuhoutuvat ja jäljelle jää muita mädätykseen vaikuttavia mikrobeita (Pakarinen ym., 2008). Itiölliset mikrobit selviävät lämpökäsittelystä huomattavasti kasvullisia mikrobeita paremmin (Tampio ym., 2018). Venkata Mohan ym., (2008) kokeissa ymppiä keitettiin tunti 100 °C kun taas Pakarinen ym., (2008) kokeissa keittoaika oli 30 min. Näissä kokeissa haihtuvien rasvahappojen sijaan tutkimuksen kohteena oli vedyn tuotto, mutta vedyn osapaineen nousu kertoo metanogeenien toimimattomuudesta, joka on edellytys myös haihtuvien rasvahappojen kumuloitumiselle. Lämpökäsittely saattaa kuitenkin jättää jäljelle metaania muodostavia mikrobeita, joka huomattiin Ghimire ym., (2015) tutkimuksessa metaanikaasun muodostumisena pelkän vedyn ja hiilidioksidin sijaan. Myös Blasco ym., (2020) havaitsi tutkimuksessaan, että lämpökäsittelyn jälkeen suurimpien läsnä olevien bakteeriryhmien, *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae*, lisäksi läsnä oli kuitenkin myös *Methanobacterium* arkeoneja. Lämpökäsittelyllä saatetaan kuitenkin inhiboida myös happoja tuottavia mikrobeita, jolloin mädätyksen tuotantosuunta saattaa muuttua enemmän vedyn tuottoon kuin rasvahappoihin (Kidanu ym., 2017). Lämpökäsittelyn vaikutuksista haihtuvia rasvahappoja kuluttavien mikrobeiden deaktivointiin olisi syytä tutkia tarkemmin. Vedyn tuotantoa on tutkittu pidempään ja monesti happokokeiden suunnittelun pohjana on käytetty vetykokeiden tuloksia.

pH-muokkaus on yksi mahdollinen keino muokata mikrobiymppiä ja näytettä happofermentaatioon sopivaksi. Herkimpiä mikrobeita pH:n muutoksille ovat metanogeenit, jotka toimivat parhaiten 6,8–7,2 pH arvoissa. pH:n muokkaus voidaan suorittaa kemikaaleilla, jolloin lisäämällä reaktoriin happoa tai emästä pH säädetään halutulle tasolle (Jankowska ym., 2017). Vaihtoehtoinen tapa luoda happokäymiselle otolliset olosuhteet, on lisätä orgaanista kuormitusmäärää niin, että prosessissa muodostuu orgaanisia happoja

enemmän kuin metanogeenit ehtivät kuluttaa, jolloin pH alenee ja metanogeenien toiminta loppuu (Valdez-Vazquez & Poggi-Varaldo, 2009).

Ilmastus tapahtuu johtamalla ilmaa ympäriin, jolloin hapelle herkät mikrobit kuolevat. Ilmastuksen ei kuitenkaan tiedetä olevan yhtä tehokas menetelmä happojen muodostumiselle kuin lämpökäsittelyn ja myös ilmastuksen jälkeen voidaan happoreaktorissa havaita metaanin muodostumista (Giordano ym., 2014). Ilmastuksen vaikutuksesta prosessiin voidaan kuitenkin päätellä, ettei hapettomien olosuhteiden luominen esimerkiksi pullokokeissa ole alussa kovinkaan tarpeellista.

Jäädytys ja sulatus -menetelmällä pystytään horjuttamaan metanogeeniä (Wang ym., 2003). Vaikka metaanipitoisuuden on raportoitu laskeneen jäähdytys ja sulatus -käsittelöllä näytteellä neljä kertaa käsittelemätöntä näytettä matalammalle tasolle, on metanogeeniä havaittu olevan läsnä kokeen alusta lähtien (Phalakornkule ym., 2017).

Metaania muodostavat arkeonit voidaan deaktivoida myös käyttämällä kemiallista esikäsittelyä kuten 2-bromoethanesulfonate (BES) tai 2-mercaptoethanesulfonate (MES). Kemiallinen käsittely on erittäin tehokas keino estää metanogeeniä toimimasta, mutta ne saattavat vaikuttaa myös muiden kuin metaania tuottavien mikrobien toimintaan (Liu ym., 2011).

4 VFA-tuottopotentialin mittaamisen menetelmän kehitys

Mittausmenetelmän kehittämisen taustalla oli tarve tutkia anaerobisessa prosessissa syntyvien rasvahappojen muodostumista eri olosuhteissa ja eri materiaaleissa olevaa potentiaalia.

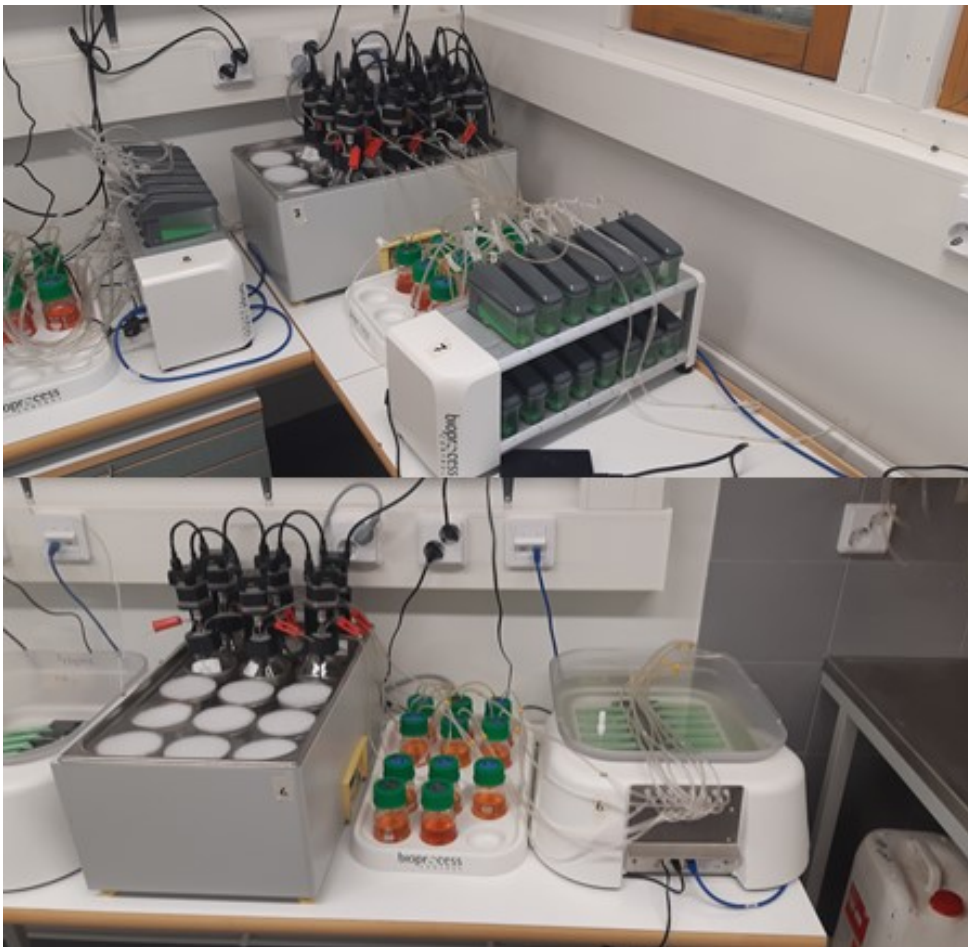
4.1 Laitteisto

Kokeet suunniteltiin tehtäväksi olemassa olevilla biologisen metaanintuottopotentialin mittauslaitteistolla AMTPS II (Bioprocess Contror AB, Ruotsi). Laitteet ovat suunniteltu biokaasun tai biometaanin mittaamiseen laboratoriomittakaavan pullokokeissa. Käytössä oli viisi AMTPS II laitetta sekä yksi vanhempi AMTPS I laite. Myöhemmissä kokeissa luovuttiin

AMTPS I ja yhdestä AMTPS II laitteesta ja näiden tilalle tuli kaksi Gas Endeavour (Bioprocess Control AB, Ruotsi) laitetta (Kuva 2).

Kuva 2

Koelaitteistot. AMTPS Endeavour (yllä) ja AMTPS II (alla).



Jokainen mittausyksikkö koostui 15 kalibroidusta 8–9 ml tilavuudeltaan olevasta solusta, jotka avautuivat täytyttyään kaasusta. AMTPS I ja II laitteissa soluille oli yhteinen vesiallas, jonka pohjalla solut sijaitsivat. Gas Endeavour laitteissa jokainen solu sijaitsi omissa astiassaan, joka täytettiin vedellä. Näin jokaisen pullon tuottama kaasu pystyttiin tarvittaessa analysoimaan erikseen. Laitteet tallensivat jokaisen solun avautumisen ja

lähettivät tiedon verkkoon käyttäen Ethernet-kaapelia. Laitteiston ohjaus ja tulosten lataus tapahtui selainpohjaisen käyttöjärjestelmän kautta. Ohjelmisto normalisoi kaasutulokset automaattisesti ideaalikaasulain mukaan (0 °C, 101.32 kPa). Tässä työssä ei kuitenkaan kiinnitetty huomiota kaasun mittauksiin vaan laitteistosta hyödynnettiin vain sekoittajia ja lämpöhauteita.

Laitteistoon kuului mittausyksikön lisäksi 500 ml borosilikaattilasia olevat reaktoripullot (VWR Collection), reaktoripulloihin kiinnitettävät sekoittajan korkit sekä tietokoneohjatut sekoittajat. 15 paikkaiset lämpöhauteet joihin reaktoripullot sijoitetaan sekä 100 ml lasipullot CO₂ absorbointia varten.

4.2 Mikrobymppien esikäsittely

Karkeassa esikäsittelyssä mikrobymppi siivilöitiin 1 mm x 1 mm siivilän läpi (Kuva 3), jonka tarkoituksena oli poistaa siinä oleva hajoamaton materiaali (luut, muovipussit yms.). Karkean esikäsittelyn jälkeen ymppeä käsiteltiin erilaisilla menetelmillä (lämpökäsittely, pakastaminen ja pH:n säätö), tavoitteena eliminoida haihtuvia rasvahappoja käyttävät metanogeenit, jotka ovat herkempiä käsittelyille kuin rasvahappoja muodostavat bakteerit.

Kuva 3

Ympin karkea esikäsittely



Lämpökäsittelyssä ymppeä lämpökäsiteltiin 100 °C:ssa 30 min keittolevyllä (Blasco ym., 2020). Lämpötilan nousua monitoroitiin lämpömittarilla (Kuva 4). Kattiloiden koot olivat ensimmäisissä kokeissa 7 litraa ja myöhemmissä kokeissa 15 litraa.

Pakastaminen tapahtui -20 °C lämpötilassa 24 h ajan (Dong ym., 2010; Ting & Lee, 2007). Ymppe jaettiin 0,5 l pakasterasioihin ja ne sijoitettiin vuorokaudeksi pakkahuoneeseen (-20 °C). Yhteen rasiaan asennettiin lämpömittari, jolla pystyttiin havainnoimaan lämpötilaa lietteen sisällä. Ymppe annettiin jäätyä 24 h siitä hetkestä, kun todettiin näytteen olevan jäässä kokonaisuudessaan. Tämän jälkeen näytteet otettiin sulamaan jääkaappiin (4 °C) ja niiden annettiin olla siellä 9 vuorokautta ennen kokeen aloitusta. Kun ymppeet olivat sulaneet, otettiin niistä näytteet analyysiin.

pH-säätö tapahtui pulloissa kokeen alituksessa. Kun reaktoripulloihin oli ladattu syötteen ja ymppe, seoksen pH säädettiin 5,0–5,5 käyttäen 3 M HCL-liuosta. Ylikuormitusta käytettäessä reaktoripulloihin ladattiin näytettä niin suuri määrä, että prosessi itsessään huolehti pH:n laskusta metanogeneille epäsuotuisaksi.

Kuva 4

Ympin lämpökäsittely



4.3 Metaanintuottopotentialiaali-laitteiston käyttö happofermentaatiokokeissa

Kaikkien kokeiden valmistelu ja toteuttaminen tapahtui samankaltaisesti. Koekohtaiset, poikkeavat muutokset on raportoitu varsinaisten, kokeista kertovien kappaleiden yhteydessä.

Koetta edeltävinä päivinä käytettävät pullot valmisteltiin merkitsemällä ne tarroilla (Kuva 5). Tarroista kävi ilmi pullojen sisältö sekä päivät, jolloin ne lopetetaan. Tämän lisäksi tarroihin kirjattiin selvyuden vuoksi paikkanumerot pullojen koneeseen asettelua varten sekä analyysinumero jatkoanalyysiin. Laboratoriotilaan valmisteltiin käynnistyksessä tarvittavat

esineet kuten lusikat, vaa'at ja dekantterit. Myös hiilidioksidin poistoon kaasusta käytettävä natriumhydroksidi liuos valmistettiin koetta edeltävänä päivänä.

Kuva 5

Valmiiksi tarroitetut pullo



Kokeet aloitettiin kaatamalla kontrollipulloihin kuhunkin kokeeseen valittua käsittelemätöntä ymppeä. Tämän jälkeen näytepulloihin kaadettiin koesuunnitelman mukaan käsiteltyä ymppeä. Yksi koepullo kerrallaan pullo aseteltiin vaa'alle, jonka tarkkuus on 0,01 g ja niihin kaadettiin ymppeä 0,02 g tarkkuudella. Tämän jälkeen pullo otettiin uudelleen käsittelyyn ja lämpö- ja pakkaskäsiteltyä ymppeä sisältäviin pulloihin lisättiin ionivaihdettua vettä niin paljon, että kokonaismassaksi saatiin 400 g. Näytepulloihin lisättiin ensin näytettä ja tämän jälkeen lisättiin sama määrä ymppeä kuin kontrollipulloihinkin (Kuva 6).

Kuva 6

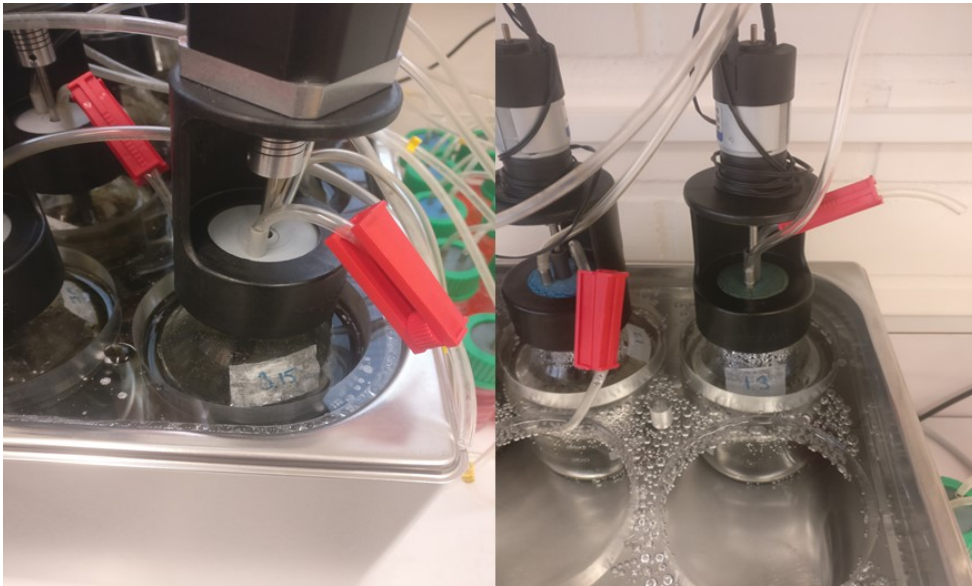
Näytepullojen valmistelu



Seuraavaksi pullojen sisällöistä mitattiin pH, jonka jälkeen ne suljettiin AMTPS II tai AMTPS I korkilla (Kuva 7). Pullojen päälle kierrettiin automaattiset sekoittajat ja pullo asetettiin vesihautisiin merkityille paikoilleen. Korkeissa on kaksi kaasuyhdettä, joista toiseen asetettiin huuhteluletku ja toiseen letku, jonka toinen pää liitettiin Kuva 8 näkyviin CO₂-sitouttamisyksiköihin. Tässä vaiheessa reaktoripulloihin syötettiin huuhteluletkusta typpikaasua (N₂) jonka tarkoituksena oli syrjäyttää pulloissa oleva happi ja tehdä näin olosuhteet sopivaksi anaerobisille mikrobeille. Kaasuhuuhtelun jälkeen CO₂-sitouttamisyksikköön kiinnitettiin letku vielä kaasunmittauslaitteistoon. Vesihauteiden vesimäärä tarkistettiin, jonka jälkeen lämmitys haluttuun lämpötilaan käynnistettiin.

Kuva 7

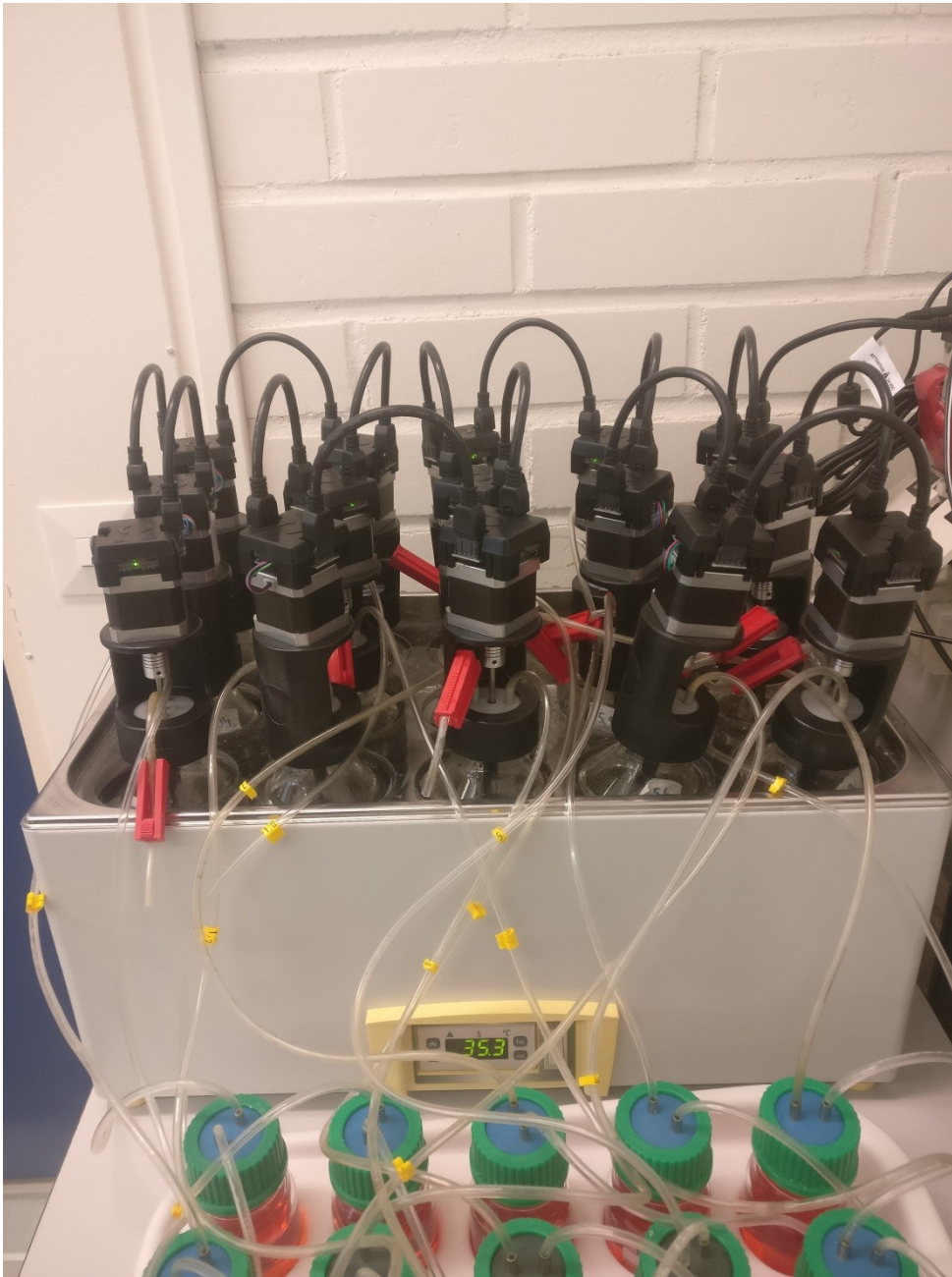
Sekoittajan korkit. AMTPS II oikealla ja AMTPS I vasemmalla.



Sekoittajien moottorit kytkettiin lyhyillä johdoilla toisiinsa ja lopulta pidemmällä johdolla ohjausyksikköön, joka säätelee sekoittajien toimintaa (Kuva 8). Ohjausyksikkö on yhteydessä kaasunmittausyksikköön, joka tallentaa tiedot verkon välityksellä serverille. Sekä mittauksia että moottoreiden toimintaa voidaan säätää selainpohjaisella ohjelmalla omalta tietokoneelta. Moottoreiden nopeudeksi asetettiin 84 kierrosta minuutissa. Samalla ohjelmaan tallennettiin näytteiden nimet ja mittaus käynnistettiin.

Kuva 8

Pulloihin kytketyt sekoittajat ja letkut



Kokeissa käytettiin Venkata Mohan ym., (2008) asettelusta muokattua järjestelyä, jossa samanaikaisesti aloitettuja koepulloja lopetettiin eriaikaisesti koesuunnitelman mukaisesti. Näin prosessin etenemistä pystyttiin seuraamaan analysoimalla rasvahappojen määrää lopetetuissa pulloissa. Kokeen edetessä rinnakkaisia pulloja lopetettiin aina jokaisen seoksen

yhdet rinnakkaiset (3 kpl) pullo kerrallaan. Näytteenotossa lopetettavien pullojen kaasunmittaus sammutettiin ja sekoitus kytkettiin pois päältä. Tämän jälkeen pullo irrotettiin laitteistoista ja vesihauteisiin lisättiin ionivaihdettua vettä pullojen tilavuutta vastaava määrä.

4.4 Analyysit

Ennen kokeen alkua materiaaleista mitattiin VFA, kuiva-aine (TS) ja VS. Ennen pullojen kiinnittämistä laitteisiin, jokaisen pullon sisällöstä mitattiin pH. Jokaisen päätettävän pullon sisällöstä tehtiin samat analyysit. Näin saatiin selville pullojen sisällöissä kokeen aikana tapahtuneet muutokset. pH mittaus tapahtui käyttämällä kannettavaa VWR pH110 mittaria (VWR, International). VS ja TS mittaus suoritettiin SFS3008 standardin mukaisesti (SFS3008, 1990). VFA-analyysiä varten näytteet esikäsiteltiin lisäämällä 4 g näytettä, 2 ml vahvaa muurahaishappoa ja 0,5 ml kyllästettyä elohopeaa 50 ml sentrifugointiputkeen. Liuos laimennettiin 40 ml de-ionisoitua vettä. Tämän jälkeen näyteputkea sekoitettiin 1 min Vortex sekoittimella ja 1 h keinusekoittimella. Sekoituksen jälkeen näytteet sentrifugoitiin (1831x g, 10 min), jonka jälkeen nestefaasi vedettiin ruiskusuodattimen (Gromafil GF/PET-20/25) läpi. Tämän jälkeen haihtuvat rasvahapot määritettiin käyttäen HP 6890 kaasukromatografia. Kaasukromatografissa oli 10 m x 0.53 mm x 1 µm HP-FFAP kolonnia (Agilent Technologies, USA) yhdessä FID-detektorin ja helium-kantajakaasun kanssa. Kromatografian uunin lämpötila oli 60–78 °C nousunopeudella 25 °C/min. Minuutin isoterminen vaihe, jonka jälkeen uunin lämpötila nousi 150 °C nopeudella 7,5 °C/min. Tämän jälkeen uunin lämpötila nousi vielä 180 °C nopeudella 25 °C/min. Injektorin ja detektorin lämpötila oli 220 °C ja 280 °C.

4.5 Kokeiden kulku

4.5.1 Koe 1, koejärjestelyn keston määrittämiseksi

Syötemateriaalina kokeissa käytettiin Loimi-Hämeen seudulta erilliskerättyä biojätettä (Envor, Forssa). Ennen analyysijä biojäte esipuhdistettiin käsin poistamalla muovit, metallit ja muut kovat jätteeseen kuulumattomat materiaalit. Puhdistuksen jälkeen jätteet

kymmenen päivän aikana (Kuva 10). Biojäte oli samaa kuin Koe 1:ssä ja sitä oli pidetty pakastimessa (-20 °C) kokeiden välinen aika 7 kk.

Syötemateriaalin, ympin ja orgaanisen kuormituksen pysyessä samana, kokeeseen 2 tehdyt muutokset olivat kokonaiskeston muuttaminen 10 päivään ja näytteenottovälin tihentäminen. Kokeeseen suoritettiin ainoastaan lämpökäsittely, joka todettiin edellisessä kokeessa toimivimmaksi esikäsittelyksi.

Kuva 10

Kokeen 2 asetelma ja retentioajat.

RT	Ymppi	Ymppi+biojäte	Lämpökäsittely ymppi	Lämpökäsittely ymppi+biojäte
1 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
3 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
6 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
10 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○

Retentioaika (retention time, RT) eli viipymä kertoo, kuinka monta päivää näytteitä mädätetään.

4.5.3 Koe 3: prosessilämpötilan vaikutusten havaitsemiseksi haastavalla syötteellä

Koe 3 syötteenä käytettiin käytettyä ruokaöljyä (UCO) (Jussin Baari, Somero) jonka alkuperäinen koostumus oli 100 % rypsiöljyä. UCO:n tiedetään olevan hankala syöte biokaasureaktoreille, mutta sillä on korkea metaanintuottopotentiali (Ervasti ym., 2019; Marchetti ym., 2020). Jotta voidaan arvioida UCO:n hyödyntämismahdollisuuksia, pitää olla selvillä myös sen mahdollinen VFA-tuotto.

Ennen kokeen alkua käytetystä paistoöljystä siivilöitiin paiston yhteydessä öljyyn jääneet kiinteät hiukkaset 1x1 mm siivilällä. Ymppeä noudettiin Envorin biokaasulaitoksesta (Forssa), joka toimii mesofiilisessa (37 °C) lämpötilassa. Ymppeä säilöttiin ennen esikäsitteilyä jääkaapissa (4 °C) ja ruokaöljy pidettiin huoneenlämmössä. Ymppeä siivilöitiin 1x1 mm siivilällä ja keitettiin samoin kuin edellisessä kokeessa (Koe 2).

Koe 3 suoritettiin muuten aikaisemmin mainituilla laitteistoilla, mutta tässä kokeessa AMTPS I ja yksi AMTPS II laite korvattiin uudemmilla Gas Endeavour (Bioprocess Control, Ruotsi) laitteilla. Näytettä sisältäviin pulloihin mitattiin UCO:ta ymppeihin suhteella 0.5 gVS/gVS (Fierro ym., 2014). Laitteiston sekoitin asetettiin sekoittamaan 1 min/h nopeudella 84 rpm. Pullot sijoitettiin vedellä täytettyihin lämpöhauteisiin, joiden lämpötiloiksi asetettiin mesofiilinen 37 °C ja termofiilinen 53 °C (Esteban-Gutiérrez ym., 2018; Hao & Wang, 2015). Koepullojen lopetus tehtiin samalla aikataululla Koe 2:sen kanssa (Kuva 11).

Kuva 11

Kokeen 3 kokeen asetelma ja retentioajat.

RT	Mesofiilinen lämpötila			Termofiilinen lämpötila	
	Lämpökäsitelty ymppeä	Lämpökäsitelty ymppeä+UCO	Lämpökäsitelty ymppeä	Lämpökäsitelty ymppeä+UCO	
1 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
3 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
6 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
10 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○

Retentioaika (retention time, RT) eli viipymä kertoo, kuinka monta päivää näytteitä mädätetään.

4.5.4 Koe 4: erilaisen syötteen ja mikrobiympin käyttäytymisen selvittämiseksi

Tässä kokeessa mikrobiympinä käytettiin kuiva-mädätyslaitoksen perkolaationestettä. Neste otettiin Luken pilot-mittakaavan, Metener Oy:n valmistamasta, suotopetireaktorista. Näytteenä toimi Luken Jokioisten tutkimusnavetasta noudettu säilörehu. Säilörehu koostui timoteista ja nurminadasta suhteella 65/35. Rehu oli tehty ensimmäisestä sadosta 6-8.6.2018. Säilöntäaineena oli käytetty AIV Plus 2 (Eastman) ja käyttötavoitteena 5 l /tn tuoretta rehua.

Perkolaationeste keitettiin kuten edellisissäkin kokeissa, jonka jälkeen säilöttiin jääkaapissa (4 °C). Myös säilörehu säilöttiin jääkaapissa ennen kokeen alkua. Pullot täytettiin keitetystä ympillä ja rehulla suhteella 1 ja 2 gVS/gVS. Lopuksi pulloihin lisättiin ionisoitua vettä 400 ml asti. Pullojen pH laskettiin 5–5,2 käyttämällä 3 M HCL liuosta. Pullot sijoitettiin 37 °C lämpöhauteisiin ja kytkettiin automaattisiin metaaninmittauslaitteisiin. Näytteenotto suoritettiin Kuva 12 tavalla.

Kuva 12

Kokeen 4 asetelma ja retentioajat.

RT	Lämpökäsittely ymppi+pH-käsittely	Lämpökäsittely ymppi+rehu 1:1+pH- käsittely	Lämpökäsittely ymppi+rehu 1:2+pH- käsittely
1 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
3 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
6 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
10 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
13 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○
16 päivää	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○

Retentioaika (retention time, RT) eli viipymä kertoo, kuinka monta päivää näytteitä mädätetään.










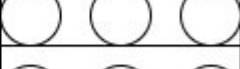


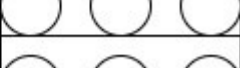





4.5.5 Koe 5: erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle

Syötteenä käytettiin päiväkodista (Helsinki, Viikki) kerättyä ruokajätettä. Ruokajätettä kerättiin kahtena päivänä, jolloin saatiin kaksi erilaista näytettä kokeisiin. Ensimmäinen ruokajäte (RJ1) sisälsi perunamuusia ja lihapullia ja toinen ruokajäte (RJ2) härkäpapurisottoa. Näytteet murskattiin tahnamaiseen muotoon yleiskoneella (Moulinex, Ovation 3) jonka jälkeen näytteet varastoititiin pakastimeen (-20 °C). Ennen koetta näytteet sulatettiin jääkaapissa (+4 °C). Mikrobympinä käytettiin täyden mittakaavan biokaasulaitoksesta noudettua mädätettä (Envor, Forssa). Ymppeä säilöttiin ennen esikäsittelyä jääkaapissa (+4 °C).

Kokeessa pulloihin ladattiin ympiä ja näytettä suhteella 2 gVS/gVS ja lisäksi vettä niin, että kokonaistilavuudeksi saatiin kaikkiin pulloihin 400 ml. Tämän jälkeen seoksen pH muokattiin 5–5,5 käyttämällä 3 M HCL-liuosta. Lopetukset pulloista tapahtui Kuva 13 mukaisella tavalla.

Kuva 13

Kokeen 5 asetelma ja retentioajat

RT	Ymppi+pH-käsittely	Ymppi+RJ1+pH-käsittely	Ymppi+RJ2+pH-käsittely
1 päivää			
2 päivää			
3 päivää			
6 päivää			
8 päivää			
10 päivää			









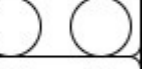


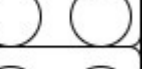


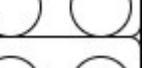


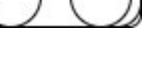
Retentioaika (retention time, RT) eli viipymä kertoo, kuinka monta päivää näytteitä mädätetään.

4.5.6 Koe 6: erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle

Ruokajätteet kerättiin samasta päiväkodista kuin kokeen 5 näytteet (RJ3 ja RJ4). Päiväkodissa tarjoiltu ruoka oli samaa kuin ensimmäisessäkin kokeessa ja sen käsittely tehtiin samankaltaisesti kuin kokeessa 5. Ymppi noudettiin biokaasulaitokselta (Envor, Forssa) ja säilytettiin jääkaapissa ennen kokeen alkua. Lopetukset tapahtuivat Kuva 14 mukaisella tavalla. Tässä ruokajättekokeessa emme muokanneet pullojen pH:ta vaan loimme metanogeenille epäsuotuisat olosuhteet ylikuormittamalla reaktorin lataamalla pulloihin näytettä ja ympiä suhteella 3 gVS/gVS.

Kuva 14

Kokeen 6 asetelma ja retentioajat

RT	Ymppi	Ymppi+RJ3	Ymppi+RJ4
1 päivää			
2 päivää			
3 päivää			
6 päivää			
8 päivää			
10 päivää			

Retentioaika (retention time, RT) eli viipymä kertoo, kuinka monta päivää näytteitä mädätetään.

5 Tulokset

5.1 Kokeiden suunnittelun ja toteuttamisen onnistuminen

Tuloksissa on käsitelty koekohtaisesti ensin kokeen suunnittelun ja fyysisen suorituksen onnistumista. Tämän jälkeen on tarkasteltu kokeen onnistumista VFA-analysien tulosten pohjalta ja lopuksi vertailtu kokeen luotettavuutta tarkastelemalla rinnakkaisten pullojen tuloksia keskiarvon ja keskihajonnan kautta. Luotettavuutta analysoidaan tarkkailemalla keskihajonnan arvoa. Luotettavuutta tarkkaillaan myös analysoitujen VFA-määrien trendillä.

5.1.1 Koe 1: koejärjestelyn keston määrittämiseksi

Ensimmäisessä kokeessa kokeiltiin VFA tuottoa maltillisella kuormituksella (0,5 gVS/gVS) kahdella eri esikäsittelemenetelmällä ilman pH muokkausta. Kokeessa 1 viipymäaika oli pitkä, (28 päivää) jolloin saimme pohjatietoa seuraavien kokeiden pituudelle ja maksimoimme orgaanisen aineen hajoamisen. Ympin esikäsitteilynä kokeessa 1 oli lämpö- ja kylmäkäsitteilyt, joista ensimmäiset ongelmat huomattiin lämpökäsitteilyn yhteydessä. Kattiloiden tilavuus oli 7 litraa ja ensimmäinen keittokoko 6 litraa. Lämpötilan noustessa ympin vaahdotus huomattavasti ja kattilaan jätetty paisumistila oli liian pieni, jolloin ympin kuohui yli ja vaahdotus jouduttiin kaatamaan erilliseen astiaan (Kuva 15). Lopulta 30 minuutin kiehumisen jälkeen ympinä oli jäljellä noin 2 litraa. Seuraavissa erissä kiehutettavan ympin määrä oli vain 2–3 litraa, joka varovaisen lämmönnoston seurauksena pysyi kattilassa, mutta samalla erän keittämiseen käytetty aika pidentyi. Huolimatta keitettävän materiaalin pienestä määrästä, vaati sen keittäminen silti jatkuvaa huomiota ylikuohumisen estämiseksi. Ympin kokonaistarve oli noin 30 litraa, joten keittoeriä syntyi useita ja aikaa kului arvioitua enemmän. Kylmäkäsitteilyn kanssa ei huomattu ongelmia.

Kuva 15

Keitettäessä ymppi kuohuu erittäin herkästi yli.

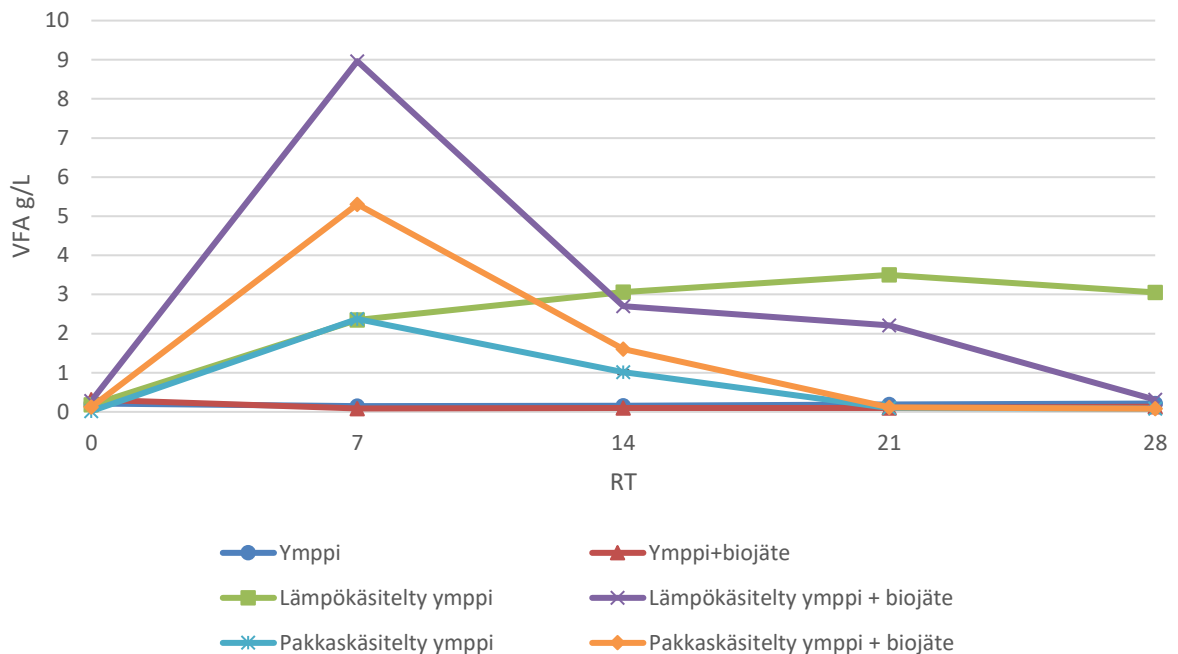


Sekä kylmäkasittelyllä että lämpökäsittelyllä pystyttiin häiritsemään metanogeneenejä kontrolliin verrattuna, mutta lämpökäsittely toimi selvästi paremmin. Suurin VFA määrä oli lämpökäsitelty ymppi+biojäte pulloissa seitsemäntenä päivänä aloituksen jälkeen. 14 päivän kohdalla VFA määrät näytteessä olivat jo selkeästi pienemmän kuin seitsemännen päivän kohdalla (Kuva 16). Tästä voidaan päätellä, että näissä olosuhteissa biojätteen hajoaminen haihtuviksi rasvahapoksi tapahtuu nopeasti ja lämpökäsittelyllä pystyttiin horjuttamaan metaanintuottoa ainakin 7 päiväksi mutta ei 14. Aikaisemmin Wang ym., (2014) ovat huomanneet, että mikrobympin ja ruokajättemädätteen kokonais-VFA määrä saattaa

lisääntyä vielä 17 päivän jälkeen. Ja pelkästään lämpökäsiteltyä ymppiä sisältäneet pulloet kuitenkin kerryttivätkin rasvahappoja vielä 21 päivän kohdalla. Kokeessa 1 näytteenottoväli olisi voinut olla tiheämpi, jolloin VFA:n kehittymisestä olisi saatu parempi kuva. On mahdollista, että biojätteen mukana pulloihin meni myös metanogeenejä, jotka aloittivat toimintansa seitsemännen päivän jälkeen. Käsittelemätöntä ymppiä sisältäneet pulloet keräsivät rasvahappoja kokeen aikana enimmillään 0,13 g/L.

Kuva 16

VFA pitoisuudet mädätteissä 28 vuorokauden mittausjakson aikana kokeessa 1



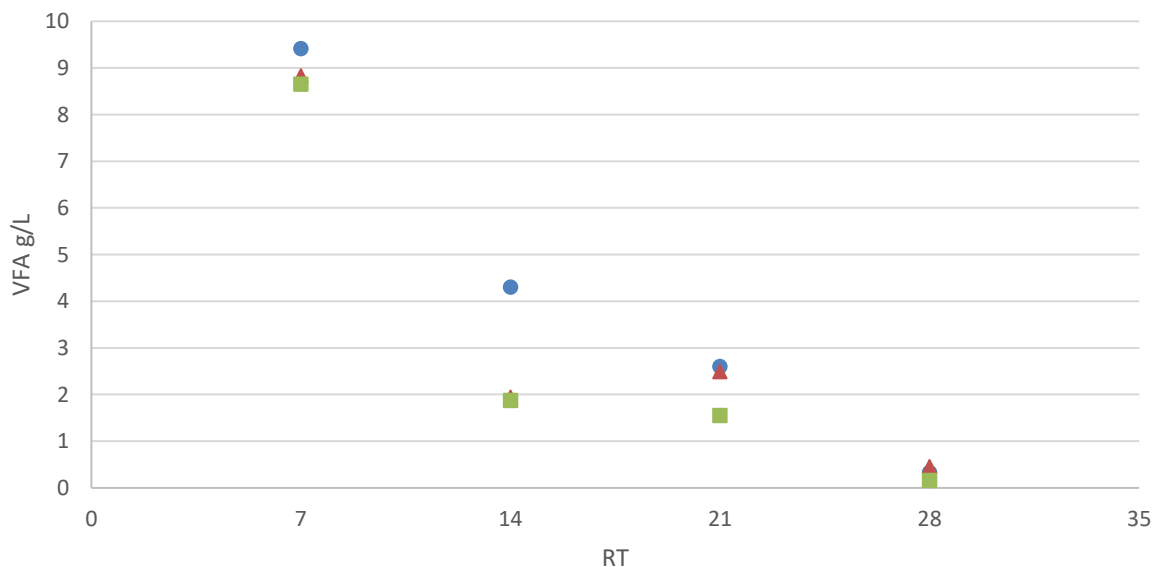
Reaktoripulloista mitatut pH arvot ennen kokeen aloitusta oli lämpökäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältäneissä pulloissa 9,3 ja pakkaskäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältävissä pulloissa 8,3. Lämpökäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältäneen pullojen pH oli 7 päivän kohdalla 6,8–7, mutta nousi tämän jälkeen kohti kahdeksaa. Pakkaskäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältäneiden pullojen pH:t olivat 7 päivän kohdalla noin 8 ja nousi tästä kokeen loppua kohden ollen lopussa noin 8,3. pH:n käyttäytyminen kokeen aikana vastaa hyvin pulloista mitattujen VFA arvojen kanssa. Seitsemännen päivän kohdalla happoja oli eniten ja

silloin myös pH arvo oli alhaisin. Lämpökäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältävien mädätteiden VFA määrä oli suurin, jolloin myös pH arvo oli alhaisin näissä näytteissä.

Rinnakkaisten pullojen sisältämän VFA:n vaihtelu oli pakkaskäsitellyissä näytteissä hyvin vähäistä ja keskihajonta vaihteli 0 ja 0,8 välillä. Kun keskiarvo suurimman hajonnan kohdalla oli 5,3 g/L ei hajontaa siis juurikaan ollut. Lämpökäsiteltyä ymppiä sisältävien näytteiden osalta vaihtelua oli jonkin verran. Biojätettä sisältävissä näytteissä suurin vaihtelu on 14 päivän kohdalla, jossa kaksi näytettä sisälsi VFA:ta 1,9 g/L, mutta kolmas erosi näistä selkeästi sisältäen VFA:ta 4,3 g/L (Kuva 17). Kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvo tässä pisteessä oli 2,7 g/L ja keskihajonta 1,4. VFA määrän laskevasta trendistä päätellen voidaan kuitenkin olettaa, että poikkeavan pullon VFA pitoisuus tulisi laskemaan seuraavaan näytteenottoon mennessä.

Kuva 17

Lämpökäsitellyn ympin ja biojätteen VFA-pitoisuudet mädätyksen aikana (kolme rinnakkaista pulloa)

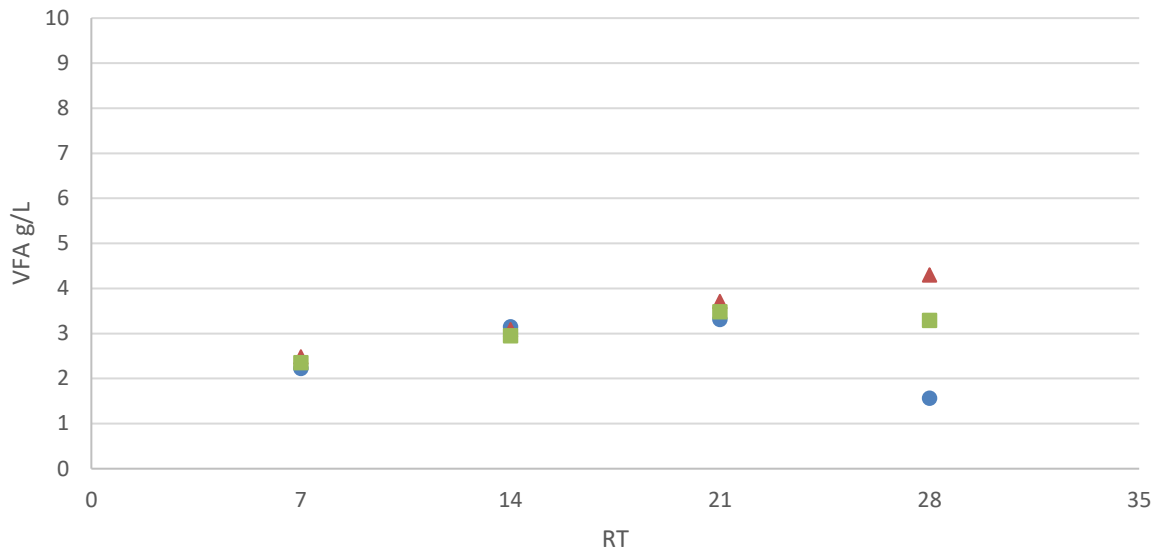


Pelkkää lämpökäsiteltyä ymppiä sisältävien pullojen hajonnat pysyivät pieninä kokeen viimeiseen näytteenottoon saakka (Kuva 18). Viimeisenä päivänä lopetettujen pullojen

hajonta olikin sitten suurempaa, kaikkien kolmen pullon tulosten poiketessa toisistaan. 28 päivän keskiarvo oli 3,1 g/L ja keskihajonta 1,4.

Kuva 18

Lämpökäsitellyn ympin VFA-pitoisuudet mädätyksen aikana (kolme rinnakkaista pulloa)

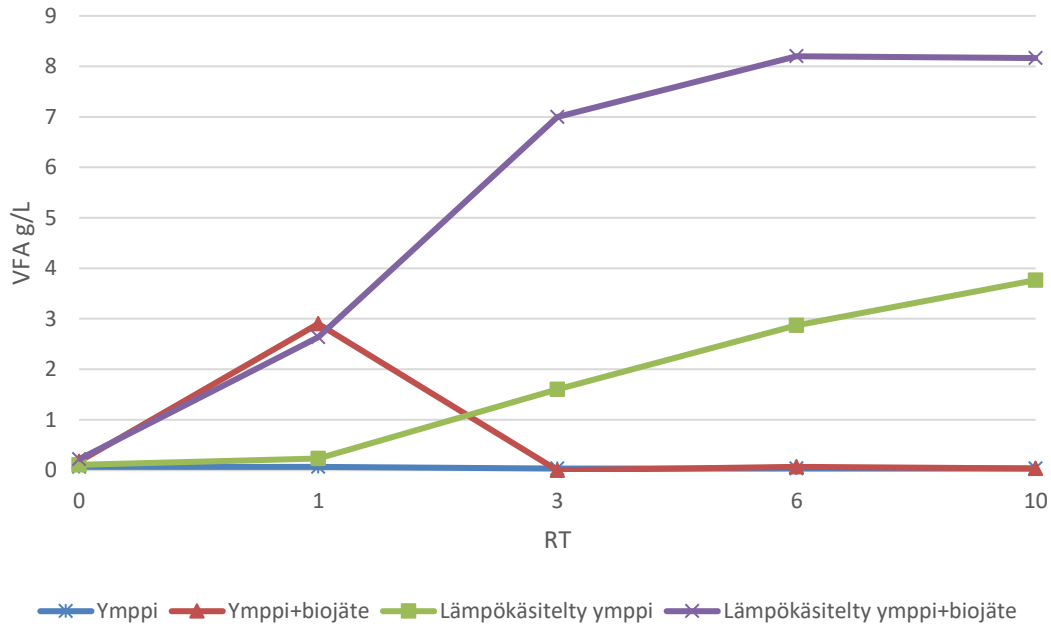


5.1.2 Koe 2: sopivien näytteenottopäivien valitsemiseksi

Tätä koetta varten hankittiin isompia kattiloita, jolloin ympin lämpökäsittely helpottui selvästi. Muita ongelmia ei kokeen kuluessa huomattu.

Kuva 19

VFA-pitoisuudet mädätteissä 10 vuorokauden mittausjakson aikana kokeessa 2



Haihtuvia rasvahappoja kuluttavien mikrobien toimintaa kyettiin viivästyttämään lämpökäsittelyllä kuten oli suunniteltu. Näin saatiin varmistus, että näillä parametreilla ja syöteaineella 10 päivän koe on riittävän pituinen. Suurin VFA:n kokonaistuotto saatiin 6 päivän kohdalla, jonka jälkeen metaanintuotto alkoi nousta ja VFA määrät pulloissa vähentyä (Kuva 19)

Ainoastaan lämpökäsitellyn ympin VFA-määrä oli isompi päivänä 10 kuin päivänä 6. Tämä saattaa johtua ympin sisältävän esim. lingiinipitoisen orgaanisen aineen hitaasta hajoamisesta, mutta se ei selitä sitä miksi lämpökäsitelty ymppi+biojäte pulloissa VFA:n määrä ei ole lisääntynyt. Yksi mahdollisuus on, että biojätteen mukana mennyt mikrobisto olisi hajoittanut ympin jäljellä olevaa orgaanista ainetta nopeammin ja antanut mikrobeille nopeamman kasvualustan kuin pelkkä ymppi. Biojätteen hajoaminen tapahtui hyvin nopeasti ensimmäisten päivien aikana, mutta VFA koostumuksessa tapahtui muutoksia vielä 10 päivän kohdalla etikkahappomäärän vähentyessä ja samanaikaisesti voi-, valeriaana- ja

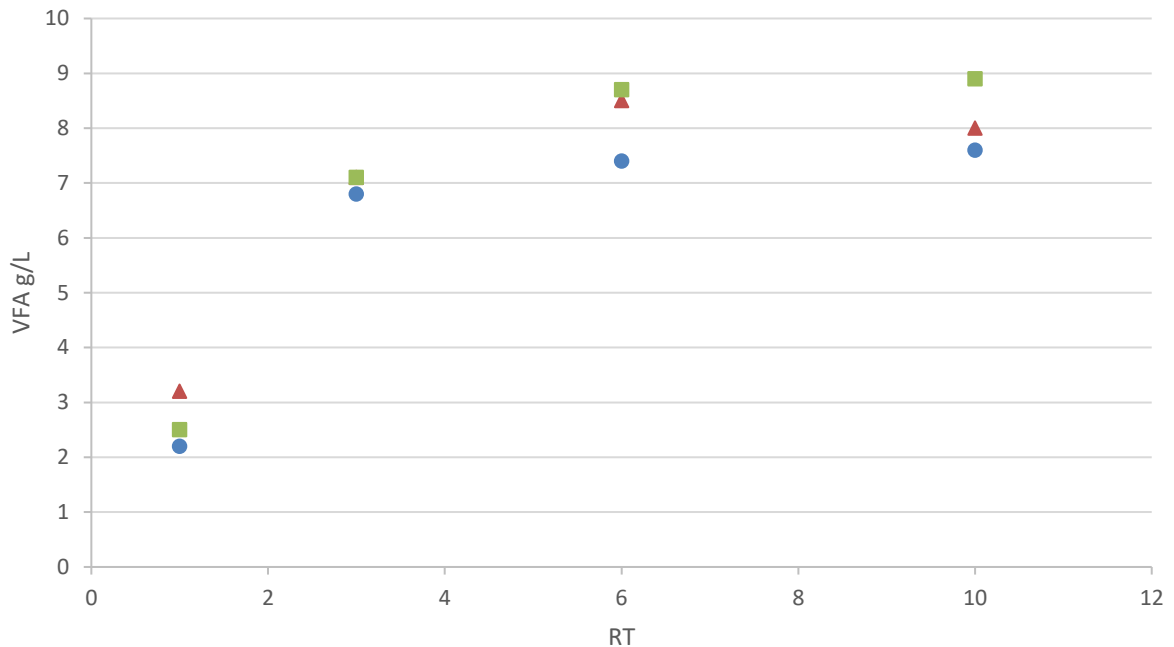
propionihappo-määrien noustessa (Tampio ym., 2018). Viipymäaika muuttamalla voidaan siis mahdollisesti muuttaa kokeen lopussa pulloissa vallitsevaa happokoostumusta.

Kokeen aikana lopetetuista pulloista mitatut pH:t mukailivat pulloista mitattuja VFA tasoja. Käynnistäessä lämpökäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältävien pullojen pH:t olivat 9,3, mutta jo ensimmäisenä näytteenottopäivänä pH oli tippunut noin 6,5. Alimmillaan tämän lämpökäsitellyn ympin ja biojätteen mädätteen pH oli noin 5,7 kuudennen päivän kohdalla. Kymmenennen päivän kohdalla pH oli jo nousussa ollen noin 6. Ymppiä ja biojätettä sisältävien pullojen pH laski ensimmäisen päivän näytteenottoon kolme kymmenystä, 7,6:sta 7,3:een, mutta nousi tämän jälkeen kolmannen päivän näytteenottoon jo takaisin 7,6:een.

Kokeen aikana lopetettujen rinnakkaisten pullojen VFA-määrät eivät juurikaan vaihdelleet. Suurinta hajonta oli pulloissa, jotka sisälsivät lämpökäsiteltyä ymppiä ja biojätettä (Kuva 20). Suurinta hajonta oli kuudennen päivän kohdalla keskihajonnan ollessa 0,7 ja keskiarvon 8,2 g/L. Lämpökäsiteltyä ymppiä ja biojätettä sisältävät pullo tuottivat kokonaismääräisesti eniten happoja, jolloin on odotettavaa, että niiden kohdalta myös keskihajonta oli suurinta.

Kuva 20

Lämpökäsitellyn ympin ja biojätteen VFA-pitoisuudet mädätyksen aikana (kolme rinnakkaista pulloa)

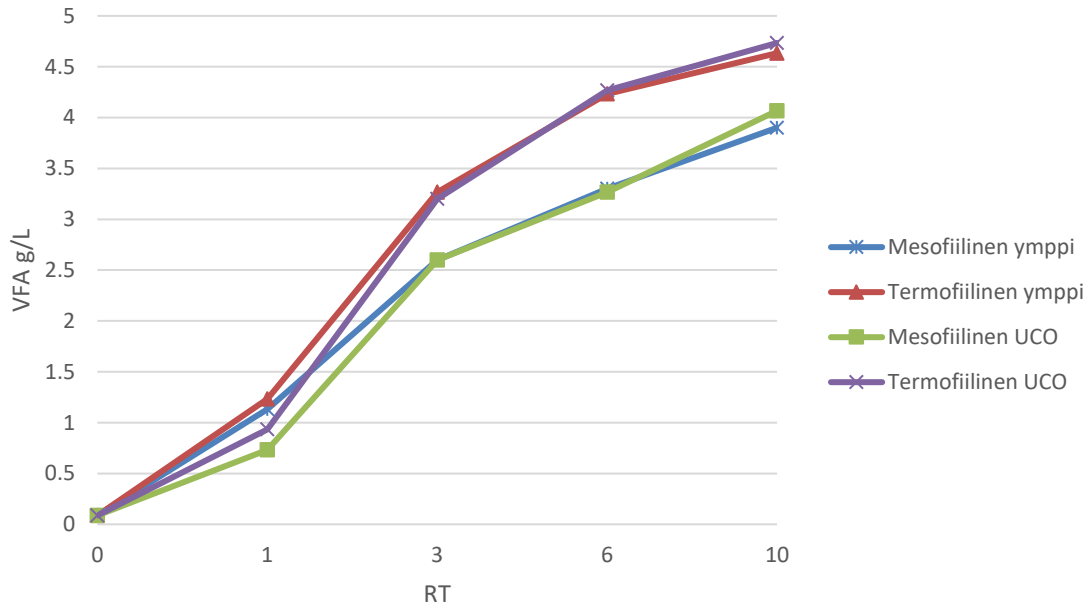


5.1.3 Koe 3: prosessilämpötilan vaikutusten havaitsemiseksi haastavalla syötteellä

Kokeessa käytettiin kokeen 2 pituutta ja näytteenottovälejä ja koe tehtiin sekä termo- että mesofiilisessä lämpötilassa. Kokeen toteuttaminen ei aiheuttanut ongelmia, mutta tulosten käsittelyn yhteydessä huomattiin, että olisimme tarvinneet lisää analyysyjä. UCO sisältää paljon pitkiä rasvahappoja (Marchetti ym., 2020). Analysoimalla pitkät rasvahapot, olisi kyetty näkemään pystyikö mikrobimme hajottamaan pitkiä rasvahappoja lyhyemmiksi kokeen aikana.

Kuva 21

VFA-pitoisuudet mädätteissä 10 vuorokauden mittausjakson aikana kokeessa 3



Termofiilisessa lämpötilassa olleet pulloet muodostivat VFA:ta nopeammin kuin mesofiilisessa lämpötilassa (Kuva 21). Myös kokonais-VFA määrä oli termofiilisessa prosessissa korkeampi kuin mesofiilisessa. Samankaltaisen tuloksen saivat myös Hao & Wang, (2015) tutkiessaan termofiilisen ja mesofiilisen prosessin eroa VFA tuotossa. Optimilämpötila voi kuitenkin olla riippuvainen syöttestä (Esteban-Gutiérrez ym., 2018). UCO-kokeessa varsinaisen näytteen VFA määrät jäivät kuitenkin hyvin pieniksi, kun pullojen kokonaistuloksesta oli vähennetty pelkän ympin tuottamat rasvahapot. Alussa UCO:ta sisältävät pulloet muodostivat jopa vähemmän rasvahappoja kuin pelkkää ympiä sisältävät pulloet, mutta kokeen lopussa näytepullojen VFA pitoisuudet olivat isompia kuin pelkkää ympiä sisältävien. Kokeen alun taantumavaihe UCO:ta sisältävissä pulloissa on samankaltainen kuin aikaisemmin raportoitu metaani tuotossa käytettyjen ruokaöljyjen kanssa (Hidalgo ym., 2015). He epäilivät metaanintuotossa esiintyvän taantumajan johtuvan nopeasta rasvahappojen muodostuksesta ja niiden inhiboivasta vaikutuksesta metanogeenille. Koska UCO kokeessa rasvahappoja ei syntynyt paljoa kokeen alussa, taantumavaihe tapahtui ennen asidogeneesin vaihetta. Tämä viittaa siihen, että inhibitio on tapahtunut muillekin mikrobeille kuin metanogeenille.

Kokeen pituutta olisi pitänyt pidentää, jolloin olisi voitu nähty öljyn maksimi VFA-tuotto. Nyt VFA määrä pulloissa oli kasvanut vielä kymmenentenäkin päivänä, eikä siis nähty rasvahappojen muodostumisen tasaantumista. Suurta rinnakkaisten pullojen välistä vaihtelua ei ollut havaittavissa ja keskihajonnat pullojen välillä jäivät alle 0,1. Myös pH:n muutos kokeen aikana oli hyvin maltillista. Tässäkin kokeessa pH laski rasvahappojen kehittymisen myötä. Termofiilinen ympä ja UCO laski 9,6:sta 8:aan. Mesofiilinen ympä ja UCO laski 9,6:sta 8,3:een.

5.1.4 Koe 4: erilaisen syötteen ja mikrobiympin käyttäytymisen selvittämiseksi

Kokeiden käynnistys ja itse fermentaatio onnistui ongelmitta. Näytteenoton yhteydessä kuitenkin huomattiin ongelmia. Pullot sisälsivät vain vähän rehua nesteeseen nähden, jolloin näytteen jakaminen eri analyyseihin tasapuolisesti osoittautui mahdottomaksi. Myös pullon sisällön homogenisointia jonkinlaisella myllyllä harkittiin, mutta murskauksen myötä näytteen VFA:t saattaisi haihtua. Tästä syystä pullojen sisällöt separoitiin siivilällä heti näytteenoton yhteydessä ja molemmista jakeista tehtiin erilliset analyysit, jotka laskettiin tuloksissa yhteen.

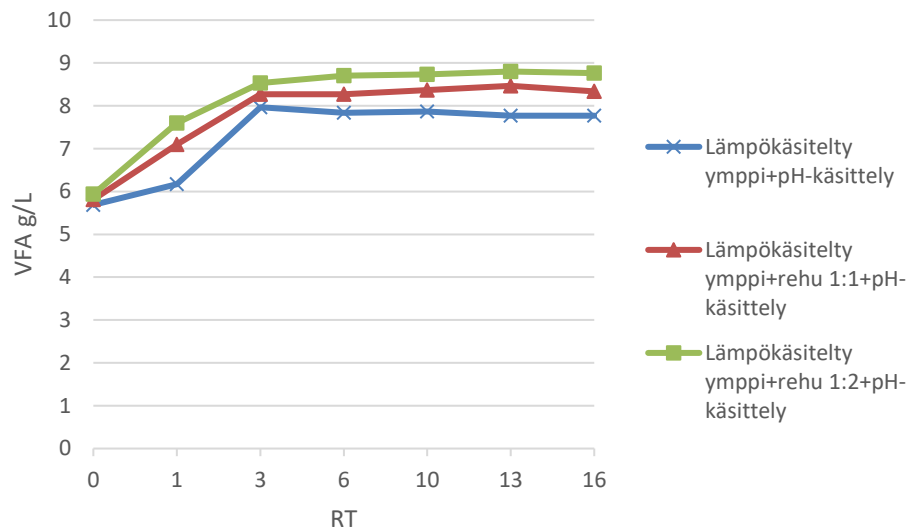
Säilörehu materiaalina on haastava, sillä se sisältää jo itsessään happoja, jotka vaikuttavat prosessiin (mm. maitohappo, muurahaishappo ja etikkahappo) (McDonald ym., 1991, ss. 184–185; Seppälä, 2014). Kokeessa kokeiltiin kahdella eri syötemäärällä etsiä oikeaa kuormitusta, jolla pystyttäisiin todentamaan mahdollisimman suuret VFA-määrät ja samalla pitkitettäisiin metanogeneesi vaiheen alkamista. Kokeeseen 4 kokeen kestoksi asetettiin 16 päivää, sillä ligniinipitoisen rehun hajoamisen oletettiin kestävän pidempään kuin kokeessa 2 käytetyn biojätteen (Mykkänen, 2008, s. 16).

Kokeen edetessä pulloissa muodostui VFA:ta aina 13 päivään asti, mutta 16 päivän näytteenotossa kokonais-VFA määrä oli kääntynyt laskuun molempien syötemäärien pulloissa (Kuva 22). Myös pH nousi viimeisessä näytteenotossa, joka kertoo happojen vähenemisestä pulloissa. Kokeessa siis onnistuttiin tuottamaan rasvahappoja ja myös kokeen pituudessa onnistuttiin näkemään maksimi kokonais-VFA tuotto, joka säilörehusta näissä olosuhteista saatiin. Kokeessa ympinä käytetty perkolaationesteen VFA pitoisuus oli hyvin korkea ja suurin osa kokonais-VFA määrästä onkin ympin mukana pulloon mennyttä.

Kuitenkin eri rehuseosten ja pelkkää ymppiä sisältäneiden pullojen välillä oli selkeä ero, joten myös rehusta saatiin tuotettua haihtuvia rasvahappoja.

Kuva 22

VFA-pitoisuudet mädätteissä 16 vuorokauden mittausjakson aikana kokeessa 4



Seuraavissa kokeissa pitäisi pyrkiä esikäsittämään näytettä niin, ettei sitä tarvitse jakaa näytteenotossa kuiva- ja märkäjakeeseen. Vaikka tässä kokeessa ei ongelmia ollutkaan, pitäisi myös pH:n säätö suorittaa tekemällä näytteseoksille titraus ennen varsinaisen kokeen aloitusta, jolloin saataisiin selville hapon oikea määrä. Suunniteltuun määrään nähden analyysit kaksinkertaistuivat ja se tulisi ottaa huomioon seuraavassa vastaavanlaisessa kokeessa. Lisäksi ympin sisältämä rasvahappojen määrä saattaa aiheuttaa ongelmia tulkittaessa huonosti hajoavia materiaaleja.

5.1.5 Koe 5: erilaisen esikäsittelyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle

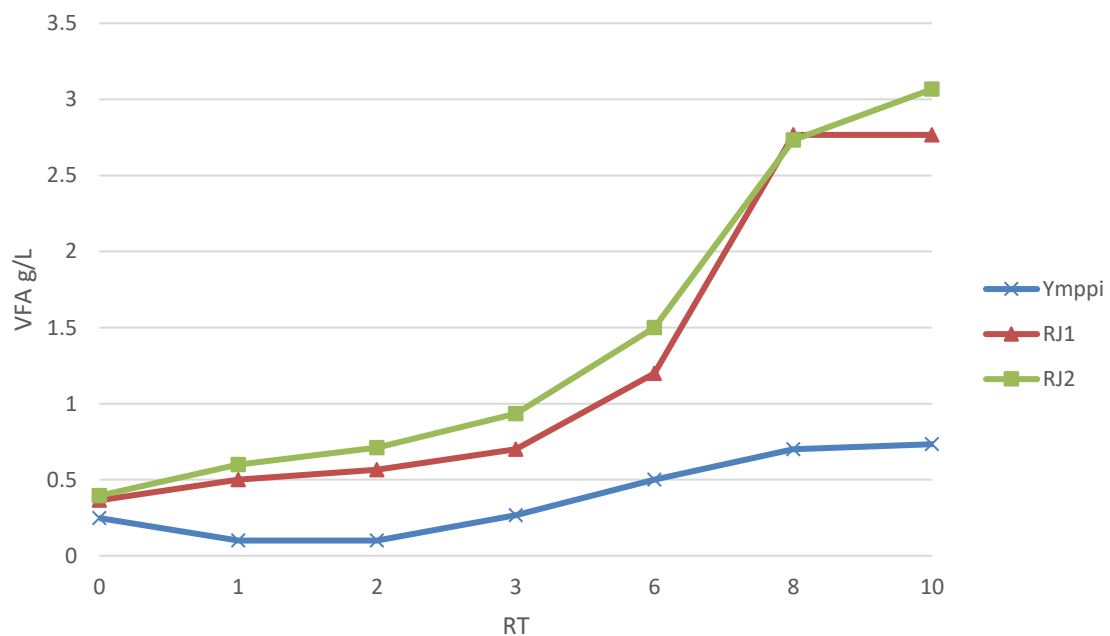
Kokeessa 5, syötteenä käytettiin päiväkodista (Helsinki, Viikki) kerättyä ruokajätettä. Kokeen käynnistyksessä ilmeni ongelmia HCL lisäyksen yhteydessä. Hapon lisäysmäärät olivat RJ1 23 ml, RJ2 31 ml ja Ymppi 29 ml, mutta jo 1 ml lisäyksellä syntyi vaahtoa, joka kuohui ulos pullosta. Happolisäys pulloihin suoritettiin pienissä erissä ja se vei ennalta suunniteltua

enemmän aikaa. Vaahdon vuotaessa yli pulloista, useita pulloja jouduttiin tekemään uudelleen. Yksi näyte tehtiin vain kahdella rinnakkaisella ympin loppuessa kesken. Kokeen käynnistyksen jälkeen ei ongelmia havaittu.

Ensimmäisen päivän lopetuksissa huomattiin pH arvon tippuneen 3,8. Näin alhainen pH lukema on epäedukas VFA tuotannolle, vaikka varsinkin etikkahappojen muodostumista on todettu muodostuvan alhaisissa pH arvoissa (Dogan ym., 2009). Toisena lopetuspäivänä pH aleni vielä molemmilla näytteillä arvoon 3,6, kunnes kahdeksantena päivänä sen huomattiin kääntyvän nousuun ja viimeisenä, kymmenentenä, päivänä lukema oli 3,8. Ymppipulloissa pH vaihteli välillä 5,1–5,5. pH lasku tapahtui molemmilla näytteillä nopeasti, ympin pH:n pysyessä sille asetetulla tasolla. Tässäkin kokeessa haihtuvia rasvahappoja muodostui, vaikka määrät jäivät pieniksi (Kuva 23). Eniten happoja kertyi RJ 2 pulloissa kymmenentenä päivänä (3,1 g/L).

Kuva 23

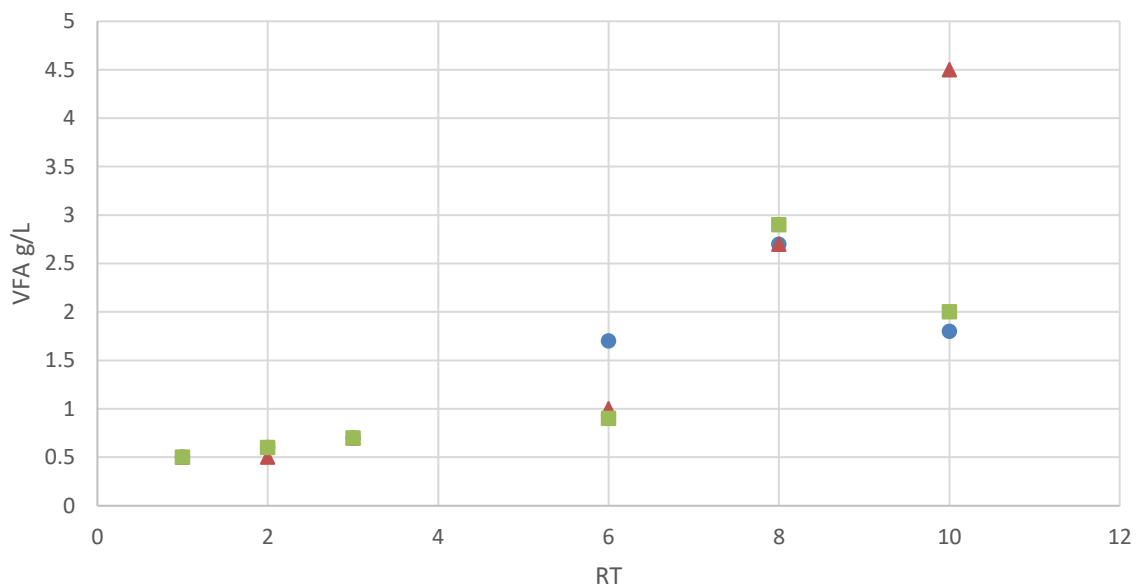
VFA-pitoisuudet mädätteissä 10 vuorokauden mittausjakson aikana kokeessa 5



Pelkkää ymppeä sisältävissä rinnakkaisissa pulloissa ei juurikaan ollut hajontaa. Sen sijaan ruokajätettä sisältävissä pulloissa hajontaa havaittiin (Kuva 24 ja Kuva 25). Molemmilla ruokajätteillä hajontaa havaittiin, mutta suurinta hajontaa oli RJ1 mädätteissä kymmenennen päivän kohdalla, nostaen keskihajonnan yli 1.5. Tässä kohtaa yhden mädätteen arvo oli selkeästi muista poikkeava. Tämän yhden pullon kohdalla happojen määrän kehitys ei ollut kääntynyt laskuun, vaan se olisi vaatinut pidemmän kokeen. Tässä kohtaa pulloissa selkeästi tapahtui paljon muutoksia, josta johtuu suuri hajonta. Tehdessä tilastollisia laskelmia kannattaa kaikkien pullojen happopitoisuudet ottaa kuitenkin mukaan, jolloin keskiarvo kuvaa parhaiten joukon monimuotoisuutta. RJ2-pulloissa hajonta taas oli tasaista 6, 8 ja 10 päivän näytteenotossa. Mitatuissa arvoissa oli selkeästi sama trendi ja tämän näytteen hajonnat hyväksyttäviä.

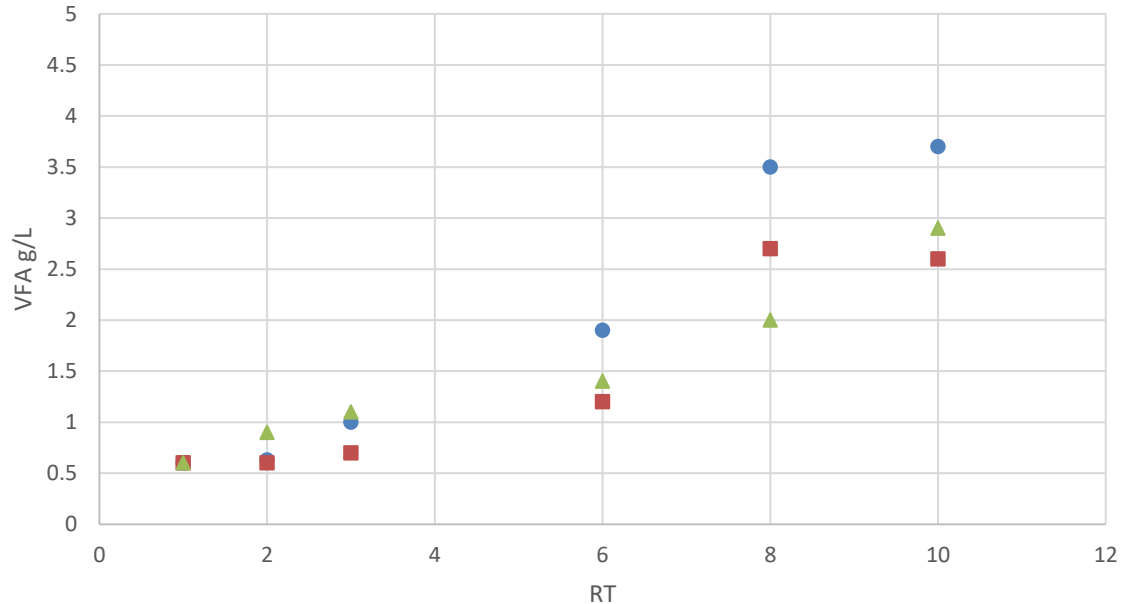
Kuva 24

RJ1 näytteen VFA-pitoisuudet mädätyksen aikana (kolme rinnakkaista pulloa)



Kuva 25

RJ2 näytteen VFA-pitoisuudet mädätyksen aikana (kolme rinnakkaista pulloa)



Nopeasti laskenut pH heti kokeen alussa ilman lyhyiden rasvahappojen nousua kielii muiden orgaanisten happojen kasvusta näytteissä. Tällaisia anaerobisessa prosessissa muodostuvia happoja ovat mm. pitkäketjuiset rasvahapot (LCFA), joita ei tästä kokeesta analysoitu (Dasa ym., 2016). Tämän kokeen tarkoituksena oli tutkia haihtuvien rasvahappojen kehittymistä eikä analyysilistalta tästä syystä löytynyt tarvittavia analyysijä prosessissa syntyvien tuotteiden karakterisointiin. Käytännön kannalta koe onnistui hyvin, vaikka prosessiteknisesti se ei kovin onnistunut ollutkaan. Seuraavaa koetta varten saimme tarvittavaa tietoa siitä, miten tämänkaltainen syöte reagoi tällä kuormituksella ja esikäsitteilyllä.

5.1.6 Koe 6: erilaisen esikäsitteilyn vaikutuksen havaitsemiseksi ruokajätteelle

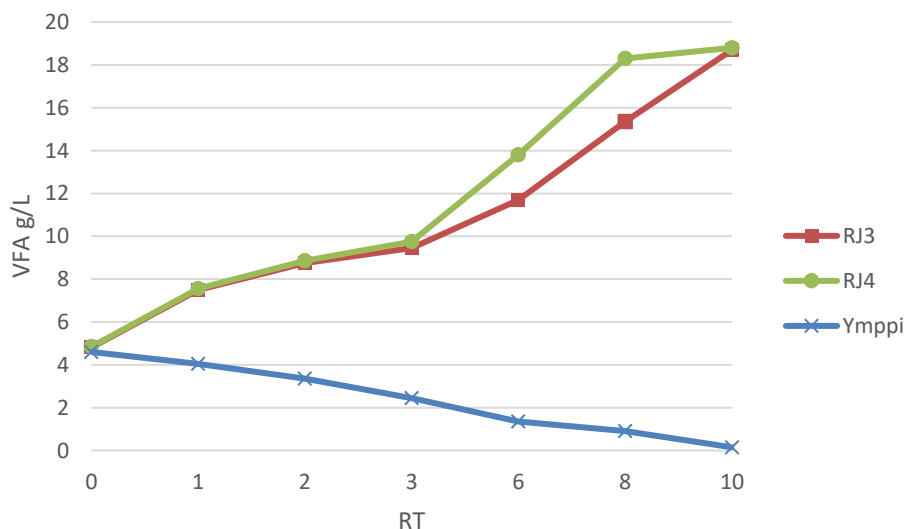
Koe 6 tehtiin samankaltaisilla syötteillä kuin koe 5, mutta käsitteilyä muutettiin niin, ettei pH:ta muokattu ennen kokeen alkua. Tällä kertaa ajankohdaksi määräytyi kuitenkin hiihtolomaviikko, joten näytettä ei saatu tarvittavia määriä, vaan kokeet jouduttiin

suorittamaan vain kaksilla rinnakkaisilla pulloilla. Muuten kokeiden toteuttaminen onnistui hyvin.

Kokeen aikana VFA-määrä pulloissa oli kasvanut jokaisen näytteenoton yhteydessä. Korkeimmat arvot mitattiin kymmenennen päivän näytteenotossa, jossa VFA-määrät olivat 18,7 g/L (RJ3) ja 18,8 g/L (RJ4) (Kuva 26). Pelkkää ymppiä sisältävien pullojen osalta VFA-pitoisuus laski koko kokeen ajan. Tämä on ymmärrettävää, koska kokeessa ei käytetty minkäänlaista esikäsitteilyä ympille, vaan epäsuotuisat olosuhteet metanogeenille luotiin syötteen ylikuormituksella. Ympin kohdalla ylikuormitusta ei ollut, joten metanogeenit pystyivät käyttämään ympissä olleen orgaanisen aineen metaaniksi ja hiilidioksidiksi.

Kuva 26

VFA-pitoisuudet mädätteissä 10 vuorokauden mittausjakson aikana kokeessa 6



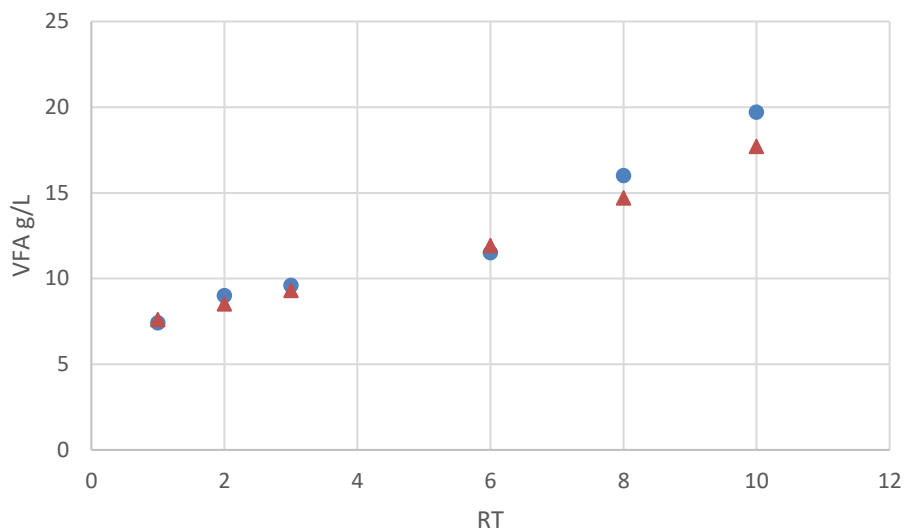
Tarkasteltaessa kokeen onnistumista kumulatiivisten VFA-tulosten kautta kokeemme oli sekä onnistunut, että epäonnistunut. Saimme tuotettua edellisiin kokeisiin nähden yli kaksinkertaisen määrän haihtuvia rasvahappoja. Pääosin etikkahappoa, mutta myös kaikkia muita VFA-happoja oli havaittavissa. Kokeen aikana emme kuitenkaan nähneet pistettä,

jolloin happojen kumuloituminen loppuu, joten pidentämällä kokeen aikaa olisi ollut ehkä mahdollista saada vieläkin suuremmat määrät happoja.

Rinnakkaisia pulloja kokeessa oli vain kaksi kappaletta. Rinnakkaisten näytteiden happomäärät olivat kuitenkin hyvin pientä tai saman trendisiä (Kuva 27). Suurin hajonta löytyy RJ3 syötteen kymmenennen päivän kohdalta, jolloin happopitoisuus pulloissa oli 18,3 g/L ja 19,3 g/L. Kymmenennen päivän kohdalla myös keskihajonnan lukuarvo nousi 1,4, mutta kahden rinnakkaisen pullon trendin ollessa samankaltainen on tämä hyväksyttävä tulos.

Kuva 27

RJ3 näytteen VFA-pitoisuudet mädätyksen aikana (kaksi rinnakkaista pulloa)



Kokeen alkaessa näytepullojen pH oli 7–7,18 ja ymppipullojen 7,42. Kokeen edetessä näytettä sisältävien pullojen pH laski alussa nopeasti alle 5, mutta lasku pysähtyi kuitenkin kolmantena päivänä, ollen alimmillaan 4,3 (RJ3) ja 4,45 (RJ4). Nämäkin arvot ovat kirjallisuuden mukaan hieman optimia alhaisemmat, mutta selkeästi paremmat kuin edellisen kokeen. Kokeen loppua kohden molempien näytteiden pH nousi yli viiden, ollen

lopussa 5,0 (RJ3) ja 5,4 (RJ4). Ympin pH oli lopussa 7,79. Päättellen pH-arvosta, koe oli onnistunut. Pystyimme ylikuormittamaan pulloja niin, että sen pH laski metanogeenille epäsuotuisiin lukemiin, mutta lopussa tapahtuneesta selkeästä pH:n noususta voidaan päätellä, että kaikkien VFA:ta kuluttavien mikrobien toiminta ei pullon happamuuden takia kokonaan loppunut.

6 Johtopäätökset

Työn tarkoituksena oli kehittää Luken laboratoriotointa, tuottamalla ohjeistus happofermentaatiokokeiden suunnitteluun, sekä kokeiden suorittamiseen. Ohjeistus muodostui kirjallisuuskatsauksesta sekä sarjasta laboratorioskokeita. Laboratorioskokeiden tarkoituksena oli vastata kahteen ensimmäiseen kysymykseen, jotka koskivat biometaanipotentiaalin mittaukseen tarkoitettujen laitteiston käyttöä happofermentaatiokokeissa ja kokeiden luotettavuutta. Kolmanteen kysymykseen siitä, miten kokeet tulisi suunnitella ja suorittaa, saatiin vastauksia sekä kirjallisuuskatsauksesta että kokeiden suorittamisesta ja niistä saaduista tuloksista.

Jokaisessa suoritettussa kokeessa onnistuttiin tuottamaan haihtuvia rasvahappoja. Kokeet eivät kuitenkaan aina onnistuneet odotusten mukaisesti ja tästä syystä koesuunnitelmia pyrittiin muokkaamaan niin, että seuraava koe olisi onnistunut paremmin. Biologiseen metaanintuottopotentiaaliin tarkoitettujen laitteistojen toimivat kuitenkin myös happofermentaatioissa, ja näin voitiin todeta, että laitteistolla voidaan tehdä happofermentaatiokokeita.

Koska kyseessä on vaikeasti hallittava mikrobiologinen prosessi, on kokeiden luotettavuuden arviointi vaikeaa, verrattuna muualla tehtyihin tutkimuksiin. Tässä työssä kokeiden luotettavuutta arvioitiin vertailemalla aina kunkin kokeen rinnakkaisia koejäseniä. Vertaillen keskihajontaa suurimmat hajonnat esiintyivät pisteissä, joiden kohdalla prosessissa tapahtui suurimmat muutokset. Hajonnan ollessa suurta joko edellisessä tai seuraavassa näytteenotossa arvot ovat selkeästi tarkasteltavasta pisteestä poikkeavat. Myös happopitoisuuksien kasvaessa keskihajonnat kasvavat. Näissä tapauksissa kuitenkin kaikki pullot seurailevat keskiarvoon perustuvaa trendiä, joten voidaan olettaa pulloissa

tapahtuvan samankaltaisia mikrobiologisia asioita, mutta hajontaa muodostuu näytteen tai ympin heterogenuudesta johtuen.

Työssä suoritettujen kokeiden perusteella, voidaan todeta metodin olevan luotettava. Luotettavuutta horjuttaa se, että näytteitä otetaan vain tietyin ennalta määrätyin väliajoin, jolloin juuri näytteenottopäivänä saattaa prosessissa tapahtua paljon asioita, jotka nostavat koejäsenten välistä hajontaa. Luotettavuutta lisää se, että samankaltaisia metodeja käytetään myös useissa tutkimuslaitoksissa ja yliopistoissa ympäri maailmaa. Lisäksi opinnäytetyössä tehtyjen kokeiden tuloksista on julkaistu jo kaksi vertaisarvioitua artikkelia.

Vastaus kolmanteen tutkimuskysymykseen, eli: ”Miten panosmalliset happofermentaatiokokeet tulee suunnitella ja toteuttaa, jotta raaka-aineesta tuotettujen rasvahappojen määrä saadaan mahdollisimman suureksi koejakson aikana?” ei ole yksiselitteinen, vaan jokainen koe pitää suunnitella omista lähtökohdistaan. Tässä työssä koetoiminnan kehittämiseen käytetyt koesarjat olivat tehty eri hankkeisiin ja eri tarkoituksiin, joten kokeet vaihtelivat hyvin paljon toisistaan, eikä niiden VFA-tuloksia voida verrata keskenään kovinkaan paljoa.

Jotta koetoiminnassa voidaan poistaa mahdollisimman paljon muuttujia, on sen tapahduttava aina samalla tavalla. Tämän työn tarkoituksena oli koota yhteen näissä kokeissa tapahtuneet tapahtumat, ja sen perusteella luoda laboratorioon ohjeistus, jolla pystytään minimoimaan kokeiden fyysisessä toteutuksessa tapahtuvat muutokset.

Kun olosuhteet ja tavoitteet juuri tietylle kokeelle on päätetty, niin suurin vaikutus rasvahappojen potentiaaliseen määrään on näytteen luonteella. Hiilihydraattipitoisesta näytteestä on mahdollista saada enemmän rasvahappoja kuin proteiini- tai lipidipitoisesta näytteestä. Näiden yhdistämisestä kuitenkin voidaan saada synergiaetuja. Myös mikrobiympillä ja sen esikäsittelyllä on suuri vaikutus kokeen onnistumiseen. Tarkempi ohjeistus kokeiden suunnitteluun ja toteuttamiseen löytyy liitteestä 1.

7 Pohdinta

Tutkimussuunnitelmaa aloitettaessa tavoitteena oli yhtenäistää käytäntöjä laboratoriossa ja luoda ohjeistus kokeiden toteutukselle. Työtä tehdessä kuitenkin huomattiin, että kokeen fyysinen suorittaminen on verrattain helppoa, kun se on kirjoitettu ohjeiden muotoon. Suurimmat ongelmat kohdataan usein yllättäen tulevissa tilanteissa. Jotta kokeen suorittaja pystyy reagoimaan yllättäviin tilanteisiin oikein, on kokeiden suunnittelulla hyvin merkittävä rooli. Hyvällä suunnittelulla ja erilaisten asioiden huomioimisella pystytään ratkomaan monta ongelmaa jo ennen niiden syntyä. Mikäli kokeiden suunnitteluvaiheessa on mukana kokeiden fyysinen suorittaja, on hän selvillä kokeen tavoitteista ja mahdollisista ongelmista jo etukäteen. Näin hän pystyy tuomaan esille mahdollisia ongelmakohtia jo ennen kokeen varsinaisessa suorittamisessa. Voidaankin sanoa, että vaikka kokeiden fyysinen toteutus on hyvä vakioita, niin suurin painoarvo kokeiden onnistumisella on hyvällä suunnittelulla.

Happofermentaatio on hyvin kompleksinen reaktioketju ja pelkästään yhtä muuttujaa vaihtamalla pystytään koko prosessin kulkua muuttamaan hyvin radikaalisti. Koska prosessiin vaikuttava mikrobipopulaatio on hyvin laaja, eikä koskaan täysin samanlainen prosessista toiseen, saattaa yhden muuttujan vaihdolla olla kahdessa rinnakkaisessa prosessissa erilainen vaikutus. Myös kirjallisuudesta löytyvät tutkimustulokset ovat osittain ristiriitaisia. Jopa samoilla yleisillä muuttujilla (OLR, HRT, t, syöte) saadut tulokset poikkeavat toisistaan. Suurimpana syynä tähän voidaan todennäköisesti pitää kokeissa käytettyjä ymppejä ja sen mukana tulevia mikrobeita. Samoin näennäisesti samanlainen syöte ei välttämättä ole täysin samanlaista maasta toiseen ja syötteen mukana reaktoriin kulkeutuva mikrobisto ei koskaan ole täysin samanlaista. Tämä ei aseptisissa olosuhteissa tapahtuvalle mikrobiselle koetoinnalle tyypillinen sattumanvaraisuus tekee prosessin toistettavuudesta erittäin haastavaa.

Perinteisissä biometaanipotentiaalikoikeissa on päästy tilanteeseen, jossa BMP-tulokset ovat melko hyvin verrattavissa toisiinsa ympäri maapalloa, vaikka mikrobiston erilaisuus on näissäkin kokeissa haastavaa. Tähän vaikuttavia asioita ovat tuhannet toistot, joiden tulokset tukevat toinen toisiaan. Lisäksi tavallisessa biokaasun tuottoon tähtäävässä anaerobisessa mädätyksessä usein pullonkaulaksi muodostuu juuri metanogeenesi vaihe. Metanogeenit ovat muuta mikrobistoa herkempiä olosuhteiden vaihteluille, jolloin prosessin olosuhteiden

pitää olla kaikkialla sellainen, joka suosii juuri metanogeeniä. Tämä rajaa ja jopa vakioi prosessiparametrejä, jolloin vaihtelu eri kokeiden välillä on huomattavasti pienempää.

Vaikka happofermentaatio tutkimuksessa suurin mielenkiinto tällä hetkellä on osoitettu fermentaatiosta saatavan VFA-rikkaan nesteen puhdistukseen ja konsentroiintiin, on myös itse fermentaatiosta paljon tutkittavaa. Aiheesta puuttuu sellaiset suuret datamäärät, joiden avulla biometaanipotentiaalikokeita voidaan todeta luotettavaksi, tai mihin laboratoriotuloksia on hyvä verrata. Happofermentaatiota on myös syytä tutkia omana prosessina, eikä vain kaksivaiheisen metaaniprosessin ensimmäisenä osana, jonka tarkoitus on esikäsitellä syötemateriaaleja metaanin tuotantoon.

Koska tieteelliset julkaisut antavat loppujen lopuksi hyvin vähän tietoa fyysisestä kokeen suorittamisesta, koin tarpeen yhtenäistää Luken laboratoriossa tapahtuvia koejärjestelyjä. Tätä ohjeistusta ja työssä läpikäytyjä ongelmia varoen, voidaan tulevaisuudessa päästä luotettavampiin tutkimustuloksiin happofermentaation alalla, ja se on jo hyvä alku tämän mysteerisen prosessin salojen selvittämiseen.

Lähteet

Aboudi, K., Álvarez-Gallego, C. J. & Romero-García, L. I. (2015). Semi-continuous anaerobic co-digestion of sugar beet byproduct and pig manure: Effect of the organic loading rate (OLR) on process performance. *Bioresource Technology*, 194, 283–290.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.07.031>

Agyeman, F. O. & Tao, W. (2014). Anaerobic co-digestion of food waste and dairy manure: Effects of food waste particle size and organic loading rate. *Journal of Environmental Management*, 133, 268–274. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2013.12.016>

Anukam, A., Mohammadi, A., Naqvi, M. & Granström, K. (2019). A Review of the Chemistry of Anaerobic Digestion: Methods of Accelerating and Optimizing Process Efficiency. *Processes*, 7(8), 504. <https://doi.org/10.3390/pr7080504>

Argyropoulos, D., Theodoros, V. & Benzie, J.(2013). Microbial communities and their dynamics in biomethane production. Teoksessa Korres, N., Okiely, P., Benzie, J., & West, J. (toim.), *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using Agricultural Biomass and Organic Waste* (ss.261–290). Routledge.

Bartek, L., Strid, I., Henryson, K., Junne, S., Rasi, S. & Eriksson, M. (2021). Life cycle assessment of fish oil substitute produced by microalgae using food waste. *Sustainable Production and Consumption*, 27, 2002–2021.

<https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.04.033>

Biarnes, M. (n.d.). *Biomass to Biogas*. E Instruments | E-Inst.Com. Haettu 9. 4.2021 osoitteesta <https://www.e-inst.com/training/biomass-to-biogas/>

Blasco, L., Kahala, M., Tampio, E., Vainio, M., Ervasti, S. & Rasi, S. (2020). Effect of Inoculum Pretreatment on the Composition of Microbial Communities in Anaerobic Digesters Producing Volatile Fatty Acids. *Microorganisms*, 8(4).

<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040581>

Calt, E. A. (2015). Products produced from organic waste using Managed Ecosystem Fermentation. *Journal of Sustainable Development*, 8(3), 43–51.

<https://doi.org/10.5539/jsd.v8n3p43>

Carlini, M., Mosconi, E. M., Castellucci, S., Villarini, M. & Colantoni, A. (2017). An Economical Evaluation of Anaerobic Digestion Plants Fed with Organic Agro-Industrial Waste.

Energies, 10(8), 1165. <https://doi.org/10.3390/en10081165>

Cavalcante, W. de A., Leitão, R. C., Gehring, T. A., Angenent, L. T. & Santaella, S. T. (2017). Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. *Process Biochemistry*, 54, 106–119.

<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.12.024>

Chalima, A., Oliver, L., Fernández de Castro, L., Karnaouri, A., Dietrich, T. & Topakas, E.

(2017). Utilization of Volatile Fatty Acids from Microalgae for the Production of High Added Value Compounds. *Fermentation*, 3(4), 54.

<https://doi.org/10.3390/fermentation3040054>

Chynoweth, D. P., Owens, J. M. & Legrand, R. (2001). Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*, 22(1–3), 1–8.

[https://doi.org/10.1016/S0960-1481\(00\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0960-1481(00)00019-7)

Cioabla, A. E., Ionel, I., Dumitrel, G. A. & Popescu, F. (2012). Comparative study on factors affecting anaerobic digestion of agricultural vegetal residues. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 1.

<https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-39>

Cirne, D. G., Lehtomäki, A., Björnsson, L. & Blackall, L. L. (2007). Hydrolysis and microbial community analyses in two-stage anaerobic digestion of energy crops. *Journal of Applied Microbiology*, 103(3), 516–527.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03270.x>

- da Silva, A. H. & Miranda, E. A. (2013). Adsorption/Desorption of Organic Acids onto Different Adsorbents for Their Recovery from Fermentation Broths. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 58(6), 1454–1463. <https://doi.org/10.1021/je3008759>
- Dareioti, M. A. & Kornaros, M. (2014). Effect of hydraulic retention time (HRT) on the anaerobic co-digestion of agro-industrial wastes in a two-stage CSTR system. *Bioresource Technology*, 167, 407–415. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.06.045>
- Dasa, K. T., Westman, S. Y., Millati, R., Cahyanto, M. N., Taherzadeh, M. J. & Niklasson, C. (2016). Inhibitory Effect of Long-Chain Fatty Acids on Biogas Production and the Protective Effect of Membrane Bioreactor. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7263974>
- Dogan, E., Dunaev, T., Erguder, T. H. & Demirer, G. N. (2009). Performance of leaching bed reactor converting the organic fraction of municipal solid waste to organic acids and alcohols. *Chemosphere*, 74(6), 797–803. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2008.10.028>
- Dong, L., Zhenhong, Y., Yongming, S. & Longlong, M. (2010). Evaluation of pretreatment methods on harvesting hydrogen producing seeds from anaerobic digested organic fraction of municipal solid waste (OFMSW). *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(15), 8234–8240. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.058>
- Dwidar, M., Park, J. Y., Mitchell, R. J. & Sang, B. I. (2012). The future of butyric acid in industry. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/471417>
- Elefsiniotis, P., Wareham, D. G. & Smith, M. O. (2004). Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. *Journal of Biotechnology*, 114(3), 289–297. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2004.02.016>

El-Mashad, H. M., Zeeman, G., van Loon, W. K. P., Bot, G. P. A. & Lettinga, G. (2004). Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, 95(2), 191–201.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2003.07.013>

Ennouri, H., Miladi, B., Diaz, S. Z., Güelfo, L. A. F., Solera, R., Hamdi, M. & Bouallagui, H. (2016). Effect of thermal pretreatment on the biogas production and microbial communities balance during anaerobic digestion of urban and industrial waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 214, 184–191.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.04.076>

Ervasti, S., Vainio, M. & Tampio, E. (2019). Use of local resources as co-substrates in a farm-scale biogas plant. *Open Agriculture*, 4(1), 650–660. [https://doi.org/10.1515/opag-](https://doi.org/10.1515/opag-2019-0065)

[2019-0065](https://doi.org/10.1515/opag-2019-0065)

Esteban-Gutiérrez, M., Garcia-Aguirre, J., Irizar, I. & Aymerich, E. (2018). From sewage sludge and agri-food waste to VFA: Individual acid production potential and up-scaling.

Waste Management, 77, 203–212. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2018.05.027>

Fierro, J., Martínez, E. J., Morán, A. & Gómez, X. (2014). Valorisation of used cooking oil sludge by codigestion with swine manure. *Waste Management*, 34(8), 1537–1545.

<https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2014.02.006>

Fortela, D. L., Hernandez, R., French, W. T., Zappi, M., Revellame, E., Holmes, W. & Mondala, A. (2016). Extent of inhibition and utilization of volatile fatty acids as carbon sources for activated sludge microbial consortia dedicated for biodiesel production.

Renewable Energy, 96, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.04.068>

Galli, F., Previtali, D., Casagrande, S., Pirola, C., Manenti, F. & Boffito, D. A. (2017). Simulation of the water-acetic acid separation via distillation using different entrainers: An

economic comparison. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 1159–1164.

<https://doi.org/10.3303/CET1757194>

Ghimire, A., Frunzo, L., Pontoni, L., d'Antonio, G., Lens, P. N. L., Esposito, G. & Pirozzi, F.

(2015). Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. *Journal of Environmental Management*, 152, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.12.049>

Giordano, A., Sarli, V., Lavagnolo, M. C. & Spagni, A. (2014). Evaluation of aeration

pretreatment to prepare an inoculum for the two-stage hydrogen and methane production process. *Bioresource Technology*, 166, 211–218.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.05.019>

Hao, J. & Wang, H. (2015). Bioresource Technology Volatile fatty acids productions by

mesophilic and thermophilic sludge fermentation : Biological responses to fermentation temperature. *Bioresource Technology*, 175, 367–373.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.106>

He, M., Sun, Y., Zou, D., Yuan, H., Zhu, B., Li, X. & Pang, Y. (2012). Influence of Temperature

on Hydrolysis Acidification of Food Waste. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.012>

Hidalgo, D., Gómez, M., Martín-Marroquín, J. M., Aguado, A. & Sastre, E. (2015). Two-phase

anaerobic co-digestion of used vegetable oils' wastes and pig manure. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(5), 1727–1736.

<https://doi.org/10.1007/s13762-014-0560-9>

Hills, D. J. (1979). Effects of carbon: Nitrogen ratio on anaerobic digestion of dairy manure.

Agricultural Wastes, 1(4), 267–278. [https://doi.org/10.1016/0141-4607\(79\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0141-4607(79)90011-8)

Jankowska, E., Chwiałkowska, J., Stodolny, M. & Oleskiewicz-Popiel, P. (2015). Effect of pH

and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture

fermentation. *Bioresource Technology*, 190, 274–280.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.096>

Jankowska, E., Chwialkowska, J., Stodolny, M. & Oleskowicz-Popiel, P. (2017). Volatile fatty acids production during mixed culture fermentation – The impact of substrate complexity and pH. *Chemical Engineering Journal*, 326, 901–910.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.021>

Jiang, J., Zhang, Y., Li, K., Wang, Q., Gong, C. & Li, M. (2013). Volatile fatty acids production from food waste: Effects of pH, temperature, and organic loading rate. *Bioresource Technology*, 143, 525–530. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.06.025>

Jones, R. J., Massanet-Nicolau, J., Guwy, A., Premier, G. C., Dinsdale, R. M. & Reilly, M. (2015). Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional electrodialysis. *Bioresource Technology*, 189, 279–284. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.04.001>

Jänisch, T., Reinhardt, S., Pohsner, U., Böringer, S., Bolduan, R., Steinbrenner, J. & Oechsner, H. (2019). Separation of volatile fatty acids from biogas plant hydrolysates. *Separation and Purification Technology*, 223(May), 264–273.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.04.066>

Kangas, A., Lund, C., Liuksia, S., Arnold, M., Merta, E., Kajolinna, T., Carpén, L., Koskinen, P. & Ryhänen, T. (2011). Energiätehokas lietteenkäsittely. *Suomen ympäristö*, 17/2011.

https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/37060/SY_17_2011.pdf?sequence

Kauranen, P., Solin, J., Törrönen, K., Koivula, J. & Laurikko, J. (2013). *Vetytiekartta – Vetyenergian mahdollisuudet Suomelle* (VTT-R-02257-13; s. 88). VTT.

Kidanu, W. G., Trang, P. T. & Yoon, H. H. (2017). Hydrogen and volatile fatty acids production from marine macroalgae by anaerobic fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 22(5), 612–619. <https://doi.org/10.1007/s12257-017-0258-1>

- Kinnunen, V. & Rintala J. (2015). Biokaasualan monet mahdollisuudet. Teoksessa M., Kymäläinen & O., Pakarinen (toim.), *Biokaasuteknologia: Raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen* (ss. 17–18). HAMK. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-784-771-1>
- Kleerebezem, R., Joosse, B., Rozendal, R. & Van Loosdrecht, M. C. M. (2015). Anaerobic digestion without biogas? *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 14(4), 787–801. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9374-6>
- KOM/2011/0571 lopullinen. (2011). *COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS Roadmap to a Resource Efficient Europe*. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2011:0571:FIN:FI:PDF>
- Kougias, P. G. & Angelidaki, I. (2018). Biogas and its opportunities—A review. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 12(3). <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1037-8>
- Kumar, S. & Babu, B. V. (2006). A Brief Review on Propionic Acid : A Renewal Energy Source. *National Conference on Environmental Conservation (NCEC-2006)*, 4, 459–464. <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.207.1979&rep=rep1&type=pdf>
- Kymäläinen, M. (2015). Anaerobinen hajoaminen ja sen hallinta biokaasureaktorissa. Teoksessa M., Kymäläinen & O., Pakarinen (toim.), *Biokaasuteknologia: Raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen* (ss. 59–81). HAMK. <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-784-771-1>

- Labatut, R. A., Angenent, L. T. & Scott, N. R. (2014). Conventional mesophilic vs. thermophilic anaerobic digestion: A trade-off between performance and stability? *Water Research*, 53, 249–258. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.01.035>
- Labatut, R. A. & Pronto, J. L. (2018). Sustainable Waste-to-Energy Technologies: Anaerobic Digestion. *Sustainable Food Waste-To-energy Systems*, 47–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811157-4.00004-8>
- Lehtomäki, A. (2006). *Biogas Production from Energy Crops and Crop Residues* (Jyväskylä studies in biological and environmental science) [väitöskirja, Jyväskylän yliopisto]. <http://urn.fi/URN:ISBN:951-39-2559-5>
- Li, C., Knierim, B., Manisseri, C., Arora, R., Scheller, H. V., Auer, M., Vogel, K. P., Simmons, B. A. & Singh, S. (2010). Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, 101(13), 4900–4906. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.10.066>
- Lim, S.-J., Kim, B. J., Jeong, C.-M., Choi, J., Ahn, Y. H. & Chang, H. N. (2008). Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresource Technology*, 99(16), 7866–7874. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.06.028>
- Liu, H., Wang, J., Wang, A. & Chen, J. (2011). Chemical inhibitors of methanogenesis and putative applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1333–1340. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3066-5>
- Longo, S., Katsou, E., Malamis, S., Frison, N., Renzi, D. & Fatone, F. (2015). Recovery of volatile fatty acids from fermentation of sewage sludge in municipal wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 175, 436–444. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.09.107>

- Luostarinen, S. & Pyykkönen, V. (2013). Biokaasuteknologian perusteet. Teoksessa S.,
Luostarinen (toim.) *Biokaasuteknologiaa maataloilla I* (ss. 10-20). MTT Raportti 113
- Marchetti, R., Vasmara, C., Bertin, L. & Fiume, F. (2020). Conversion of waste cooking oil into
biogas: Perspectives and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7),
2833–2856. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10431-3>
- McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E. (1991). The biochemistry of silage. *The
Biochemistry of Silage*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930759161>
- Mykkänen, E. (2008). *Biokaasun tuottaminen säilörehusta lehmänlantaa käsittelevällä
biokaasulaitoksella*. [pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto].
<http://urn.fi/URN:NBN:fi:juu-200806265558>
- National Center for Biotechnology Information. (2021a). *PubChem Compound Summary for
CID 176, Acetic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetic-acid>
- National Center for Biotechnology Information. (2021b). *PubChem Compound Summary for
CID 1032, Propionic acid*. from
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propionic-acid>
- National Center for Biotechnology Information. (2021c). *PubChem Compound Summary for
CID 6590, Isobutyric acid*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isobutyric-
acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isobutyric-acid)
- National Center for Biotechnology Information. (2021d). *PubChem Compound Summary for
CID 264, Butyric acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Butyric-acid>
- National Center for Biotechnology Information. (2021e). *PubChem Compound Summary for
CID 7991, Valeric acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valeric-acid>
- National Center for Biotechnology Information. (2021f). *PubChem Compound Summary for
CID 8892, Hexanoic acid*. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexanoic-
acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexanoic-acid)

- Pakarinen, O., Lehtomäki, A. & Rintala, J. (2008). Batch dark fermentative hydrogen production from grass silage: The effect of inoculum, pH, temperature and VS ratio. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(2), 594–601.
<https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2007.10.008>
- Phalakornkule, C., Nuchdang, S., Khemkhao, M., Mhuantong, W., Wongwilaiwalin, S., Tangphatsornruang, S., Champreda, V., Kitsuwat, J. & Vatanyoopaisarn, S. (2017). Effect of freeze–thaw process on physical properties, microbial activities and population structures of anaerobic sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(4), 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.11.005>
- Plácido, J. & Zhang, Y. (2018). Production of volatile fatty acids from slaughterhouse blood by mixed-culture fermentation. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 8(3), 621–634.
<https://doi.org/10.1007/s13399-018-0313-y>
- Rantala, T. & Kari, T. (2020). *Maatalouden biomassoija hyödyntävät biokaasulaitokset ja niiden kannattavuus*. LAB Pro. Haettu 3.11.2021 osoitteesta
<https://www.labopen.fi/lab-pro/maatalouden-biomassoija-hyodyntavat-biokaasulaitokset-ja-niiden-kannattavuus/>
- Rasi, S., Veijanen, A. & Rintala, J. (2007). Trace compounds of biogas from different biogas production plants. *Energy*, 32(8), 1375–1380.
<https://doi.org/10.1016/J.ENERGY.2006.10.018>
- Reyhantash, E., Kersten, S. R. A. & Schuur, B. (2017). Recovery of Volatile Fatty Acids from Fermented Wastewater by Adsorption. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(10), 9176–9184. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02095>
- Scoma, A., Varela-Corredor, F., Bertin, L., Gostoli, C. & Bandini, S. (2016). Recovery of VFAs from anaerobic digestion of dephenolized Olive Mill Wastewaters by Electrodialysis.

Separation and Purification Technology, 159, 81–91.

<https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2015.12.029>

Seppälä, A. (2014). *Säilöntähaasteiden hallinta*. <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2014111246260>

SFS 3008. (1990). *Determination of total residue and total fixed residue in water, sludge and sediment*. SFS Online.

Shi, X. S., Dong, J. J., Yu, J. H., Yin, H., Hu, S. M., Huang, S. X. & Yuan, X. Z. (2017). Effect of Hydraulic Retention Time on Anaerobic Digestion of Wheat Straw in the Semicontinuous Continuous Stirred-Tank Reactors. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2457805>

Shin, H.-S., Youn, J.-H. & Kim, S.-H. (2004). Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(13), 1355–1363.

<https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2003.09.011>

Siegert, I. & Banks, C. (2005). The effect of volatile fatty acid additions on the anaerobic digestion of cellulose and glucose in batch reactors. *Process Biochemistry*, 40(11), 3412–3418. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.025>

Sikora, A., Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A. & Błaszczuk, M. (2018). Searching for Metabolic Pathways of Anaerobic Digestion: A Useful List of the Key Enzymes. *Anaerobic Digestion*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81256>

Speece, R. E., Boonyakitsombut, S., Kim, M., Azbar, N. & Ursillo, P. (2006). Overview of Anaerobic Treatment: Thermophilic and Propionate Implications - Keynote Address- Association of Environmental Engineering and Science Professors-78th Annual Water Environment Federation Technical Exposition and Conference, Washington, D.C., Oct. *Water Environment Research*, 78(5), 460–473.

<https://doi.org/10.2175/106143006x95492>

Tampio, E., Blasco, L., Vainio, M., Kahala, M. & Rasi, S. (2018). Volatile fatty acids and methane from food waste and cow slurry: Comparison of biogas and VFA fermentation processes. *GCB Bioenergy*, 11(1), 72–84.

<https://doi.org/10.1111/gcbb.12556>

Tampio, E., Ervasti, S., Paavola, T., Heaven, S., Banks, C. & Rintala, J. (2014). Anaerobic digestion of autoclaved and untreated food waste. *Waste Management*, 34(2), 370–377. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2013.10.024>

Tampio, E., Ervasti, S. & Rintala, J. (2015). Characteristics and agronomic usability of digestates from laboratory digesters treating food waste and autoclaved food waste. *Journal of Cleaner Production*, 94, 86–92.

<https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2015.01.086>

Tampio, E., Vainio, M., Virkkunen, E., Rahtola, M. & Heinonen, S. (2018). Opas kierrätyslannoitevalmisteiden tuottajille. *Luonnonvara ja biotalouden tutkimus* 37/2018, <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-606-3>

Thierry, A., Richoux, R. & Kerjean, J.-R. (2004). Isovaleric acid is mainly produced by *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss cheese. *International Dairy Journal*, 14(9), 801–807. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2004.02.002>

Ting, C. H. & Lee, D. J. (2007). Production of hydrogen and methane from wastewater sludge using anaerobic fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(6), 677–682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.063>

TTL. (2015a). *Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: Kloorivety ja suolahappo*.

<https://www.ttl.fi/ova/kloovety.html>

TTL. (2015b). *Onnettomuuden vaaraa aiheuttavat aineet: Natriumhydroksidi*.

<https://www.ttl.fi/ova/naoh.html>

- Valdez-Vazquez, I. & Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Hydrogen production by fermentative consortia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(5), 1000–1013.
<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2008.03.003>
- Valentino, F., Moretto, G., Gottardo, M., Pavan, P., Bolzonella, D. & Majone, M. (2019). Novel routes for urban bio-waste management: A combined acidic fermentation and anaerobic digestion process for platform chemicals and biogas production. *Journal of Cleaner Production*, 220, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.102>
- Venkata Mohan, S., Lalit Babu, V. & Sarma, P. N. (2008). Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. *Bioresource Technology*, 99(1), 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.004>
- Wainaina, S., Lukitawesa, Kumar Awasthi, M. & Taherzadeh, M. J. (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*, 00(00), 437–458.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>
- Wainaina, S., Parchami, M., Mahboubi, A., Horváth, I. S. & Taherzadeh, M. J. (2019). Food waste-derived volatile fatty acids platform using an immersed membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 274, 329–334.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2018.11.104>
- Wang, C. C., Chang, C. W., Chu, C. P., Lee, D. J., Chang, B. V. & Liao, C. S. (2003). Producing hydrogen from wastewater sludge by *Clostridium bifermentans*. *Journal of Biotechnology*, 102(1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(03\)00007-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(03)00007-5)
- Wang, K., Yin, J., Shen, D. & Li, N. (2014). Anaerobic digestion of food waste for volatile fatty acids (VFAs) production with different types of inoculum: Effect of pH. *Bioresource Technology*, 161, 395–401. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.03.088>

- Wijekoon, K. C., Visvanathan, C. & Abeynayaka, A. (2011). Effect of organic loading rate on VFA production, organic matter removal and microbial activity of a two-stage thermophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresource Technology*, 102(9), 5353–5360. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.12.081>
- Winqvist, E., Luostarinen, S., Kässi, P., Pyykkönen, V. & Regina, K. (2015). Maatilojen biokaasulaitosten kannattavuus ja kasvihuone- kaasujen päästövähennys. *Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus*, 36/2015 <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-045-0>
- Yang, L., Huang, Y., Zhao, M., Huang, Z., Miao, H., Xu, Z. & Ruan, W. (2015). Enhancing biogas generation performance from food wastes by high-solids thermophilic anaerobic digestion: Effect of pH adjustment. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105, 153–159. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2015.09.005>
- Yin, J., Yu, X., Wang, K. & Shen, D. (2016). Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(46), 21713–21720. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2016.07.094>
- Zhai, N., Zhang, T., Yin, D., Yang, G., Wang, X., Ren, G. & Feng, Y. (2015). Effect of initial pH on anaerobic co-digestion of kitchen waste and cow manure. *Waste Management*, 38, 126–131. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2014.12.027>
- Zhou, Y. J., Takaoka, M., Wang, W., Liu, X. & Oshita, K. (2013). Effect of thermal hydrolysis pre-treatment on anaerobic digestion of municipal biowaste: A pilot scale study in China. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(1), 101–105. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.014>
- Zirkler, D., Peters, A. & Kaupenjohann, M. (2014). Elemental composition of biogas residues: Variability and alteration during anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 67, 89–98. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2014.04.021>

Zupančič, G. & Grilc, V. (2012). Anaerobic Treatment and Biogas Production from Organic Waste. *Management of Organic Waste*, 2. <https://doi.org/10.5772/32756>

Liite 1: Happofermentaatio kokeiden suunnittelu- ja suoritusohjeet

Suunnittelu

Haihtuvien rasvahappojen kokeita tehdessä on syytä kiinnittää huomiota suunnitteluun. Suunnittelun pohjana toimii aina tutkimussuunnitelma ja sieltä esiin nouseva tutkimuskysymys. Mikäli tavoitteena on pyrkiä tutkimaan jonkin tietyn syötteen VFA-potentiaalia, on kokeen suunnittelussa käytettävä juuri kyseiselle syötteelle sopivia prosessiparametrejä.

Kokeen kesto ja välinäytteet

Kokeen keston vaikuttavia asioita ovat syötemateriaali, lämpötila ja mikrobipopulaatio ja näiden kaikkien yhteisvaikutus. Syötemateriaalin koostumus vaikuttaa hydrolyysin toimivuuteen, jolloin vaikeasti hajoavien syötteiden, kuten paljon ligniiniä sisältävän säilörehun, käsittelyaika saattaa olla pidempi kuin nopeasti hajoavien hiilihydraattipitoisten ruokajätteiden. Hajoamisnopeuteen vaikuttaa kuitenkin myös mikrobipopulaatio, jota kokeessa käytetään. Mikäli käytettävä ympäristö on tottunut kokeessa vallitseviin olosuhteisiin ja syötteeseen on sen toiminta nopeampaa kuin syötteeseen tottumattoman ja uudenlaiseen ympäristöön joutuvan ympin. Hajoamisnopeuteen lämpötilan vaikutus saattaa olla jopa suurempi kuin käytettävän ympin vaikutus kuten huomattiin kokeessa, jossa mesofiiliseen lämpötilaan tottunutta ympäristöä käytettiin termofiilisessä lämpötilassa. Kokeen kestossa on kuitenkin huomioitava myös syötteen aiheuttama happojen kumuloituminen ja sitä myötä pH:n lasku, joka muuttaa reaktorissa vallitsevia olosuhteita toisille mikrobeille suotuisaksi ja toisille taas inhiboivaksi. Vaikka Jankowska ym., (2015) tutkimuksessa todettiin pH:n vaikuttavan rasvahappojen määrään enemmän kuin syötteen koostumuksen, on koostumuksella kuitenkin suuri vaikutus hajoamisnopeuteen ja sitä myöden kokeen keston (Yin ym., 2016).

Koska panoskokeiden tarkoituksena on saada tietoa syötteen VFA-potentiaalista, tehdään kokeet usein monella rinnakkaisella pullolla, joita lopetetaan näytteenottoa varten erilaisilla retentioajoilla. Näin saadaan tietoa prosessin eri vaiheista ja pystytään näkemään, milloin rasvahappojen kumuloituminen loppuu. Kun kokeiden kestoä suunnitellaan, pitää myös päättää missä vaiheessa koetta näytteitä otetaan. Mikäli kokeessa käytetään nopeasti hajoavia syötteitä,

on näytteenottoja hyvä sijoittaa tiheästi kokeen alkuun. Hitaasti hajoavissa näytteissä liian nopeasti lopetettavat pulloet eivät välttämättä tuota haluttua informaatiota.

Hyvänä ohjenuorana voisi pitää, että koe kestää syötteen mukaan 8–16 päivää. Kokeen aikana lopetettavien pullojen määrään vaikuttaa usein resurssit. Jos lopetettavia pulloja on useita, vaatii se paljon kapasiteettia laitteistolta. Näytteiden ottaminen ja pullojen lopettaminen on myös hyvin työvoimaintensiivistä, jolloin myös henkilöstöresursseja pitää olla riittävästi.

Kokeita voidaan tehdä myös pulloissa, joista pystytään ottamaan näyte VFA-analyysiin kokeen edetessä. Tällaisia pulloja käyttäen on kuitenkin hyvä muistaa, että samalla orgaanisen aineen määrä ja mädätteen kokonaistilavuus pullossa muuttuu.

Kuormitus

Orgaaninen kuormitus pullokokeissa määrittyy yleensä ympin ja näytteen VS suhteella. Toisin sanoen kuinka paljon orgaanista ainesta pulloon laitetaan syötteenä, suhteessa kuinka paljon orgaanista ainesta pulloon laitetaan ympinä. Toinen vaihtoehto on laskea kuormitusta kemikaalisen hapen kulutuksen (COD) suhteen. Kokeessa näytteen ja ympin suhteella on merkittävä vaikutus.

Suunnitellessa tulevan kokeen kuormitusta pitää ottaa huomioon millä tavalla reaktoreihin pyritään aiheuttamaan happomädätykseen sopivat olosuhteet. Mikäli tavoitteena on aiheuttaa prosessin happamoituminen ylikuormituksella, on kuormitus säädettävä riittävän korkeaksi esimerkiksi 2–3 gVS syötettä/gVS ymppiä. Ylikuormituksella metanogeenien toiminta estyy muodostuvien happojen aiheuttamasta mädätteen happamoitumisesta. Mikäli ymppi esikäsitellään esimerkiksi lämmöllä, voidaan kuormitus pitää BMP-kokeille tavanomaisina esimerkiksi 0,5–1,0 gVS syötettä/gVS ymppiä.

Ympin esikäsitteilyn lisäksi myös syötteen ominaisuuksilla on merkitystä kuormituksen määrään. Nopeasti hajoavan ja paljon rasvahappoja tuottavan syötteen kuormituksen on hyvä olla maltillisempi kuin hitaasti hajoavien näytteiden. Jos VFA:n kumuloituminen reaktorissa tapahtuu nopeasti, saattaa osa näytteessä olevasta orgaanisesta aineesta jäädä hajoamatta tai hajoamispolku muuttua tuottamaan muita yhdisteitä rasvahappojen sijaan. Yksi merkittävä asia

syötteen ominaisuuksissa on sen jo valmiiksi sisältämä happojen määrä. Vaikka esimerkiksi tuore säilörehu on normaalisti hitaasti hajoavaa, tuo se mukanaan myös erilaisia happoja reaktoriin esim. maitohappoa ja muurahaishappoa (McDonald ym., 1991, ss. 184–185). Nämä hapot saattavat aiheuttaa reaktorissa liiallista happamoitumista, joka aiheuttaa prosessin ennenaikaisen pysähdyksen.

pH

Jo suunnitelma vaiheessa on myös tehtävä päätös, millaisella hapokkuudella koe pyritään tekemään. pH voidaan säätää jo ennen koetta alhaiseen pisteeseen, mutta on muistettava, että kokeen aikana muodostuvat hapot laskevat mädätteen pH-arvoa, jonka vaikutuksesta haihtuvien rasvahappojen synty saattaa pysähtyä tai koko mädätys prosessi saattaa kaatua. Mikäli pH säädetään neutraaliksi, on syntyvillä hapoilla varaa pudottaa pH:ta alemmas. Mutta tällöin, mikäli metanogeneeniä ei olla pystytty tuhoamaan esikäsitelyissä, on vaarana rasvahappojen kulutus metaaniksi. Myös emäksisellä pH arvolla on saatu hyviä VFA-tuloksia, mutta tässäkin on vaarana metaanin tuotantoon suuntautuvan arkkien ja bakteerien toiminta, kun pH putoaa rasvahappojen muodostuessa. Yksi vaihtoehto on muokata pH:ta prosessin aikana, jolloin reaktorissa vallitsisi vakio pH. Tämä taas vaatii erikseen pH säätöön suunniteltuja laitteistoja ja ohjelmia.

Ympäri

Jotta mikrobiologinen prosessi toimii, tarvitaan siihen oikeanlaiset mikrobit. Laboratoriokokeita varten helpoin keino hankkia oikeanlainen mikrobisto on käyttää ympäriä toiminnassa olevan biokaasulaitoksen mädätettä. Biokaasulaitoksilla ei normaalisti ole mitään sitä vastaan, että heidän laitokseltaan haettaisiin mädätettä, mutta on kuitenkin hyvä neuvotella laitosten henkilökunnan kanssa hyvissä ajoin ennen mädätteen tarvetta. Samalla kannattaa selvittää onko laitos toiminut normaalisti ja ettei ole ollut huoltokatkoja tai muuta, joka olisi voinut vaikuttaa mikrobiston laatuun.

Laitoksen valintaan kannattaa kiinnittää huomiota, sillä mikrobiosto adaptoituu syötteen mukaan. Laitos kannattaa siis valita sen mukaan minkälaista materiaalia kokeessa tullaan käyttämään. Jos kokeessa käytetään esimerkiksi ruokajätettä niin ympäriä kannattaa käyttää biojätettä käsittelevän laitoksen mädätettä.

Kun ymppeä on noudettu biokaasulaitokselta, on sitä syytä inkuboida tulevassa koelämpötilassa. Näin siinä oleva orgaaninen aines ja rasvahapot ehtivät hajota ennen kuin ymppeä käytetään kokeessa. Ympin liiallinen aktiivisuus kokeissa saattaa estää havainnoimasta eroja ympin- ja näytteen tuottaman VFA:n välillä. Pahimmassa tapauksessa yliaktiivinen ymppeä saattaa häiritä jopa koko prosessia niin, ettei näytteestä saada VFA-tuottoa ulosmitattua. Pitkien säilytysten aikana mikrobien aktiivisuus kuitenkin laskee, joten säilytysaika on hyvä pitää mahdollisimman lyhyenä. Mikäli ymppeä joudutaan varastoimaan pidempään kannattaa se tehdä jääkaappi lämpötilassa (4 °C).

Suunniteltaessa koetta pitää myös ottaa huomioon ympin käsittelyyn menevä aika. Inkuboinnin lisäksi ympille saatetaan tehdä erilaisia esikäsittelyjä, joilla estetään metanogeenien toiminta kokeen aikana. Esikäsittelyt saattavat vaikuttaa ympin ominaisuuksiin, joten kokeita varten tarvittavat analyysit on syytä teettää vasta esikäsittelyn jälkeen.

Analyysit

Analyysien suhteen ratkaisevaa on mitä kokeessa varsinaisesti halutaan tutkia ja resurssien riittävyys. Kokeen käynnistyksen kannalta tärkeimpiä analyysiejä on kuitenkin orgaanisen kuiva-aineen määrä. Mikäli kuormituksen määrä lasketaan COD:nä on myös se analysoitava. Koska kokeiden tarkoitus on tutkia näytteiden VFA-potentiaaleja, on VFA analyysi luonnollisesti pakollinen. Jotta kokeessa pystytään seuraamaan VFA:n lisääntymistä tai orgaanisen aineen hajoamista on analyysit tehtävä ennen koetta ja kokeen jälkeen. Seuraavassa taulukossa on listattuna minimianalyysit sekä harkittavia analyysiejä.

Mahdollisia analyysiejä

Pakolliset Valinnaiset

TS	COD
VS	sCOD
pH	Hiilihydraatit
VFA	Proteiinit
	Raakarasvat
	Alkoholit
	LCFA
	Maitohappo
	Muurahaishappo

Valinnaisia analyysejä voi kuitenkin olla myös muita, tutkimuskysymyksen mukaan. sCOD on liukoinen hapenkulutus, jolla voidaan arvioida, kuinka hyvin orgaaninen aines muuttuu liukoiseen muotoon prosessissa. Tämä arvo kertoo ennen kaikkea hydrolyysin toiminnasta, jossa isompia molekyylejä hajoaa liukoiseen muotoon. Makroravinteet, eli hiilihydraatit, proteiinit ja rasvat kertovat syötteen ominaisuuksista. Näiden analyysien avulla voidaan arvioida kokeessa käytettävää kuormitusta, sekä laskea teoreettista maksimaalista potentiaalia. Anaerobisessa mädätysprosessissa syntyy myös alkoholeja ja pitkäketjuisia rasvahappoja (LCFA). On raportoitu, että varsinkin pH:n ollessa alle 5 alkaa anaerobinen mikrobisto tuottamaan enemmän alkoholeja kuin rasvahappoja (Dogan ym., 2009). Varsinkin säilörehua käytettäessä syötteenä saattaa maitohapon ja muurahaishapon analyysit olla tärkeitä. Näiden avulla voidaan arvioida syötteen mukana reaktoriin kulkeutuvaa hapon määrää ja pystytään valitsemaan optimaalinen kuormitus kyseiselle syötteelle. Myös pH mittaus auttaa havaitsemaan syötteiden happo- tai emäspitoisuutta ja näin tilanteeseen voidaan reagoida jo ennen kokeen alkua.

Resurssointi (henkilöt ja laitteet)

Vaikka kokeet kestävät yleensä vain noin kaksi viikkoa vaatii se huomattavan määrän resursseja. Kun tilastollisen varmuuden saamiseksi käytetään kolmea rinnakkaista koepulloa ja välilopetuksia on useita, vaatii se paljon myös laitekapasiteettia. Lisäksi käytetään pelkkiä ympäri pulloja, jolloin tulosten tarkastelussa voidaan laskea ympäri tuottamat VFA-määrät pois.

Tarvittavien pullojen määrä muodostuu kaavalla:

Kaava 13. P = pullojen määrä per lopetuskerta L = lopetettavat kerrat kokeessa. N = näytteiden määrä ja S = pullojen kokonaismäärä.

$$P_y * L_x * N_n = S_{tot}$$

Esimerkkinä 10 päivän koe yhdellä syötteellä, jossa pullojen lopetuksia 1, 2, 3, 6, 8, 10 päivän retentioajalla. Jokaista lopetettavaa päivää kohden pitää olla siis kolme näytepulloa ja kolme ympäripulloa. Kun esimerkin sijoittaa kaavaan tulee siitä $6 \times 6 = 36$ pulloa. Mikäli kokeessa käytetään kahta syötettä nostaa se pullojen määrään vain puolella, koska laskelmissa voidaan käyttää samaa ympäriä molemmille syötteille. Mikäli kokeissa käytetään Bioprocessin AMTPS II tai

Endeavour laitteita, joissa yhteen laitteeseen mahtuu 15 pulloa, vie yksi esimerkin kaltainen koe kaksi kokonaista laitetta ja 6 paikkaa kolmannesta laitteesta.

Myös henkilöstöressurssien määrään on suunnitteluvaiheessa kiinnitettävä huomiota. Seuraavassa taulukossa on laskettu esimerkin kokeen käynnistämiseen tarvittavia henkilötyötunnit. Ympin nouto tapahtuu 15 min ajomatkan päästä laboratorion lähtökäytöstä ja esikäsittelyä ympärille on siivilöinti ja 30 min lämpökäsittely.

Työvaihe	htt
Ympin hankinta ja käsittely	7
Kokeiden valmistelu	4
Kokeiden aloitus	10
Kokeiden lopetukset	7

Näissä laskelmissa on mukana ainoastaan laboratoriohenkilöstön suorittama fyysinen työ esimerkkikokeelle, eikä sisällä mahdollisia analyysijä. Analyysieihin varattavat resurssin määrä riippuu siitä mitä analyysijä halutaan teettää. Kuitenkin esimerkkitapauksessa analyysijä tulisi 36 pullosta ja kahdesta aloitusnäytteestä, joten myös analyysikuluihin on syytä varautua ennakkoon.

Kokeen suorittaminen

Reagenssit ja niiden riskit

Natriumhydroksidi (NaOH) on voimakkaasti syövyttävä emäs, joka liuetessaan veteen muodostaa lämpöä. Käsiteltäessä on käytettävä suojahanskoja, suojalaseja sekä pöliseviä rakeita käsiteltäessä hengityssuojainta. Ensiapuna ihokosketuksessa käytettävä välittömästi runsasta huuhtelua vähintään 30 minuutin ajan. Silmiin joutuessa huuhtelu aloitettava välittömästi välttämättä huuhteluveden valumista puhtaaseen silmään. Silmävaurion estämiseksi potilas on toimitettava ensiapuasemalle. Jäte kemikaalit voidaan neutraloida käyttämällä suola- tai etikkahappoa. Liuos voidaan neutraloinnin jälkeen hävittää viemäriin viemäriverkoston käyttömääräysten mukaisesti. (TTL, 2015b).

Suolahappo (HCL) on väkevä happo, joka syövyttää voimakkaasti ihoa ja vaurioittaa silmiä. HCL saattaa myös aiheuttaa hengitysteiden ärsyyntymistä. Ensiapuna iho- ja silmäkosketuksessa on välitön huuhtelu vedellä 15–20 minuuttia ja toimittaminen ensiapuasemalla tai lievemmissä

ihokontakteissa yhteydenotto lääkäriin. Suojavarusteina käytettävä suojalaseja sekä hanskoja. (TTL, 2015a).

Laitteet ja välineet

Kokeessa tarvittavat välineet ja laitteet:

- Siivilä
- Analyysivaaka
- Pasteur pipettejä
- Vesihaude
- Kaasunmittausyksikkö (ml. sekoittajat, letkut ja korkit)
- 500 ml laboratorio pulloja
- Kannuja ja dekanttereita
- De-ionisoitua vettä
- Lusikoita ja spaatteleita
- Suppilo
- Hiilidioksidipullo ja kaasusäädin
- pH-mittari
- Merkintätarrat pulloihin

Lisäksi mahdollisesti tarvittavia välineitä:

- Tehosekoittaja
- Kaasupusseja
- Keittolevy
- Kattila
- 80 ml lasipulloja NaOH-liuosta varten ja kaasuyhteillä olevat korkit.

Valmistelut

Ennen kokeen alkua on varmistuttava, että toimivaa laitteistoa on riittävästi. Mikäli laitteisto ei ole ollut käytössä lähiaikoina on sen toimintavarmuus testattava ennen kokeen alkua. Samalla varmistetaan, että reaktoreina käytettäviä pulloja, sekoittajia ja sekoitin korkkeja on riittävästi. Tarkistetaan myös, että kokeessa käytettäviä kemikaaleja on riittävästi ja valmistetaan tarvittavat liuokset.

Tutkimussuunnitelman mukaisesti kokeissa käytettävää ymppiä on noudettava siihen valitulta biokaasulaitokselta. Mikäli laitos sijaitsee kaukana, on mielekkäämpää järjestää ympin toimitus jonkin kuljetuspalvelun kautta. Ennen mädätteen luovutusta kuljetusyritykselle on sen aktiivisuus laskettava mahdollisimman pieneksi. Tämä onnistuu esimerkiksi jäähdyttämällä mädäte jääkaapissa vähintään vuorokauden ennen paketin toimittamista matkaan. Mikäli ymppi on kovin aktiivista se saattaa muodostaa suljettuun astiaan huomattavan ylipaineen, joka lopulta vapautuu astian heikoimmasta kohdasta.

Ympin saavuttua laboratorioon suoritetaan sille ensin karkean materiaalin erottelu. Tämän vaiheen voi suorittaa käyttäen tavallista siivilää ja mikäli ymppiä lähetetään kuljetuspalvelulla, on tämä vaihe hyvä suorittaa jo lähtöpaikassa. Siivilöinnin jälkeen ymppiä inkuboidaan jonka jälkeen tehdään esikäsittely koesuunnitelman mukaisesti.

Lämpökäsittelyssä ymppiä keitetään lämpölevyllä määrätty aika. Hyväksi todettua aikoja ovat esimerkiksi 30 ja 60 min. Keittäessä ymppiä on oltava erityisen tarkkana, ettei se kuohu yli. Ymppi reagoi lämpöön hyvin voimakkaasti kuohumalla juuri ennen kuin se rupeaa kiehumään. Tämän

takia lämpölevyn lämpö kannattaa pitää maltillisena ja keitosta on syytä tarkkailla jatkuvasti. 10 litran kattilalle sopivaksi määräksi on todettu 2–3 litraa. Näin kattilaan jää riittävästi kuohuntavaraa ja aikaa reagoida, mikäli vaahtoa alkaa muodostua runsaasti. Keittämisessä muodostuvan höyryn takia se on suositeltavaa suorittaa vetokaapissa käyttäen asianmukaisia suojaimeja. Vähimmäissuojavarustus on laboratoriotakki, suojalasit ja hansikkaat. Suositeltavaa on myös käyttää raitisilma maskia tai muuta riittävää hengityssuojainta.

Ympin pH:ta säätäessä on syytä tehdä titraus suunnitellulla hapolla tai emäksellä. Näin saadaan tietoa kuinka paljon happoa tai emästä tarvitaan, jotta saavutetaan haluttu pH-arvo. Myös tässä esikäsittelymenetelmässä on riski näytteen kuohumiselle, joten se on hyvä tehdä isommassa astiassa. Mikäli kuitenkin ympin pH:ta säädetään pulloissa, on huomioitava riittävä kuohuntavara. Kummassakin tapauksessa on käsittely syytä tehdä viemärillisessä vetokaapissa. Käsiteltäessä kemikaaleja on huolehdittava riittävästä työturvallisuudesta. Kemikaalien kanssa vaadittavat suojavarustukset voi tarkastaa laboratorion löytyvistä SDS-lomakkeista (Safety Data Sheet).

Mikäli näytteet ovat jäässä on ne sulatettava ennen koetta. Sulat näytteet sekoitetaan hyvin ja sekä niistä että ympistä otetaan näytteet TS ja VS analyysiin. Analyysien jälkeen lasketaan pulloihin lisättävät määrät näytettä, ymppeä ja vettä. Määrät muotoutuvat koesuunnitelman mukaisesti, käyttäen siihen valittua näytteen ja ympin VS määrien suhdetta. Lopuksi vedellä tasataan pulloon jäävä kaasutilavuus kaikille pulloille yhteneväisiksi.

Aloit

1. Taarataan pullo analyysivaa'alla.
2. Sekoitetaan ymppeä ja punnitaan sitä pulloon suunnitelman mukaisesti.
 - Tehdään pH säätö, mikäli se on suunniteltu tehtäväksi pullossa.
3. Sekoitetaan näytettä ja punnitaan sitä pulloon suunnitelman mukainen määrä.
 - Pelkästään ymppeä sisältäviin pulloihin ei lisätä näytettä.
4. Kaadetaan de-ionisoitua vettä niin, että jokaisen pullon sisällön kokonaispaino on yhtenevä.

5. Toistetaan vaiheet 1–4 kunnes kaikki näytteet ovat käsitelty.
6. Mitataan jokaisen pullon pH.
7. Suljetaan pullot Bioprocess-laitteiden sekoittajan korkeilla ja kierretään sekoittaja paikalleen.
8. Kiinnitetään kaasuletku sekä huuhteluletku ja asetetaan pullot sammutettuihin vesihauteisiin.
9. Kiinnitetään tyypipullosta tuleva letku näytepullojen huuhteluletkuihin ja huuhdellaan pullon kaasutila typpikaasulla. 30 sekuntia/pullo virtausnopeudella 2 litraa minuutissa. Huuhtelun loputtua, suljetaan huuhteluletkut ja kiinnitetään kaasuletkut mittausyksiköihin.
 - Mikäli automaattista kaasunmittausta ei käytetä, kytketään kaasupussit kaasuletkuihin.
 - Mikäli käytetään NaOH-liuosta hiilidioksidin absorboimiseen, kytketään kaasuletku NaOH-pulloihin ja mittauslaitteet letkuilla näihin pulloihin.
10. Kytketään sekoittajien moottoreiden virtajohdot. Kun kaikki sekoittajan johdot ovat kiinni, kytketään sekoittajan ohjausyksikkö sähköverkkoon ja kytketään virrat jokaiseen sekoittajan moottoriin.
11. Kytketään sekoittajat päälle käyttäen laitteiden selainpohjaista ohjaussivustoa ja tarkistetaan, että jokainen moottori toimii.
12. Kytketään päälle vesihauteet ja kaasunmittaus. Tarkastetaan vesihauteiden lämpötila ja säädetään se koesuunnitelmassa määriteltyyn lämpötilaan.

Lopetus

1. Kytketään sekoituksen ohjaus ja lopetettavien pullojen kaasunmittaus pois päältä ohjaussivulta.
2. Kytketään sekoittajien moottorit pois päältä ja ohjausyksikkö irrotetaan verkkovirrasta.
3. Irrotetaan sekoittajien johdot sekä kaasuletkut.

4. Poistetaan lopetettavat pulloet vesihautteesta ja kytketään jäljelle jäävien pullojen sekoittajat takaisin toimintaan.
5. Lisätään vesihautteeseen vettä poistettujen pullojen tilavuuden verran.
6. Kierretään pullojen korkit auki ja otetaan mahdolliset mikrobinäytteet.
7. Mitataan lopetettavien pullojen pH.
8. Sekoitetaan pullon sisältö hyvin ja otetaan näytteet analyyseihin.
9. Pestään pulloet ja laitteet seuraavaa käyttöä varten.
10. Lopetuksia toistetaan kokeen loppuun asti.

Kokeen jälkeen

1. Kytketään kaikki sekoittajat ja kaasunmittaukset pois päältä.
2. Kytketään vesihautteet pois päältä.
3. Tyhjennetään vesihautteet vedestä.
4. Puhdistetaan likaantuneet laitteet ja tarvikkeet.