
MIKROLEVIEN METAANITUOTON TEHOSTAMINEN



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Bio- ja elintarviketekniikka

Visamäki, syksy 2012

Tuomo Viitaja



VISAMÄKI

Bio- ja elintarviketekniikka
Ympäristöbioteknologia

Tekijä	Tuomo Viitaja	Vuosi 2012
Työn nimi	Mikrolevien metaanituoton tehostaminen	

TIIVISTELMÄ

Huoli fossiilisten polttoaineiden riittävydestä ja ilmastonmuutoksesta on luonut tarvetta kehittää uusia korvaavia energiamuotoja. Biopolttoaineiden tuotannossa levä pidetään lupaavana vaihtoehtona perinteisille raaka-aineille. Levien etuna on mm. kasvuympäristön vaihtelevuus ja monipuolisuus biopolttoaineiden raaka-aineena. Tämä opinnäytetyö on osa Tekes -rahoitteista ALDIGA-hanketta (Algae from Waste for Combined Biodiesel and Biogas Production), jossa on tavoitteena levien tuotanto jäteraaka-aineita hyödyntäen, ja leväbiomassan kokonaisvaltainen hyödyntäminen lähinnä biopolttoainetuotannossa (biodiesel, biokaasu). Hankkeen tutkimusosapuolet ovat VTT, SYKE, Helsingin yliopisto, LAMK ja HAMK, ja lisäksi mukana on 13 yritystä.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää eri levälajien metaani (CH₄)-tuottoa ja erilaisia esikäsittelymenetelmiä tuoton tehostamiseksi. Käytettävät levät olivat kaupallinen *Chlorella pyrenoidosa* ja, Helsingin yliopiston kasvattama *Chlorella*- ja *Selenastrum*-levä. Esikäsittelymenetelminä olivat happo-, emäs-, vetyperoksidi- ja SCE(Supercritical extraction)-käsittely. Esikäsittelyt tehtiin eri pitoisuuksilla ja vaikutusajoilla, huoneenlämmössä SCE-käsittelyä (80 °C, 500 atm, 1 h) lukuun ottamatta. Metaanintuottopotentiaalit määritettiin panoskokeilla.

Metaanituotto oli hyvin vastaava (n. 230 ml/g VS) sekä kaupallisella että HY:n tuottamalla *Chlorellalla*. *Selenastrum*-levän tuotto oli n. 290 ml/ g VS. SCE-käsittelyllä levän CH₄-tuotto nousi n. 22 % verrattuna käsittelemättömään levään. SCE-käsittelyllä voidaan uuttaa levästä lipidejä selektiivisesti, biodieselin valmistukseen. Muilla esikäsittelymenetelmillä ei saatu havaittavaa parannusta CH₄-tuottoon. Esikäsittelymenetelmien tehoa voisi mahdollisesti parantaa lämpökäsittelyllä. Tämä kuitenkin heikentäisi kokonaistaloutta isossa mittakaavassa.

Avainsanat biopolttoaineet, biokaasu, levä, mikrolevät, metaani

Sivut 33 s. + liitteet 13 s.

VISAMÄKI

Degree programme in Biotechnology and Food Engineering
Environmental biotechnology

Author	Tuomo Viitaja	Year 2012
Subject of Bachelor's thesis	Enhancement of methane production from microalgae	

ABSTRACT


Concern of the climate change and the availability of fossil fuels have created a need to develop new compensating sources of energy. Algae are seen as a promising option for traditional raw materials. The advantages of algae are, among other things, diverse cultivation options and versatility as a raw material for biofuels. This thesis is part of a project called ALDIGA (Algae from Waste for Combined Biodiesel and Biogas Production), which is funded by the Finnish Funding Agency for Technology and Innovation (Tekes). The aim of the project is to produce algae by exploiting waste material and benefiting from algae biomass as a whole in biofuel production (biodiesel, biogas). The research partners of the project are VTT Technical Research Centre of Finland, the Finnish Environment Institute (SYKE), University of Helsinki, Lahti UAS and HAMK UAS. In addition, there are 13 companies involved in the project.

The aim of the thesis was to find out the methane (CH₄) potential of different algae. In addition, the aim was to find out pretreatment options for improving the methane yield. The algae used were commercial *Chlorella pyrenoidosa* and, *Chorella* and *Selenastrum* algae grown by the University of Helsinki. The pretreatments used were done by acid, base, hydrogen peroxide and supercritical extraction (SCE). The pretreatments were done with different concentrations and timing in room temperature, apart from supercritical extraction, which was done in 80 °C, 500 atm, 1 h. The methane potential was determined with batch tests.

The methane yields (approx. 230 ml/g VS) were similar both for commercial algae and *Chlorella* cultivated by University of Helsinki. *Selenastrum* algae produced approx. 290 ml/ g VS. SCE treated alga produced 22 percent more methane than untreated algae. Lipids can be extracted selectively to the biodiesel production with the SCE treatment. There was not a noticeable improvement to methane yields with other pretreatments. Heating might improve the effect of the pretreatments. However, it would weaken the total economy of the process.

Keywords Biofuels, biogas, algae, microalgae, methane

Pages 33 p. + appendices 13 p.



SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	LEVÄT BIOPOLTTOAINEIDEN RAAKA-AINEENA	2
2.1	Levien luokittelusta.....	2
2.2	Mikrolevien kasvatuksesta	3
2.2.1	Bioreaktorit.....	3
2.2.2	Kasvatustavan vaikutus leväsolun koostumukseen	5
2.3	Mikrolevät biopolttoaineiden raaka-aineena.....	6
2.3.1	Biodieselin tuotto leväbiomassasta.....	7
2.3.2	Etanolin tuotto fermentoimalla.....	10
2.3.3	Metaanintuotto leväbiomassasta.....	10
2.3.4	Biovedyn tuottaminen levillä	10
2.3.5	Biojalostamo-konsepti.....	11
3	MIKROLEVÄT BIOKAASUN TUOTANNOSSA.....	13
3.1	Mikrolevien koostumuksesta.....	13
3.2	Biokaasutuottoon vaikuttavia tekijöitä.....	13
3.3	Esikäsittelymenetelmiä biomassalle.....	14
3.3.1	Entsyyttinen hydrolyysi	15
3.3.2	Alkaalinen käsittely	16
3.3.3	Happohydrolyysi	16
3.3.4	Höyryräjäytys	17
3.3.5	Jauhaminen	17
4	MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	18
4.1	Ympäri ja levät	18
4.1.1	Ympäri	18
4.1.2	Levät	18
4.2	Ylikriittinen hiilidioksidituotto (SCE-käsittely).....	19
4.3	Esikäsittelymenetelmät.....	20
4.3.1	Happokäsittelyt.....	20
4.3.2	Emäskäsittely.....	21
4.3.3	Vetyperoksidi (H ₂ O ₂)- käsittely	21
4.4	Analyysit	22
4.4.1	Liukoisen orgaanisen aineen mittaaminen	22
4.4.2	TS ja VS-analyysi.....	22
4.5	Metaanintuottotestit.....	23
4.5.1	Panoskoelaitteisto	23
4.5.2	Ensimmäinen panoskoe	23
4.5.3	Toinen panoskoe.....	24
4.5.4	Kolmas panoskoe.....	24
5	TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	25
5.1	Esikäsittelyn vaikutus liukoiseen orgaaniseen aineeseen.....	25
5.2	Metaanituotot	26
5.2.1	Eri levät	26

5.2.2	Fuugauksen vaikutus	26
5.2.3	Happokäsittelyt	27
5.2.4	SCE-käsittely	28
5.2.5	Vetyperoksidikäsittely	30
5.2.6	Emäskäsittely	30
5.2.7	Virhetarkastelu	31
6	JOHTOPÄÄTÖKSET	32
	LÄHTEET	33

Liite 1	Ensimmäisen panoskokeen punnitustulokset
Liite 2	Ensimmäisen panoskokeen TS ja VS-tulokset
Liite 3	Toisen panoskokeen punnitustulokset
Liite 4	Toisen panoskokeen TS ja VS-tulokset
Liite 5	Kolmannen panoskokeen punnitustulokset
Liite 6	Kolmannen panoskokeen TS ja VS-tulokset
Liite 7	Ensimmäisen panoskokeen tuotot
Liite 8	Toisen panoskokeen tuotot
Liite 9	Kolmannen panoskokeen tuotot
Liite 10	Levien kasvatusluokset

1 JOHDANTO

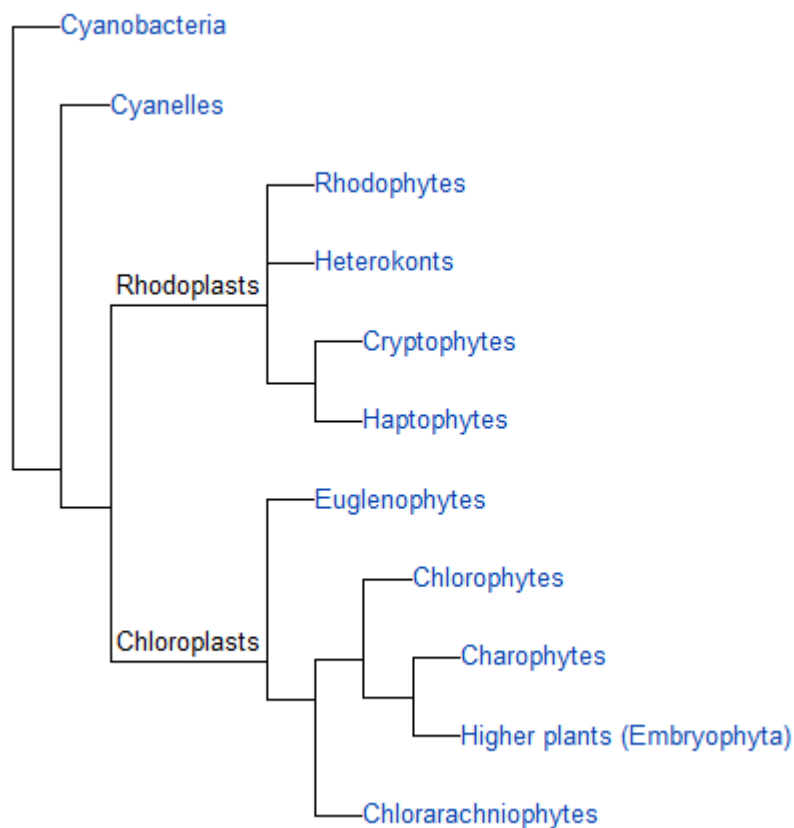
Huoli fossiilisten polttoaineiden riittävydestä ja ilmastonmuutoksesta on lisännyt tarvetta kehittää ja tukea uusiutuvien energiamuotojen käyttöä. Levien käyttöä biopolttoaineiden raaka-aineena on tutkittu viime aikoina vaihtoehtona perinteisille raaka-aineille. Levien etuna ovat niiden vaihtelevat kasvuympäristöt sekä monipuolinen käyttö biopolttoaineina. Verrattuna perinteiseen kasvibiomassan saadaan levästä monipuolisesti niin bio-kaasua, vetyä, etanolia kuin biodieseliä.

Tämä opinnäytetyö on osa Tekes -rahoitteista ALDIGA-hanketta (Algae from Waste for Combined Biodiesel and Biogas Production), jota on toteutettu v.2010-2012 . Hankkeessa on yhteistyössä VTT, Helsingin yliopisto, Lahden ja Hämeen ammattikorkeakoulut, SYKE sekä useita yrityksiä. Tässä opinnäytetyössä on tutkittu muutamia eri leviä, eri esikäsittelymenetelmiä leväbiomassalle ja niiden vaikutusta metaanintuottoon. Testatut esikäsittelymenetelmät pyrittiin valitsemaan niin, että ne olisivat tarkoituksenmukaisia ja kustannustehokkaita suuren mittakaavan laitostoimintaan. Käsittelyt tehtiin alhaisessa lämpötilassa, paitsi yksi lipideille spesifinen uuttokäsittely, ylikriittinen CO₂-uutto, josta saadun leväbiomassan metaanituottoa myös testattiin tässä työssä.

2 LEVÄT BIOPOLTTOAINEIDEN RAAKA-AINEENA

2.1 Levien luokittelusta

Levien luokittelu on vaikeaa, koska levät koostuvat ryhmästä, jolla on samankaltaisia piirteitä, mutta jotka eivät ole kehittyneet samasta kantamuodosta. Eri levälajeja arvellaan olevan noin 300 000. Leviin on perinteisesti luettu myös syanobakteerit eli sinilevät, jotka muodostavat yhden leväryhmän. Aitotumalliset levät ovat usein yksisoluisia ja yhteyttäviä eliöitä. Leviä on luokiteltu myös niiden yhteyttämisspigmenttien mukaan, näin luokiteltuja leviä ovat esimerkiksi punalevät, ruskolevät ja viherlevät. Levien päälinjat ovat *Chlorophyta* (viherlevät), *Rhodophyta* (punalevät), *Glaucocystophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Heterokonta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, ja *dinoflagellates* (Rikkinen 1999, 52-53; Scott et al, 2010; Bhattacharya D & Medlin L, 1998). Levät voidaan myös jaotella koon mukaan mikro- ja makroleviin (www.ymparisto.fi). Kuvassa 1 on esitetty yksi mahdollinen evolutiivinen puu leville. Kuvasta huomataan miten osa levistä on lähempää sukua korkeammille kasveille kuin syanobakteereille.



Kuva 1. Levien taksonomia (Bhattacharya D & Medlin L, 1998)

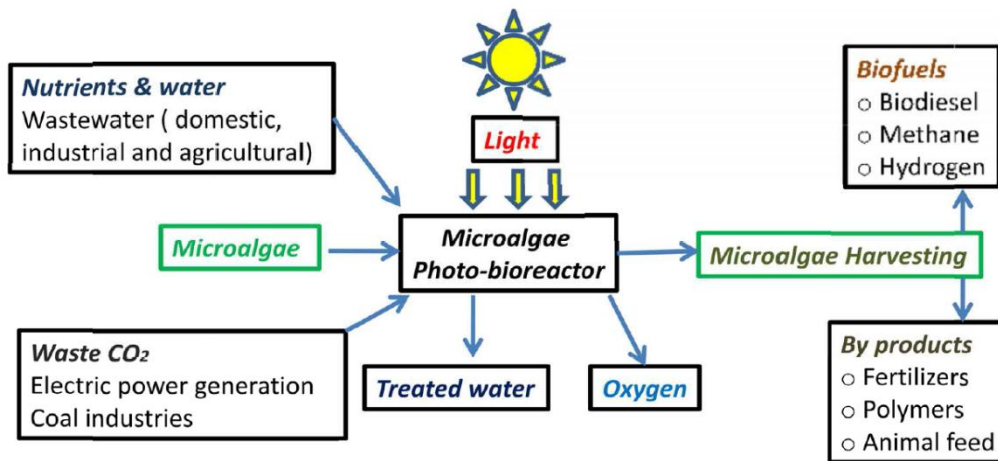
Levien ravinnonottotavat ovat monipuolisia ja jotkut levät voivat vaihdella ravinnonottotapaa olosuhteiden mukaan. Suurin osa levistä on autotrofeja, mutta levistä löytyy myös mikstorofeja ja heterotrofeja (Rikkinen, 1999, 50).

Mikrolevät ovat nimensä mukaisesti mikroskooppisia leviä, joiden koko vaihtelee 5-50 µm välillä. Mikroleviin kuuluu prokaryoottisia ja eukaryoottisia yhteyttäviä eliöitä, joilla on joko yksisoluinen tai yksinkertainen monisoluinen rakenne. Mikrolevien fotosynteesi ja hiilidioksidin käyttö on monia kasveja tehokkaampaa. Tästä syystä mikrolevät kasvavat tehokkaasti ja nopeasti. Mikroleviä löytyy vaihtelevista ympäristöolosuhteista ja leviä löytyy niin vedestä kuin maaltakin. Mikrolevät kykenevät vaihtelemaan elintapojaan ympäristön mukaan ja mikrolevät voivat elää fotoautotrofeina, heterofeina että mikstrofeina. (Mata, Martins & Caetano, 2010; Zamalloa C, Vulsteke E, Albrecht J & Verstraete W, 2011). Mikroleviä kutsutaan myös planktonleviksi. Mikroleviin kuuluu niin alkeistumallisiin ja alkueliöihin luokiteltavia leviä kuin viherleviä, jotka luokitellaan kasveihin (www.ymparisto.fi; Converti A et al, 2009; Bhattacharya D & Medlin L, 1998).

2.2 Mikrolevien kasvatuksesta

2.2.1 Bioreaktorit

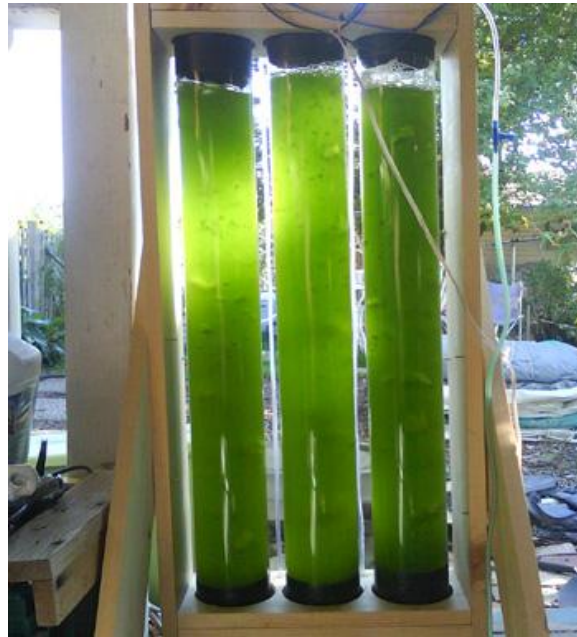
Mikroleviä voidaan kasvattaa monenlaisissa reaktoreissa, jotka voivat olla joko suljettuja tai avoimia. Kasvatuksessa voidaan käyttää avoimia lamikoita sekä erityyppisiä fotobioreaktoreita (PBR). Avoimet bioreaktorit ovat tyypillisesti suurempia verrattuna suljettuihin bioreaktoreihin, mutta avoimissa ei voida kasvattaa eri lajeja niin laajasti kuin suljetuissa johtuen kontaminaatio riskistä. Avoimissa reaktoreissa ei voida hallita kasvuolosuhteita juurikaan verrattuna suljettuihin reaktoreihin, joissa olosuhteita on suhteellisen helppo hallita. Avoimissa reaktoreissa biomassan laatu ei ole myöskään niin tasalaatuista kuin suljetuissa bioreaktoreissa eikä harvestointi- eli talteenottotehokkuus ole niin hyvä verrattuna suljettuihin reaktoreihin. Biomassan tuotanto suhteessa reaktorin kokoon on selvästi huonompi avoimissa reaktoreissa. Avoimien bioreaktoreiden etuna on, että kustannukset ovat pienemmät verrattuna suljettuihin reaktoreihin. Kuitenkin avoimissa bioreaktoreissa levän kerääminen on kalliimpaa kuin suljetuissa, mutta käyttökustannukset ovat pienemmät. Fotobioreaktori on esimerkki suljetusta bioreaktorista. Kuvassa (2) on kaaviokuva mikrolevän tuottamisesta fotobioreaktorissa, hyödyntäen jäteveden ravinteita ja savukaasun hiilidioksidia, ja tuotettaessa levästä biopolttoaineita.



Kuva 2. Kokonaiskonsepti, jossa osana mikrolevän kasvatus fotobioreaktorissa (Znad H et al, 2012)

Reaktoreissa on oleellista optimoida sekoitus ja levien valon saanti. Oleellisia ravinteita levälle kasvatuksessa hiilen lisäksi ovat typpi, fosfori, rauta ja joskus pii. Hiilen levät voivat ottaa suoraan ilman hiilidioksidista, mutta levät voivat hyödyntää myös teollisuuden savukaasuja ja hiiltä joka on kemiallisesti sitoutunutta liukoisiin karbonaatteihin. Suurin osa mikrolevistä suosii neutraalia pH:ta, mutta on olemassa lajeja, jotka kestävät korkeampaa tai matalampaa pH:ta. Leville optimi kasvulämpötila on 15-26 °C:n välillä. Optimilämpötila vaihtelee lajista riippuen ja optimilämpötilaan vaikuttaa myös valon määrä. Levien kasvatuksessa fotosynteesin sivutuotteena syntyvä happi voi inhiboida levien metaboliaa. Tyypillisesti leväbiomassa kaksinkertaistuu 24 h:n aikana, mutta eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa leväbiomassa voi kaksinkertaistua 3,5 tunnissa (Gouveia L, 2011; Scott S, Davey P, Dennis J, Horst I, Howe C, Lea-Smith D & Smith A, 2010; Chisti Y, 2007; Znad H, Naderi G, Ang H.M & Tade M.O, 2012).

Fotobioreaktorit voivat olla panostyyppisiä tai jatkuvatoimisia. Fotobioreaktoreissa on tärkeää, että valaistus on oikeanlainen. Kuvassa 4 on suljettu fotobioreaktori. Eri levätyypit vaativat eri aallonpitoista valoa ja valomäärän tarve vaihtelee lajeittain. Valo voi toimia levillä kasvua rajoittavana tekijänä sekä inhiboivana tekijänä. Fotobioreaktoreissa valon pääseminen reaktorin keskialueelle voi aiheuttaa ongelmia ja biomassan tiheä kasvu reaktorin seinämille voi estää valonpääsemistä reaktorin kaikkiin osiin. Tätä ongelmaa voidaan vähentää kunnollisella sekoituksella, jolloin leväbiomassa ei pääse kiinnittymään reaktorin seinämiin. Sekoituksen täytyy kuitenkin olla tarpeeksi hellävaraista, etteivät leväsolut pääse rikkoutumaan. Fotobioreaktoreiden etuna on hyvä kontrolloitavuus verrattuna muun tyyppisiin reaktoreihin (Gouveia L, 2011; Chisti Y, 2007). Levien harvestoinnissa on käytössä eri menetelmiä, joita ovat esimerkiksi flokkulointi, sedimentaatio ja sentrifugointi. Flokkuloinnissa voidaan käyttää kemiallista flokkulointia, jolloin kemikaalina voi olla esimerkiksi kitosaani (Amin S, 2009; Gouveia L, 2011).



Kuva 3. Fotobioreaktori (www.algaegeek.com)

2.2.2 Kasvatustavan vaikutus leväsolun koostumukseen

Mikrolevät voivat vaihdella aineenvaihduntaansa kasvatusolosuhteiden mukaan ja mikrolevät voivat kasvaa esimerkiksi autotrofisesti, heterotrofisesti ja miksotrofisesti (Gouveia L, 2011). Kasvatustapa ja ravinteiden määrä vaikuttaa leväsolujen koostumukseen. Yleisesti levää ”stressaavat” olosuhteet nostavat leväsolujen lipidipitoisuuksia. Typen ja fosforin määrä rajoittavat solujen kasvua, mutta niiden puute nostaa leväsolujen lipidipitoisuutta. Typen puute myös vähentää leväsolujen proteiinipitoisuutta ja nostaa diglyserin että tärkkelyksen pitoisuutta. Typen saannin vaikutusta proteiini-, lipidi- ja hiilihydraatti-pitoisuuksiin on esitetty taulukossa 1. Taulukosta huomataan miten typen puute aiheuttaa selvän nousun levän lipidi-pitoisuudessa sekä laskua proteiineissa.

Taulukko 1. Typen vaikutus leväsolujen koostumukseen (Sialve et al, 2009)

Laji	Kasvatustapa	Proteiinit (%)	Lipidit (%)	Hiilihydraatit (%)
<i>C.vulgaris</i>	Normaali	29	18	18
<i>C.vulgaris</i>	Vähä typpinen	7	40	23
<i>C.emersonii</i>	Normaali	32	29	21
<i>C.emersonii</i>	Vähä typpinen	28	63	29
<i>C.protothecoides</i>	Normaali	38	11	19
<i>C.protothecoides</i>	Vähä typpinen	36	23	24

Lipidien määrään vaikuttaa myös kasvatuslämpötila. Esimerkiksi muuttaman asteen lämpötila-muutoksella voidaan saada levät tuottamaan selvästi

enemmän lipidejä. Lämpötilan vaikutus riippuu käytettävästä levä-lajista ja kaikki levät eivät tuota enemmän lipidejä alemmissa lämpötiloissa. Converti et al (2009) raportoivat *C. vulgaris*-levällä 2,5 kertaisen lipidipitoisuuden kasvun kun lämpötilaa laskettiin 30 °C:sta 25 °C:een.

Lipidipitoisuuteen vaikuttaa myös suuresti kasvaako levä autotrofisesti vai heterotrofisesti. Scott et al:n (2010) mukaan esimerkiksi *Chlorella protothecoides*:lla lipidipitoisuus oli neljä kertaa suurempi heterotrofisena kasvatettuna kuin autotrofisena. Kasvatustapa vaikuttaa myös, mitkä bioreaktori tyypit sopivat kasvatukseen ja kuinka suuret kustannukset kasvatuksesta tulee (Scott A et al, 2010; Sialve B, Berntet N, Bernard O, 2009; Converti A, Casazza A, Ortiz E, Perego P & Del Borghi M, 2009). Taulukossa 2 on esitetty vertailua eri kasvatustapojen välillä ja kasvatustavan vaikutusta solutiheyteen.

Taulukko 2. Levän kasvatustapojen vertailua (Chen et al, 2011)

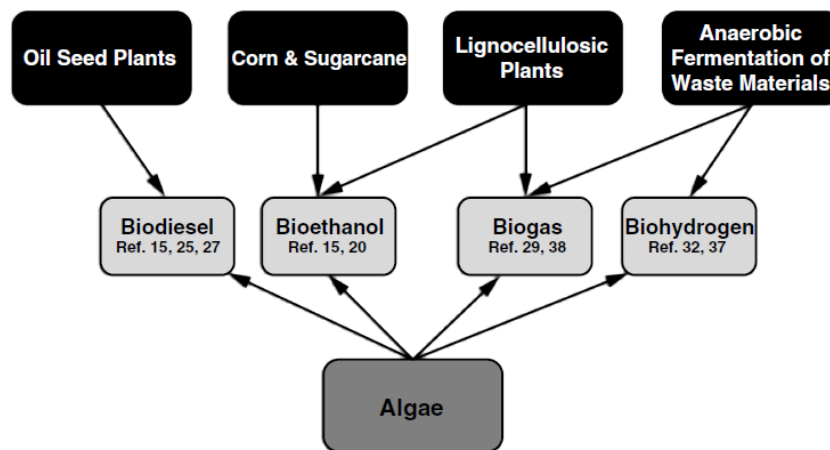
Kasvatustapa	Energian lähde	Hiilenlähde	Solutiheys	Reaktorityyppi	Kustannus	Kasvatuksen ongelmia
Fototrofinen	Valo	Epäorgaaninen	Alhainen	Avoin lammikko tai PBR	Matala	Alhainen solutiheys
Heterotrofinen	Orgaaninen	Orgaaninen	Korkea	Perinteinen fermentori	Keskitaso	Kontaminaatoriski, korkea substraatti kustannukset
Miksotrofinen	Valo ja orgaaninen	Epäorgaaninen ja orgaaninen	Keskitaso	Suljettu PBR	Korkea	Kontaminaatoriski, korkeat laite ja substraatti kustannukset
Foto-heterotrofinen	Valo	Orgaaninen	Keskitaso	Suljettu PBR	Korkea	Kontaminaatoriski, korkeat varuste ja substraatti kustannukset

2.3 Mikrolevät biopolttoaineiden raaka-aineena

Levät kuuluvat niin sanottuihin toisen sukupolven biopolttoaineraaka-aineisiin, joihin kuuluu myös esimerkiksi korkeita määriä lignoselluloossa sisältäviä raaka-aineita. Leviä voidaan käyttää biodieselin, bioetanolin, biovedyn ja biokaasun/metaanin tuotantoon (Rösch C, Skarka J & Patyk A). Levien etuna on, että kasvatuksessa voidaan käyttää suolavettä sekä jätevesiä ja levät eivät kilpaile ruuantuotannon kanssa. Leviä voidaan myös kasvattaa alueilla, jossa ei voida kasvattaa perinteisiä maakasveja. Levät sitovat myös hiilidioksidia kasvunsa seurauksena, joka auttaa poistamaan hiilidioksidia ilmasta ja leviä voitaisiin käyttää puhdistamaan hiilidioksidia eri tuotantolaitosten päästöistä. Levien kasvatuksessa voidaan käyttää myös jätevesiä, jolloin levät käyttävät kasvuun jäteveden tyyppiä ja fosforia. Levät pystyvät myös puhdistamaan vedestä raskasmetalleja ja muita saasteita. Levien etuna on se, että niitä voidaan manipuloida tuottamaan haluttuja tuotteita. Esimerkiksi kasvuolosuhteiden mukaan levät tuottavat eri määriä lipidejä, proteiineja ja hiilihydraatteja. Leviä voidaan harvestoida melkein ympärivuoden, joten levä biopolttoaineet eivät ole niin vuodenajasta riippuvia kuin perinteiset kasvubiomassat. Etuna on myös monimutkaisten erikoistuneitten osien puute verrattuna esimerkiksi kasveihin, joilla on lisääntymistä varten erikoistuneet osat. Leväbiomassasta saatavilla biopolttoaineilla on kuitenkin muutamia haasteita voitettavana ennen kuin ne ovat täysin kannattavia. Esimerkiksi biodieselin tuotto on vielä

kalliimpaa verrattuna fossiilisiin polttoaineisiin (Pienkos P, 2007; Amin S, 2009; Gouveia L, 2011).

Leväbiomassan energiaksi muuttamistavat voidaan luokitella kolmeen eri luokkaan, jotka ovat biokemialliset, termokemialliset ja suoraan polttoon perustavat menetelmät (Amin S, 2009, 1835). Levä on suunniteltu hyödynnettävän myös jätevedenpuhdistuksessa, teollisuuden pakkokaasujen hiilidioksidin poistossa ja mikrolevien sisältämiä aineita on suunniteltu käytettävän eri teollisuudenaloilla (Mata et al, 2010) Suomessa on esimerkiksi suunniteltu levien käyttöä omega 3 valmistuksessa. Levät voisivat hyödyntää jätevesiä ja kasvustosta voitaisiin kerätä omega 3 talteen, jota voitaisiin myydä lisäravinteena (Söisitkö itse? Suomessa kasvatetaan pian ravintolisiä sellutehtaan jätevesissä, 2012). Kuvassa 4 on esitetty eri vaihtoehtoja hyödyntää levä biopolttoaineina. Kuvasta näkyy myös miten leväbiomassa soveltuu useamman eri polttoaineen valmistukseen verrattuna perinteisiin kasvibiomassoihin. Seuraavassa on käsitelty muutamia yleisiä tapoja hyödyntää leväbiomassaa biopolttoaineiden raaka-aineena.



Kuva 4. Levien hyödyntäminen (Jones C et al 2012)

2.3.1 Biodieselin tuotto leväbiomassasta

Leväbiomassassa olevat lipidit ovat kemiallisesti samankaltaisia perinteisten kasvibiomassojen lipidien kanssa, jonka takia levät soveltuvat hyvin biodieselin valmistamiseen johtuen suuremmasta lipidipitoisuudesta kasveihin verrattuna. Kaikki levistä saatava öljy ei kuitenkaan sovellu biodieselin valmistukseen. Biodieselin valmistuksen kannalta on olennaista valita oikea kanta, joka soveltuu korkeiden lipidipitoisuuksien tuottamiseen. Kuvassa 5 on listattuna eri mikrolevä-lajien öljypitoisuuksia.

Mikrolevä	Öljypitoisuus (% kuivapainosta)
<i>Botryococcus braunii</i>	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	28–32
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca</i> sp.	16–37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis</i> sp.	25–33
<i>Monallanthus salina</i>	>20
<i>Nannochloris</i> sp.	20–35
<i>Nannochloropsis</i> sp.	31–68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35–54
<i>Nitzschia</i> sp.	45–47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20–30
<i>Schizochytrium</i> sp.	50–77
<i>Tetraselmis suecica</i>	15–23
<i>B. braunii</i>	25–75

Kuva 5. Eri mikrolevä-lajien öljypitoisuuksia (Singh J & Gu S, 2010)

Levien kuivamassasta voi olla tyypillisesti 30-50 % varastorasvoja, joita voidaan hyödyntää biodieselin valmistuksessa. Levät tuottavat öljypalmuun verrattuna huomattavasti enemmän öljyä (Neste oil, 2010, Levästä tulevaisuuden polttoainetta). Kuvassa 6 on vertailussa eri biodiesel raaka-aineiden öljyntuottoja ja tuotoista huomataan, että matalan öljypitoisuudenkin mikrolevät tuottavat enemmän öljyä kuin palmuöljy kasvatuspinta-alaa kohti tarkasteltaessa.

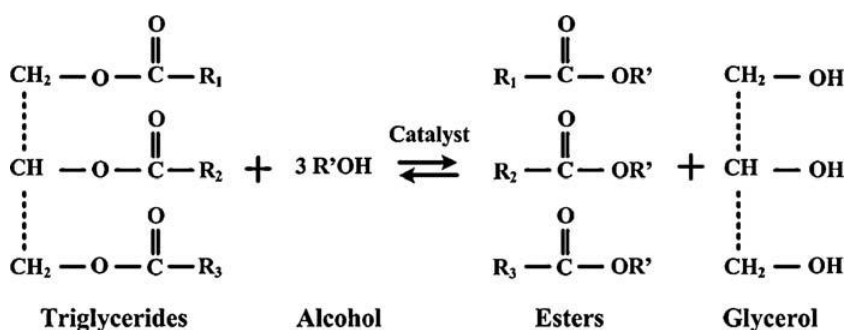
Plant source	Seed oil content (% oil by wt in biomass)	Oil yield (L oil/ha year)	Land use (m ² year/kg biodiesel)	Biodiesel productivity (kg biodiesel/ha year)
Corn/Maize (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soybean (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola/Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Castor (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palm oil (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgae (low oil content)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgae (medium oil content)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgae (high oil content)	70	136,900	0.1	121,104

Kuva 6. Eri biodiesel raaka-aineiden öljyntuottoarvoja. (Mata, Martins & Caetano, 2010).

Öljyn erottamiseksi leväbiomassasta on olemassa useita eri menetelmiä. Öljyn erotusta hankaloittaa leväsolujen soluseinän monimutkainen rakenne, jonka takia esimerkiksi öljysiemen kasveille käytettävät erotusmenetelmät eivät ole yhtä tehokkaita levälle. Erottamismenetelmiä ovat mekaaniset, kemialliset ja entsyymaattiset erotusmenetelmät. Mekaanisia erotusmenetelmiä ovat puristaminen ja ultraääniavusteinen puristaminen. Mekaanista erotusta varten leväbiomassa on kuivattava, joka vie energiaa ja

on kustannuksia nostava tekijä. Kemiallisia erotusmenetelmiä ovat esimerkiksi erilaisten liuottimien käyttö erottamisessa. Käytettäviä liuottimia ovat esimerkiksi asetoni ja syklo-heksaani. Tehokas tapa erottaa öljyt leväbiomassasta on superkriittiset fluidit, jotka kuitenkin vaativat kalliita laitteita. Superkriittisillä nesteillä voidaan erottaa melkein kaikki öljy leväbiomassasta. Andrich et al (2006) olivat onnistuneet erottamaan 90 % erotettavissa olevista öljyistä superkriittisellä hiilidioksidiuutolla (55 °C , 70 MPa, 15 min). Levä lajina oli *Spirulina Platenis* (Andrich G, Zinnai A, Nesti U, Venturi F & Fiorentini R, 2006; Jones C & Mayfield S, 2012; www.oilgae.com; Chisti Y, 2007; Griffiths M.J & Harrison S.T.L, 2009; Singh J & Gu S, 2010).

Perinteinen tapa biodieselin valmistukseen on vaihtoesteröinti menetelmä, joka voidaan suorittaa ilman katalyyttiä tai käytössä voi olla happo tai emäskatalyytti. Katalyyttinä voidaan käyttää myös entsyymejä. Katalyyttiä käytetään yleensä reaktionopeutta ja saantoa parantamaan. Emäs katalyytit ovat yleisempiä vaihtoesteröinnissä johtuen niiden nopeudesta verrattuna happokatalyyttiin (Demirbas A, 2006). Vaihtoesteröinti on reaktio, jossa rasva tai öljy reagoi alkoholin kanssa muodostaen estereitä ja glyserolia. Alkoholi yhdistyy triglyseridin kanssa muodostaen glyserolia ja estereitä (Amin S, 2009). Kuvassa 7 on esitetty vaihtoesteröinnin reaktioyhtälö.



Kuva 7. Vaihtoesteröinti (Mata, Martins & Caetano, 2010).

Muita tapoja tuottaa biodieseliä on esimerkiksi hydraus, joka on niin sanottu toisen sukupolventapa valmistaa biodieseliä.

Leväbiodiesel ei ole vielä tarpeeksi kilpailukykyistä verrattuna fossiilisiin polttoaineisiin. Biodieselin kannattavuuden kannalta on olennaista optimoida leväsolujen lipidipitoisuus ja leväbiomassan tuotto. Lipidipitoisuuden optimoinnissa vaihtoehtona on kasvuolosuhteiden manipulointi ja geenitekniikka, jolla saataisiin levät tuottamaan enemmän lipidejä ja tehostettua levien kasvunopeutta. Valmistuksen kannalta on myös olennaista keksiä tehokas ja kustannuksiltaan alhainen keino erottaa öljy leväbiomassasta. (Jones C & Mayfield S, 2012; Scott S et al, 2012; Scott S et al, 2010)

2.3.2 Etanolin tuotto fermentoimalla

Leväbiomassasta voidaan tuottaa etanolia fermentoimalla, jota voidaan käyttää polttoaineena sellaisenaan tai seoksena tavallisen bensiinin kanssa. Leväbiomassa soveltuu hyvin etanolituottoon, johtuen leväsolujen korkeasta hiilihydraattipitoisuudesta. Etanolin tuotossa voidaan käyttää leväbiomassaa, josta on erotettu lipidit biodieselin tuottoa varten. Erotuksesta jää jäljelle biomassaa mikä sisältää proteiinit ja hiilihydraatit, joita voidaan fermentoida. Fermentoinnissa leväbiomassan hiilihydraatit, kuten tärkkelys muutetaan entsyymeillä sokereiksi, joita hiivat käyttävät hyväkseen muodostaen etanolia. Leväsolujen rakenteesta riippuu mitä entsyymejä tarvitaan sokereiden vapauttamiseksi. Esimerkiksi selluloosan, hemiselluloosan ja ligniinin suhteet solussa vaikuttavat siihen mitä entsyymejä tarvitaan. Levät kuitenkin sisältävät pienempiä osuuksia hemiselluloosaa ja ligniiniä verrattuna perinteisiin kasvibiomassoihin. Tärkkelyksen vapauttamiseksi voidaan käyttää myös mekaanisia menetelmiä. Saatu etanoli puhdistetaan tislamalla, joka on energiaa vievä prosessi. Yleensä fermentoinnissa käytetään *Saccharomyces cerevisiae*-hiivaa (Amin S, 2009; www.oilgae.com; Jones C & Mayfield S, 2012).

2.3.3 Metaanintuotto leväbiomassasta

Metaanin tuotossa leväbiomassasta voi olla käytössä joko anaerobinen käyminen tai terminen kaasutus. Terminen kaasutuksen kannattavuus riippuu biomassan kuiva-ainepitoisuudesta, koska veden haihduttaminen vaatii paljon energiaa. Anaerobinen käyminen on prosessi missä eri mikrobit hajottavat hiilipitoisen aineksen muodostaen biokaasua, joka on noin 60 % metaania ja 40 % hiilidioksidia levässä tuotetussa biokaasussa. Biokaasu sisältää myös pieniä määriä rikkivetyä, dityppeä, divetyä ja muita haihtuvia yhdisteitä. Korkean typpipitoisuuden materiaalissa voi syntyä myös ammoniakkia, joka inhiboi anaerobista käymistä. Levästä saatava biokaasu sisältää enemmän metaania verrattuna moneen muuhun kasvibiomassasta saatavaan kaasuun. Levästä saatavan biokaasun puhdistamiseen ja metaanin erottamiseen voisi käyttää hyväksi leväkasvustoa, jolloin levät käyttäisivät biokaasussa olevan hiilidioksidin kasvuunsa. Anaerobisessa käymisessä voidaan käyttää pelkää leväbiomassaa tai levän kanssa voidaan käyttää yhteiskäsittelyä muuta orgaanista materiaalia esimerkiksi jätevesipuhdistamonlietettä (Chynowetha D, Owensa J & Legrand R, 2001; Cecchi F, Pavanb P & Mata-Alvarez J; Sialve B et al 2009).

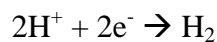
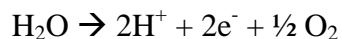
Terminen kaasutus on kemiallinen prosessi missä biomassasta saadaan poltettavia kaasuja osittaisella hapetuksella ilman, hapen ja/tai höyryn kanssa korkeissa lämpötiloissa (Amin S, 2009).

2.3.4 Biovedyn tuottaminen levillä

Syanobakteerit ja viherlevät pystyvät tuottamaan biovetyä aineenvaihduntansa tuloksena. Biovedyn tuotossa syanobakteerit ovat hyvä ehdokas, johtuen alhaisista ravintovaatimuksista. Syanobakteerit ja viherlevät tuottavat biovetyä eri tavalla. Syanobakteerien biovety syntyy prosessissa, jossa va-

lostasta riippuva reaktio tai pimeä-anaerobinen reaktio katalysoituu entsyymien vaikutuksesta. Viherlevillä biovety syntyy fotosynteesistä vedestä, jolloin vedestä syntyy happea ja vetyä kaksivaiheisessa prosessissa. Kuviossa 1 on esitetty biovedyn vedestä syntymisen reaktioyhtälöt. Biovedyn tuottaminen nostaa leväsolujen lipidi ja tärkkelyspitoisuutta, joka tekee levistä paremmin soveltuvaa fermentointiin. Tämän takia leväbiomassalla biovedyn tuottaminen voi olla kannattavaa ennen levän fermentointia (Gouveia L, 2011; Peer M. Schenk, Skye R. Thomas-Hall, Evan Stephens, Ute C. Marx, Jan H. Mussgnug, Clemens Posten, Olaf Kruse & Ben Hankamer, 2008).

Kuvio 1. Biovedyn syntyminen vedestä (Peer M. Schenk et al 2008)

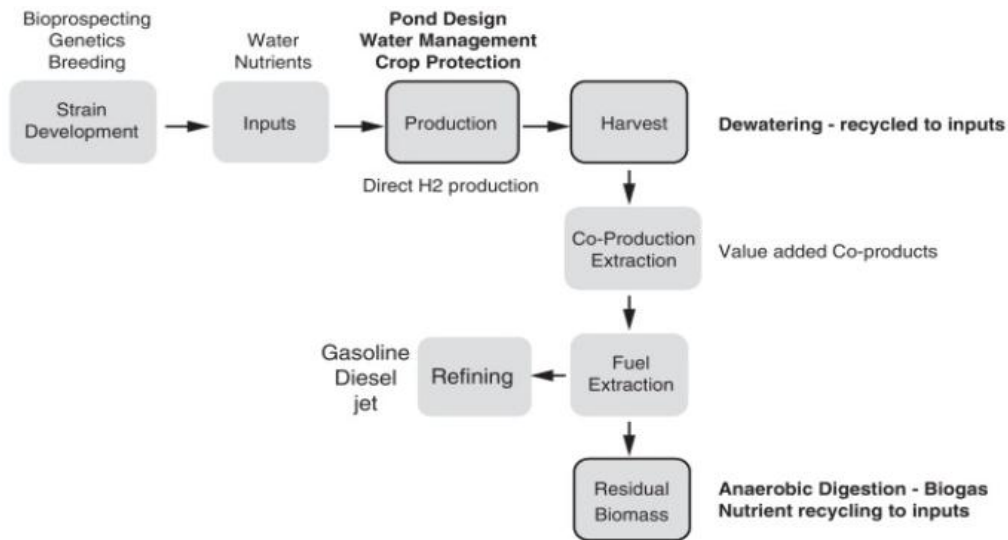


Levien suoran vetytuotannon lisäksi, biovetyä voidaan tuottaa leväbiomassasta anaerobisten bakteereiden avulla, jolloin biovetyä syntyy ilman auringonvalon tarvetta osana bakteereiden aineenvaihduntaa. Biovedyn tuotannon kannalta on tärkeää oikeat olosuhteet, joissa vedyn tuotanto on optimaalista ja inhiboivien aineiden tuotanto mahdollisimman vähäistä. Tärkeitä parametreja biovedyn tuotannon kannalta ovat pH, viipymäaika ja kaasunosapaine mikä vaikuttaa metabolian tasapainoon. Makrolevät soveltuvat hyvin biovedyn tuotantoon johtuen rakenteellisen ligniinin puutteesta, joka yleensä on vaikeasti hajoavaa (Jones C & Mayfield S, 2012; Ren N, Li J, Li B, Wang Y, Liu S, 2006; Levin D, Pitt L, Love M, 2003).

2.3.5 Biojalostamo-konsepti

Biojalostamo-konseptissa on kyse yhden biomassan mahdollisimman täydellistä hyödyntämistä. Esimerkiksi leväbiomassaa pyritään hyödyntämään biodieselin valmistuksen ohella mahdollisimman suuri osa eri sivutuotteiden ja kaasutuksen muodossa. Tämä mahdollistaa jokaisen komponentin tuottamisen halvemmalla kuin mitä niiden tuottaminen yksistään tulisi maksamaan. Levää voidaan käyttää aluksi biovedyn tuottamiseen, jolloin levät tuottavat vetyä aineenvaihdunnan sivutuotteena. Levä harvennetaan ja otetaan hyötyjakeet talteen, joita ovat eri ravintoaineet ja öljyt joista voidaan valmistaa biodieselä. Arvokkaita levistä saatavia sivutuotteita ovat eri pigmentit, antioksidantit, vitamiinit ja muut lääkeaineiksi soveltuvat sivutuotteet. Jäännösbiomassasta voidaan tuottaa biokaasua, lannoitetta tai sitä voidaan käyttää eläinten rehuna. Jäännösbiomassa sopii hyvin lannoitteeksi johtuen korkeasta typpi/fosfori-suhteesta. Biokaasusta saatavaa energiaa voidaan käyttää leväntuotantolaitoksen toiminnan pyörittämisessä. Biokaasusta saatava tuotto voi olla myös tärkeä tekijä biodieselin kannattavuuden kannalta. Yhteiskäsittely tekee leväntuotannosta kannattavampaa kuin jos tuotettaisiin vain yhtä tuotetta ja leväbiomassa saadaan hyödynnettyä mahdollisimman tehokkaasti.

Käytettävästä levälajista ja kasvatustavasta riippuu mitä biopolttoaineita levästä saadaan. Levistä, jotka sisältävät paljon lipidejä saadaan enemmän biodieseliä kun taas levät jotka sisältävät paljon hiilihydraatteja soveltuvat paremmin bioetanolin raaka-aineeksi. Kuvassa 8 on esitettyä biojalostamo-konsepti leväbiomassan hyödyntämisestä. Kuvasta näkyy miten eri vaiheissa otetaan talteen hyödyllisiä sivutuotteita ja miten leväbiomassaa käytetään mm. biovedyn tuottamiseen. (Jones C & Mayfield S, 2012; Schmid-Staiger U, 2009; Sialve B, Berntet N, Bernard O, 2009; Gouveia L, 2011).



Kuva 8. Biojalostamo-konsepti (Jones C et al 2012)

3 MIKROLEVÄT BIOKAASUN TUOTANNOSSA

3.1 Mikrolevien koostumuksesta

Leväsolujen soluseinän rakenne vaihtelee suuresti kannasta riippuen. Soluseinän koostumus esim. aminohappokoostumus vaihtelee levätyypin mukaan. Soluseinä voi koostua levästä riippuen noin 4-15 eri aminohaposta (Burczyka J, SÂ mietanaa B, TerminÂ ska-Pabisa K, Zycha M & Kowalowskia P, 1999, 494). Mikrolevät sisältävät proteiineja, hiilihydraatteja, aminohappoja, lipidejä, pigmenttejä ja vitamiineja eri suhteissa. Proteiinien osuus vaihtelee 10-60 % välillä ja lipidien pitoisuus vaihtelee 2-90 % välillä. Hiilihydraatit ovat levissä tärkeä kyllä, glukoosin, ym. sokerien ja polysakkaridien muodossa. Hiilihydraattien pitoisuus vaihtelee 5-50 % välillä kuivapainosta. Levät sisältävät myös arvokkaita ravinteita esimerkiksi eri B-vitamiineja ja happoja. Levien etuna perinteisiin kasvibiomassoihin on rakenteellisen ligniinin ja hemiselluloosa vähäinen määrä, joka tekee niistä helpommin käsiteltäviä esimerkiksi bioetanolin valmistuksessa (Zamalloa et al, 2011; Schmid-Staiger U, 2009; Jones C & Mayfield S, 2012).

Esimerkkinä mikrolevän rakenteesta on *Chlorella pyrenoidosa*, jonka solujen halkaisija on noin 3-4 µm ja soluseinän paksuus on noin 210 ångströmiä. Soluseinän osuus leväsolun koko kuivapainosta on noin 13,6 %. Soluseinän koostumus on noin 27 % proteiineja, 9 % lipidejä, 15,4 % α-selluloosaa, 31,0 % hemiselluloosaa, 3,3 % glukosamiinia ja 5,2 % tuhkaa. Soluseinän glukosamiini on emäsiukuista. Mutta kuten edellä todettiin, mikrolevien koostumukseen voidaan vaikuttaa kasvatusolosuhteilla (D. H. Northcote, K. J. Goulding & R. W. Horne, J. 1958; Burczyka et al, 1999).

3.2 Biokaasutuottoon vaikuttavia tekijöitä

Levistä saatavaan biokaasutuottoon vaikuttaa viipymääjan lisäksi käytettävä levälaji, sen koostumus ja biohajoavuus. Tehokkuuteen vaikuttavat erityisesti leväsolun hajoaminen ja miten paljon metanogeenisiä inhiboivia aineita syntyy. Inhiboivia aineita ovat esimerkiksi ammonium-ionit ja natrium-ionit, joiden syntyminen riippuu levän kemiallisesta koostumuksesta. Esimerkiksi korkea typpipitoisuus voi johtaa korkeaan ammoniakkipitoisuuden fermentoinnissa. Ammoniakin ja ammonium-ionien suhde riippuu pH:sta. Natriumia esiintyy merilevillä ja sen korkea pitoisuus voi vaikuttaa bakteerien toimintaan. Kuitenkin natrium on myös tärkeää levien aineen vaihdunnan kannalta. Levien kyky sietää inhiboivia aineita vaihtelee lajikohtaisesti. Ilman esikäsitelyä leväbiomassan hajoaminen on 20-80 % välillä orgaanisesta aineesta, joten leväbiomassan esikäsitely on tarpeellista. Leväsolujen hajoaminen on huonoa johtuen leväsolujen soluseinän vaikeasti hajoavuudesta. Soluseinä on vaikeasti käsiteltävää bakteereille vaikka leväsolu olisi kuollut. Osalla levälajeista soluseinä koostuu proteiineista eikä sisällä ollenkaan selluloosaa tai hemiselluloosaa. Proteiinipitoiset levät tuottavat biokaasutuksessa helposti inhiboivia aineita. Osalla levistä ei ole ollenkaan soluseinää ja nämä lajikkeet ovat selvästi helpommin hajoavia. Proteiinipitoiset levät omaavat alhaisemman hiili/typpi suhteen kuin

maalla kasvavat kasvit. Suhde on mikroleville keskimäärin noin 10,2 kun taas suhde on n. 36 monille maakasveille.

Anaerobisen käymisen kannalta levät sisältävät paljon lipidejä, jotka ovat hyvää materiaalia metaanintuotannossa, johtuen korkeasta teoreettisesta metaanisaannosta verrattuna proteiineihin ja hiilihidraatteihin.

Leväbiomassan hajoavuuteen voidaan vaikuttaa myös käyttämällä leväbiomassan kanssa anaerobisessa käymisessä muuta orgaanista ainesta. Yhteiskäsittelyllä voidaan tasoittaa ravinne-epätasapainoa. Esimerkiksi hiili/typpi-suhteen ollessa alle 20 on anaerobisen mikroflooran ravinnevaatimuksissa epätasapaino. Yen et al (2007) olivat käsitelleet leväbiomassaa ja jätepaperia, jolloin saatiin parempi metaanituotto levästä. Tämä johtui osaltaan paremmasta hiili/typpi-suhteesta, joka oli tutkimuksessa ollut 20-25 välillä. Lämpötila vaikuttaa myös leväbiomassan hajoamiseen ja bakteerien kykyyn tuottaa metaania. Optimilämpötilaksi Sielve et al (2009) ehdottavat 40 °C ja esimerkiksi lämpötilan nosto 35 °C:ta 50 °C:een voi nostaa hajoavuutta n. 5 %. Levien korkean vesipitoisuuden takia levien kuivaaminen voi olla kuljettamisen kannalta välttämätöntä. Kuivaaminen kuitenkin saattaa laskea leväbiomassasta saatavan metaanin määrää. Mussnug et al (2010) raportoivat 20 % metaanintuottopotentiaalin laskua kuivatuilla levillä. Tämä voi johtua haihtuvien orgaanisten aineiden menetyksestä, joilla on korkea fermentaatiopotentiaali (Zamalloa et al, 2011; Jones et al, 2012; Mussnug J, Klassen V, Schuter A & Kruse O, 2010; Yen H, Brune D.E, 2007; Sielve B, 2009).

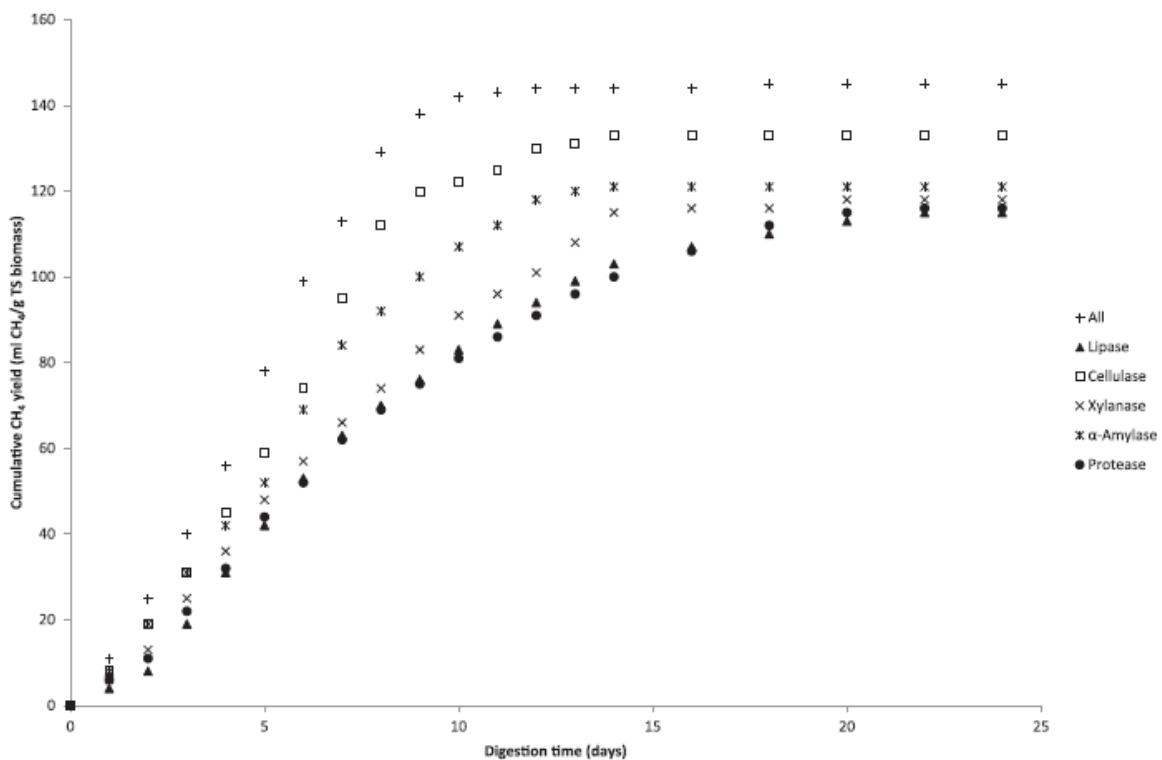
3.3 Esikäsittelymenetelmiä biomassalle

Esikäsittelymenetelmän valitseminen biomassalle perustuu siihen mitä biomassasta halutaan tuottaa. Esikäsittelymenetelmillä on eri vaikutukset riippuen halutaanko tuottaa metaania vai etanolia. Selluloosa sisältävän biomassan esikäsittelyn tarkoitus on saada selluloosa paremmin käsiteltävään muotoon ja hajottaa selluloosan kiderakennetta. Esikäsittelymenetelmät ovat joka fyysisiä tai kemiallisia. Osa esikäsittelyistä sisältää molempien menetelmien yhdistämistä. Fyysisiä menetelmiä ovat esimerkiksi partikkelikoon mekaaninen pienentäminen ja höyryräjäyttäminen. Kemiallisia menetelmiä ovat esimerkiksi happo- ja emäs katalysoidut hydrolyysit (Mosier et al, 2005). Fernandes et al (2009) mukaan kasvibiomassa joka sisältää paljon ligniiniä hyötyy esikäsittelystä enemmän kuin biomassassa, jossa ligniinipitoisuus on pieni. Tämä johtuu siitä, että ligniini on hydrofobinen polymeeri joka ei hajoa niin helposti anaerobisissa olosuhteissa. Leväbiomassan esikäsittelyn kannalta on olennaista saada rikottua leväsoluseinän rakennetta, jolloin levän ravinteet ovat paremmin käytettävissä. Levälajit, joiden soluseinä on helposti hajoavaa, eivät välttämättä tarvitse esikäsittelyä. (Fernandes T, Klaasse Bos G, Zeeman G, Sanders J & van Lier J, 2009; Pakarinen A, 2012).

3.3.1 Entsymaattinen hydrolyysi

Entsymaattista hydrolyysiä rajoittavia tekijöitä on useita lignoselluloosaa sisältävässä materiaalissa. Rajoittavia tekijöitä ovat polymerisaatioaste, kosteus ja ligniini pitoisuus (Hendriks & Zeeman, 2009). Entsymaattinen hydrolyysi voidaan toteuttaa ennen fermentointia tai fermentoinnin aikana. Käytettävät entsyymit riippuvat käytettävästä materiaalista ja esimerkiksi solujen soluseinän materiaalin hydrolysoimiseen vaaditaan useita eri entsyymejä. Esimerkki entsyymaattisesta hydrolyysistä on tärkkelyksen hydrolysoiminen amylaaseilla etanolituotantoa varten. Eri entsyymeillä on eri pH-arvot ja lämpötilat, jonka ne vaativat toimiakseen optimaalisesti. Tämä osaltaan hankaloittaa entsyymien käyttöä.

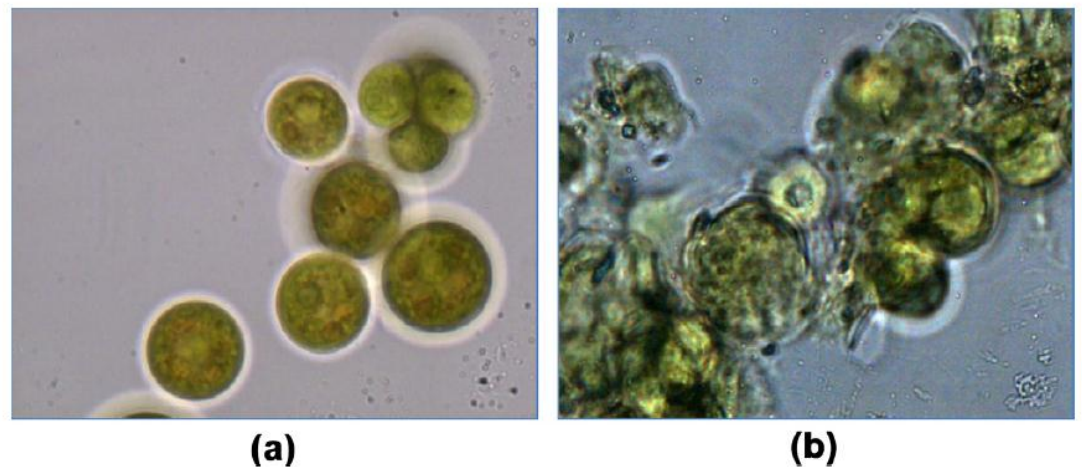
Ehimen et al (2012) olivat eri entsyymejä käyttämällä saaneet 21 %:n parannuksen metaanituotantoon verrattuna leväbiomassaa joka oli ainoastaan jauhettu. Suurin vaikutus leväbiomassan metaanituotantoon oli saatu sellullaasi-entsyymillä. Levälajina oli ollut *Rhizocolonium*, joka on rihmamainen monisoluiainen levä. Kuvassa 9 on esitetty Ehimen et al (2012) tuloksia eri entsyymien vaikutuksesta metaanituottoon (Pakarinen A, 2012; Ehimen E.A, Holm-nielsen J, Poulsen M & Boelsmand J.E, 2012).



Kuva 9. Entsyymien vaikutus metaanituottoon *Rhizocolonium*-biomassasta (Ehimen et al 2012)

3.3.2 Alkaalinen käsittely

Alkaaliset käsittelyt vaativat muihin käsittelymenetelmiin verrattuna alhaisemmat lämpötilat sekä paineet. Vaikutusajat ovat pidemmät alkaalisilla käsittelyillä vaihdellen tunneista päiviin. Vaikutusaikoja voidaan lyhentää käyttämällä korkeampia lämpötiloja käsittelyissä. Käsittelyissä voidaan käyttää esimerkiksi natrium, kalium, kalsium ja ammoniakkihydroksideja. Kalsiumhydroksidi sopii erityisesti biomassalle, jossa on korkea ligniinipitoisuus. Alkaalisessa käsittelyssä tapahtuu biomassan turpoamista mikä tekee biomassasta helpommin käsiteltävää bakteereille ja entsyymeille. Samson et al (1983) olivat käsitelleet *Spirulina maxima*-levää 150 °C lämpötilassa NaOH-lisäyksellä, jolloin COD-liukoisuus oli ollut 78 %. Ilman alkaalilisäystä liukoisuus oli ollut 43 %. Kuvassa 10 on leväsolut ennen käsittelyä ja käsittelyn jälkeen. Kuvassa oleva levä on *C. infusionum*. (Hendriks et al, 2009, 14; Mosier et al, 2003; Fernand et al, 2012; Samson R & Leduy A, 1983; Harun R, Jason W.S.Y, Cherrington T, Danquah M, 2011).



Kuva 10. Kuvassa leväsolut ennen alkaalista käsittelyä (a) ja käsittelyn jälkeen (b) (Harun R et al 2011)

3.3.3 Happohydrolyysi

Happohydrolyysillä on tarkoitus liuottaa hemiselluloosaa. Happohydrolyysissä voidaan käyttää laimeaa tai vahvaa happoa. Happokäsittelyn etuna on hemiselluloosan liuottaminen, jolloin selluloosa on paremmin entsyymien käytettävissä. Happokäsittely sopii hyvin biomassalle, josta tuotetaan metaania, mutta esimerkiksi etanolin tuotossa happokäsittely saattaa tuottaa inhiboivia aineita. Proteiinien ja polysakkaridien happohydrolyysi tuottaa furfuraaleja ja levuiinihappoa. Hapon lisääminen lämpökäsittelyssä alentaa tarvittavaa optimilämpötilaa (Hendriks et al, 2009; Samson R & Leduy A, 1983).

3.3.4 Höyryräjäytys

Höyryräjäytyksessä biomassassa oleva vesi räjäytetään nopealla paineen alennuksella 160-260 °C lämpötiloissa. Höyryräjäytyksen vaikutus riippuu käsiteltävästä materiaalista ja käsittelyn vaikutuksesta voi vapautua inhiboivia aineita. Käsittelyn vaikutuksesta hemiselluloosa mahdollisesti hydrolysoituu ja ligniinirakenne muuttuu. Höyryräjäytys lisää myös biomassan pinta-alaa mikä helpottaa biomassan käytettävyyttä. Höyryräjäytys soveltuu esikäsittelyksi niin etanolia kuin biokaasua valmistettaessa (Mosier et al, 2003; Pakarinen A, 2012)

3.3.5 Jauhaminen

Jauhamista käytetään yleensä ennen muitten esikäsittelymenetelmien käyttämistä, jotta materiaali saadaan paremmin käsiteltävään muotoon. Biomassan käsitteleminen jauhamalla ei vaadi kemikaalilisäyksiä, joten sitä voidaan pitää ympäristöystävällisenä menetelmänä. Etuina jauhamisella esikäsittelymenetelmänä on, ettei sellaisia inhiboivia aineita pääse syntyämään mitä kemikaalien lisäys voisi aiheuttaa. Erityisesti tämä on etu bioetanolin tuotossa. Samson et al (1983) olivat saaneet jauhamisella nostettua *Spirulina maxima* levän liukenevuutta ja tulokset olivat samankaltaisia kuin kemiallisilla esikäsittelymenetelmillä (Pakarinen A, 2012; Samson R & Leduy A, 1983).

4 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

4.1 Ymppi ja levät

4.1.1 Ymppi

Ymppinä metaanituottojen määrittämisessä käytettiin Envor Biotech Oy:n Forssan biokaasulaitoksen mädätettä eli biokaasureaktorin poistetta. Ymppejä pidettiin nälkiintymässä 36 °C:n vesihauteessa muutama päivä ennen kokeen aloittamista.

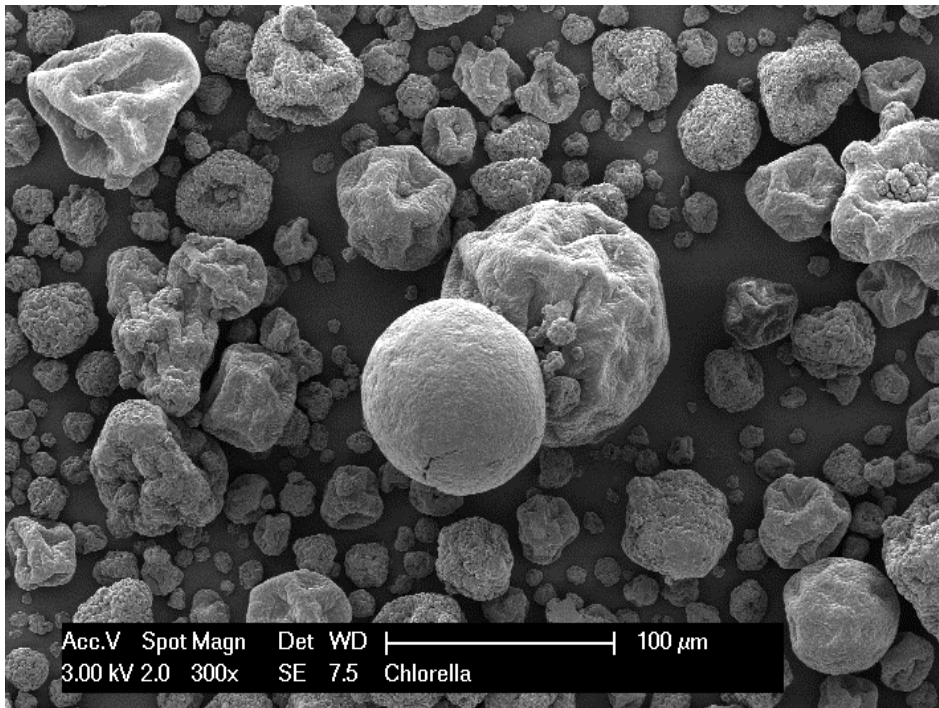
4.1.2 Levät

Työssä käytettiin sekä kaupallista *Chlorella pyrenoidosa* että Helsingin yliopiston (HY) kasvattamaa tuorelevää, joka oli joko *Chlorella pyrenoidosa* tai *Selenastrum*-levää. Kaupallinen kuivattu jauhemainen *Chlorella* oli kuiva-ainepitoisuudeltaan noin 95 %. Helsingin yliopiston *Chlorella* oli sentrifugoitu ja pakastettu. HY-*Chlorella* oli kuiva-aineeltaan noin 15 %. Helsingin yliopiston levää oli kasvatettu eri kasvatusalustoilla ja kasvatustapa oli joko autotrofikasvatus tai mikсотrofikasvatus. Levien kasvatuksessa käytettyjen kasvatusalustojen tiedot löytyvät liitteistä 10. Levien flokkauksessa käytettiin eri aineita, jotka saattoivat olla vielä mukana sentrifugoidussa tuotteessa. Panoskokeissa oli mukana neljää eri kasvatuserää Helsingin yliopiston levää. Mukana oli myös levää, joka oli käsitelty ylikriittisellä hiilidioksiduutolla (SCE-super critical extraction). Käsitelty levä oli rakenteeltaan raemaista ja kuiva-aineeltaan noin 95 %. Kuvassa 11 näkyy kaupallinen *Chlorella* ja SCE-käsitelty HY-*Chlorella*.



Kuva 11. Kuvassa vasemmalla kaupallista *Chlorella* ja oikealla SCE-käsiteltyä HY-*Chlorella*

Kuvassa 12 näkyy kaupallisen *Chlorella*-levän solut. Kuvasta huomataan, ettei kuvaus ole rikkonut leväsolujen rakennetta.



Kuva 12. SEM-kuva leväsoluista

4.2 Ylikriittinen hiilidioksidiuutto (SCE-käsittely)

Ylikriittisellä hiilidioksidiuutolla pyrittiin uuttamaan neutraalilipidit leväbiomassasta. Uutto tehtiin 80 °C lämpötilassa 500 atm paineessa ja uutto-aika oli 60 minuuttia. Hiilidioksidin virtausnopeus oli 1,5 ml/min. Taulukossa 3 on esitetty uuttotiedot, jotka osoittavat, että lipidejä ei ole erottunut käsittelyssä. Lipidiuutossa ei tapahtunut muutakaan hävikkiä, joten biomassa saatiin melkein sellaisenaan panoskokeisiin saannon ollessa 99,93 %.

Taulukko 3. Uuttotiedot (saatu Marika Tikka, HY)

PVM (uutto)	Putki (nro)	kammio (nro)	putki (g)	levä (g)	Putki & Lipidit	lipidit % / dW	Lipidimäärä	Saanto
4.9.2012	38	31	24,3368	2,1621	24,3402	0,1573	0,0034	99,84275
4.9.2012	39	32	24,2563	1,781	24,2573	0,0561	0,001	99,94385
5.9.2012	40	33	24,1405	1,9881	24,1412	0,0352	0,0007	99,96479
5.9.2012	41	34	24,1235	2,4793	24,1241	0,0242	0,0006	99,9758
5.9.2012	42	35	24,1103	2,4837	24,1115	0,0483	0,0012	99,95168
Keskiarvo						0,0642		99,93577

4.3 Esikäsittelymenetelmät

Esikäsittelymenetelminä levälle oli muurahaishappo-, NaOH - ja vetyperoksidikäsittelyt. Menetelmiä testattiin eri pitoisuuksilla ja vaikutusajoilla. Kaikki käsittelyt SCE-käsittelyä lukuun ottamatta tehtiin huoneenlämmössä. Taulukossa 4 on yhteenveto esikäsittelymenetelmistä.

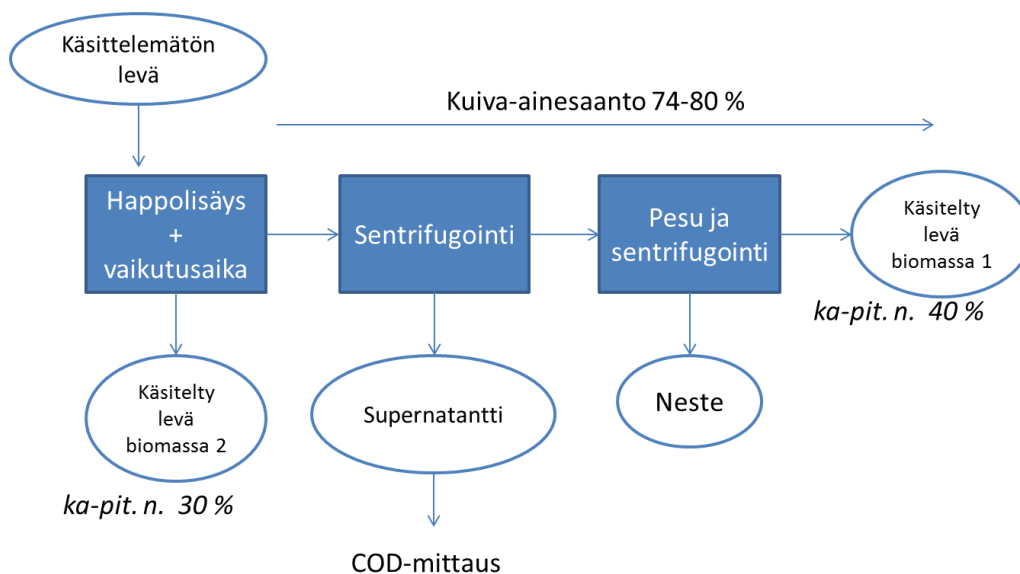
Taulukko 4. Esikäsittelymenetelmät

Menetelmä	Annostus	Vaikutusaika
Happokäsittely 1	17 kg muurahaishappoa/ tonni ka _{levä}	1 tunti, 4 tuntia ja vuorokausi
Happokäsittely 2	25 kg muurahaishappoa/ tonni ka _{levä}	1 tunti ja vuorokausi
Emäs-käsittely	20 kg NaOH/tonni ka _{levä}	vuorokausi
Vetyperoksidi pH:n säädöllä (H ₂ O ₂ + pH säätö)	500 kg H ₂ O ₂ /tonni ka _{levä} 2%:n H ₂ O ₂ -liuospitoisuudessa (+ pH-säätö 11,5)	vuorokausi
Vetyperoksidi BDP-lisäyksellä (H ₂ O ₂ + BDP)	+ BDP-845 kemikaali (-> 10min) +H ₂ O ₂ - lisäys (-> 10min)	noin. 20 minuuttia

4.3.1 Happokäsittelyt

Happokäsittelyn vaikutusta levistä saatavaan metaaniin testattiin kahdella eri pitoisuudella ja kolmella eri vaikutusajalla. Käsittelyissä happona käytettiin 85 % muurahaishappoa ja käsittelyt erosivat toisistaan pitoisuuksien ja vaikutusaikojen osalta. Käsittelyt tehtiin normaalissa huoneenlämpötilassa. Vaikutusajan loputtua näytteet sentrifugoitiin (30 min 11 000 rpm). Sentrifugoinnin jälkeen pulloista poistettiin supernatantti ja näyte sekoitettiin veteen sekä sentrifugoitiin uudelleen hapon poistamiseksi. Pesuvesiannostus oli 1000 ml vettä/ 200 g kuiva-ainetta. Toisen sentrifugoinnin jälkeen neste poistettiin jälleen ja näytteestä määritettiin kuiva-aineen ja orgaanisen aineen pitoisuudet ennen panoskokeen aloittamista. Pesun tarkoituksena oli pysäyttää hapon vaikutus halutun vaikutusajan jälkeen. Kuten kuvassa 13 on esitetty leväbiomassaa (leväbiomassa 2) käytettiin metaanituotto-testeissä myös sellaisenaan ilman pesuja ja fuugauksia.

Ensimmäisessä happokäsittelyssä muurahaishapon annostelu oli 17 kg/tonni kuiva-ainetta ja vaikutusaikoina oli tunti, 4 tuntia ja vuorokausi. happokäsittelyssä 2 testattiin maksimihappopitoisuutta, jolloin happoannostus oli 25 kg/tonni kuivaa levää. Vaikutusaikoina käsittelyssä kaksi oli tunti ja vuorokausi. Käsittelyjen 1 ja 2 vuorokauden vaikutusajalla ei tehty hapon pois sentrifugointia ja pesua. Saanto käsittelyissä oli 74-80 % kuiva-aineesta. Häviöitä tapahtui kun levää otettiin talteen sentrifugiputkista ja nesteiden mukana on tapahtunut pientä hävikkiä.



Kuva 13. Happo-esikäsitelyprosessi

4.3.2 Emäskäsittely

Emäs eli NaOH-käsittelyssä NaOH-annostus oli 2 % leväbiomassan kuiva-aineesta. NaOH sekoitettiin 30 % kuiva-ainepitoisuuteen lietettyyn leväbiomassaan ja seoksen annettiin vaikuttaa huoneenlämmössä vuorokausi ennen panoskokeen käynnistämistä. NaOH-käsittelyssä ei tehty seoksen pesua ja NaOH:n poistoa vaan seos lisättiin sellaisenaan panoskoepulloihin.

4.3.3 Vetyperoksidi (H₂O₂)- käsittelyt

Käsittelyssä oli tarkoituksena hapettaa orgaanista ainesta vetyperoksidilla alkaalisessa liuoksessa. Käsittelyssä vetyperoksidin ja levän kuiva-aineen suhde oli 0,5. Kaupallinen *Chlorella* lietettiin ensiksi 30 % kuiva-ainepitoisuuteen minkä jälkeen tehtiin vetyperoksidi lisäys. Liuoksen pH säädettiin arvoon 11,5 ja liuoksen vetyperoksidipitoisuudeksi pyrittiin saamaan 2 % liuoksen tilavuudesta.

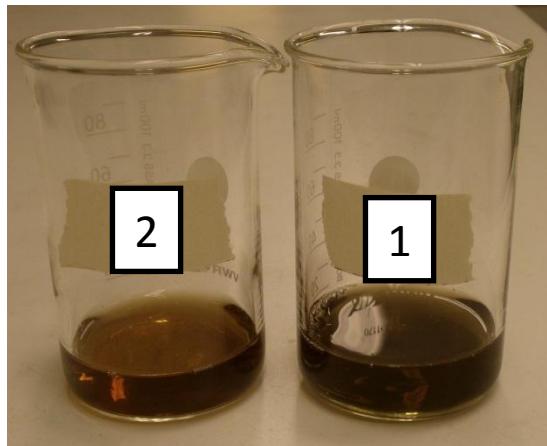
Vetyperoksidikäsitely tehtiin myös ilman pH:n säätöä Kemiran BDP-kemikaalilisäyksellä, jolla pyrittiin edesauttamaan vapaiden radikaalien syntyä. Käsittelyssä lisättiin ensiksi BDP, jonka jälkeen odotettiin 10 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin vetyperoksidi ja odotettiin 10 minuuttia, jonka jälkeen näytteet pistettiin valmiiksi panoskoetta varten. Verrokkina käsittelylle oli näyte, johon oli lisätty vetyperoksidi, mutta ei BDP:tä.

4.4 Analyysit

4.4.1 Liukoisen orgaanisen aineen mittaaminen

Liukoinen orgaaninen aine (COD_{liuk} eli COD_{sol}) määritettiin ensimmäisen sentrifugoinnin jälkeisestä supernatantista. Näytteet suodatettiin $0,2 \mu\text{m}$ ruiskusuodattimen läpi ja näytteistä tehtiin sopivat laimennokset. Näytteiden analysoimiseen käytettiin Hach Lange LCK514 COD-reagenssiputkia, joiden mittausalue oli $100\text{--}2000 \text{ mg O}_2/\text{l}$. COD-reagenssiputket sisälsivät 90 % rikkihappoa, elohopeasulfaattia ja kaliumdikromaattia. Menetelmässä hapetettavat ainekset reagoivat rikkihappo-kaliumdikromaattiliuoksessa elohopeasulfaatin toimiessa katalyyttinä.

Näytteitä mitattiin automaattipipetillä 2 ml putkiin, jonka jälkeen putkia kuumennettiin Hach Lange LT 200-laitteistolla $148 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa kahden tunnin ajan. Putket analysoitiin käyttämällä Hach Lange DR 2800-laitteistoa. Kuvassa 14 näkyy happokäsittelyjen jälkeiset supernatantit tunnin vaikutusajalla. Vahvemmallalla happopitoisuudella supernatantin väri oli kellertävä, kun taas pienemmällä annostuksella väri oli vihreä.



Kuva 14. Happokäsittelyjen 1 ja 2 supernatantit (vaikutusaika 1 tunti)

4.4.2 TS ja VS-analyysi

TS ja VS-analyysillä määritettiin näytteiden kuiva-aineen ja orgaanisen aineen pitoisuudet. Analyysiä varten upokkaita taarattiin $550 \text{ }^\circ\text{C}$:n uunissa, jonka jälkeen upokkaiden annettiin jäähtyä eksikaattorissa. Tämän jälkeen upokkaat punnittiin ja niille punnittiin sopiva määrä näytettä. Näytteet haihdutettiin $105 \text{ }^\circ\text{C}$:n lämpökaapissa 22 tuntia. Haihdutuksen jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä, jonka jälkeen näytteet hehkutettiin $550 \text{ }^\circ\text{C}$:ssa kaksi tuntia. TS ja VS-analyysit tehtiin standardin SFS 3008 mukaan.

4.5 Metaanintuottotestit

Metaanituotot määritettiin panoskokeilla.

4.5.1 Panoskoelaitteisto

Panoskoelaitteistona oli Bioprocess Control-laitteisto, johon kuului kaksi vesihautetta, kaasunpesupullot, kaasunmittauskennot sekä tietokoneet tulosten seuraamiseksi ja kirjaamiseksi. Laitteisto näkyy kuvassa 15. Panoskoepullojen tilavuus oli 500 ml ja panoskoepulloja oli yhdessä vesihautteessa 15 kappaletta. Vesihauteiden lämpötila oli 36,6 °C. Pesupullot sisälsivät 3 M natriumhydroksidia (NaOH) sekä thymoliftaleiniä. Pesupullojen tarkoituksena oli pestä kaasuista hiilidioksidi natriumhydroksidin avulla thymoliftaleinin toimiessa indikaattorina. Pesupulloissa oli magneetti ja pesupullot olivat magneettisekoittajan päällä. Näytepullot oli kytketty pesupulloihin, jotka taas olivat kytketty kaasukennoihin, joiden avulla biokaasun mittaaminen tapahtui. Kaasukennojen tilavuus oli noin 12-15 ml ja kaasukennojen vapautuessa tämän tilavuuden verran tietokone laski muodostuvan kaasun kumulatiivisesti. Ennen panoskokeiden käynnistämistä näytepulloista poistettiin happi typpikaasun avulla. Näytepulloissa oli automaattinen sekoittaja, joka sekoitti pulloja minuutin ajan kerran tunnissa.



Kuva 15. Bioprocess Control-laitteisto

4.5.2 Ensimmäinen panoskoe

Ensimmäisessä panoskokeessa oli 29 pulloa, jotka sisälsivät kaikki 350 g ympiä. Nollanäytteenä oli 3 pulloa pelkkää ympiä ja vertailunäytteenä kaksi pulloa, jotka sisälsivät tärkkelystä. Testattavana oli *Chlorella pyrenoidosa*-levyä, joka oli käsitelty happokäsittelyillä 1 ja 2. Vaikutusaikoina oli tunti ja 4 tuntia. Ennen hapon lisäystä levä lietettiin 30 %:n kuiva-aine pitoisuuteen. Jokaisesta käsittelystä oli neljä rinnakkaista pulloa. Vertailuksi happokäsittelyille leville otettiin kaupallista *Chlorella*-levyä, jota ei käsitelty lainakaan. Vertailu *Chlorella* lietettiin vedellä 40 % kuiva-aine pitoisuuteen.

Kaupallisen *Chlorellan* lisäksi testattiin kahta Helsingin yliopiston kasvatamaa levää, jotka erosivat toisistaan kasvatusalustan ja kasvatustavan

osalta. Molemmille Helsingin yliopiston levällä tehtiin happokäsittely tunnin vaikutusajalla sekä otettiin vertailuksi käsittelemättömät näytteet mukaan panoskokeeseen. Vähäisen levämäärän takia käsittelyistä levistä tehtiin vain kaksi rinnakkaista pulloa. Levät olivat kaupallista *Chlorella* kosteampia, joten vesi lisäystä ei tarvittu. Ennen panoskokeiden aloittamista kaikista näytteistä tehtiin TS ja VS-analyysit sekä mitattiin pH. Panoskoe kesti kolme viikkoa, jonka jälkeen pulloista mitattiin pH. Tarkat pullotiedot on esitetty liitteessä 1.

Käsittelyjen jälkeisissä supernatanteissa oli selvät värierot kaupallisen *Chlorella* ensimmäisen käsittelyn supernatantin ollessa väriltään selvästi vihreää verrattuna käsittelyjen kaksi ja kolme väriltään keltaiseen supernatanttiin. Helsingin yliopiston levien supernatantit olivat myös väriltään erilaiset.

Eri käsittelyjen TS ja VS-pitoisuus erot olivat pienet, mutta selvät. Ensimmäisen käsittelyn TS ja VS-pitoisuudet olivat pienimmät ja suurin TS ja VS-pitoisuus saatiin käsittelyllä kolme, jossa happopitoisuus oli suurin. Käsittelyt vaikuttivat ilmeisesti sentrifugoinnin tehoon ja käsittelyissä kolme sekä kaksi nesteen erottuminen sentrifugoinnissa oli tehokkaampaa kuin käsittelyssä yksi. Tarkat TS ja VS-tulokset on esitetty liitteessä 2.

4.5.3 Toinen panoskoe

Toisessa panoskokeessa testattiin käsiteltyjen kaupallisten levien lisäksi käsittelyistä saatavat supernatantit. Toiseen panoskokeeseen saatiin myös mukaan Helsingin yliopiston kasvattamaan levää suuremmat määrät. Toista panoskoetta varten tehtiin suuremmalle määrälle levää käsittelyt, jotta saatiin panoskoetta varten tarpeeksi supernatanttia. Levämäärät olivat nelinkertaiset verrattuna ensimmäiseen panoskokeeseen. Toiseen panoskokeeseen tuli mukaan kaupallista levää, jolle oli tehty kummatkin happokäsittelyt tunnin ja 4 tunnin vaikutusajoilla. Kaupallisten levien supernatanteista tehtiin kaksi rinnakkaista pulloa ja käsitellyistä levistä sekä käsittelemättömästä levästä tehtiin kolme rinnakkaista panoskoepulloa. Tarkat pullotiedot ovat liitteissä 3 ja 4.

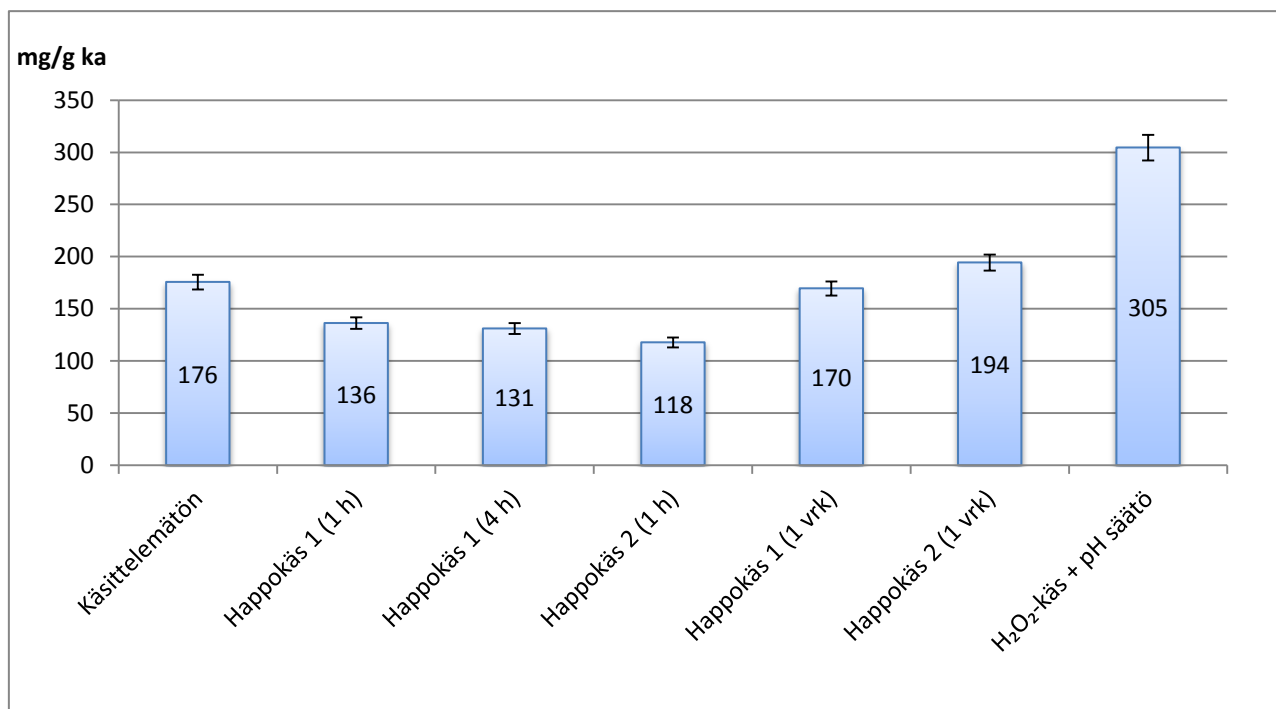
4.5.4 Kolmas panoskoe

Kolmannessa panoskokeessa tuli mukaan levää joka oli käsitelty ylikriittisellä hiilidioksiduutolla. Lisäksi verrokina toimi tuorelevä, jota ei ollut käsitelty mitenkään. Kolmanteen panoskokeeseen tuli mukaan myös levää mikä oli käsitelty vetyperoksidilla sekä levää, jolle oli tehty NaOH-käsittely. Mukana oli happokäsittelyt eri pitoisuuksilla ja vaikutusaikana oli yksi vuorokausi. Happopitoisuudet olivat 17 kg/tonni kuiva-ainetta ja 25 kg/tonni kuiva-ainetta. Hapko ja NaOH-käsittelyt lietettiin noin 30 % kuiva-aine pitoisuuteen. Kolmannessa panoskokeessa näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista pulloa. Tarkat pullotiedot ovat esitetty liitteissä 5 ja 6.

5 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELO

5.1 Esikäsitellyn vaikutus liukoiseen orgaaniseen aineeseen

Esikäsitellyjen vaikutusta arvioitiin mittaamalla liukoista orgaanista ainetta näytteiden supernatanteista eli COD_{liuk}-pitoisuutta. Kuviossa 2 on esitettynä näytteiden orgaanisen aineen pitoisuudet. Kuvioista huomataan, että muurahaishappokäsittely on vaikuttanut negatiivisesti liukoiseen orgaaniseen ainekseen eli käsittelemättömällä näytteellä on suurempi COD-pitoisuus. Tämä voisi johtua mahdollisesti muurahaishapon aiheuttamasta sakkautumasta, jolloin orgaanista ainesta on saostunut kiintomuotoon. Kuitenkin huomataan, että happokäsittelyt 1 ja 2 yhden vuorokauden vaikutusajalla on nostanut liukoisen orgaanisen aineksen pitoisuutta. Vetyperoksidikäsitely vuorokauden vaikutusajalla ja pH:n säädöllä antoi korkeimman COD-tuloksen. COD-arvoa ei saatu mitattua vetyperoksidikäsitelylle, jossa oli BDP-lisäys ja 20 minuutin vaikutusaika. Tämä voi johtua siitä, että vetyperoksidi mahdollisesti haittaa analyysiä. Vetyperoksidikäsitelyssä vuorokauden vaikutusajalla on vetyperoksidi ehtinyt hajota suurimmaksi osaksi.

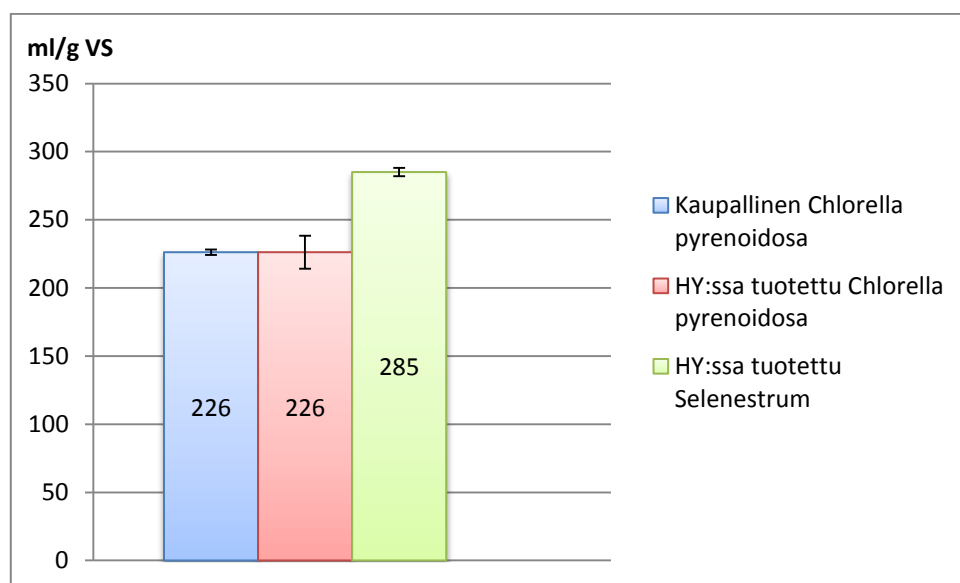


Kuvio 2. Levän liukoisen orgaanisen aineksen (COD_{liuk}) pitoisuudet (mitattu fuugatus- ja suodatetusta näytteestä).

5.2 Metaanituotot

5.2.1 Eri levät

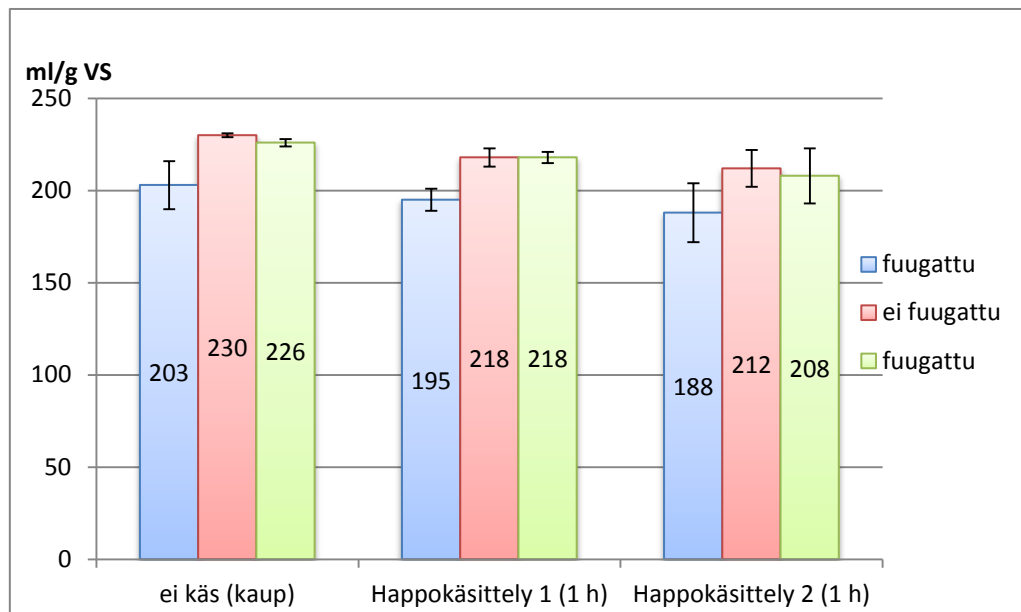
Helsingin yliopiston ja kaupallisen *Chlorella*:n metaanituotot olivat hyvin vastaavat n. 230 ml CH₄/g VS. Kaupallinen *Chlorella* oli kuivattua, joten kuivauksella ei näyttäisi olevan vaikutusta metaanintuottoon verrattuna tuorelevään. *Selenastrum*-levä tuotti enemmän metaania kuin *Chlorella*:t. Rinnakkaisten tuloksien hajonta oli suurempaa HY-levällä kuin kaupallisella. Tämä luultavasti johtuu siitä, että kuivattuna levä on homogeenisempää ja helpommin annosteltavaa kuin tuorelevä. Helsingin yliopiston levien ja kaupallisen *Chlorella*-levän tuottoja on vertailtu kuvassa 16.



Kuva 16. Eri levien metaanituotot

5.2.2 Fuugauksen vaikutus

Happokäsittelyjen näytteiden fuugauksen, pesun ja supernatantin erotuksen tarkoituksena oli saada pysäytettyä hapon vaikutus halutun vaikutusajan kuluttua. Kuvassa 17 on esitetty muurahaishappokäsittelyjen tulokset sentrifugoiduille näytteille ja näytteille, joita ei sentrifugoitu. Tulosten perusteella näyttäisi, että sentrifugoimattomilla ja sentrifugoiduilla näytteillä ei ole juuri eroa tuotossa. Sentrifugoinnilla, pesulla ja supernatantin erottamisella ei näyttäisi olevan vaikutusta metaanintuottoon ja muurahaishappo-pitoisuudellakaan ei näyttäisi olevan vaikutusta. Fuugaamattomien levien happo ei myöskään vaikuttanut merkittävästi panoskoepullojen pH:n vaan fuugattujen ja fuugaamattomien pullojen pH:t olivat samankaltaiset. Panoskoepullojen pH tiedot on esitetty liitteissä.

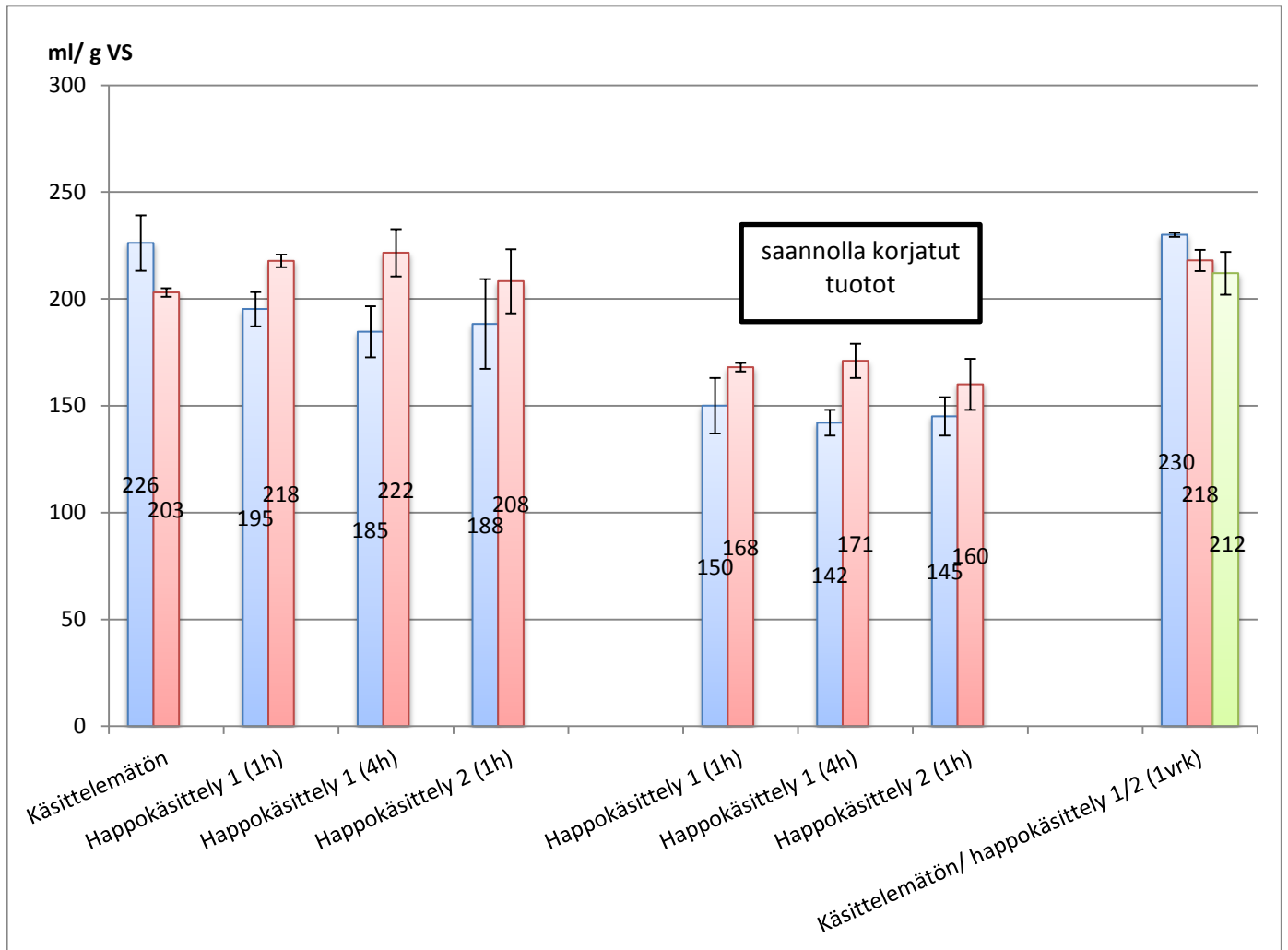


Kuva 17. Fuugauksen, pesun ja supernatantin erotuksen vaikutus leväbiomassan metaanituottoon.

5.2.3 Happokäsittelyt

Happokäsittelyjen ja käsittelemättömien levien metaanituotoissa ei ollut merkittävää eroa. Metaanintuottonopeudessaakaan ei ollut eroa käsiteltyjen ja käsittelemättömien levien välillä. Näytteiden tuotot eri panoskokeista on esitetty liitteissä 6, 7 ja 8. Tulokset näyttäisivät, että muurahaishappokäsittelyillä ei ollut vaikutusta metaanintuottoon. Tulokset olivat samankaltaiset myös käsiteltyjen ja käsittelemättömän levän supernatanttejen tuotoissa. Kuvassa 18 on esitetty happokäsittelyjen levien tuotot ja saannolla korjatut tuotot. Kuvassa on esitetty rinnakkain eri panoskokeiden tuotot. Saannot olivat välillä 74-80 % ja korjauksessa käytettiin saantojen keskiarvoa 77 %.

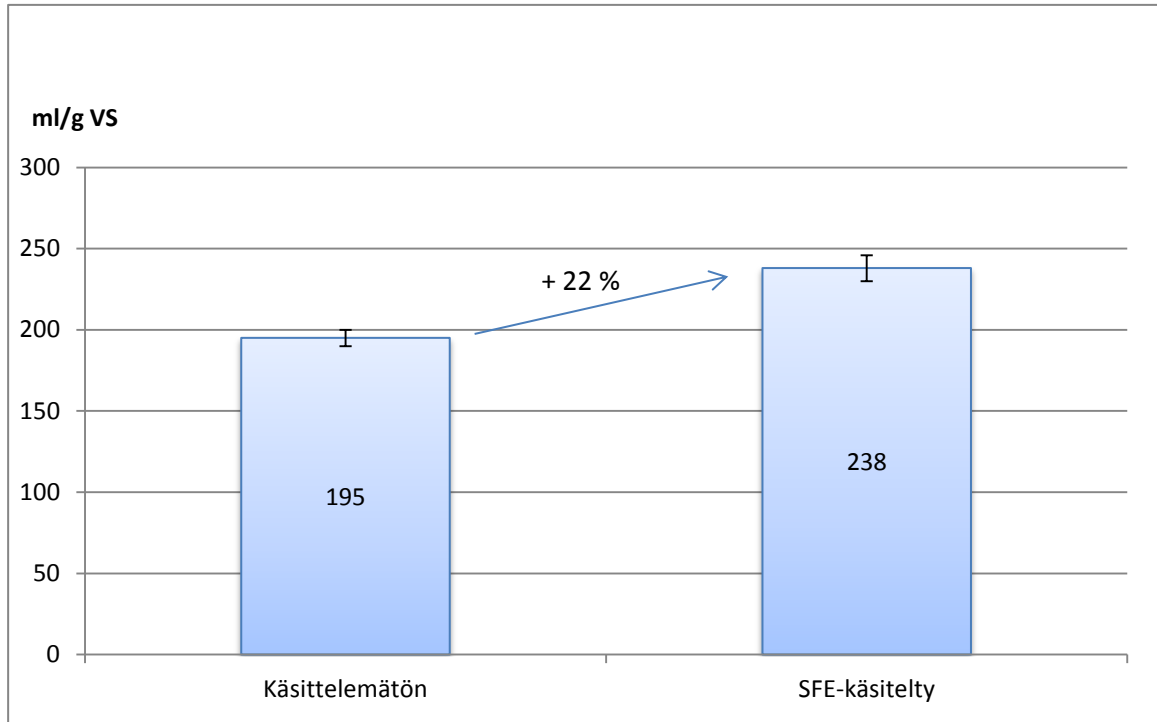
Rinnakkaisten näytteiden välinen hajonta oli pientä ja suurin hajonta oli happokäsittelyn 2 näytteille tunnin vaikutusajalla. Eri käsittelyjen välillä ei ole juurikaan eroa, joten eri pitoisuuksilla ja vaikutusajoilla ei ole ollut vaikutusta tuottoon, Supernatanteissa ei ollut suurta hajontaa rinnakkaisten näytteiden välillä. Supernatanttien alhaisesta VS-pitoisuudesta ja siitä aiheutuvista määrittelyongelmista johtuen tarkastelu on tehty ml/g näytettä. Supernatantit tuottivat metaania 10-14 ml/g näytettä.



Kuva 18. Muurahaihappokäsittelyjen näytteiden CH₄-tuotot ja saannolla (77%) korjatut tuotot

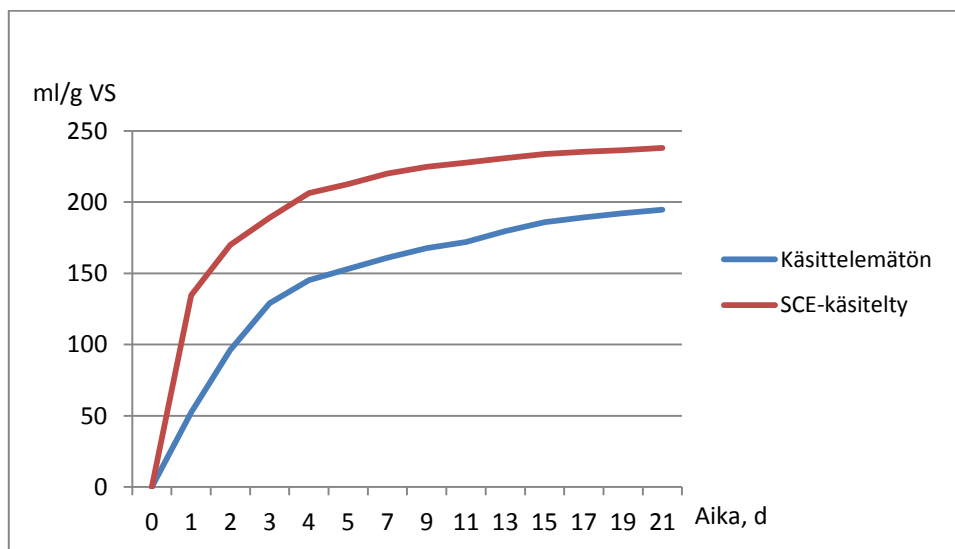
5.2.4 SCE-käsittely

Lipidi uutettu levä tuotti paremmin kuin uuttamaton levä. Uuttaminen näyttäisi vaikuttavan levän rakenteeseen niin, että se on paremmin käytävissä biokaasutuksessa. Uutossa oli käytössä suhteellisen suuret paineet joka on varmasti vaikuttanut leväsolujen rakenteen rikkoutumiseen. Uutolla ei saatu juurikaan lipidejä uutettua, joten uutto oli epäonnistunut. Epäonnistuneesta uutosta johtuen uutetussa levässä oli vielä suurin osa lipideistä tallessa mikä on varmasti vaikuttanut levän hyvää metaanintuottoon. Toinen vaihtoehtoinen syy uutun epäonnistumiselle voisi olla, ettei levässä ollut lipidejä johtuen kasvatustavasta. Uutettu levä olisi mahdollisesti tuottanut huonommin jos lipidit olisi saatu uutettua levästä, mutta uutun epäonnistuessa uuttoprosessi toimi esikäsitteilynä leväbiomassalle. SCE-käsittely paransi tuottoa noin 22 % ml/g VS. Kuvassa 19 on esitetty HY-levä uuttamaton/uutettu vertailu.



Kuva 19. SCE-käsittelyn vaikutus *Chlorella pyrenoidosa* levän (HY) metaanituottoon

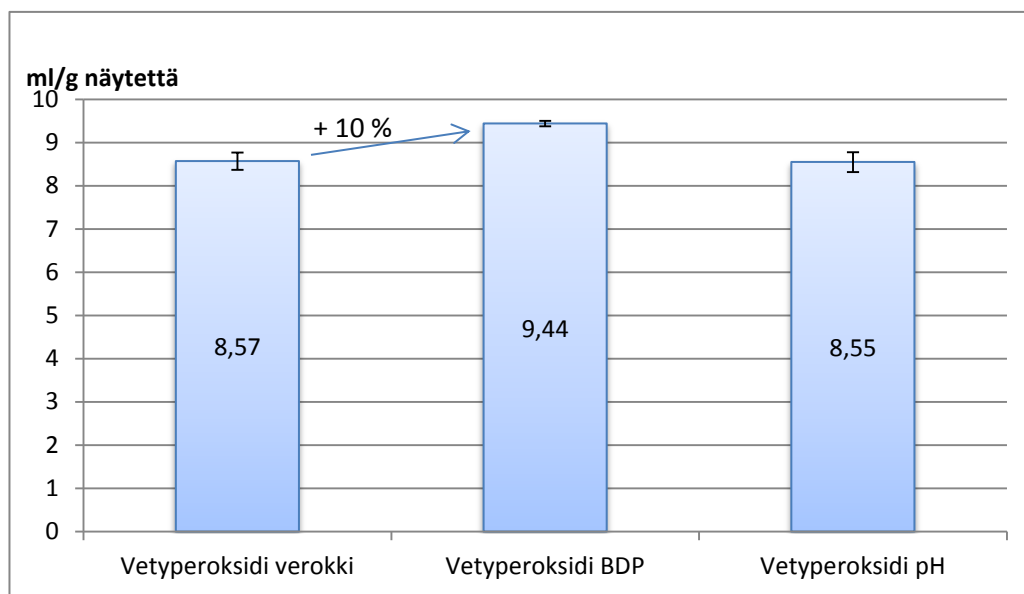
SCE-käsittelyn vaikutus näkyi myös selvästi metaanintuottonopeudessa ja SCE-käsitellyllä levällä ensimmäisten päivien tuotto oli selvästi suurempaa kuin käsittelemättömällä (kuva 20).



Kuva 20. SCE-käsittelyn/käsittelemättömän-levän tuottonopeuksien vertailu

5.2.5 Vetyperoksidikäsitely

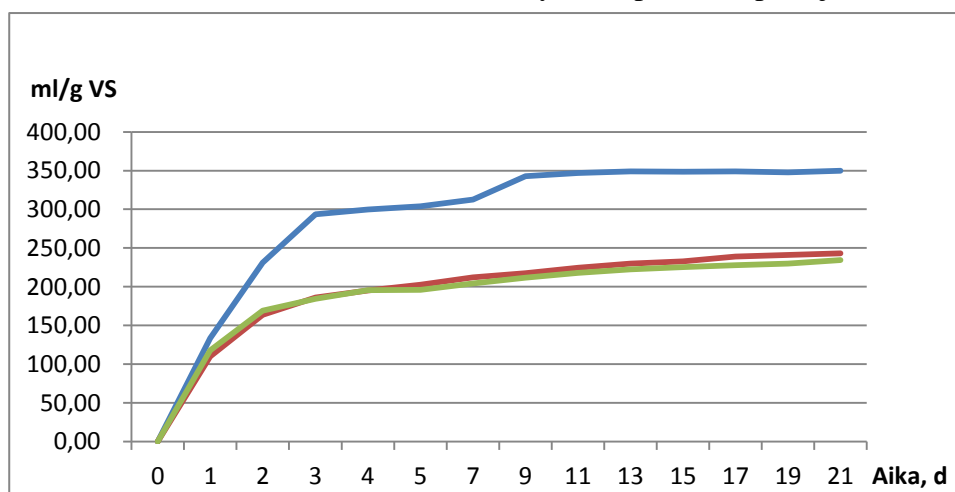
Vetyperoksidi käsitely BDP-lisäyksellä tuotti noin 10 % paremmin metaania kuin ilman BDP-lisäystä. Vetyperoksidi käsitelyllä pH:n säädöllä ja verrokillä ei ollut suurta eroa mitattuna ml/g näytettä, mutta ml/g VS tuotti pH-säädetty levä noin 10 % paremmin metaania. Kuvassa 21 on esitetty vetyperoksidi-käsittelyn tuotot ml/g näytettä.



Kuva 21. Vetyperoksidikäsitettyjen näytteiden CH₄-tuotot (ml/g näytettä)

5.2.6 Emäskäsittely

NaOH-käsittelyissä kahden panoskoepullon tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan, mutta yksi pulloista tuotti selvästi enemmän. Pullojen tuottojen eroille ei ole selvää syytä. Kahden saman verran tuottaneen pullon tuotot ovat samassa tasossa käsittelemättömän levän kanssa, mutta kolmas pullo on tuottanut noin 20 % enemmän kuin käsittelemätön levä. NaOH-käsittelyn vaikutuksien tutkimiseksi olisi tehtävä vielä lisää testejä, koska tuloksissa oli hajontaa, eikä voida tehdä varmoja johtopäätöksiä käsittelyn vaikutuksesta. Kuvassa 22 on esitettyinä eri panoskoepullojen tuotot.



5.2.7 Virhetarkastelu

Mahdollisia virheitä on voinut tulla käsittelyissä sekä erityisesti happomäärien punnitsemisessa. Kaasuntuotoissa virheet punnitsemisessa voivat näkyä rinnakkaisten pullojen tuottojen eroissa. Osa eroista rinnakkaisten pullojen tuotoissa voi selittyä pesupullojen NaOH:n loppumisella, jolloin kennoihin on voinut päästä hiilidioksidia. NaOH:n loppuminen ei kuitenkaan ole voinut aiheuttaa kuin pientä hajontaa, koska pulloja on vaihdettu säännöllisesti.

Ympin aktiivisuus on voinut aiheuttaa osan hajonnasta pulloissa, mutta pääosin ympin toiminta oli panoskokeissa samankaltaista eikä suurta hajontaa ollut ympin tuotoissa. Ympin voi olla myös ollut huonosti sekoitunutta ja epätasaisuus on voinut aiheuttaa hajontaa pullojen tuloksissa, mutta ympin sekoittamisessa oltiin huolellisia, joten ympin heterogeenisyys ei ole luultavasti ollut syynä hajontaan pulloissa. Ympin aktiivisuus voi osaltaan selittää miksi levien tuotoissa oli eroja ml/g VS eri panoskokeiden välillä myös käsittelemättömillä levillä. Suurimmassa osassa näytteistä ei ollut paljoa hajontaa, joten työn suorituksessa ei ole luultavasti ollut suuria virheitä. Suurimmat hajonnat tulivat 3 panoskokeen näytteissä ja kolmannessa panoskokeessa ympin ei ollut niin homogeenistä kuin muissa johtuen ympin sisältämästä hiekasta ja muusta kiinteästä aineesta. Kuitenkaan ympin panoskoepullojen tuotoissa ei ollut suurta hajontaa.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä opinnäytetyössä testatuilla esikäsittely menetelmillä ei ollut positiivista vaikutusta levien metaanituottoon SCE-käsittelyä lukuun ottamatta. Esikäsittelyjen tehottomuus on voinut johtua leväsolujen soluseinän vaikeasta hajoavuudesta ja siitä, etteivät esikäsittelyolosuhteet ole olleet tarpeeksi kovat.

Muurahaishappokäsittelyn tehoa voisi kokeilla korkeammissa lämpötiloissa, mutta tällöin käsittely ei välttämättä soveltuisi suuremman mittakaavan toimintaan ja lisäisi ainakin käsittelykustannuksia.

Emäskäsittelyllä saatiin pientä kasvua metaanintuottoon, johtuen yhden panoskoepullon paremmasta tuotosta, joten käsittelyn vaikutuksesta ei voida vetää lopullisia johtopäätöksiä vaan lisäkokeet olisivat tarpeen. Hiltunen (2011) oli saanut hyviä tuloksia alkalikäsittelyllä, jossa oli lämmitys autoklaavissa, joten emäskäsittelyllä voitaisiin saada parempia tuloksia lisäämällä lämpökäsittelyä.

Ylikriittisellä hiilidioksidikäsittelyllä eli SCE-käsittelyllä saatiin selvä 22% kasvu metaanintuottoon. Myös metaanintuottonopeus parani selvästi. Käsittely soveltuisikin hyvin esikäsittelymenetelmäksi leväbiomassalle, jos uutolla saataisiin lipidit talteen biodieselin valmistusta varten. SCE-käsittelyllä saatiin selvästi parempia tuloksia kuin muilla esikäsittelymenetelmillä, joka johtuu luultavasti siitä, että käsittelyssä oli selvästi kovemmat olosuhteet verrattuna muihin käsittelyihin ja paineen/lämpötilan vaikutuksesta solujen rakenne on rikkoutunut tehden levän orgaanisesta helpommin biosaatavaa ja hajoavaa.

Kaupallisen *Chlorella pyrenoidosa*-levän ja Helsingin yliopiston kasvataman *Chlorella*-levän tuotoissa ei ollut juurikaan eroa. Tämä viittaisi siihen, ettei levän kuivaamisella ole ollut juurikaan vaikutusta levän metaanintuottopotentiaaliin. Helsingin yliopiston kasvattama kotimainen *Selenastrum*-kanta tuotti paremmin metaania kuin *Chlorella*-levät. Tutkittujen levien energiasisältö vaihteli välillä 2,23-2,82 kWh/kg VS. Levien energia-arvot olivat samankaltaiset kasvubiomassojen kanssa, joiden energiasisältö vaihtelee tyypillisesti välillä 2,97-4,95 kWh/kg VS.

LÄHTEET

Agarwal, A.K, 2006. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science* Volume 33, Issue 3, June 2007, Pages 233–271. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128506000384>

<http://algaegeek.com/Projects/Photo-Bio-reactor-V2/page5.aspx> Viitattu 25.10.2012

Amin S, 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. *Energy Conversion and Management* 50 (2009) 1834–1840, Pdf.

Andrich G, Zinnai A, Nesti U, Venturi F & Fiorentini R, 2006, Supercritical fluid extraction of oil from microalga *spirulina (arthrospira) platenis*, *Acta Alimentaria*, Vol. 35 (2), pp. 195–203 (2006)

A.T.W.M. Hendriks, G. Zeeman, 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100 (2009) 10–18.

Bhattacharya D & Medlin L, 1998, Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants, *Plant Physiol.* (1998) 116: 9–15

Burczyk J, S&A mietanaa B, Termin& ska-Pabis K, Zycha M, Kowalowska P, 1999, Comparison of nitrogen content amino acid composition and glucosamine content of cell walls of various chlorococcalean algae, *Phytochemistry* 51 (1999) 491±497

Chynoweth D, Owensa J, Legrand R, 2001. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy* 22 (2001) 1-8.

Cecchi F, Pavanb P, Mata-Alvarez J, 1996, Anaerobic co-digestion of sewage sludge: application to the macroalgae from the Venice lagoon, *Resources, Conservation and recycling* 17 (1996) 57-66

Chen C, Yeh Ki L, Aisyah R, Lee D, 2011, Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102:71-81.

Converti A, Casazza A, Ortiz E, Perego P & Del Borghi M, 2009, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *Chemical Engineering and Processing* 48 (2009) 1146–1151

Demirbas A, 2006. Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics. *Energy Conversion and Management* 47 (2006) 2271–2282.

D. H. NORTHCOTE, K. J. GOULDING & R. W. HORNE, J. 1958. The Chemical Composition and Structure of the Cell Wall of *Chlorella pyrenoidosa*, *BIOCHEMICAL JOURNAL*, VOL. 70, NO. 3

Ehimen E.A, Holm-nielsen J, Poulsen M, Boelsmand J.E, 2012, Influence of different pre-treatment routes on the anaerobic digestion of a filamentous algae, *Renewable energy* 50 (2013) 476-480

Fangrui M, Milford A, 1999. Biodieselproduction: a review. *Bioresource Technology* Volume 70, Issue 1, October 1999, Pages 1–15.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499000255>
Viitattu 17.8.2012

Fernandes T, Klaasse Bos G, Zeeman G, Sanders J, van Lier J, 2009, Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology* 100 (2009) 2575–2579.

Griffiths M.J & Harrison S.T.L, 2009, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *J Appl Phycol* (2009) 21:493-507

Gouveia L, 2011. *Microalgae as a feedstock for biofuels*. Springer.

Harun R, Jason W.S.Y, Cherrington T, Danquah M, 2011, Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production, *Applied Energy* 88 (2011) 3464–3467

Hiltunen H, 2011, *Biogasification Potential of Some Algae Species*, *Opinnäytetyö*

Jones C, Mayfield S, 2012, Algae biofuels: versatility for the future of bioenergy, *Current opinion in biotechnology* 2012, 23:346-351

Levin D, Pitt L, Love M, 2003, Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application, *International Journal of Hydrogen Energy* 29 (2004) 173 – 185

Mata T, Martins A, Caetano N, 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.14(2010)217–232.

Michael Cooney, Greg Young, Nick Nagle. *Extraction of Bio-oils from Microalgae*

Mussnug J, Klassen V, Schuter A, Kruse O, 2010, Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept, *Journal of biotechnology* 150(2010) 51-56

Nathan Mosier, Charles Wyman, Bruce Dale, Richard Elander, Y.Y. Lee, Mark Holtzapple, Michael Ladisch, 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96 (2005) 673–686.

Neste oil, 2010, Levästä tulevaisuuden polttoainetta.
<http://www.nesteoil.fi/default.asp?path=35;52;88;17746;17926;17993> viitattu 23.7.2012

Oilgae. Algae Oil Extraction.
<http://www.oilgae.com/algae/oil/extract/extract.html> viitattu 31.7.2012

Pakarinen A, 2012, Evaluation of fresh and preserved herbaceous field crops for biogas and ethanol production.

Peer M. Schenk, Skye R. Thomas-Hall, Evan Stephens, Ute C. Marx, Jan H. Mussnug, Clemens Posten, Olaf Kruse & Ben Hankamer, 2008, Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production, *Bioenerg. Res.* (2008) 1:20–43

Pienkos, P. T, 2007, Potential for biofuels from algae.
NREL/PR-510-42414. National Renewable Energy Laboratory.

Ren N, Li J, Li B, Wang Y, Liu S, 2006, Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system, *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (2006) 2147 – 2157

Rikkinen, 1999, *Leviä, sieniä ja leväsieniä*, Helsinki: Yliopistopaino.

Rösch C, Skarka J, Patyk A, 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae.

Samson R, Leduy A, 1983, Influence of mechanical and thermochemical pretreatments on anaerobic digestion of *Spirulina maxima* biomass, *Biotechnology letters* vol 5 no 10 671-676 (1983)

Schmid-Staiger U, 2009, *Algae Biorefinery – Concepts*, National German Workshop on Biorefineries 15th September 2009, Worms

Scott S, Davey P, Dennis J, Horst I, Howe C, Lea-Smith D & Smith A, 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166910000443>.pdf-tiedosto.

Sialve B, Berntet N, Bernard O, 2009, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, *Biotechnology advances* 27 (2009) 409-416

Singh J & Gu S, 2010, Commercialization potential of microalgae for bio-fuels production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Volume 14, Issue 9, December 2010, Pages 2596–2610

Söisitkö itse? Suomessa kasvatetaan pian ravintolisiä sellutehtaan jätevesissä, 2012,
<http://www.tekniikkatalous.fi/energia/ymparisto/soisitko+itse+suomessa+kasvatetaan+pian+ravintolisia+sellutehtaan+jatevesissa/a849653> Viitattu 24.10.2012

Yen H, Brune D.E, 2007, Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane, *Bioresource Technology* 98 (2007) 130–134

<http://www.ymparisto.fi> viitattu 21.8.2012

Zamalloa C, Vulsteke E, Albrecht J, Verstraete W, 2011, The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae, *Bioresource technology* 102(2011) 1149-1158

Znad H, Naderi G, Ang H.M & Tade M.O, 2012, CO₂ Biomitigation and biofuel production using microalgae: photobioreactors developments and future directions, *Advances in Chemical Engineering*

ENSIMMÄISEN PANOSKOKEEN PUNNITUSTULOKSET

TARKAT PUNNITUSTULOKSET					
	<u>Pullo</u>		<u>Näyte, g</u>		<u>pH</u>
Vesihaude 1					
1	Ympäri				7,6
2	Ympäri				7,6
3	Ympäri				
4	Chlorella(kaup). Ei käs		8,71		7,5
5	Chlorella(kaup). Ei käs		8,67		7,6
6	Chlorella(kaup). Ei käs		8,77		
7	Chlorella(kaup). Ei käs		8,72		
8	Chlorella(kaup) käs 1		8,3		7,6
9	Chlorella(kaup) käs 1		8,3		7,5
10	Chlorella(kaup) käs 1		8,31		
11	Chlorella(kaup) käs 1		8,3		
12	Chlorella(kaup) käs 2		8,5		7,5
13	Chlorella(kaup) käs 2		8,5		7,6
14	Chlorella(kaup) käs 2		8,49		
15	Chlorella(kaup) käs 2		8,5		
Vesihaude 2					
16	Chlorella(kaup) käs 3		8,1		7,6
17	Chlorella(kaup) käs 3		8,1		7,6
18	Chlorella(kaup) käs 3		8,1		
19	Chlorella(kaup) käs 3		8,1		
20	HY1-levä. Ei käs		22,41		7,8
21	HY1-levä. Käs 1		8,08		7,8
22	HY1-levä. Käs 1		7,98		7,8
23	Tärkkelys		3,5		7,7
24	Tärkkelys		3,5		7,6
25	HY2-levä. Ei käs		10		7,8
26	HY2-levä. Ei käs		10,08		7,9
27	HY2-levä. Ei käs		10,02		
28	HY2-levä. Käs 1		5		7,8
29	HY2-levä. Käs 1		5		7,83
30					

ENSIMMÄISEN PANOSKOKEEN TS JA VS TULOKSET

TS & VS MÄÄRITYKSET NÄYTTEISTÄ											
näyte	upokas. g	upokas+näyte.g	upokas+näyte.g	upokas+näyte.g	m märkä näyte.g	m kuiva näyte.g	TS %	keskiarvo TS %	m poltettu näyte	VS %	keskiarvo VS%
			kuivaus 22 h	poltto 2 h							
Ymppi	20,0234	28,8572	20,3482	20,1317	8,8338	0,3248	3,677		0,1083	2,4508	
	26,9166	37,4105	27,2959	27,0775	10,4939	0,3793	3,614		0,1609	2,0812	
	32,0034	45,9875	32,5117	32,2159	13,9841	0,5083	3,635	3,64	0,2125	2,1153	2,22
							0,032	0,03		hajonta	0,20
Levä(kaup). Ei käs	27,8442	29,2955	28,4461	27,887	1,4513	0,6019	41,473		0,0428	38,5241	
	29,1865	30,3174	29,6444	29,2279	1,1309	0,4579	40,490	40,83	0,0414	36,8291	37,57
	28,8072	30,5341	29,5072	28,8622	1,7269	0,7000	40,535		0,0550	37,3502	
							hajonta	0,56		hajonta	0,87
Levä(kaup). 1 käs	29,6362	31,1758	30,2859	29,6722	1,5396	0,6497	42,199		0,0360	39,8610	
	29,1216	30,5444	29,7322	29,1568	1,4228	0,6106	42,915	43,84	0,0352	40,4414	40,57
	58,3228	59,6398	58,9339	58,3887	1,3170	0,6111	46,401		0,0659	41,3971	
							hajonta	2,25		hajonta	0,78
Levä(kaup). 2 käs	55,9785	58,2693	56,995	56,0554	2,2908	1,0165	44,373		0,0769	41,0162	
	56,2495	58,8731	57,426	56,3379	2,6236	1,1765	44,843	44,85	0,0884	41,4735	41,56
	57,1239	58,7281	57,8513	57,1746	1,6042	0,7274	45,343		0,0507	42,1830	
							hajonta	0,49		hajonta	0,59
Levä(kaup). 3 käs	58,2972	60,1557	59,1499	58,3541	1,8585	0,8527	45,881		0,0569	42,8195	
	50,8387	52,9723	51,8302	50,9065	2,1336	0,9915	46,471	46,16	0,0678	43,2930	43,03
	61,8025	64,1843	62,9013	61,8778	2,3818	1,0988	46,133		0,0753	42,9717	
							hajonta	0,30		hajonta	0,24
Täkkelys	25,9411	26,4457	26,4221	25,9431	0,5046	0,4810	95,323		0,0020	94,9267	
	32,6999	33,1101	33,0912	32,702	0,4102	0,3913	95,392	95,16	0,0021	94,8805	94,73
	29,3732	30,4874	30,4289	29,3773	1,1142	1,0557	94,750		0,0041	94,3816	
							hajonta	0,35		hajonta	0,30
HY-levä2	29,7178	35,4089	30,1233	29,7718	5,6911	0,4055	7,125		0,0540	6,1763	
	30,3457	36,4577	30,7857	30,4053	6,1120	0,4400	7,199	7,17	0,0596	6,2238	6,22
	28,0225	33,6979	28,4302	28,0746	5,6754	0,4077	7,184		0,0521	6,2656	
							hajonta	0,04		hajonta	0,04
HY-levä 2 käs 1.	53,9477	54,561	54,0322	53,9538	0,6133	0,0845	13,778		0,0061	12,7833	
	58,7895	59,2647	58,8543	58,7942	0,4752	0,0648	13,636	13,71	0,0047	12,6473	12,72
							hajonta	0,10		hajonta	0,10
HY-levä 1	20,0211	25,2945	20,6418	20,144	5,2734	0,6207	11,770		0,1229	9,4398	
	31,5352	32,7782	31,6819	31,5636	1,2430	0,1467	11,802	11,79	0,0284	9,5173	9,47
	30,7382	33,1833	31,0263	30,7949	2,4451	0,2881	11,783		0,0567	9,4638	
							hajonta	0,02		hajonta	0,04
HY-levä 1 käs 1	27,3768	28,6168	27,739	27,4319	1,2400	0,3622	29,210		0,0551	24,7661	
	34,1483	36,0084	34,6834	34,2282	1,8601	0,5351	28,767	29,05	0,0799	24,4718	24,62
	30,9162	32,779	31,4599	31,0012	1,8628	0,5437	29,187		0,0850	24,6242	
							hajonta	0,25		hajonta	0,15

TOISEN PANOSKOKEEN PUNNITUSTULOKSET

TARKAT PUNNITUSTULOKSET									
	Pullo		Näyte, g		pH				pH
Vesihaude 1									
1	Ymppi								
2	Ymppi				7,47				
3	Ymppi				7,48				
4	kaup.käsitlemätön		8,49						
5	kaup.käsitlemätön		8,49		7,48				
6	kaup.käsitlemätön		8,54		7,48				
7	Chlorella (kaup) käs 1		8,52						
8	Chlorella (kaup) käs 1		8,68		7,45				
9	Chlorella (kaup) käs 1		8,48		7,43				
10	Chlorella (kaup) käs 2		8,5						
11	Chlorella (kaup) käs 2		8,6		7,36				
12	Chlorella (kaup) käs 2		8,6		7,48				
13	Chlorella (kaup) käs 3		8,54						
14	Chlorella (kaup) käs 3		8,49		7,45				
15	Chlorella (kaup) käs 3		8,54		7,40				
Vesihaude 2									
16	käs 1 supernatantti		60,23						
17	käs 1 supernatantti		60,01		7,25				
18	käs 2 supernatantti		60,25		7,24				
19	käs 2 supernatantti		60,2		7,24				
20	käs 3 supernatantti		60,04		7,23				
21	käs 3 supernatantti		60		7,17				
22	HY-levä ei käs		29,69		7,18				
23	HY-levä ei käs		30,05		7,51				
24	HY-levä käs 1		23,84		7,53				
25	HY-levä käs 1		22,5		7,50				
26	Täkkelys		3,52		7,53				
27	Täkkelys		3,49		7,56				
28	supernatantti ei käs		50,29		7,58				
29	supernatantti ei käs		50,03		7,48				
30					7,47				

TOISEN PANOSKOKEEN TS JA VS TULOKSET

TS & VS MÄÄRITYKSET NÄYTTEISTÄ													
näyte	upokas_g	upokas+näyte_g	upokas+näyte_g	upokas+näyte_g	m märkä näyte_g	m kuiva näyte_g	TS %	keskiarvo TS %	m poltettu näyte	VS %	keskiarvo VS%	pH	
		kuivaus 22 h	poltto 2 h										
Ympäri	27,3777	30,0993	27,4981	27,4247	2,7216	0,1204	4,424		0,0470	2,6969			
	29,1241	35,0121	29,3739	29,2202	5,8880	0,2498	4,243		0,0961	2,6104			
	28,0225	33,0009	28,2394	28,1061	4,9784	0,2169	4,357	4,34	0,0836	2,6776	2,66		
							0,092	0,09		hajonta	0,05		
Levä(kaup). Ei käs	58,2973	59,0902	58,6304	58,324	0,7929	0,3331	42,010		0,0267	38,6430			
	50,8412	52,843	51,6455	50,9009	2,0018	0,8043	40,179	41,17	0,0597	37,1965	38,03		
	57,3876	59,0776	58,0859	57,4395	1,6900	0,6983	41,320		0,0519	38,2485			
							hajonta	0,92		hajonta	0,75		
Levä(kaup). 1 käs	27,7141	29,4445	28,4448	27,7576	1,7304	0,7307	42,227		0,0435	39,7134			
	31,5297	32,1456	31,7867	31,5461	0,6159	0,2570	41,728	42,08	0,0164	39,0648	39,41		
	25,9416	27,32	26,5243	25,9803	1,3784	0,5827	42,274		0,0387	39,4660			
							hajonta	0,30		hajonta	0,33		
Levä(kaup). 2 käs	58,0303	60,4921	59,0309	58,097	2,4618	1,0006	40,645		0,0667	37,9357			
	60,1915	61,5657	60,7642	60,2274	1,3742	0,5727	41,675	41,61	0,0359	39,0627	38,98		
	58,79	60,1188	59,355	58,8243	1,3288	0,5650	42,520		0,0343	39,9383			
							hajonta	0,94		hajonta	1,00		
Levä(kaup). 3 käs	57,7382	58,8356	58,232	57,7618	1,0974	0,4938	44,997		0,0236	42,8467			
	58,3554	59,6178	58,9221	58,3886	1,2624	0,5667	44,891	44,82	0,0332	42,2608	42,44		
	56,9301	57,8919	57,3588	56,9528	0,9618	0,4287	44,573		0,0227	42,2125			
							hajonta	0,22		hajonta	0,35		
käs 1 supernatantti	32,7004	38,9867	32,956	32,7641	6,2863	0,2556	4,066		0,0637	3,0527			
	26,9173	31,0873	27,085	26,96	4,1700	0,1677	4,022	4,05	0,0427	2,9976	3,04		
	33,5421	38,9736	33,7629	33,5968	5,4315	0,2208	4,065		0,0547	3,0581			
							hajonta	0,03		hajonta	0,03		
käs 2 supernatantti	29,1866	31,9379	29,3066	29,2158	2,7513	0,1200	4,362		0,0292	3,3003			
	27,8473	31,4917	28,0066	27,8859	3,6444	0,1593	4,371	4,38	0,0386	3,3119	3,31		
	31,1819	35,378	31,3666	31,227	4,1961	0,1847	4,402		0,0451	3,3269			
							hajonta	0,02		hajonta	0,01		
käs 3 supernatantti	33,1582	38,6073	33,3745	33,2163	5,4491	0,2163	3,969		0,0581	2,9032			
	29,1256	34,542	29,3434	29,1826	5,4164	0,2178	4,021	4,01	0,0570	2,9688	2,94		
	32,0053	37,5547	32,229	32,0651	5,5494	0,2237	4,031						
							hajonta	0,03		hajonta	0,05		
HY-levä ei käs	60,1731	63,461	60,6912	60,2	3,2879	0,5181	15,758		0,0269	14,9396			
	57,1276	60,1894	57,6114	57,1516	3,0618	0,4838	15,801	15,78	0,0240	15,0173	14,97		
	54,8547	57,913	55,3369	54,8795	3,0583	0,4822	15,767		0,0248	14,9560			
							hajonta	0,02		hajonta	0,04		
HY-levä käs 1	34,1485	35,5526	34,5149	34,1609	1,4041	0,3664	26,095		0,0124	25,2119			
	29,7149	31,2045	30,0788	29,7259	1,4896	0,3639	24,429	24,86	0,0110	23,6909	24,06		
	59,5695	61,5374	60,0429	59,5848	1,9679	0,4734	24,056		0,0153	23,2786			
							hajonta	1,09		hajonta	1,02		
Täikkelys	55,9818	56,9632	56,8983	55,9882	0,9814	0,9165	93,387		0,0064	92,7349			
	55,5706	56,4532	56,3966	55,5772	0,8826	0,8260	93,587	93,49	0,0066	92,8393	92,79		
							hajonta	0,14		hajonta	0,07		
Ei käs supernatantti	58,6519	63,4514	58,8811	58,7001	4,7995	0,2292	4,775		0,0482	3,7712			
	59,6455	66,1818	59,9575	59,7109	6,5363	0,3120	4,773	4,77	0,0654	3,7728	3,77		
							hajonta	0,00		hajonta	0,00		

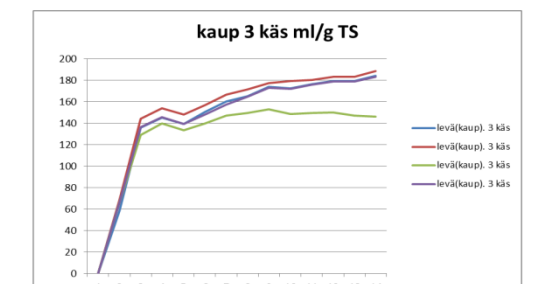
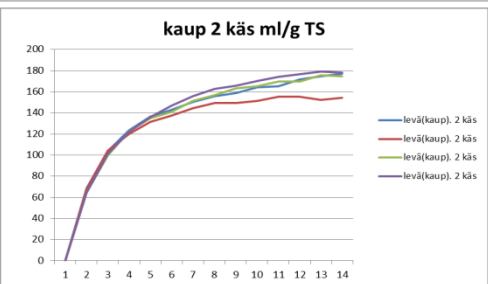
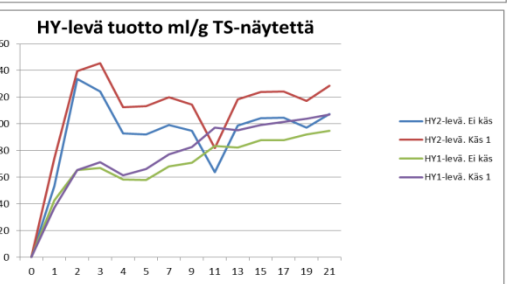
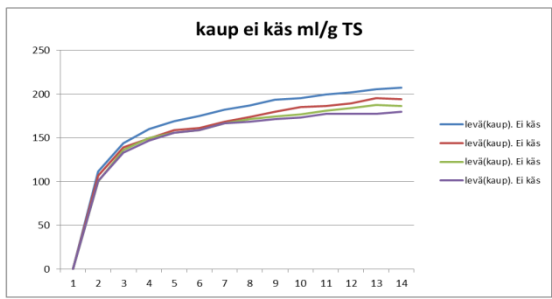
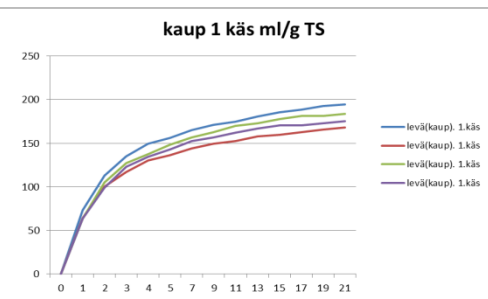
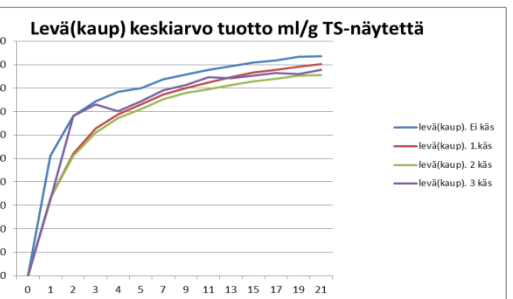
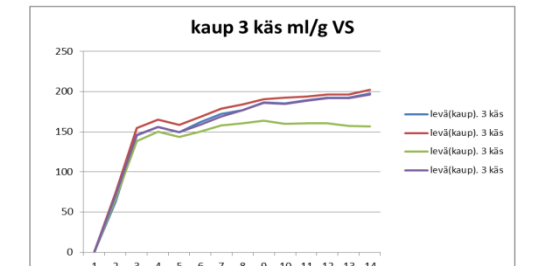
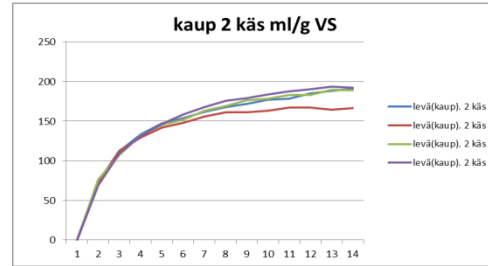
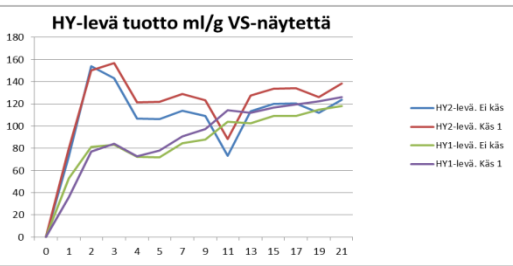
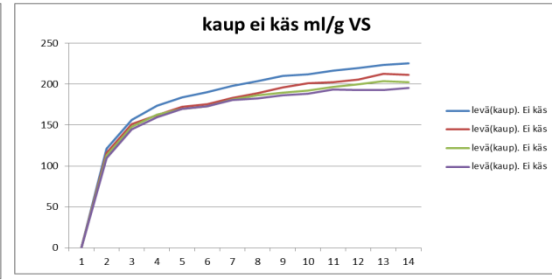
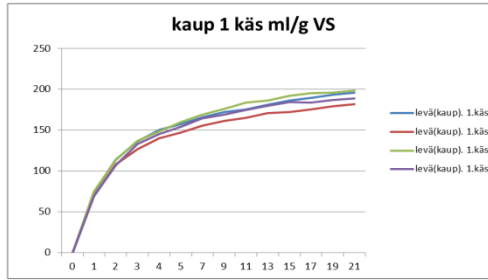
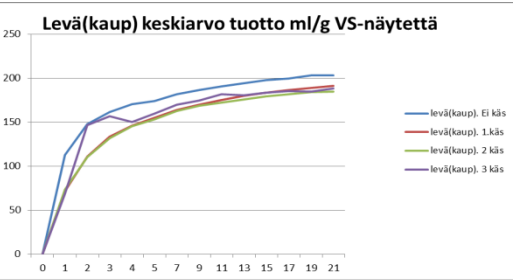
KOLMANNEN PANOSKOKEEN PUNNITUSTULOKSET

	Pullo		Ymppi g	Näyte, g		Vesi		pH	pH
Vesihaude 1									
	1	Ymppi	300			100,5		7,5	
	2	Ymppi	300,6			100,06		7,5	
	3	Ymppi	300			100,8			
	4	kaup.käsittelemätön	300,1	18,24		81,7		7,3	
	5	kaup.käsittelemätön	300,1	18,08		81,9		7,3	
	6	kaup.käsittelemätön	301,7	18,1		81,9		7,4	
	7	Chlorella (kaup) käs 1	300	18,43		81,5		7,4	
	8	Chlorella (kaup) käs 1	300,1	17,94		82		7,3	
	9	Chlorella (kaup) käs 1	300	18,3		81,8		7,3	
	10	Chlorella (kaup) käs 3	300	18,11		81,9		7,3	
	11	Chlorella (kaup) käs 3	300,1	18,34		81,8		7,3	
	12	Chlorella (kaup) käs 3	300,1	18,15		81,8		7,3	
	13	NaOH käsittely	300,1	18,03		82,4		7,4	
	14	NaOH käsittely	300,1	19,19		80,8		7,4	
	15	NaOH käsittely	300	17,97		82			
Vesihaude 2									
	16	HY-levä ei käs	300	78,72		12,2		7,48	
	17	HY-levä ei käs	300	79		11,5		7,41	
	18	HY-levä ei käs	300	79,1		11,4			
	19	HY-levä uutettu	300,1	2,5		99		7,4	
	20	HY-levä uutettu	300,5	2,5		97,5		7,4	
	21	HY-levä uutettu	300	2,5		97,9		7,4	
	22	Peroksidi pH	300	100				7,6	
	23	Peroksidi pH	300,2	100				7,6	
	24	Peroksidi pH	300	101,1				7,5	
	25	Peroksidi verokki	300	93,3				7,6	
	26	Peroksidi verokki	300,1	93,4				7,4	
	27	Peroksidi verokki	300	93,3					
	28	Peroksidi BDP	300	93,3				7,5	
	29	Peroksidi BDP	300,8	93,3				7,3	
	30	Peroksidi BDP	300	93,3					

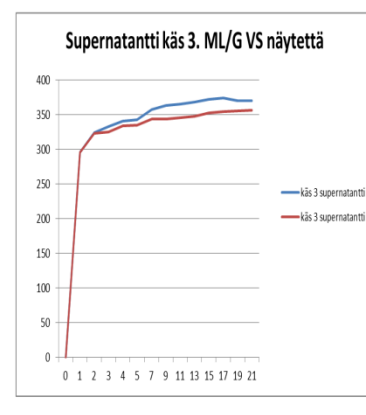
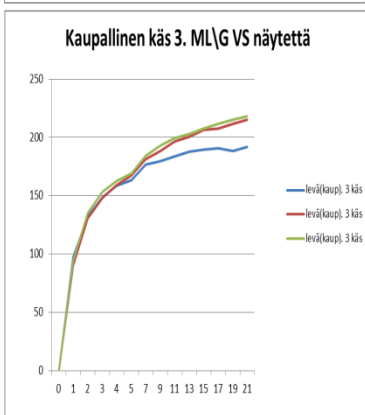
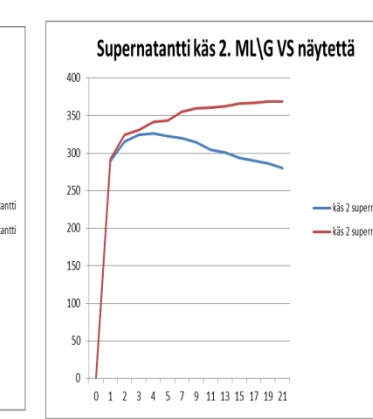
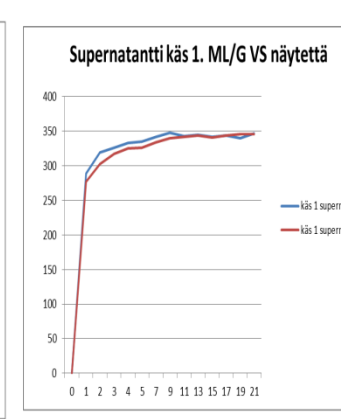
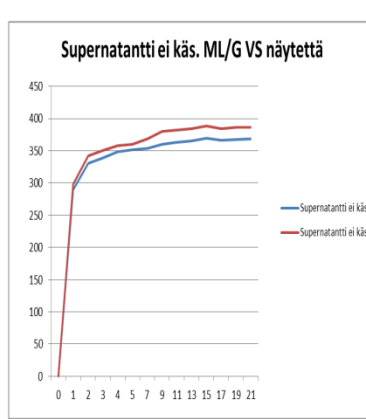
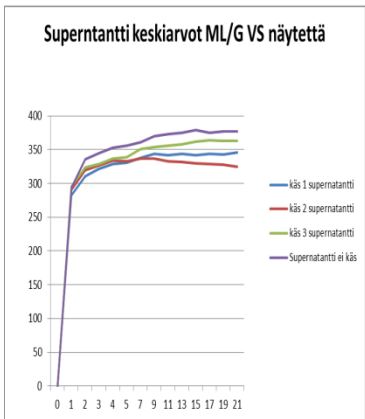
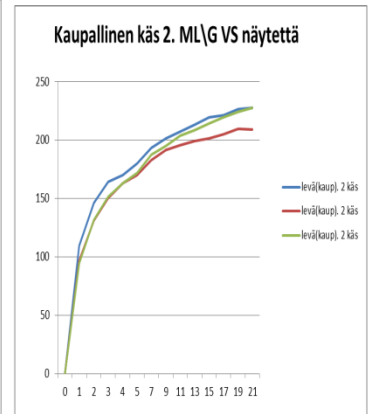
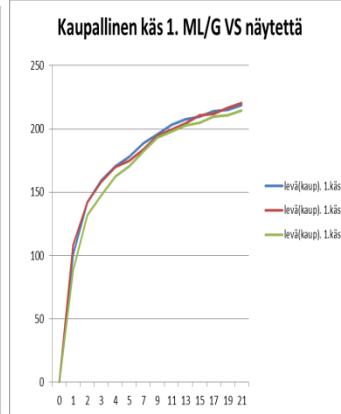
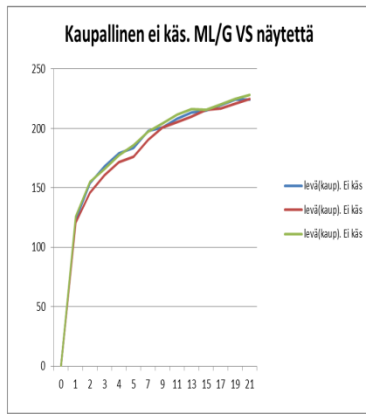
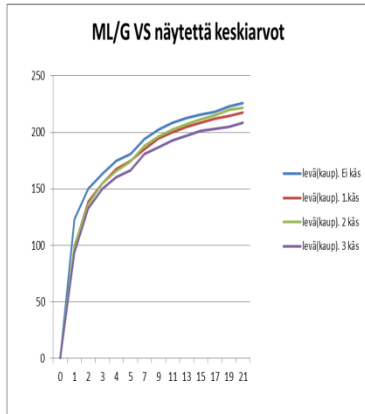
KOLMANNEN PANOSKOKEEN TS JA VS TULOKSET

TS & VS MÄÄRITYKSET NÄYTTEISTÄ													
näyte	upokas. g	upokas+näyte.g	upokas+näyte.g kuivaus 22 h	upokas+näyte. g poltto 2 h	m märkä näyte. g	m kuiva näyte. g	TS %	keskiarvo TS %	m poltettu näyte	VS %	keskiarvo VS%	pH	
Ympäri	30,7372	35,5235	31,1084	30,9246	4,7863	0,3712	7,755		0,1874	3,8401			
	27,3807	32,2053	27,8144	27,5799	4,8246	0,4337	8,989		0,1992	4,8605			
	30,3459	36,0935	30,8539	30,6407	5,7476	0,5080	8,838	8,53	0,2948	3,7094	4,14		
							0,673	0,67		hajonta	0,63		
Levä(kaup). Ei käs	33,1566	35,6177	33,724	33,1933	2,4611	0,5674	23,055		0,0367	21,5635			
	29,7163	33,1804	30,5194	29,7704	3,4641	0,8031	23,184	23,15	0,0541	21,6218	21,60		
	27,7149	31,4308	28,5769	27,7741	3,7159	0,8620	23,198		0,0592	21,6045			
							hajonta	0,08		hajonta	0,03		
Levä(kaup). 1 käs	27,8468	29,449	28,2237	27,8698	1,6022	0,3769	23,524		0,0230	22,0884			
	31,1819	34,4921	31,9612	31,2475	3,3102	0,7793	23,542	23,53	0,0656	21,5606	21,82		
	32,0033	36,5422	32,0756	32,055	4,5389	0,0723	1,593		0,0517	0,4539			
							hajonta	0,01		hajonta	12,34		
Levä(kaup). 3 käs	33,5397	35,9634	34,1137	33,5879	2,4237	0,5740	23,683		0,0482	21,6941			
	58,3579	61,8306	59,181	58,431	3,4727	0,8231	23,702	23,72	0,0731	21,5970	21,75		
	58,7915	61,7892	59,5043	58,8463	2,9977	0,7128	23,778		0,0548	21,9502			
							hajonta	0,05		hajonta	0,18		
NaOH-käsittely	50,8451	53,1166	51,34	50,8805	2,2715	0,4949	21,787		0,0354	20,2289			
	58,3065	61,2485	58,948	58,3522	2,9420	0,6415	21,805	21,80	0,0457	20,2515	20,24		
	58,0321	63,8203	59,295	58,1227	5,7882	1,2629	21,819		0,0906	20,2533			
							hajonta	0,02		hajonta	0,01		
HY-levä ei käs	57,125	58,3135	57,2498	57,1327	1,1885	0,1248	10,501		0,0077	9,8528			
	56,9321	60,0327	57,2514	56,953	3,1006	0,3193	10,298	10,36	0,0209	9,6239	9,71		
	29,1263	34,5784	29,6873	29,1607	5,4521	0,5610	10,290		0,0344	9,6587			
							hajonta	0,12		hajonta	0,12		
HY-levä uutettu	29,1227	29,2985	29,297	29,1364	0,1758	0,1743	99,147		0,0137	91,3538			
	25,942	26,9175	26,9027	26,0071	0,9755	0,9607	98,483	98,81	0,0651	91,8093	91,81		
	26,916	27,484	27,4772	26,9531	0,5680	0,5612	98,803		0,0371	92,2711			
							hajonta	0,33		hajonta	0,46		
Peroksidi pH	34,148	39,6668	34,3744	34,1682	5,5188	0,2264	4,102		0,0202	3,7363			
	30,9172	35,551	31,1085	30,9342	4,6338	0,1913	4,128	4,11	0,0170	3,7615	3,75		
	29,6369	36,09	29,9017	29,6603	6,4531	0,2648	4,103		0,0234	3,7408			
							hajonta	0,01		hajonta	0,01		
Peroksidi verokki	32,6988	36,0915	32,8446	32,7061	3,3927	0,1458	4,297		0,0073	4,0823			
	29,1881	32,5709	29,3352	29,1954	3,3828	0,1471	4,348	4,32	0,0073	4,1327	4,12		
	29,373	32,58	29,5111	29,3781	3,2070	0,1381	4,306		0,0051	4,1472			
							hajonta	0,03		hajonta	0,03		
Peroksidi + BDP	20,0247	23,187	20,1107	20,0291	3,1623	0,0860	2,720		0,0044	2,5804			
	31,5251	34,4843	31,6064	31,5298	2,9592	0,0813	2,747	2,73	0,0047	2,5885	2,59		
	28,0232	32,2886	28,1395	28,0281	4,2654	0,1163	2,727		0,0049	2,6117			
							hajonta	0,01		hajonta	0,02		

ENSIMMÄISEN PANOSKOKEEN TUOTOT

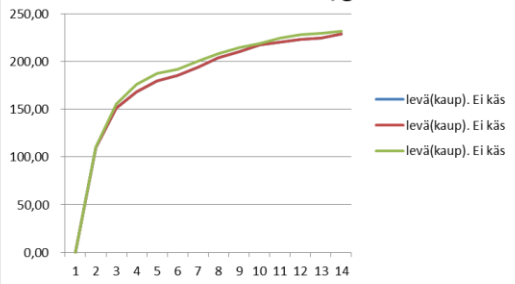


TOISEN PANOSKOKEEN TUOTOT

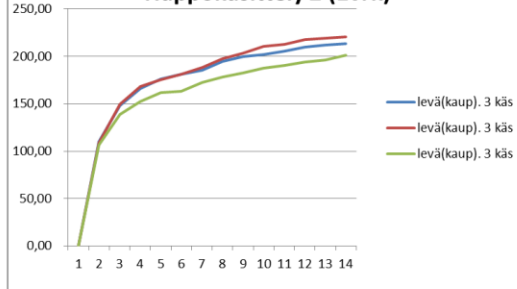


KOLMANNEN PANOSKOKEEN TUOTOT

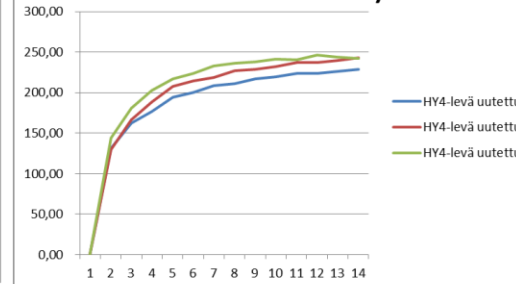
Käsittelemätön ml/g vs



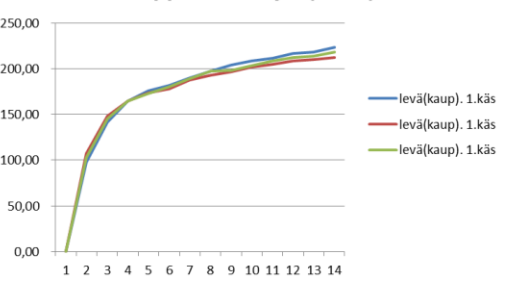
Happokäsittely 2 (1vrk)



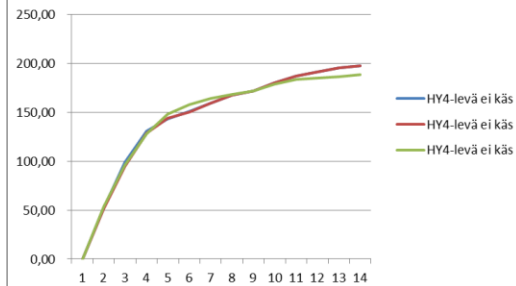
HY-levä SFE-käsittely



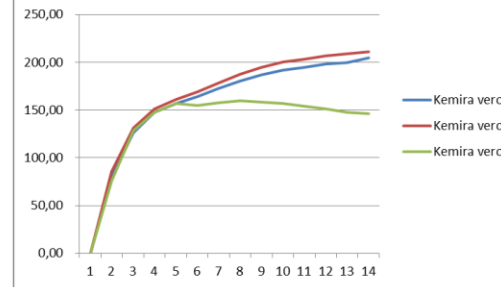
Happokäsittely 1 (1 vrk)



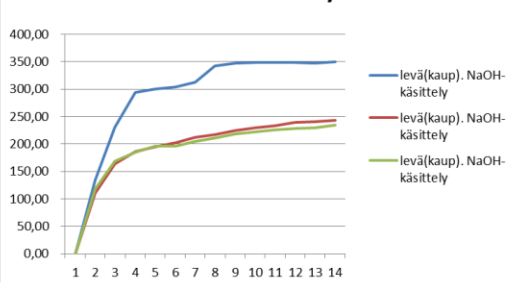
HY-levä käsittelemätön



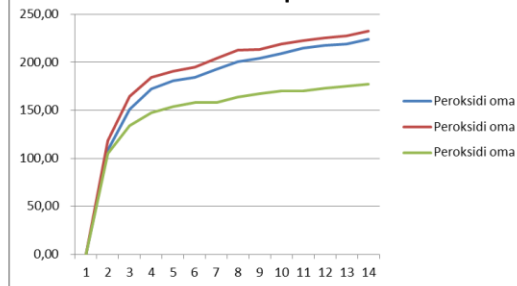
Kemira verokki



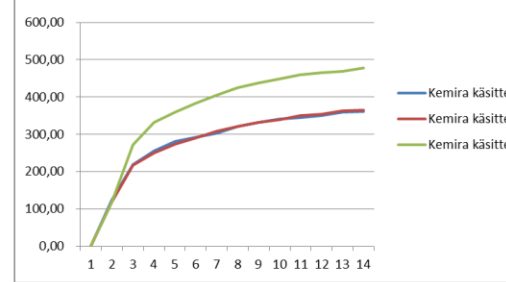
Emäs-käsittely



Peroksidi + ph säätö



Peroksidi + BDP



LEVIEN KASVATUSLIUOKSET

EG (*Euglena gracilis* medium)

Freshwater algae and protozoa

Stock	per litre
(1) CaCl ₂ stock solution: CaCl ₂	1.0 g
Medium	per litre
Sodium acetate trihydrate	1.0 g
"Lab-Lemco" powder (Oxoid L29)*	1.0 g
Tryptone (Oxoid L42)*	2.0 g
Yeast extract (Oxoid L21)*	2.0 g
CaCl ₂ stock solution (1)	10.0 ml

Add constituents above and make up to 1 litre with deionized water. For agar add 15 g per litre *Bacteriological Agar (Oxoid L11). Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

LEVIEN KASVATUSLIUOKSET

COMBO Medium

Kilham et al. 1998

COMBO Medium was formulated by preparing Guillard and Lorenzen's (1972) WC medium (without glycylglycine or Tris buffer) and enriching it with animal trace metals.

To prepare the medium, begin with 900 mL of dH₂O and individually add 1 mL of each stock solution. Bring the final volume to 1 L with dH₂O, adjust the pH to 7.8 and filter sterilize.

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
NaNO ₃	85.01 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.00 x 10 ⁻³ M
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36.76 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	2.50 x 10 ⁻⁴ M
MgSO ₄ · 7H ₂ O	36.97 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.66 x 10 ⁻⁴ M
NaHCO ₃	12.60 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.50 x 10 ⁻⁴ M
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	28.42 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.00 x 10 ⁻⁴ M
K ₂ HPO ₄	8.71 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	5.00 x 10 ⁻⁵ M
H ₃ BO ₃	1.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.62 x 10 ⁻⁵ M
KCl	7.45 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.00 x 10 ⁻⁴ M
algal trace elements solution	(see recipe below)	1 mL	---
animal trace elements solution	(see recipe below)	1 mL	---
vitamin solution	(see recipe below)	1 mL	---

LEVIEN KASVATUSLIUOKSET

Algal Trace Elements Solution

This is slightly modified from WC medium; the iron and copper are reduced, selenium and vanadium are added. To prepare, begin with 950 mL of dH₂O, add the components and bring final volume to 1 liter with dH₂O. Autoclave.

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	---	4.36 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
FeCl ₃ 6H ₂ O	---	1.00 g	3.70 x 10 ⁻⁶ M
CuSO ₄ 5H ₂ O	10.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	4.01 x 10 ⁻⁹ M
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	7.65 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ 6H ₂ O	10.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	4.20 x 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ 4H ₂ O	180.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	9.10 x 10 ⁻⁷ M
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.0 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	2.48 x 10 ⁻⁸ M
H ₂ SeO ₃	1.6 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.24 x 10 ⁻⁸ M
Na ₃ VO ₄	1.8 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	9.79 x 10 ⁻⁹ M

Animal Trace Elements
(Elendt and Bias 1990)

These trace elements are necessary for animals (e.g., Cladocera) but not for algae.

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
LiCl	0.31 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	7.31 x 10 ⁻⁶ M
RbCl	0.07 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	5.79 x 10 ⁻⁷ M
SrCl ₂ 6H ₂ O	0.15 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	5.63 x 10 ⁻⁷ M
NaBr	0.016 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.55 x 10 ⁻⁷ M
KI	0.0033 g L ⁻¹ dH ₂ O	1 mL	1.99 x 10 ⁻⁸ M

LEVIEN KASVATUSLIUKOKSET

Vitamin Solution

First, prepare primary stock solutions. To prepare final vitamin solution, begin with 950 mL of dH₂O, dissolve the thiamine HCl, add 1 mL of the primary stocks and bring final volume to 1 liter with dH₂O. Filter sterilize. Store in refrigerator or freezer.

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
thiamine · HCl (vit. B ₁)	---	100 mg	2.96×10^{-7} M
biotin (vit. H)	0.5 g/L dH ₂ O	1 mL	2.05×10^{-9} M
cyanocobalamin (vit. B ₁₂)	0.55 g/L dH ₂ O	1 mL	4.06×10^{-10} M