

Hiilihydraattianalytiikan GC/MS-menetelmän kehittäminen

**Biokaasutuotannon puupohjaisten syötenäytteiden esikäsittely ja
analysointi**

LAB-ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

2022

Sofia Malin

Tiivistelmä

Tekijä(t) Malin, Sofia	Julkaisun laji Opinnäytetyö, AMK	Valmistumisaika 2022
	Sivumäärä 35	
Työn nimi Hiilihydraattianalytiikan GC/MS-menetelmän kehittäminen Biokaasutuotannon puupohjaisten syötenäytteiden esikäsittely ja analysointi		
Tutkinto Insinööri (AMK), Energia- ja ympäristötekniikan koulutus		
Toimeksiantajan nimi, titteli ja organisaatio Mervi Pulkkinen, lehtori FM, LAB-ammattikorkeakoulu		
Tiivistelmä <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää analyysimenetelmä hiilihydraattien kvantitatiiviseen määrittämiseen puupohjaisesta näytematriisista kaasukromatografisesti. Analysoitaviksi yhdisteiksi valittiin arabinoosi, galaktoosi, glukuronihappo, ksyloosi ja mannoosi. Menetelmänkehitys kokonaisuudessaan käsitti toimivan prosessin kehittämistä seuraavilla osa-alueilla: näytteiden esikäsittely, GC/MS-laitteiston kalibrointi ja käytetyn menetelmän toistettavuuden toteaminen. Lisäksi menetelmä todettiin sovellettavaksi biokaasutuotannossa puupohjaisten syötenäytteiden hiilihydraattipitoisuuden määrittämiseen.</p> <p>Kirjallisessa työssä oli teoriaosuus ja kokeellinen osio. Teoriaosuuksessa käsiteltiin puukemian perusteita sekä kerrottiin käytetyistä analyysimenetelmistä. Kokeellisessa osiossa kerrottiin analyysimenetelmän kehityksestä. Lopullisten tulosten perusteella voitiin todeta analyysimenetelmän toimivuus niin esikäsittelyn kuin GC/MS-analytiikan osalta. Kaasukromatografian kalibroinnissa käytettiin ulkoisen standardin menetelmää, jota tukee laadunvarmistusnäytteen käyttö. Esikäsittelyn toimivuuden varmistuksessa käytettiin sisäisen standardin menetelmää.</p>		
Asiasanat kaasukromatografia, metanalyysi, esikäsittely, menetelmänkehitys		

Abstract

Author(s) Malin, Sofia	Type of Publication Thesis, UAS	Published 2022
	Number of Pages 35	
Title of Publication The development of a GC-MS method for the carbohydrate analysis Pre-treatment and analysis of wood-based samples for biogas production		
Name of Degree Bachelor of Engineer (UAS), Energy and Environmental Engineering		
Name, title and organization of the client Mervi Pulkkinen, senior lecturer, MSc, LAB University of Applied Sciences		
Abstract <p>The purpose of this thesis was to develop a method for the quantitative determination of carbohydrates from a wood-based samples by using gas chromatography. The development of the method included following areas: pre-treatment for samples, calibration of the GC/MS and verifying repeatability and reproducibility. The aim was also to investigate if the development method could be used to determine the carbohydrate content of samples which are used in biogas production.</p> <p>Thesis included a theory section and a study section. The theory section consisted of methods of analysis used in the study as well as wood chemistry. Study section consisted of using development method in practice by utilizing methanolysis. The results were obtained and compared with each other to ensure that the method works as intended. An external standard was used to calibrate the gas chromatograph, and internal standard was used to ensure that there was not for example contaminations in pre-treatment.</p>		
Keywords gas chromatograph, methanolysis, pre-treatment, method development		

Sisällys

1	Johdanto.....	1
2	Puun rakenne	2
2.1	Makroskooppinen rakenne.....	2
2.2	Puun solut	3
2.3	Soluseinän koostumus.....	3
3	Puun kemiallinen koostumus	5
3.1	Kemiallinen rakenne	5
3.2	Puun hiilihydraatit	5
3.3	Selluloosa	6
3.4	Hemiselluloosat	7
3.5	Ligniini	10
4	Biokaasu.....	11
4.1	Biokaasun taustaa	11
4.2	Biokaasun muodostuminen.....	11
4.3	Biokaasuksi hyödynnettävät syötteet	13
5	Hydrolyysi.....	15
6	GC/MS-menetelmä.....	16
6.1	Kromatografian periaate	16
6.2	Kaasukromatografia.....	17
6.3	Massaspektrometria	18
6.4	Yhdistelmätekniikka	19
7	Hiilihydraattien analysointi GC/MS-menetelmällä.....	20
7.1	Liuoksien valmistus.....	20
7.2	Standardinäytteiden esikäsittely.....	21
8	Tulokset ja niiden analysointi	25
9	Yhteenveto	31
	Lähteet	33

Liitteet

Liite 1. Sahanpurun nollanäytteen ja yhden rinnakkaisnäytteen kromatogrammi

Liite 2. Koivunlehden nollanäytteen ja yhden rinnakkaisnäytteen kromatogrammi

Liite 3. Standardiseoksen kromatogrammi

1 Johdanto

Fossiilisten polttoaineiden vähentäminen vaihtoehtoisten menetelmien avulla on yksi merkittävä askel kohti vähäpäästöisempää tulevaisuutta. Esimerkiksi biokaasussa on paljon potentiaalia lämmön- ja sähköntuotannossa, mutta toisaalta myös liikennepolttoaineen valmistuksessa (Suomen Biokierto ja Biokaasu ry). Koska helposti hajoavia hiilihydraatteja sisältävää ainesta, mikä tuottaa nopeasti paljon metaania biokaasutuksessa, on runsaasti saatavilla, olisi kehiteltävä laboratorio-olosuhteissa toteutettavia analyysijä hiilihydraattipitoisuuksien selvittämiseen. Näin saataisiin selvyttä siitä, mitkä syötteet voisivat olla potentiaalisia.

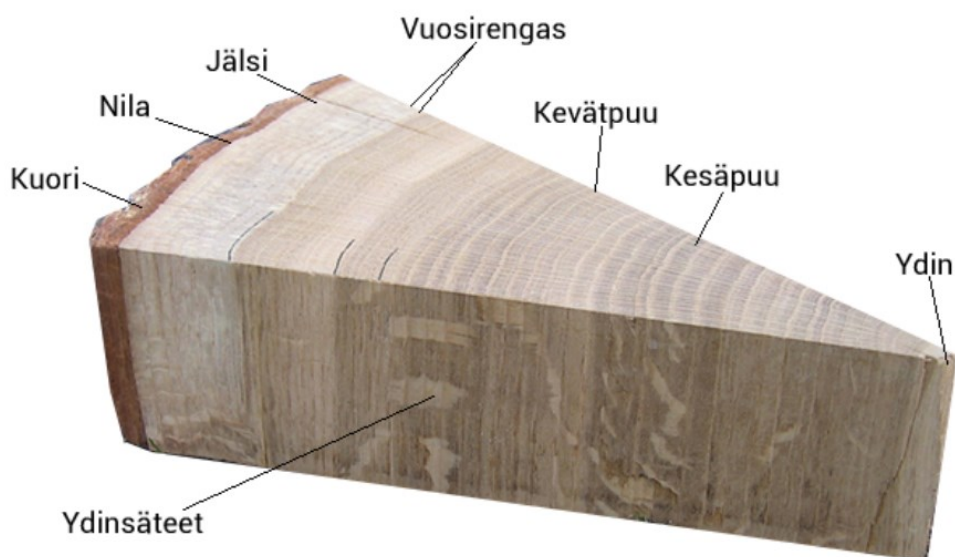
Mahdollisuus hiilihydraattipitoisuuksien määrittämiseen voisi toisaalta lisätä ymmärrystä myös muilla aloilla. Esimerkiksi selluteollisuuden sivuvirroista saatavalla hemiselluloosalla voisi olla asemansa korvaamaan neitseellisiä raaka-aineita niin lääke-, kosmetiikka- kuin elintarviketeollisuudessakin. Toisin sanoen kyky pystyä analysoimaan hiilihydraattipitoisuuksia laboratorio-olosuhteissa voisi mahdollistaa biokiertoalouden kehittymistä. (Kauppi 2021.)

Tämä opinnäytetyö koostuu teoriaosuudesta sekä kokeellisesta osiosta. Teoriatasolla aihetta käsitellään aina puun rakenteesta käytettyihin laboratoriomenetelmiin asti. Tarkoituksena on tarjota ymmärrystä hiilihydraattien moninaisuudesta sekä osoittaa tarpeellisuus kehittää toistettava ja toisaalta sovellettava kaasukromatografinen analyysimenetelmä puupohjaisten näytematriisien kvantitatiiviseen määrittämiseen. Työn kokeellisessa osiossa testataan kehiteltyä esikäsittelymenetelmää, sen toimivuutta ja toistettavuutta sekä pureudutaan tarkemmin saatuihin tuloksiin.

2 Puun rakenne

2.1 Makroskooppinen rakenne

Puu rakentuu useista ominaisuuksiltaan erilaisista ja pääsääntöisesti rungon suuntaisista soluista, jotka ovat huokosten avulla yhteydessä toisiinsa. Samoja ominaisuuksia sisältävät solut muodostavat yhdessä kokonaisuuden eli solukkoja, jotka vastaavat tietyistä tehtävistä, kuten esimerkiksi puun tukemisesta, nesteiden kuljetuksesta tai vararavinnon säilytyksestä. (Sjöström 1989, 9.) Kuva 1 havainnollistaa puun rungon rakennetta.



Kuva 1. Puun rungon rakenne (Puuproffa a)

Noin muutaman millimetrin läpimittainen ydin voidaan havaita rungon ja oksien keskustassa tummahkona juovana. Samankeskiiset rengasmaiset vuosirenkaat eli -lustot muodostavat puuosan, jossa vaakasuorista soluriveistä muodostuneet ydinsäteet ulottuvat kuoresta aina ytimeen (primaariset ydinsäteet) tai johonkin vuosilustoon (sekundaariset ydinsäteet) asti. Lisäksi havupuissa on myös pihkatiehyitä tarkemmin määriteltynä soluvälejä, jotka muodostavat yhtenäisen käytäväverkoston puuhun. Vanhan puun sisäosa on useimmiten ulkomuodoltaan tummunutta sydänpuuta. Ulko-osa on osaltaan vaaleampaa pintapuuta eli mantoa. Puun jälsi on hyvin ohut kerros ja se on muodostunut elävistä soluista, jossa puun kasvutoiminta tapahtuu. Kuori jakaantuu vaaleaan ja elävään sisäkuoreen eli nilaan ja kuollessaan tummaan ulkokuoreen eli kaarnaan. (Sjöström 1989, 10–18.)

2.2 Puun solut

Puuaines itsessään muodostuu puusolukoista, joiden tehtävänä on kuljettaa nestettä sekä varastoida ravinteita. Puun solujen rakenne on kaikilla puulajeilla hyvin samankaltainen. Karkeasti voidaan puiden solut jakaa neljään eri ryhmään riippuen niiden tehtävistä: kasvusta huolehtivat solut, ravintoaineista huolehtivat solut, veden kuljetuksesta vastaavat solut sekä lujuutta ylläpitävät solut. (Puuproffa.)

Kuitenkin havupuiden sekä lehtipuiden solurakenne poikkeaa merkittävästi toisistaan. Tämä vaikuttaa oleellisesti lajien kasvuun, ominaisuuksiin ja teolliseen jalostukseen. Havupuiden puuaineksesta suurin osa (90–95 %) on putkisoluja eli trakeideja, jotka kytkeytyvät toisiinsa pienien rengashuokosten avulla. Vesi siirtyy solusta toiseen läpäisten huokoiset huokoskalvot. Suurin osa lopusta puuaineksesta muodostuu ydinsäteistä, joka sisältää eläviä ja kuolleita soluja. Eläviä soluja kutsutaan parenkyymisoluiksi ja kuolleita trakeidiksi. (Haapala ym. 2018, 52.)

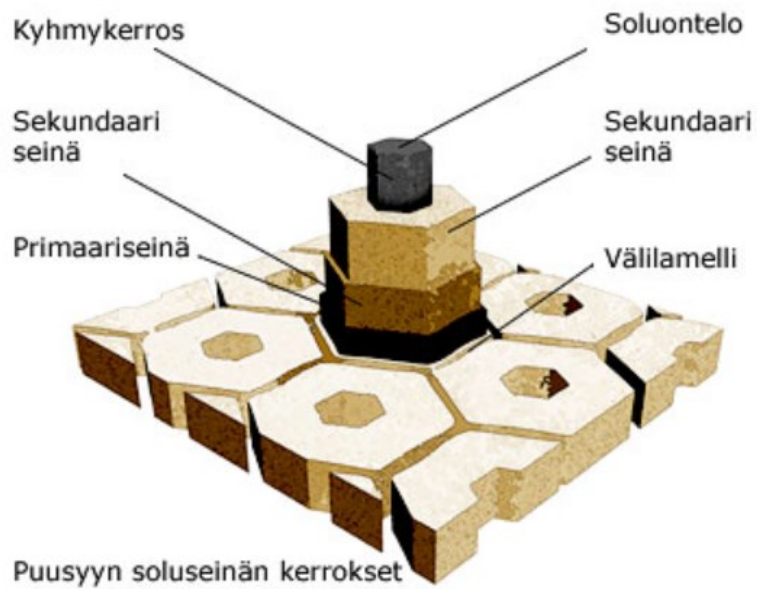
Lehtipuiden solurakenne on vaihteleva sekä monimutkaisempi kuin havupuiden. Kuitenkin lehtipuiden puuaines koostuu suuremmalti osin libriformsoluista eli kuidusta. Lehtipuiden voidaan havaita sisältävän myös putkisoluja eli trakeideja, joiden tarkoituksena on johtaa vettä. (Haapala ym. 2018, 52–53.)

2.3 Soluseinän koostumus

Puun solujen soluseinät koostuvat pääasiassa selluloosasta, joka muodostaa rungon, jota muut aineet ympäröivät. Lisäksi soluseinissä on merkittäviä määriä hemiselluloosia ja ligniiniä, jotka sitovat selluloosasäikeet toisiinsa. Selluloosarunko on muodostunut ketjumaisista selluloosamolekyyleistä. Selluloosarungon pienin rakenneyksikkö on elementaari- eli alkeisfibrilli. Kaksi tai useampi alkeisfibrilli muodostaa mikrofibrillin, ja nämä voivat liittyä toisiinsa ja jälleen muodostaa kokonaisuuden eli fibrillejä. Nämä voivat edelleen yhdistyä toisiinsa muodostaen lamelleja. (Isotalo 2004, 32.)

Soluseinä voidaan jaotella seuraavasti välilamelli, primääri- ja sekundääriseinä sekä kyhmykerros. Kuvassa 2 on havainnollistettu soluseinän rakennetta. Kemialliselta koostumukseltaan välilamelli on pektiiniä, joka muuntuu lopulta ligniiniksi. Primääriseinä on solun uloin ja ohut kerros sisältäen paljon ligniiniä sekä amorfista hemiselluloosaa. Tässä solun osassa selluloosan määrä on pieni. Sekundääriseinä voidaan jakaa vielä kolmeen osaan: uloin, sisin ja keskikerros. Uloimmat ja sisimmät kerrokset ovat ohuita kuten aikaisemmin mainittu primaarikerros, mutta keskikerros on paksu. (Isotalo 2004, 32.) Keskellä solua sijaitsee soluntelo, jossa ei ole solun rakenteita, vaan sen lävitse kulkee vesi, johon on sekoittunut

muita liuenneita aineita (Haapala ym. 2018, 54). Karkeasti voidaan sanoa, että soluseinän rakenteesta selluloosa muodostaa suurimman osuuden eli 40–50 %, hemiselluloosat 20–25 % ja ligniini 20–30 % puulajista riippuen (Puuproffa).

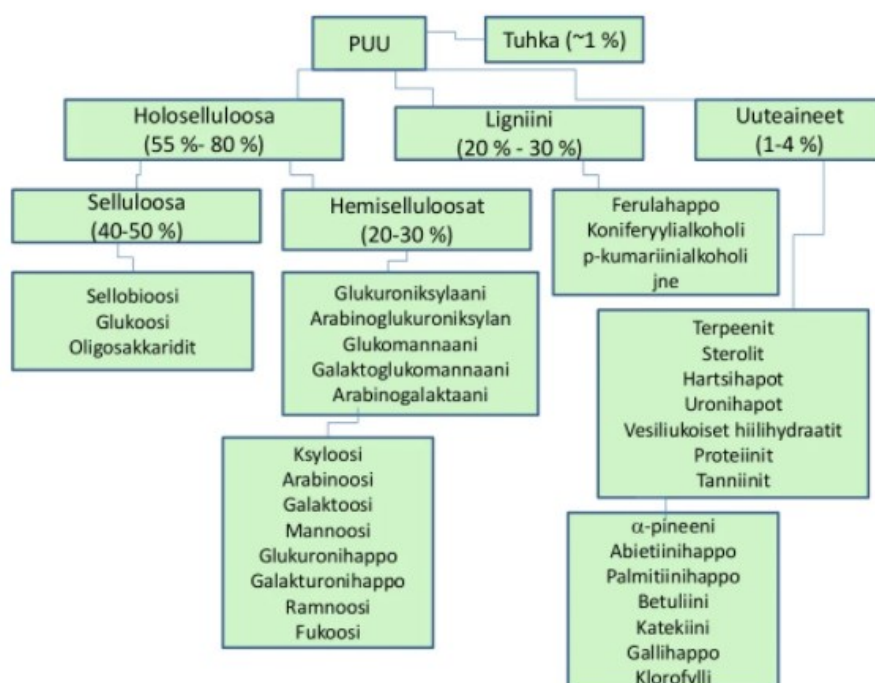


Kuva 2. Soluseinän rakenne (PuuProffa b)

3 Puun kemiallinen koostumus

3.1 Kemiallinen rakenne

Puu on orgaanista ainetta, joka elää jatkuvasti. Puun luonnehditaan koostuvan pääsääntöisesti selluloosasta, hemiselluloosista ja ligniinistä, jotka antavat puulle sen tunnetut ominaisuudet. Lisäksi puuaineksessa on merkittävä määrä uuteaineita, jotka käsittävät suuren joukon erilaisia kemiallisia yhdisteitä. Uuteaineiksi luetaan muun muassa seuraavat yhdisteet: pihka, rasva- ja hartsihapot, terpeenit, fenoliset yhdisteet sekä proteiinit. Kuviossa 1 on jaoteltu puun kemiallista rakennetta. (Haapala ym. 2018, 54.)



Kuvio 1. Puun kemiallinen rakenne (Sirén 2013)

3.2 Puun hiilihydraatit

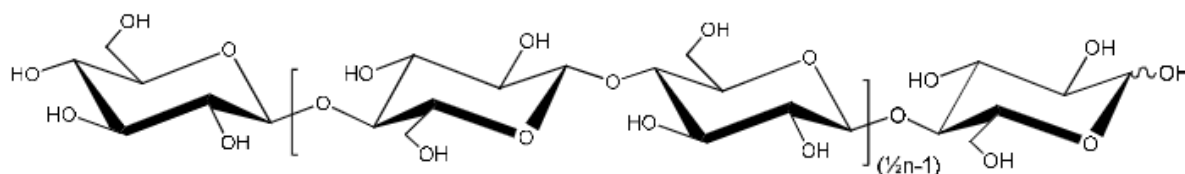
Hiilihydraatit ovat polyhydroksiyhdisteitä, joita esiintyy luonnossa ja niiden molekyylikoko vaihtelee pienestä makromolekyyliin. Hiilihydraatit syntyvät neulasten ja lehtien viherhiukkasissa fotosynteesin avulla ja näin muuttuvat orgaanisiksi yhdisteiksi. Ilman hiilidioksidia, puun maasta ottama vesi ja auringon energia yhdessä muodostaa glukoosia. Tämä kulkeutuu lehdistön nilatiehkeitä pitkin rungon ja oksien jälsi- eli kambiaalisolukkaan. Solessa glukoosi muuttuu biokemiallisten prosessien avulla selluloosaksi, hemiselluloosiksi tai

ligniiniiksi. Nämä osaltaan muuttuvat soluseinämien rakennusosiksi. (Isotalo 2004, 39.) Pie-nimolekyyliset hiilihydraatit eli sokerit toimivat energian lähteenä ja vastaavasti suurimole-kyyliset hiilihydraatit eli tärkkelys vararavintona tai muodostavat kasvien tukisolukkoa, kuten selluloosaa (Sjöström 1989, 30).

Hiilihydraatit voidaan jakaa kuuteen eri ryhmään: eli mono-, di-, tri-, oligo- ja polysakkaridit sekä polyuronidit. Monosakkaridit ovat yksinkertaisia sokereita, joista tavallisin on glukoosi. Disakkaridissa kaksi monosakkaridia on yhdistynyt toisiinsa glykosidisella sidoksella, kuten esimerkiksi maltoosi ja laktoosi. Trisakkaridissa on kolme monosakkaridiyksikköä, kun taas oligosakkaridissa näitä on 2–10 ja polysakkaridissa monosakkaridiyksiköiden määrä on jo yli 10. Polyuronidit ovat vastaavasti polysakkarideja, jotka sisältävät uronihappotähteitä. (Sjöström 1989, 30.)

3.3 Selluloosa

Puussa olevien hiilihydraattien pääaines on selluloosa, joka sijaitsee sekundaariseinän keskikerroksessa. Se on yleisin luonnon tuottama polymeeri ja luetellaan polysakkaridiksi. Selluloosa koostuu glukoosianhydrideistä $C_6H_{10}O_5$, jotka ovat liittyneet toisiinsa β -glykosidisilla 1→4-sidoksilla. (Isotalo 2004, 41.) Kuvion 2 avulla voidaan ymmärtää paremmin selluloosan rakennetta, mikä on lineaarinen. Selluloosalle on ominaista voimakas taipumus muodostaa vetysidoksia naapurimolekyylien kanssa. Tämä osaltaan mahdollistaa selluloosan kuitumaisen rakenteen, joka taas takaa puusolujen mekaanisen tuen. (Sjöström 1989, 56.) Kasvien lisäksi selluloosaa tuottavat eräät muutkin alkeelliset organismit, kuten esimerkiksi muutamat bakteerit, sienet ja levät. Kuusessa, männnyssä ja koivussa selluloosan pitoisuus on noin 40 % kuiva-aineesta. (Jääskeläinen & Sundqvist 2007, 65.)



Kuvio 2. Selluloosan rakennekaava (Ruuttunen 2014)

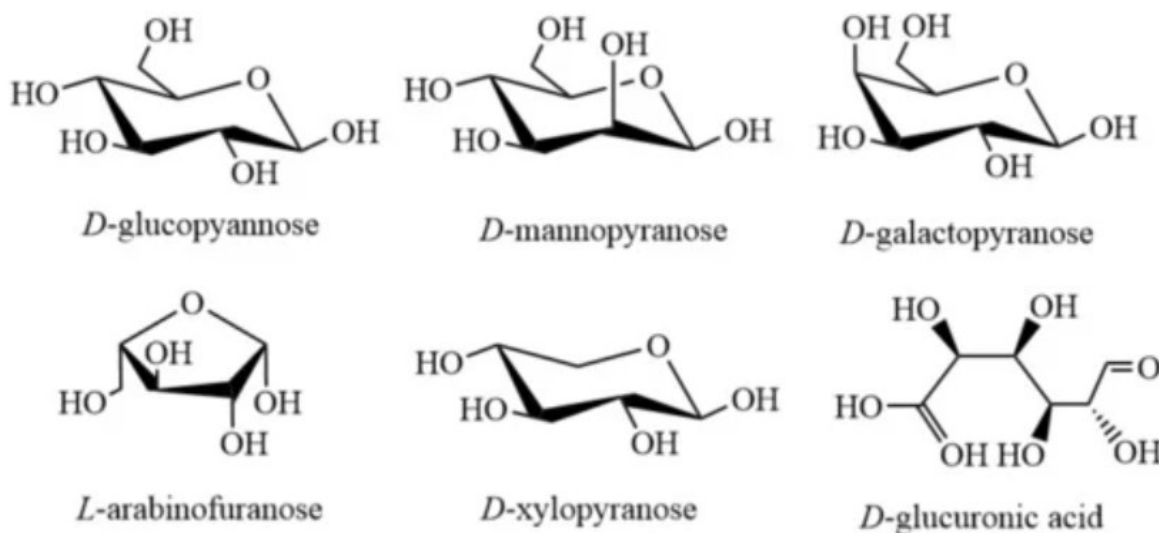
Selluloosalla on taipumus sitoa itseensä vettä. Vesimolekyylit sitoutuvat selluloosakuitujen järjestyttömien alueiden vapaisiin hydroksyyliiryhmiin vetysidosten avulla, jolloin selluloosakuidut turpoavat. Kun vesi vastaavasti poistuu, syntyy selluloosakuitujen väliin

voimakkaita vetysidoksia, jotka saavat aikaan kuivaan kuituverkkoon, esimerkiksi paperiin hyvän sidoslajuuden. (Isotalo 2004, 43.)

Vaikka selluloosan molekyyli rakenne on tarkasti selvillä, on tiedot fysikaalisesta olotilasta puutteelliset. Fysikaalisella olomuodolla tässä tapauksessa tarkoitetaan järjestäytyneiden selluloosamolekyylien kiteisyyttä ja selluloosaketjujen fibrillirakennetta. Tiedossa on myös selluloosan biosynteesi, mutta toisaalta tarkoin ei tunneta, missä solun osissa se tapahtuu, ja kuinka solun eri osat tähän osallistuvat. (Sjöström 1989, 66.)

3.4 Hemiselluloosat

Hemiselluloosat ovat yksi puun soluseinämän pääraaka-aineista. Aikaisemmin on luultu niiden syntyvän välituotteena selluloosan biosynteesissä, mutta hemiselluloosat muodostavat oman heterogeenisen ryhmän, johon kuuluu useita eri polysakkarideja. Nämä biosyntetisoituvat eri teitä kuin selluloosa. Hemiselluloosat sijoittuvat mikrofibrillien väliin ja näin osaltaan vahvistavat sen rakennetta. (Isotalo 2004, 46.) Selluloosa kuuluu homopolysakkaridien ryhmään, kun taas hemiselluloosat koostuvat heteropolysakkarideista. Puun polysakkaridit voivat toimia solujen rakenneaineena, kuten selluloosa ja hemiselluloosa, tai toimia vararavintona, kuten tärkkelys. Hemiselluloosien hydrolyysissa, joka voidaan toteuttaa esimerkiksi hapoilla, muodostuu monosakkarideja kuten D-glukoosi, D-mannoosi, D-galaktoosi tai D-ksyloosi. (Sjöström 1989, 61.) Kuviossa 3 on esitetty tavallisimmat hemiselluloosissa esiintyvät monomeerit.

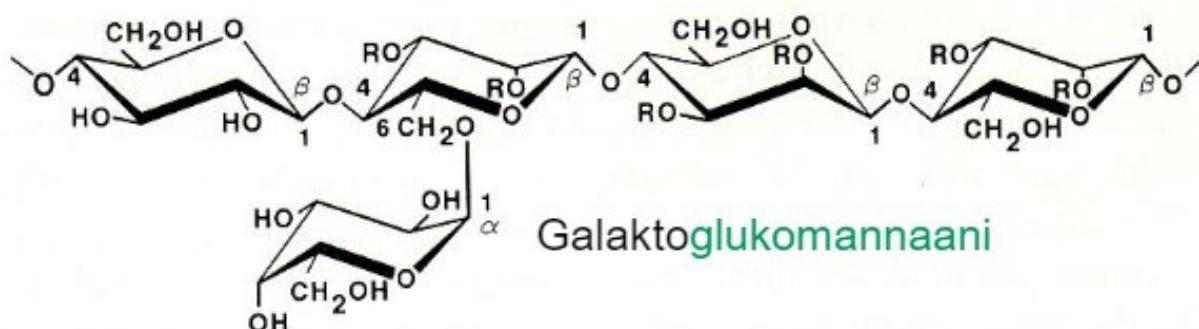


Kuvio 3. Yleisimmät hemiselluloosien monomeerit (Biao ym. 2020)

Puuaineksesta noin 20–30 % on hemiselluloosia. Havu- ja lehtipuiden hemiselluloosien koostumus ja rakenne eroavat merkittävästi toisistaan. Koostumuksen ja määrien eroja voidaan havaita myös siinä tapauksessa, mikäli kyseessä on jokin muu alue kuin puun runko, kuten esimerkiksi oksat, juuret tai puun kuori. (Sjöström 1989, 61–62.)

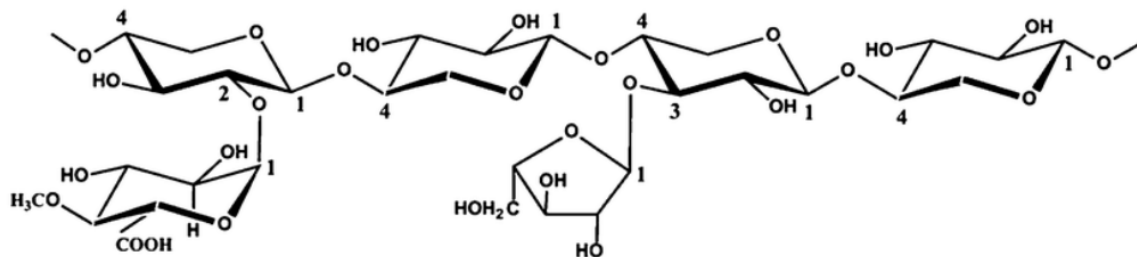
Havupuiden hemiselluloosat

Havupuissa voidaan havaita löytyvän tyypillisesti kolmea eri hemiselluloosaa: galaktoglukomannaani, arabinoglukuroniksyylaani sekä arabinogalaktaani. Kuitenkin havupuiden pääsääntöinen hemiselluloosa on galaktoglukomannaani, jossa glukomannaaniketju toimii runkona. Se koostuu glukoosi- ja mannoosiyksiköistä, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa 1→4-glykosidin sidoksin. Ketju voi olla myös haaroittunut, jolloin siihen on liittyneenä galaktoosi mannoosiyksiköiden C-6-asemiin kuten kuvassa 6. Galaktoglukomannaani pilkkoutuu helposti happojen vaikutuksesta ja erityisesti galaktoosisivuhaarat ovat hydrolyysille herkkiä. Mannoosiyksiköiden C-2- ja C-3-asetat ovat vain osittain korvautuneet asetyyliryhmillä ja ovat hydrolyysille herkkiä emäksisissä olosuhteissa. (Isotalo 2004, 47.)



Kuvio 4. Galaktoglukomannaanin rakennekaava (Ruuttunen 2014)

Arabinoglukuroniksyylaani muodostuu ksyloosiyksiköistä, jotka liittyvät toisiinsa 1→4-sidoksin. Kyseiseen pääketjuun yhdistyvät myös 1→2-glykosidisin sidoksin 4-O-metyyli-α-D-glukuronihapporyhmiä eli kaksi ryhmää kymmentä ksyloosiyksikköä kohden sekä arabinoosiryhmiä. Kuviossa 5 nähdään arabinoglukuroniksyylaanin rakennekaava kuvainnollisesti esitettynä. Arabinoosisivuryhmät hydrolysoituvat erittäin helposti happojen avulla. (Isotalo 2004, 47.)



Kuvio 5. Arabinoglukuroniksylaanin rakennekaava (Sjöström 1993)

Arabinogalaktania ilmenee lähinnä lehtikuusen hemiselluloosissa ja se liukenee helposti veteen haaroittuneisuutensa vuoksi. Galaktoglukomannaanin ja arabinoglukuroniksylaanin ohella havupuut sisältävät erinäisen määrän myös muita polysakkarideja, joiden ominaisuudet ovat joiltain osin samantapaisia kuin lehtipuiden hiilihydraateissa, joissa voidaan havaita rakenneosina muun muassa arabinoosi, galaktoosi, glukuroni- ja galakturonihappo. (Sjöström 1989, 64.)

Lehtipuiden hemiselluloosat

Lehtipuiden hemiselluloosat muodostuvat pääasiassa O-asetyyli-4-O-metyyloglukuroniksylaanista, jota voidaan nimittää glukuroniksylaaniksi eli yksinkertaisemmin ilmaistuna ksylaaniksi. Hemiselluloosien rakenteiden samankaltaisuudesta huolimatta voidaan havaita laadullisuudessa ja määrällisyydessä suuriakin eroja. (Isotalo 2004, 48.)

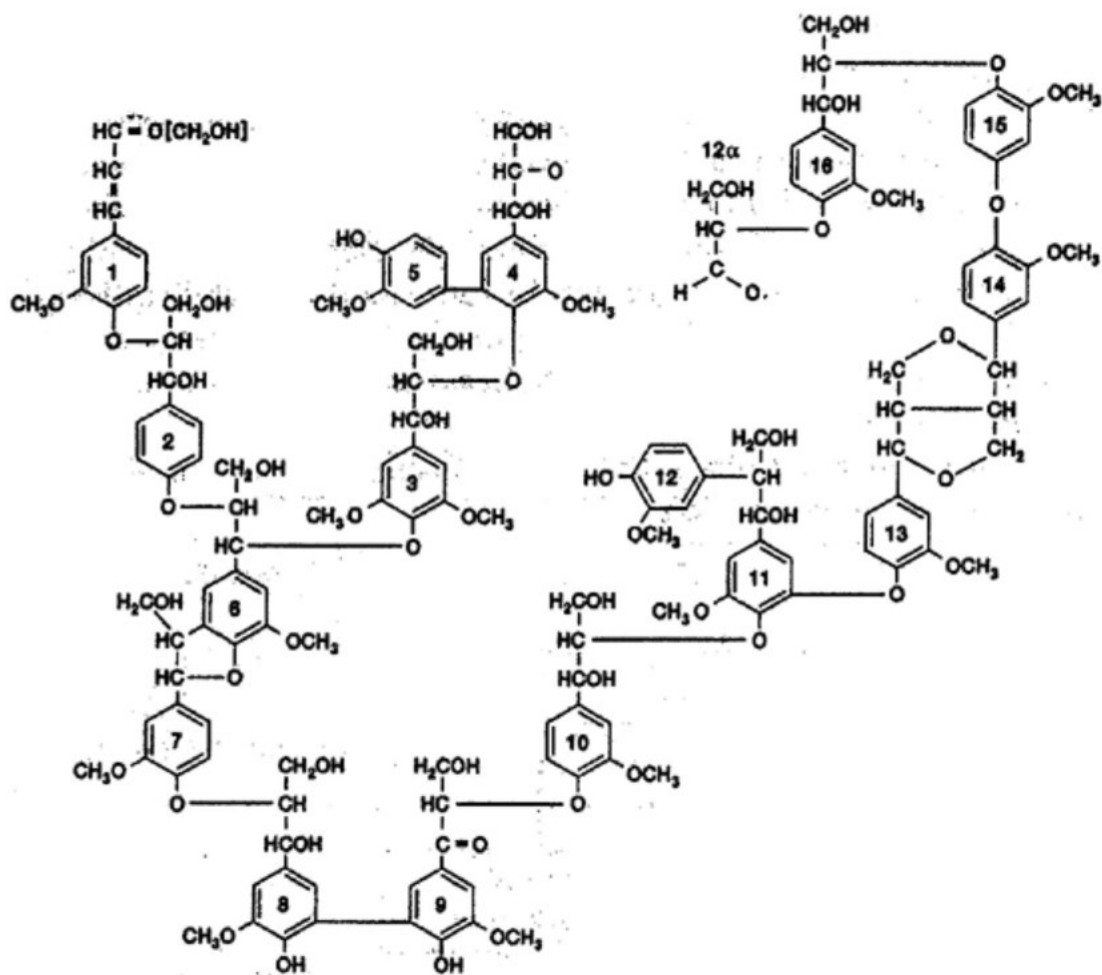
Lehtipuissa ksylaanin määrä voi vaihdella 15–30 % puun kuivapainosta riippuen lajista. Sen pääketju muodostuu β-D-ksylopyranoosiyksiköistä, jotka ovat liittyneet 1→4 glykosidisten sidosten välityksellä. Toisaalta osa pääketjun hydroksyyliyhdistelmästä on korvautunut asetyyli CH₃CO -ryhmillä. Lisäksi ksyloosiyksiköihin on yhdistynyt 4-O-metyyli-α-D-glukuronihapporyhmiä. Ksyloosiyksiköiden väliin muodostuneet sidokset hydrolysoituvat hapolla herkästi. (Isotalo 2004, 48)

Edellä mainitun lisäksi lehtipuissa esiintyy mainittava määrä glukomannaania, jota on puun kuivapainosta noin 2–5 %. Glukomannaani koostuu β-D-glukopyranoosi- β-D-mannopyranoosiyksiköistä, joita glykosidiset sidokset sitovat toisiinsa. Glukomannaani pilkkoutuu helposti hapettomissa olosuhteissa. (Isotalo 2004, 48.)

3.5 Ligniini

Kolmas tärkeä puun rakenneaine on ligniini, jota voidaan havaita puun välilamelleissa ja solun sekundaariseinämässä. Soluseinämässä se on liittynyt hemiselluloosiin kovalenttisin sidoksin. Sen tehtävä on lisätä puun lujuutta ja toisaalta estää veden pääsy soluseinämien lävitse. Voidaan luonnehtia, että puun kuivapainosta noin 20–30 % on ligniiniä. (Jääskeläinen & Sundqvist 2007, 85–84, 93.)

Toisaalta Isotalo (2004, 50) kirjoittaa teoksessaan, että ligniinin rakennetta ei ole pystytty täysin selvittämään, mutta sen arvioidaan sisältävän monimutkaisia polymeerejä, jotka taas ovat koostuneet fenyylipropaaniyksiköistä. Kuvio 6 havainnollistaa ligniinin rakennetta niiltä osin, mitä siitä on pystytty selvittämään.



Kuvio 6. Ligniinin rakenne (Opetushallitus b)

4 Biokaasu

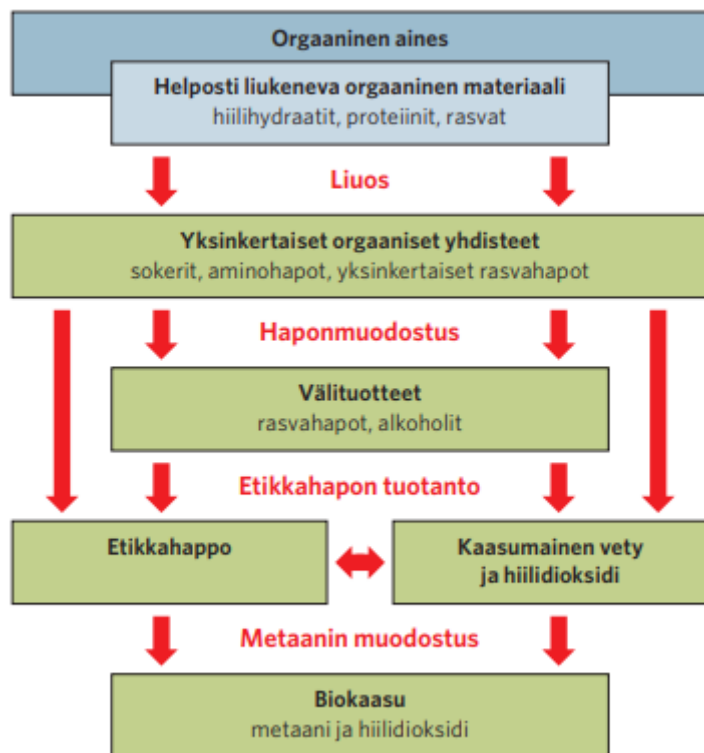
4.1 Biokaasun taustaa

Biokaasu on kaasuseos, johon on sekoittunut erityyppisiä kaasuja. Suuremmalti osin metaania sisältävää biokaasua syntyy silloin, kun orgaaninen aines saa mädäntyä anaerobisissa olosuhteissa. Karkeasti voidaan luonnehtia, että biokaasusta 40–70 % on metaania ja 30–60 % hiilidioksidia. Lisäksi biokaasussa on pieninä, mutta tarkemmin määrittelemättöminä pitoisuuksina muita ainesosia, kuten esimerkiksi rikkiyhdisteitä. Biokaasua voidaan hyödyntää lämmön- ja sähköntuotannossa, mutta myös jalostaminen ajoneuvojen polttoaineksi on mahdollista. (Gasum Oy 2022.)

4.2 Biokaasun muodostuminen

Biokaasun muodostuminen voidaan ajatella tapahtuvan neljässä eri vaiheessa, jossa kussakin on omat pieneliöryhmät, jotka vastaavat prosessin etenemisestä. Muodostuminen on jaettu seuraavasti: liukoistuminen eli hydrolyysi, happokäyminen eli asidogeneesi, etikkahappokäyminen eli asetogeneesi sekä metaanikäyminen eli metanogeneesi (Kuvio 7). Huomattavaa on, että vaiheet eivät ole erillisiä tapahtumaketjuja, vaan tapahtuvat samanaikaisina. (Motiva Oy 2013, 4.)

Ensimmäisessä vaiheessa eli liukoistumisessa on tarkoituksena saada liukenemaan veteen mädätettävän aineen kiinteät hiilihydraatit, valkuaisaineet ja rasvat, jotka ovat ensin pilkkoutuneet yksinkertaisemmiksi yhdisteiksi, kuten esimerkiksi sokereiksi, rasvahapoiksi ja aminohapoiksi. Pilkkoutumisesta huolehtivat pieneliöiden erittämä solun ulkoinen entsyymi. Toisessa vaiheessa eli happokäymisessä ensimmäisen vaiheen liuenneista aineista muodostuu yksinkertaisia rasvahappoja. Nämä osaltaan hajoavat edelleen etikkahapoksi ja hiilidioksidiksi. Reaktioiden välituotteina syntyvät etikkahappo, hiilidioksidi ja vety muodostavat yhdessä metaania. Rasvahapot ja vety, jotka syntyvät käymisvaiheessa, ovat suurina pitoisuuksina vahingollisia pieneliöille. Siksi on huolehdittava siitä, että edellä mainitut ainesosat poistuvat metaanituotannossa samassa suhteessa kuin niitä syntyy. (Motiva Oy 2013, 4.)



Kuvio 7. Biokaasun muodostumisen vaiheet (Motiva Oy 2013, 4)

Lämpötilan vaikutus biokaasun muodostumisessa

Jotta biokaasua syntyisi ja edellä mainittu hajoamisprosessi saataisiin käynnistymään, on olosuhteiden oltava suotuisat. Suotuisia piirteitä ovat esimerkiksi hapettomat olosuhteet, sopiva lämpötila ja pH. Metaanin tuotannon aikana on tärkeää, että lämpötila prosessin aikana on vakaa, eikä suuria lämpötilaeroja pääse syntymään. Muuten vaarana on, että kaasun muodostuminen häiriintyy. Biokaasua tuottavat bakteerit kestävät paremmin hitaita kuin nopeita lämpötilaeroja, koska silloin eliöt pystyvät paremmin sopeutumaan muuttuneisiin olosuhteisiin. (Motiva Oy 2013, 6.)

Lämpötilan suhteen prosessit ovat joko psykro-, meso- tai termofiilisiä. Psykrofiilisessa prosessissa metaanin tuotanto tapahtuu alle 25 °C lämpötilassa. Tällöin metaanin tuotto on hidasta sekä toisaalta kaasun muodostuminen on vähäistä. Psykrofiilisissa olosuhteissa tapahtuvia prosesseja voidaan havaita lähinnä luonnossa. (Motiva Oy 2013, 6.)

Mesofiilissä olosuhteissa tapahtuvat prosessit tapahtuvat lämpötilavälillä 32–42 °C. Yleisimmässä biokaasulaitoksissa kaasun muodostus toteutetaan kyseisessä lämpötilassa. Mesofiilissä olosuhteissa syntyvän biokaasun muodostus on hyvä ja prosessi on helppo pitää vakaana. (Motiva Oy 2013, 6.)

Hajoaminen, mikä tapahtuu lämpötilavälillä 50–60 °C, on termofiilistä mädäntymistä. Karkeasti voidaan todeta, että termofiilisissa olosuhteissa tapahtuva hajoaminen on puolet nopeampaa kuin mesofiilisissa olosuhteissa. Toisaalta termofiiliset prosessit häiriintyvät herkemmin kuin mesofiiliset sekä energiaa kuluu prosessin ylläpitämiseen enemmän. Näin siksi, että korkeammasta lämpötilasta vapautuu enemmän lämpöä ympäristöön, jolloin mädätettävän aineksen lämmittäminen vaatii enemmän energiaa. (Motiva Oy 2013, 6.)

pH-arvon merkitys biokaasun muodostumisessa

Kuten on aiemmin todettu, myös pH-arvo vaikuttaa eliöiden aktiivisuuteen. Hydrolysoivien ja happoa muodostavien mikrobien optimi pH vaihtelee välillä 4,5–6,5. Edellä mainitut mikrobit voivat selviytyä myös neutraaleissa olosuhteissa, mutta silloin niiden aktiivisuus laskee hieman. Metanogeenit vaativat vastaavasti pH:n väliltä 6,7–8,5. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 65.)

Biokaasureaktorissa pH on usein 7–8 eli lähellä neutraalia. Kuitenkin syötteen laatu vaikuttaa siihen, mihin reaktorin pH lopulta asettuu. Hiilihydraattipitoiset syötteet laskevat pH-arvoa, sillä niiden hajoamisessa syntyy happoja. Toisaalta proteiinipitoiset syötteet nostavat pH-arvoa, koska ne hajotessaan tuottavat ammoniakkaa. Hyvässä metaanin tuotannossa pH-arvon pitäisi pysyä vakiona, muutoin prosessi häiriintyy. Vakauten vaikuttaa reaktorin kyky neutraloida muodostuvia happoja. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 65.)

4.3 Biokaasuksi hyödynnettävät syötteet

Biokaasun valmistuksessa voidaan periaatteessa mädättää kaikki orgaaninen aines (hiilihydraatit, proteiinit ja rasvat), mutta tekniikka sopii parhaiten materiaaleille, joilla on luonnostaan taipumus hajota. Tällaisiksi voidaan luetella lanta ja rehu, mutta myös biojäte ja elintarviketeollisuudessa syntyvä jäte. (Motiva Oy 2013, 7–8.) Osaltaan paljon helposti hajoavaa hiilihydraattia sisältävä aines tuottaa nopeasti paljon metaania biokaasutuksessa (Havukainen 2019). Kuitenkin reilusti ligniiniä ja kuitua sisältävä aines, kuten puu tai olki, sopii huonosti mädätykseen. Syötemateriaaleissa ei tulisi myöskään olla selvästi suurina pitoisuuksina haitallisia aineita, jotka voivat vaikuttaa negatiivisesti biokaasun syntyyn. Näitä ovat muun muassa antibiootit, desinfiointiaineet, kasvimyrkyt, suolat ja raskasmetallit. (Motiva Oy 2013, 7–8.)

Biokaasun syntyyn mikro-organismit tarvitsevat energianlähteenä ja solukasvun rakennusaineena erilaisia ravinteita. Pääravinteisiin voidaan luetella kuuluvaksi hiili, typpi, fosfori ja rikki. Lisäksi entsyymitoiminta tarvitsee onnistuakseen hivenaineita ja vitamiineja. Nämä olisi hyvä tulla syötteestä itsestään, jotta ylimääräisten lisäravinteiden käytöltä vältyttäisiin. (Kymäläinen & Pakarinen 2015, 27.)

Motiva Oy:n (2013, 7) mukaan sopivassa syötemateriaalissa hiilen ja typen suhde on oltava sopiva. Jos materiaali sisältää liikaa hiiltä, kuten esimerkiksi polttaessa vain kasvituotteita, voi osa materiaalin tuotantopotentialista jäädä hyödyntämättä. Toisaalta, jos syöte sisältää liikaa typpeä suhteessa hiileen, syntyy liikaa ammoniakkia, mikä osaltaan estää biokaasun tuotantoketjun syntymisen. Näin voi käydä esimerkiksi, jos mädätettävä aines on vain kanan- tai sianlantaa. Motiva Oy:n (2013, 7) raportissa todetaan, että syötettävässä materiaalissa tulisi olla hiilen ja typen suhde noin 20:1. Syötteistä voidaan tehdä myös syöteseoksia.

5 Hydrolyysi

Hydrolyysillä tarkoitetaan näytteen sisältämien yhdisteiden vapauttamista takaisin lähtöaineikseen. Esimerkiksi hiilihyaattien kohdalla hydrolyysillä halutaan hajottaa di- tai polysakkaridit jälleen monosakkarideiksi. (Kanerva ym. 1995, 102.) Hydrolyysiä voidaan käyttää hyväksi näytteiden esikäsittelyssä, kun kompleksoituneille muodoille ei ole olemassa malliaineita, joiden avulla voitaisiin suorittaa identifiointi tai kvantitointi. (Laiho ym. 2009, 245.)

Erilaisia hydrolyysitapoja voidaan tunnistaa useita, joista yleisimmät ovat happo- ja emäshydrolyysi sekä entsyymattinen hydrolyysi. Happohydrolyysissä hajoaminen saadaan aikaiseksi HCl- tai H₂SO₄-liuoksella, jonka pH-arvo on hyvin alhainen. Emäshydrolyysissä vastaavasti käytetään NaOH-liuosta, missä pH-arvo on saatu todella korkeaksi. Entsyymattisessa hydrolyysissä yhdisteiden palautuminen lähtöaineikseen tehdään nimensä mukaisesti entsyymeillä, esimerkiksi hiivasieni. Hydrolyysi voidaan suorittaa myös käyttämällä metanolia, jolloin kyseessä on metanolyysi. Emäs- ja happohydrolyysit suoritetaan 100 °C:en lämpötiloissa, jossa reaktioaika on 1–2 tuntia. Entsyymihydrolyysi toteutetaan 25–65 °C:en lämpötilassa, tällöin reaktioaika on tunnista useaan tuntiin, riippuen lämpötilasta. (Laiho ym. 2009, 245.)

6 GC/MS-menetelmä

6.1 Kromatografian periaate

Kromatografialla tarkoitetaan fysikaalista erotusmenetelmää, jonka tarkoituksena on erottaa yhdisteet toisistaan. Erkaantuminen tapahtuu kolonnissa, jossa toisiinsa liukenemattomat stationaarifaasi ja liikkuva faasi toimivat vuorovaikutuksessa keskenään. Näytemolekyylit liikkuvat tarttuen ensin stationaarifaasiin ja sen jälkeen liikkuvaan faasiin, jonka jälkeen prosessi alkaa alusta. Erottuminen perustuu siihen, kuinka herkästi tutkittavat yhdisteet sitoutuvat faaseihin. (Halonen & Penttilä 2004, 100.) Stationaarifaasiin voimakkaasti sitoutuvat yhdisteet kulkeutuvat liikkuvassa faasissa hitaasti ja vastaavasti stationaarifaasiin heikosti sitoutuvat yhdisteet liikkuvat nopeammin, jonka johdosta yhdisteet erottuvat. Liikkuva faasi on joko nestemäinen tai kaasumainen. Stationaarifaasi voi olla liikkuvan faasin tavoin nestemäinen tai vaihtoehtoisesti kiinteää ainetta. Kromatografia jaetaan pääsääntöisesti kaasu- tai nestekromatografiaan. (Jaarinen & Niiranen 2005, 141.)

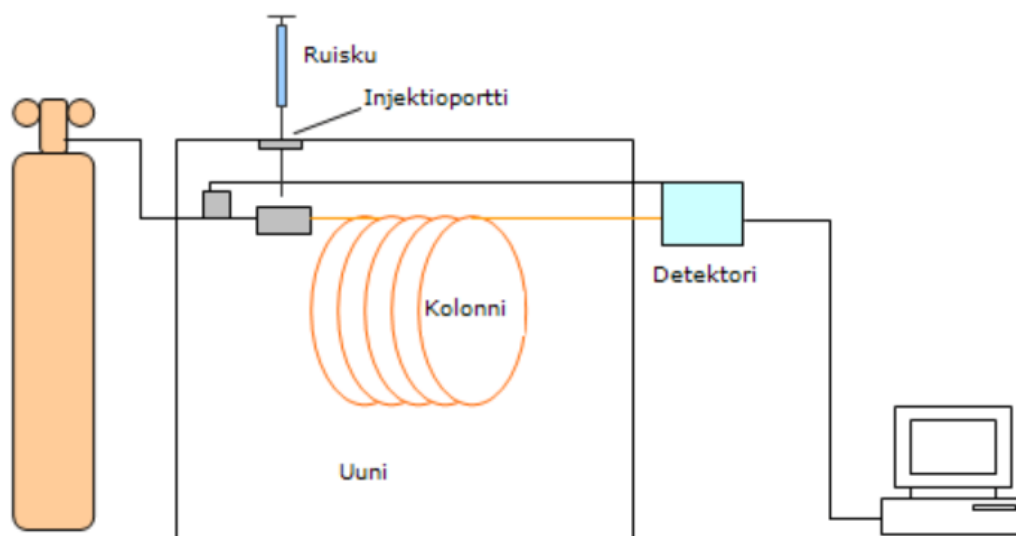
Kromatografiassa retentioajalla (t_r) tarkoitetaan aikaa, joka kuluu näytteen syöttöhetkestä siihen, kun mitattavan yhdisteen huippupitoisuus havaitaan detektorilla. Erotuskyvyllä eli resoluutiolla (R) ilmaistaan sitä, kuinka hyvin yhdisteet eroavat toisistaan kromatografia-ajon aikana. Erotuskyky lasketaan kromatografian tuottamien piikkien huippujen välisen etäisyyden ja piikkien leveyksien keskiarvon suhteesta. (Halonen & Penttilä 2004, 100.) Erotuskyvyn määrään vaikuttaa tehokkuus, selektiivisyys ja kapasiteetti. Kolonnin tehokkuudesta kertoo pohjaluku (N), joka osoittaa, kuinka monta kertaa molekyyli kiinnittyy stationaarifaasiin ja irtoaa siitä erotuksen aikana. Mitä suurempi pohjaluku on sitä kapeammat piikit ovat, minkä vuoksi yhdisteet voidaan erottaa paremmin toisistaan. Pohjaluku on suoraan verrannollinen kolonnin pituuteen. Erotustekijä (α) on kahden yhdisteen todellisten retentioaikojen suhde, joka kuvaa yhdisteiden erottumista toisistaan. Retentiotekijä (k) saadaan laskettua, kun yhdisteen määrä tai aika stationaarifaasissa jaetaan yhdisteen määrällä tai ajalla liikkuvassa faasissa. Retentiotekijän suuruus kuvastaa sitä, miten kauan molekyyli viipyy kolonnissa. Toisin sanoen mitä suurempi retentiotekijä, sitä kauemmin molekyyli viipyy kolonnissa ja sitä pidempi on analyysi-aika. Vastaavasti retentiotekijän ollessa pieni, tulee yhdiste liian nopeasti ulos kolonnista ja näin ollen toivottua erottumista ei tapahdu. (Jaarinen & Niiranen 2005, 144–148.)

Kaasu- ja nestekromatografi tuottaa tuloksena kromatogrammeja, joissa piikkien tulisi olla gaussimaisia. Piikeissä voi esiintyä epäsymmetrisyyttä eli niin sanottua häntimistä (Jernberg 2022). Tämä saattaa johtua esimerkiksi liian väkevästä näyteliuoksesta, näytteelle

sopimattomasta stationaarifaasista tai epähomogeenisesta faasista. (Jaarinen & Niiranen 2005, 144.)

6.2 Kaasukromatografia

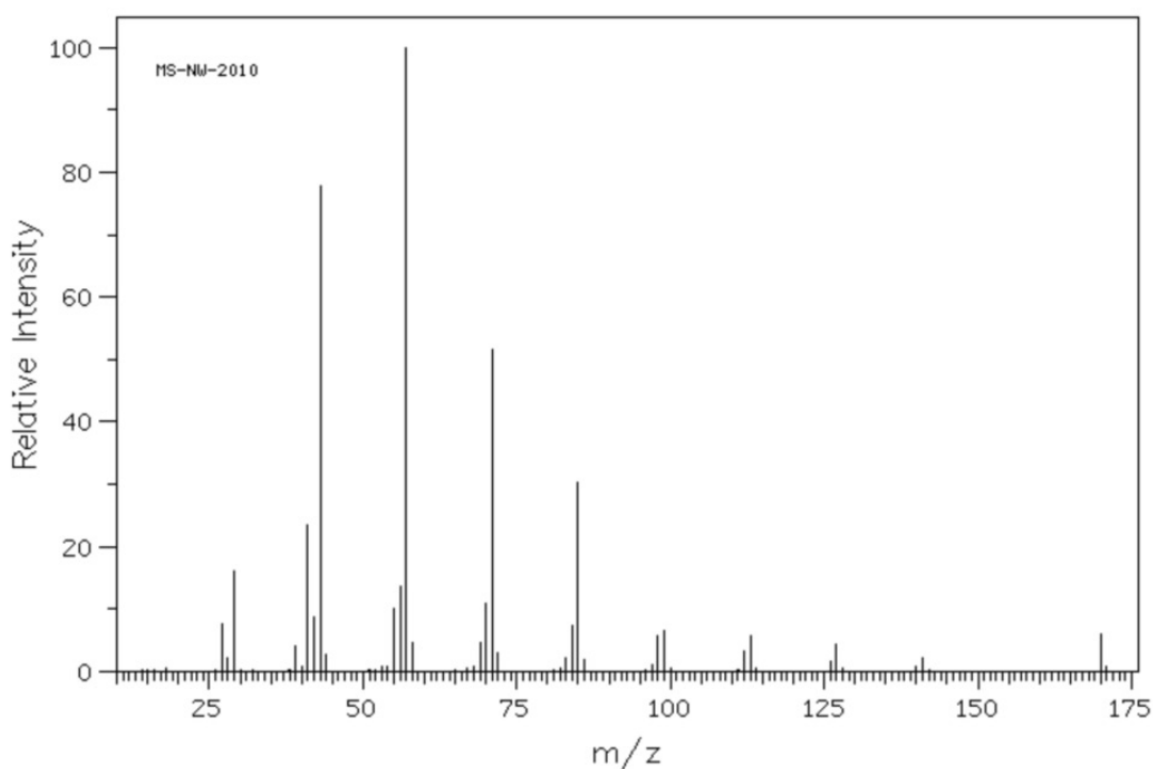
Kaasukromatografia on analyysimenetelmä, jota käytetään haihtuvien yhdisteiden tunnistamiseen kvalitatiivisesti sekä kvantitatiivisesti. Kaasukromatografian periaate on kuvattuna kuviossa 8. Liikkuvana faasina toimii kaasu, joka kuljettaa näytteessä olevat höyrystyvät yhdisteet kolonnissa kiinteän faasin läpi aina detektorille asti. Kaasukromatografiassa stationaarifaasi on yleensä neste ja kantokaasuna käytetään yleisimmin heliumia. Näyte syötetty injektorin avulla laitteiston injektiokammioon ja höyrystyy 200–300 °C:ssa. Höyrystyneet yhdisteet päätyvät kantokaasun kuljettamana kolonniin. Siellä yhdisteet liikkuvat jokainen omalla nopeudellaan stationaarifaasissa ja liikkuvassa faasissa. Yhdisteiden kuljettua kolonnin läpi tavoittavat ne vuorollaan detektorin, joka tuottaa jokaisesta havaitsemastaan yhdisteestä signaalin. Nämä näkyvät piikkeinä kromatogrammissa. Piikkien tunnistaminen perustuu retentioaikaan, mikä on kullakin yhdisteellä ominainen. (Opetushallitus a.)



Kuvio 8. Kaasukromatografian periaate (Opetushallitus a)

6.3 Massaspektrometria

Massaspektrometria on analysointimenetelmä, missä tarkoituksena on määrittää yhdisteen molekyylipaino. Massaspektrometriassa tutkittava yhdiste ionisoidaan positiiviseksi molekyyliioniksi, joka sisältää ylimääräistä energiaa, sillä massaspektrometri ei tunnista neutraaleja molekyyliä. Ionisoituneen molekyylin sidokset katkeavat energian vaikutuksesta eli molekyyli-ioni pilkkoutuu pienemmiksi kappaleiksi, niin sanotusti massafragmenteiksi. Massaspektrometri erottelee massafragmentit toisistaan hyödyntämällä massa-varaussuhdetta (m/z). Massaspektri (Kuvio 9) havainnollistaa molekyylin rakenteen ja tämän perusteella yhdiste tunnistetaan. Toisin sanoen tunnistuksen tekemiseksi vertaillaan mitattua spektriä tietokoneohjelmiston sisältämään kirjastospektriin, jolloin tunnistus tapahtuu automaattisesti. (Jaarinen & Niiranen 2005, 122–126.)



Kuvio 9. Esimerkkikuva dodekaanin massaspektristä (Myllyviita 2019)

6.4 Yhdistelmätekniikka

GC/MS-menetelmässä on yhdistetty kaasukromatografi sekä massaspektrometri, jolloin ne tukevat toisiaan. Yhdistelmätekniikalla voidaan analysoida yhdisteitä, jotka höyrystyvät tarpeeksi sekä kestävät hajoamatta kaasukromatografian korkeat lämpötilat. Yhdistelmäanalyysissä kaasukromatografi yhdistetään massaspektrometriin, jolloin kaasukromatografian erottelamat yhdisteet kulkevat retentioaikansa mukaisesti kapillaarikolonnista massaspektrometrin ionisaattoriin. Kolonnista saapuvaa kaasua ionisoidaan jatkuvasti ja samalla mitataan massaspektrejä. (Jaarinen & Niiranen 2005, 207.)

Kromatogrammien mittauksessa voidaan käyttää niin sanottua TIC-menetelmää (Total Ion Chromatogram), jossa mitataan kaikkien massaspektrometrin ionisaattorissa syntyneiden ionien kokonaismäärä. Massasignaali saadaan kaikista havaituista yhdisteistä. Analysoitavan näytteen sisältämät yhdisteet tunnistetaan niiden retentioajalle tallentuneen massaspekttrin perusteella. (Jaarinen & Niiranen 2005, 207–208.)

7 Hiilihydraattien analysointi GC/MS-menetelmällä

7.1 Liuoksien valmistus

Työssä käytettiin hyväksi seuraavia liuottimia ja reagensseja:

- Asetyylikloridi, 99+ %, Acros Organics
- BSTFA-TMCS (99:1) [Derivatizing Reagent for GC], TCI Europe N.V.
- Glukoosi, $C_6H_{12}O_6$, 99,8%, Supelco
- D-Galaktoosi, $C_6H_{12}O_6$, 97 %, Merck
- D-Glukuronihappo, $C_6H_{10}O_7$, 98 %, Thermo Scientific
- D(+)-Mannoosi, $C_6H_{12}O_6$, 99+ %, Thermo Scientific
- D-(+)-Mannoosi, $C_6H_{12}O_6$, 98 %, TCI Europe N.V.
- D-Sorbitoli, $C_6H_{14}O_6$, 98 %, Thermo Scientific
- D(+)-Ksyloosi, $C_5H_{10}O_5$, 99+ %, Thermo Scientific
- DL-Arabiinoosi, $C_5H_{10}O_5$, 98+ %, Thermo Scientific
- Kaliumhydroksidi, 85%, J.T. Baker
- Pyridiini, 99,5 %, VWR Chemicals
- Asetoni, SupraSolv, Supelco
- Metanoli, SupraSolv, Supelco

Standardinäytteet

Työssä tutkittaviksi hiilihydraateiksi valikoituivat arabiinoosi, galaktoosi, glukoosi, glukuronihappo, ksyloosi ja mannoosi. Standardien valmistuksessa käytettiin analyyttejä, jotka olivat kiinteässä muodossa ja näin ollen tuli liuottaa ultrapuhtaaseen veteen. Perusliuoksien pitoisuudet olivat 1000 mg/l. Piikkien tunnistamista varten valmistettiin kustakin tutkittavasta hiilihydraattien oma näytteensä sekä standardiseos, joka sisälsi kaikkia tutkittavia hiilihydraatteja.

Lisäksi menetelmän kalibrointia varten standardiseoksesta tehtiin viisi pitoisuudeltaan poikkeavaa kalibrointiliuosta. Näin saatiin selville signaalien tasot jokaiselle eri pitoisuudelle. Mittauspisteiden kautta piirrettiin kalibrointisuora. Tätä kutsutaan ulkoisen standardin menetelmäksi. Kalibrointisarjaa ei tarvitse mitata jokaisen mittaussarjan yhteydessä, vaan jatkossa kalibroinnin pysyvyyttä seurataan laadunvalvontanäytteen avulla. (Lehtonen & Sihvonon 2004, 85.) Jos laadunvalvontanäytteen pitoisuus ei menisi sallitun vaihteluvälin rajoihin, tehdään kalibrointi uudestaan, mikäli kyseessä ei ole satunnainen virhe (Jaarinen & Niiranen 2005, 25). Työssä laadunvalvonta näytteenä toimii mannoosi, joka valittiin eri valmistajalta kuin mitä käytettiin standardinäytteissä.

Piikkien tunnistamisessa käytettyjen standardinäytteiden pitoisuudet olivat liian suuret, jonka johdosta GC/MS laitteella tunnistettavat yhdisteet saturoituivat. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että kolonnin sisäpinnalla oleva stationaarifaasi on kyllästynyt tutkittavalla analyytillä niin, ettei se pysty enää tunnistamaan pitoisuuden paljoutta. Saturoituminen vältettiin nostamalla niin sanottua split-suhdetta ja pienentämällä injektiomäärää. (Jernberg 2022.) Kalibrointia varten liuosten pitoisuudet kuitenkin laimennettiin, jotta menetelmän ajo-parametrit saatiin ihanteellisiksi. Laimennokset pyrittiin laimentamaan välttämättä ylimääräisiä välilaimennoksia, sillä tämä voi vaikuttaa virheellisesti mittaustuloksiin.

Sisäinen standardi

Näytteiden analysoinnissa käytettiin sisäisen standardin menetelmää, jossa näytteisiin lisätään analyytin kaltaista yhdistettä, joka kuitenkin selkeästi erottuu kromatogrammissa. Sisäisellä standardilla pyritään korjaamaan vääristymät, jotka johtuvat esimerkiksi esikäsitte-lystä, derivatisoinnista, näytematriisista tai käytetystä analyysimenetelmästä. Näin siksi, että virheen oletetaan vaikuttavan samoin sisäiseen standardiin sekä tutkittavaan analyyt-tiin. (Lehtonen & Sihvonen 2004, 85–87.) Sisäisenä standardina käytettiin kiinteää sorbitolia liuotettuna metanoliin.

Metanolyysireagenssi

Esikäsitteilyä varten valmistettiin metanolyysireagenssi, jossa asetyylikloridia tiputellaan hil-jakseen metanoliin. Koska reaktio on voimakkaasti eksoterminen, tuli käytettävän metanolin olla kylmää ja pidettävä jäähauteessa asetyylikloridin lisäyksen ajan ja toisaalta kosteuden pääsyä metanoliin oli varottava. Hapon ja metanolin avulla katkotaan hiilihidraattiketjun gly-kosidisiä sidoksia.

7.2 Standardinäytteiden esikäsitteily

Standardinäytteitä mitattiin näytepulloon automaattipipetin avulla. Lisäksi jokaisen näyte-sarjan yhteydessä valmistettiin niin sanottu nollanäyte, jolla todennetaan käytettyjen liuotti-mien ja välineiden puhtaus. Näytteet haihdutettiin kuiviksi ensin hyödyntämällä pyöröhaih-dutinta, mutta päätymällä kuitenkin käyttämään typpikaasun (N_2) avulla tehtävää haihdu-tusta ja lämmintä vesihaudetta, jotta haihdutusprosessia saatiin tehostettua (Kuva 3).



Kuva 3. Typpikaasuhaihdutus vesihauteen avulla.

Kuivattuun näytteeseen lisättiin huoneenlämpöistä metanolysireagenssia, joka lämpökaappin lämmön kanssa sai aikaan sokerien pilkkoutumisen monosakkarideiksi. Ennen lämpökaappikäsittelyä näytteitä käytettiin ultraäänihauteessa (Kuva 4), tällä varmistettiin kuivatun näytteen liukeneminen reagenssiin. Näytteille oli määritelty oma aikansa, minkä ne olivat lämpökaapissa (Kuva 5). Näin saatiin varmistettua kaasukromatografilla, mikä on lyhin mahdollinen aika, minkä jälkeen sokerien pilkkoutumista ei enää tapahdu. Lämpökaappikäsittelyn jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi, jotta näytepullojen sisälle syntynyt paine saatiin tasaantumaan. Paine syntyy siitä, että käytetyn reagenssin sisältämän metanolin kiehumispiste on $64,7\text{ }^{\circ}\text{C}$, joten liuotin kaasuuntuu voimakkaasti lämpökaappin ollessa lämpötilaltaan huomattavasti kiehumispistettä korkeampi.



Kuva 4. Näytteiden ultraäänihaudekäsittely



Kuva 5. Näytteiden lämpökaappikäsittely

Paineen tasaantumisen jälkeen lisättiin näytteisiin automaattipipetillä KOH-rakeilla kuivattua pyridiiniä ylimääräisen vetykloridihapon neutraloimiseksi sekä sisäinen standardi. Näytteet haihdutettiin typpi avulla uudestaan kuiviksi. Kuivattuihin näytteisiin lisättiin jälleen kuivattua pyridiiniä sekä BSTFA:ta silylointia varten. Silylointi on yksi derivatisoinnin muoto, jota käytetään silloin, kun halutaan heikosti haihtuvat yhdisteet tehdä helpommin haihtuviksi. Tämä voidaan toteuttaa esimerkiksi lisäämällä jokin yhdiste, kuten metyyli tai silyyli, joka alentaa tutkittavan yhdisteen kiehumispistettä. (Measur Oy 2022.) Liukenemisen tehostamiseksi näytteet käytettiin ultraäänihauteessa sekä pidettiin hetki tasoravistelijassa. Lopuksi näyte siirrettiin kaasukromatografian näytepulloon kertakäyttöisen lasipipetin avulla, johon oli asetettu pieni asetonilla pesty lasivillatuppo mahdollisen sakan suodattamista varten. Nolla- ja laadunvarmistusnäytteet käsiteltiin samoin kuin standardinäytteet.

Biokaasutuotannon syötenäytteiden esikäsittely

Kehitetyn menetelmän sovellettavuuden kokeilemiseksi saatiin testattavaksi biokaasutuotantoon tarkoitettuja syötteitä, joille oli tehty entsyymaattinen hydrolyysi. Tästä syystä metanolyysia ei tarvinnut tehdä näille näytteille. Näytteitä oli pidetty lämpökaapissa 48 tuntia sekä 72 tuntia ja tarkoituksena oli selvittää, mitkä matriisit sisälsivät potentiaalisen määrän hiilihydraattia. Näytteet olivat lämpökaapissa 40–50 asteessa.

Varsinaista näytettä mitattiin näytepulloihin 5 ml automaattipipetillä. Näytteet olivat kuitenkin selvästi sakkaisia, joten ensin oli suoritettava sentrifugoiminen, jotta kiintoaines saatiin laskeutumaan ja tarvittava näytemäärä olisi sakatonta. Tämän jälkeen näytteet haihdutettiin typpikaasulla kuiviksi, jonka jälkeen lisättiin kuivattua pyridiiniä sekä silylointireagenssia. Lopuksi näytteet käytettiin ultraäänihauteessa ja tasoravistelijassa sekä suodatettiin kaasukromatografian näytepulloihin esikäsittelymenetelmän mukaisesti.

8 Tulokset ja niiden analysointi

Biokaasusyötenäytteistä saadut tulokset laskettiin kaavan 1 mukaisesti:

$$c_H = [(c - c_0) * V * LK] / m \quad (1)$$

c_H = näytteen hiilihydraatin pitoisuus (mg/kg ka)

c = standardisuorasta laskettu hiilihydraatin pitoisuus näytteelle ($\mu\text{g/ml}$)

c_0 = standardisuorasta lasketun hiilihydraatin pitoisuus nollanäytteelle ($\mu\text{g/ml}$)

V = uuttoliuoksesta otettu näytetilavuus (2 ml)

LK = laimennoskerroin

m = punnittu näytemäärä (g ka)

Tulokset on kirjattu taulukkoon 1. Nolla näytteen nimen perässä edustaa näytenollaa eli näytettä, joka on käynyt entsyymaattisen hydrolyysin ilman entsyymiä. Numerot yksi, kaksi ja kolme näytteen nimen perässä tarkoittava rinnakkaisnäytteitä. SP on lyhenne sahanpurusta ja KL tarkoittaa koivunlehteä.

Näyte	Arabinoosi (mg/kg)	Ksyloosi (mg/kg)	Glukuronihappo (mg/kg)	Mannoosi (mg/kg)	Galaktoosi (mg/kg)	Glukoosi (mg/kg)
SP0 48 h	0,156	0,172	0,11	2,28	5,78	0,0871
SP1 48 h	0,0310	0,0579	2,73	67,0	0,985	2,26
SP2 48 h	0,0431	0,058	2,91	69,5	0,837	2,40
SP3 48 h	0,0047	0,0578	3,42	78,2	0,807	28,1
SP0 72 h	0,106	0,756	0,252	1,73	62,2	0,165
SP1 72 h	0,0356	0,0327	2,48	63,1	0,819	2,21
SP2 72 h	0,0328	0,0457	2,022	58,5	5,95	1,85
SP3 72 h	0,0321	0,357	2,058	52,7	0,0773	1,53
KL0 48 h	28,8	60,3	471	109	149,0	179,0
KL1 48 h	5,07	9,04	12,02	70,2	2,13	1,65
KL2 48 h	0,331	0,843	17,4	46,1	1,93	0,0726
KL3 48 h	0,339	0,280	0,857	61,5	21,5	28,26
KL0 72 h	0,113	0,7	612	129	179,0	8,51
KL1 72 h	3,42	5,99	9,49	34,9	0,959	0,840
KL2 72 h	3,21	6,40	3,036	39,9	1,93	1,44
KL3 72 h	2,36	5,46	1,62	54,7	6,13	0,568

Taulukko 1. Entsyymihydrolyysin avulla käsiteltyjen näytteiden tulokset

Tuloksia tarkastellessa voidaan osassa rinnakkaisnäytteistä havaita pientä heittelyä. Tämä voi johtua esimerkiksi siitä, että saatu näyte ei ole ollut homogeeninen tai, että entsymaattinen hydrolyysi on estynyt. Näytteistä saatavaa uuttoliuosta on ollut niukasti, joten on mahdollista, että näyte ei ole ollut edustava. Lopputulokseen on voinut vaikuttaa myös se, että syötteisiin lisätyn veden määrässä ja mitatun aineksen painossa on pientä heittelyä. Syötteisiin mitatut vesimäärät ja punnitut näytemäärät, ennen näytteiden asettamista lämpökaappiin, on esitelty taulukossa 2. 48 tunnin näytteiden uuttoliuoksen määrä on pienentynyt näytteenoton vuoksi, jonka jälkeen näytteet laitettiin takaisin lämpökaappiin. 72 tunnin näytteiden vesimäärää ei ole ilmoitettu, sillä tarkka määrä ei ole tiedossa. Kiinteän näytteen tasalaaduttomuus voi osaltaan aiheuttaa tuloksiin vääristymiä. Esimerkiksi sahanpuru voi sisältää monia eri puulajeja, joiden suhde voi vaihdella.

Näyte	Näytteen määrä (g)	Veden määrä (g)
SP0 48 h	14,30	152,9
SP1 48 h	14,30	151,6
SP2 48 h	14,30	149
SP3 48 h	14,30	155
SP0 72 h	14,30	-
SP1 72 h	14,30	-
SP2 72 h	14,30	-
SP3 72 h	14,30	-
KL0 48 h	5,96	106,2
KL1 48 h	4,72	103,2
KL2 48 h	5,16	106,7
KL3 48 h	4,4	108,2
KL0 72 h	5,96	-
KL1 72 h	4,72	-
KL2 72 h	5,16	-
KL3 72 h	4,4	-

Taulukko 2. Veden ja näytteen punnitut määrät

Sahanpuruja sisältävät näytteet sisälsivät tutkittuja hiilihydraatteja pääsääntöisesti vähemmän kuin koivun lehdet. Näytteissä mannoosia, glukuronihappoa ja glukoosia syntyi entsymaattinen hydrolyysin tuloksena. Galaktoosin määrä näytteissä vastaavasti väheni entsymaattisessa hydrolyysissa, vaikka nollanäytteessä pitoisuus kasvoi, mitä kauemmin se oli lämpökaapissa. Muutamassa rinnakkaisessa näytteessä galaktoosi- ja glukoosipitoisuudet poikkeavat selkeästi muista näytteistä, mikä voi johtua näytteen heterogeenisuudesta.

Ksyloosin ja arabinoosin määrä ei merkittävästi muuttunut entsyymaattisessa hydrolyysissä ja niitä löytyi tutkittavista näytteistä niukasti. Sahanpuruja sisältävän nollanäytteen ja yhden rinnakkaisnäytteen kromatogrammit on esitelty liitteessä 1.

Koivunlehtiä sisältävissä näytteissä havaittiin kaikkia tutkittavia hiilihydraatteja. Nolla- ja rinnakkaisnäytteitä, jotka ovat olleet 48 tuntia lämpökaapissa, vertailtaessa voi huomata, että hiilihydraattipitoisuudet laskevat entsyymien takia. Mannoosin, glukuronihapon ja galaktoosin määrä nollanäytteissä lisääntyi, mitä kauemmin näyte oli lämpökaapissa. Arabinoosin, ksyloosin ja glukooosin määrä nollanäytteissä tippui entsyymaattisen hydrolyysin pidentyessä. Entsyymiä sisältävien näytteiden hiilihydraattipitoisuuden pääsääntöisesti laskivat, mitä kauemmin näytteet olivat lämpökaapissa. Liitteessä 2 on kuvattuna koivunlehden nollanäytteen ja yhden rinnakkaisnäytteen kromatogrammit.

Sisäisen standardin pinta-alat näytteissä

Taulukossa 3 on lueteltu sisäisenä standardina käytetyn sorbitolin piikkien pinta-alat. Saa-
duissa kromatogrammeissa piikit olivat saturoituneet eli pitoisuudet ovat todellisuudessa
suuremmat. Tuloksista voidaan päätellä, että entsyymaattisen hydrolyysin aikana sorbitolia
syntyy niin, että sisäisen standardin pitoisuutta näytteestä ei voida tunnistaa. Esimerkiksi
koivunlehtiä sisältävissä näytteissä on mahdollista, että glukoosi, galaktoosi ja mannoosi
muuntuvat entsyymaattisessa hydrolyysissa sorbitoliksi. Toisaalta näytteiden voitiin havaita
sisältävän itsessään jo sorbitolia, kun verrataan laadunvalvontanäytteiden sorbitolipitoi-
suutta suhteessa näytteisiin. Sorbitoli ei ole soveltuva sisäiseksi standardiksi tässä työssä
tutkittaville näytteille.

Näyte	Sorbitoli
SP0 48 h	718 127
SP1 48 h	59 803 211
SP2 48 h	59 729 958
SP3 48 h	35 817 096
SP0 72 h	703 654
SP1 72 h	53 953 495
SP2 72 h	37 191 893
SP3 72 h	37 845 345
KL0 48 h	5 934 227
KL1 48 h	43 138 534
KL2 48 h	41 800 166
KL3 48 h	40 608 979
KL0 72 h	6 388 978
KL1 72 h	36 665 269
KL2 72 h	42 544 054
KL3 72 h	37 530 172
LV2	201 893
LV9	191 859

Taulukko 3. Tutkittujen näytteiden sorbitolipiikkien pinta-alat

Kalibrintistandardien ja laadunvarmistusnäytteiden pitoisuudet

Taulukkoon 4 on kirjattu kalibrintistandardeista saadut pitoisuudet sekä prosentuaalinen erotus jo tiedossa olevaan pitoisuuteen. GC/MS-laitteen kalibrointi tehtiin näiden tulosten perusteella. Laadunvarmistusnäytteillä tarkastettiin kalibrointisuoran toimivuus. Laadunvalvonta näytteiden prosentuaalinen erotus tiedettävään pitoisuuteen on suotavaa olla käytetyllä kalibroinnilla $\pm 5-10\%$ (Jaarinen & Niiranen 2005, 38–39). Toisen laadunvarmistusnäytteen kohdalla prosentuaalinen erotus ylittyi. Liitteessä 3 on yhden kalibrintistandardiseoksen kromatogrammi.

	STD1	STD3	STD5	STD8	STD10	LV2	LV9
Arabinoosi	870,642	2950,807	5159,536	8072,164	9890,195		
Erotus (%)	-12,94	-1,64	3,19	0,9	-1,1		
Ksyloosi	1192,628	3027,909	5237,752	8111,072	9764,631		
Erotus (%)	19,26	0,93	4,76	1,39	-2,35		
Glukuronihappo	1000,989	2806,58	5261,598	7709,546	10159,49		
Erotus (%)	0,1	-6,45	5,23	-3,63	1,59		
Mannoosi	826,822	2733,31	4960,895	8311,664	9867,546	2273,821	8286,841
Erotus (%)	-17,32	-8,89	-0,78	3,9	-1,32	13,7	-7,92
Galaktoosi	786,741	2726,287	4949,51	8234,244	9941,29		
Erotus (%)	-21,33	-9,12	-1,01	2,93	-0,59		
Glukoosi	956,458	2780,806	5444,306	8007,431	9842,014		
Erotus (%)	-4,35	-7,31	8,89	0,09	-1,58		

Taulukko 4. Standardi- ja laadunvalvontanäytteiden pitoisuudet

Esikäsittelyn kehittämisen tulokset

Esikäsittelyn kehittämiseksi haluttiin selvittää, voiko ultraäänihautteen käytön korvata koeputkiravistelijalla (vortex). GC/MS-laitteen avulla saatiin yhdisteiksi pinta-alat, joita vertailtiin keskenään. Taulukkoon 5 on kirjattu vertailtavien näytteiden eri yhdisteiksi pinta-alat. Tämän perusteella voidaan todeta, että koeputkiravistelija ei riitä liuottamaan kuivunutta näytettä näytepullojen seinämistä, jonka vuoksi ultraäänihautteen käyttö on perusteltua.

	Näyte 1 (vortex)	Näyte 2 (ultraäänihaude)
Arabinoosi	10176879	15166396
Ksyloosi	2639449	4013737
Glukuronihappo	1674490	2233557
Mannoosi	4797683	7156446
Galaktoosi	2785139	4167073
Glukoosi	788971	1120863

Taulukko 5. Kahden vertailtavan näytteen hiilihydraattipiikkien pinta-alat

Hiilihydraattien pilkkoutuminen metanolyysillä haluttiin varmistaa mahdollisimman tehokkaaksi. Tämä tehtiin pitämällä kolmea samanlaista standardinäytettä eri ajan lämpökaapissa. Tuloksia vertailemalla saatiin selville aika, jonka jälkeen hiilihydraattien pilkkoutuminen selkeästi hidastuu. Taulukon 6 perusteella viiden tunnin lämpökaapissa oloaika voidaan pitää sopivana. Tällöin useimpien sokerien pilkkoutuminen selkeästi hidastuu, mutta muutoksia on vielä havaittavissa.

	3 h	4 h	5 h
Sorbitoli	2960041	3038152	3370149
Arabinoosi	5410228	5834498	5867325
Ksyloosi	3386566	3526782	3550064
Glukuronihappo	1323862	1401892	1601269
Mannoosi	5711994	5773643	5820656
Galaktoosi	5665944	5979448	5986640
Glukoosi	5859860	6115294	6170506

Taulukko 6. Lämpökaappikäsittelyn pituuden vaikutus pinta-aloihin

9 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli kehittää toimiva esikäsitelymenetelmä, jonka avulla saatiin analysoidua puupohjaisista näytesyötteistä hiilihydraattipitoisuudet seuraavien sokerien osalta: arabiinoini, galaktoosi, glukuronihappo, glukoosi, ksyloosi ja mannoosi. Lisäksi työhön kuului GC/MS-laitteen kalibrointi, jotta esikäsitellyistä näytteistä saatiin tunnistettua hiilihydraattipiikit ja niiden pitoisuudet määriteltä. Kalibrointi tapahtui ulkoisen standardin menetelmällä. Työssä suoritettiin yksittäisten piikkien tunnistaminen, jonka avulla GC/MS-laite pystyi jatkossa tunnistamaan halutut hiilihydraatit automaattisesti. Tämä tehtiin valmistamalla jokaisesta analysoitavasta hiilihydraatista oma näyte. Yksittäisten yhdisteiden tulosten perusteella standardiseoksen kromatogrammista tunnistettiin analysoitavat yhdisteet. Tunnistaminen osoittautui tarpeelliseksi, sillä yhdisteiden retentioajat ja massavaraukset olivat hyvin samankaltaisia.

Menetelmänkehityksen yhtenä tavoitteena oli esikäsitelyprosessin tehostaminen. Tehostamista voitiin hyödyntää esimerkiksi näytteiden kuivaksi haihduttamisessa. Alun perin haihdutuksessa käytettiin pyöröhaihdutinta. Se osoittautui paljon aikaa vieväksi, joten haihdutuksessa siirryttiin käyttämään typpikaasua. Tällöin pystyttiin yhden näytteen sijasta haihduttamaan viittä samanaikaisesti.

Työssä selvitettiin, mikä olisi lyhin mahdollinen aika, minkä tutkittavan näytteen tulisi olla lämpökaapissa, jotta metanolyyysin avulla tehty sokerien pilkkoutuminen olisi mahdollisimman hyvä. Tämä toteutettiin pitämällä jokaista standardinäytettä ennalta määrätty aika lämpökaapissa. Sopiva aika löytyi kromatogrammien vertailun perusteella, kun piikkien pinta-ala ei enää merkittävästi kasvanut. Lisäksi työssä selvitettiin, voiko ultraäänihauteen korvata koeputkiravistelijalla. Tulokset osoittivat, että ultraäänihauteen käyttö on perusteltua.

Puupohjaisten syötenäytteiden analysoinnissa tuli ilmi, että työssä käytettävä sisäinen standardi ei ole soveltuva tutkittaville näytteille. Näytteissä syntyy sorbitolia entsyymaattisen hydrolyysin aikana niin, että sisäisen standardin piikin määrittäminen piikkien päällekkäisyyksien vuoksi on mahdotonta. Sisäisenä standardina käytettävän sorbitolin vaihtaminen myoinositoliin voisi ratkaista ongelman.

Biokaasutuotannon syötenäytteiden tuloksissa esiintyi joidenkin tuloksien osalta epä johdonmukaisuutta. Tämä voi johtua esimerkiksi siitä, että näyte ei ole homogeeninen tai mitattavan vesi- ja näytemäärän vaihtelu näytteissä on vaikuttanut lopputulokseen. Toisaalta kuivan syötenäytteen heterogeenisuus voi vaikuttaa lopputulokseen. Luotettavan lopputuloksen saamiseksi tulisi jatkossa punnittavaa kiinteää näytettä ja lisättyä uuttoliuosta olla aina sama määrä.

Näytteenotto on osaltaan saattanut vaikuttaa tuloksiin. Näytteenotossa näytettä mitattiin 5 ml, josta sentrifugoimalla saatiin esikäsittelyä varten sakatonta näytettä. Jatkossa voisi olla tarpeellista kokeilla, olisiko näytteenotossa aiheellista näytettä mitata 10 ml, jolloin näyte saattaisi olla tasalaatuisempaa.

Tulosten perusteella hiilihydraattien tutkiminen metanolyysin avulla on toimiva menetelmä ja on sovellettavissa puupohjaisiin syötenäytteisiin. Tulosten luotettavuuden kannalta tulisi mainitut kehityskohteet korjata, jolloin voitaisiin varmistua, onko niillä väliä lopputuloksen kannalta. GC/MS-laitteen uudelleen kalibrointi ja sisäisen standardin vaihtaminen lisäisi myös tulosten luotettavuutta

Lähteet

- Biao, Y., Hui, S., Yuelong, Z. & Yunxuan, W. 2020. Hemicellulose-Based Film: Potential Green Films for Food Packaging. MDPI. Polymers. Vol. 12(8), 1775 Viitattu 15.4.2022. Saatavissa <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/8/1775/htm>
- Gasum Oy. 2022. Miten biokaasua tuotetaan. Viitattu 20.5.2022. Saatavissa <https://www.gasum.com/kaasusta/biokaasu/biokaasu/miten-biokaasua-tuotetaan/>
- Haapala, A., Etelä, R., Kiilunen, R., Laitinen, E., Luostarinen, K., Möttönen, J. & Voutilainen, M. 2018. Metsästä tuotteeksi: puualan perusteet. Helsinki: Opetushallitus.
- Halonen, T. & Penttilä, I. 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Helsinki: WSOY.
- Havukainen, L. 2019. Rikastetulla lantaseoksella lisää metaania ja monipuolisempi mikrobipopulaatio biokaasureaktorissa. Luomuinstituutti. Viitattu 26.5.2022. Saatavissa <https://luomuinstituutti.fi/rikastetulla-lantaseoksella-lisaa-metaania-ja-monimuotoisempi-mikrobipopulaatio-biokaasureaktorissa/>
- Isotalo, K. 2004. Puu- ja sellukemia. Helsinki: Opetushallitus.
- Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Helsinki: Edita
- Jernberg, J. 2022. Myyntipäällikkö. Berner Oy. GC/MS-koulutus 23.5.2022, 25.5.2022 ja 17.6.2022.
- Jääskeläinen, A.-S. & Sundqvist, H. 2007. Puun rakenne ja kemia. Helsinki: Otatieto.
- Kanerva, K., Karkela, L. & Valste, J. 1995. Katalyytti: orgaaninen kemia. Helsinki: WSOY.
- Kauppi, A. 2021. Puuta käytetään yhä useammin ruokaan ja kosmetiikkaan – hemiselluloosalla on tutkijan mukaan valtavat mahdollisuudet. Suomen metsäalan yhteinen verkkolehti. Suomen Metsäyhdistys. Viitattu 28.5.2022. Saatavissa <https://forest.fi/fi/artikkeli/puuta-kaytetaan-yha-useammin-ruokaan-ja-kosmetiikkaa-hemiselluloosalla-on-tutkijan-mukaan-valtavat-mahdollisuudet/#93c456d0>
- Kymäläinen, M. & Pakarinen, O. 2015. Biokaasuteknologia – raaka-aineet, prosessointi ja lopputuotteiden hyödyntäminen. Suomen Biokaasuyhdistys ry. Hämeen ammattikorkeakoulun e-julkaisu 36/2015. Viitattu 21.5.2022. Saatavissa https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/104180/HAMK_Biokaasun_tuotanto_2015_ekirja.pdf
- Laiho, J., Perämäki, P. & Sirén, H. 2009. Esikäsittelyn käsikirja. Helsinki: Kemian kustannus Oy.

Lehtonen, P. & Sihvonen, M.-L. 2004. Laboratorioalan analyttinen kemia. Helsinki: Opetushallitus.

Measur Oy. 2022. Kaasukromatografia-massaspektrometria. Measurlabs. Viitattu 26.5.2022. Saatavissa <https://measurlabs.com/fi/menetelmat/kaasukromatografia-massaspektrometria-gc-ms/>

Motiva Oy. 2013. Biokaasun tuotanto maatilalla. Viitattu 21.5.2022. Saatavissa [https://www.motiva.fi/files/6958/Biokaasun tuotanto maatilalla.pdf](https://www.motiva.fi/files/6958/Biokaasun_tuotanto_maatilalla.pdf)

Myllyviita, A. 2019. Spektrometriaa ja spektroskopiaa lukiossa: Massaspektrometria. Peda.net. Viitattu 23.5.2022. Saatavissa <https://peda.net/p/myllyviita/spektroskopia/sm>

Opetushallitus a. Laboratorioanalyysit - analyysimenetelmät: Kaasukromatografia. Opetushallitus. Viitattu 1.4.2022. Saatavissa http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/analyysimenetelmat_2-5_kaasukromatografia.html

Opetushallitus b. Laboratorioanalyysit – teollisuusnäyteanalyysit: Selluloosamassan ligniinipitoisuus. Opetushallitus. Viitattu 1.4.2022. Saatavissa http://www03.edu.fi/oppimateriaalit/laboratorio/teollisuusnayteanalyysit_selluloosamassan_ligniiniipitoisuus.html

PuuProffa a. Puun kerrokset. Pro Puu -keskus. Suomen metsäsäätiö. Viitattu 23.2.2022. Saatavissa <https://puuproffa.fi/puutieto/puun-kerrokset/>

PuuProffa b. Solukko. Pro Puu -keskus. Suomen metsäsäätiö. Viitattu 23.2.2022 Saatavissa <https://puuproffa.fi/puutieto/puun-kerrokset/solukko/>

Ruuttunen, K. 2014. Biotuoteteollisuus, puusta lopputuotteeseen. Aalto-yliopisto. Kemian tekniikan korkeakoulu. Viitattu 25.4.2022. Saatavissa <https://docplayer.fi/7841236-Biotuoteteollisuus-puusta-lopputuotteeseen-chem-a1100-teollisuuden-toimintaymparisto-ja-prosessit-5-op-kyosti-ruuttunen.html>

Sirén, Heli. 2013. Puuperäisistä raaka-aineista uusia antibakteerisia yhdisteitä. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Viitattu 25.2.2022. Saatavissa <https://www.slideshare.net/SitraEkologia/heli-siren-1552013-puuperisist-raakaaineista>

Sjöström, E. 1993. Wood chemistry: Fundamentals and applications. San Diego:

Academic Press. Viitattu 27.4.2022. Saatavissa:

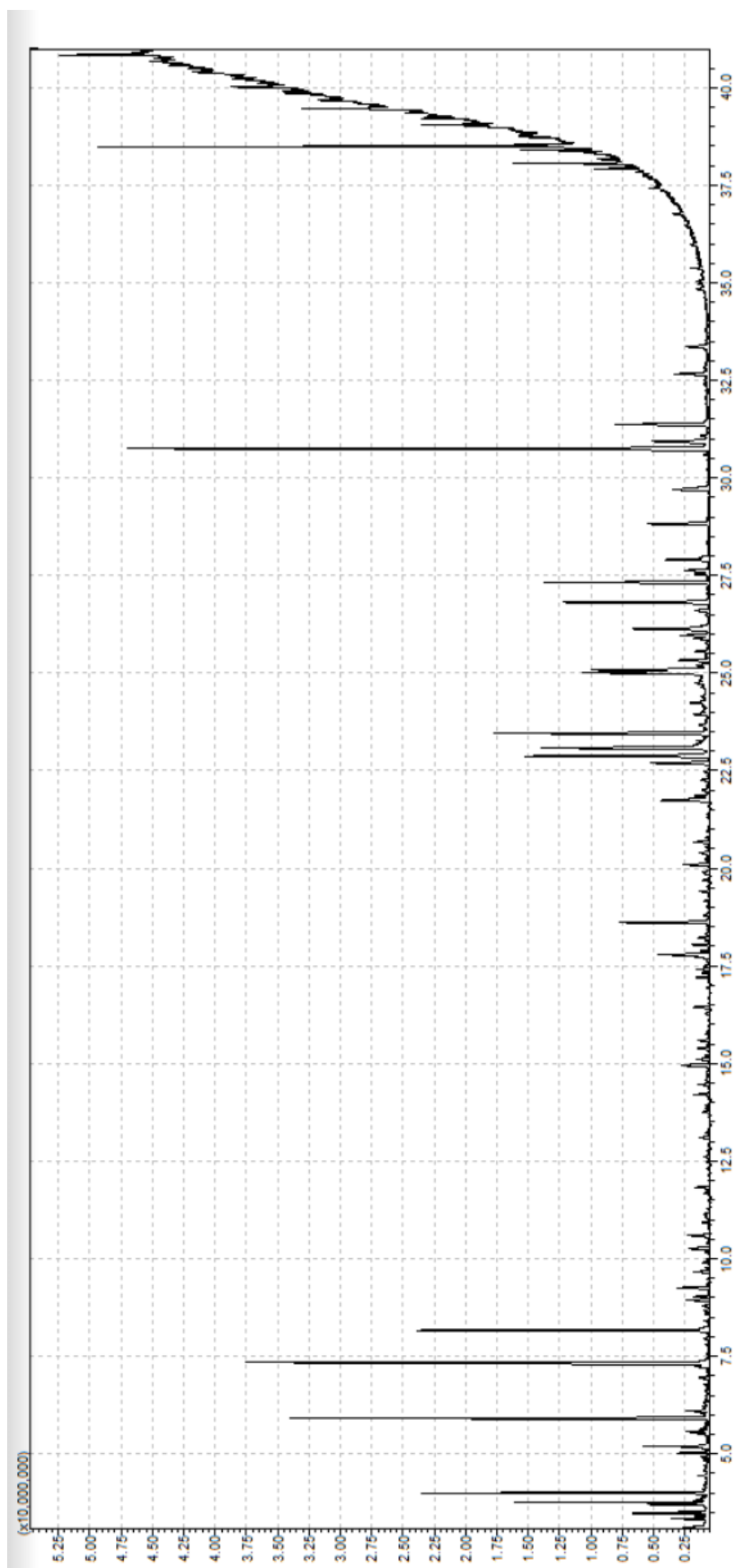
https://www.researchgate.net/figure/Principal-hemicelluloses-structure-in-softwood-a-Galactoglucomannans-b_fig4_268258151

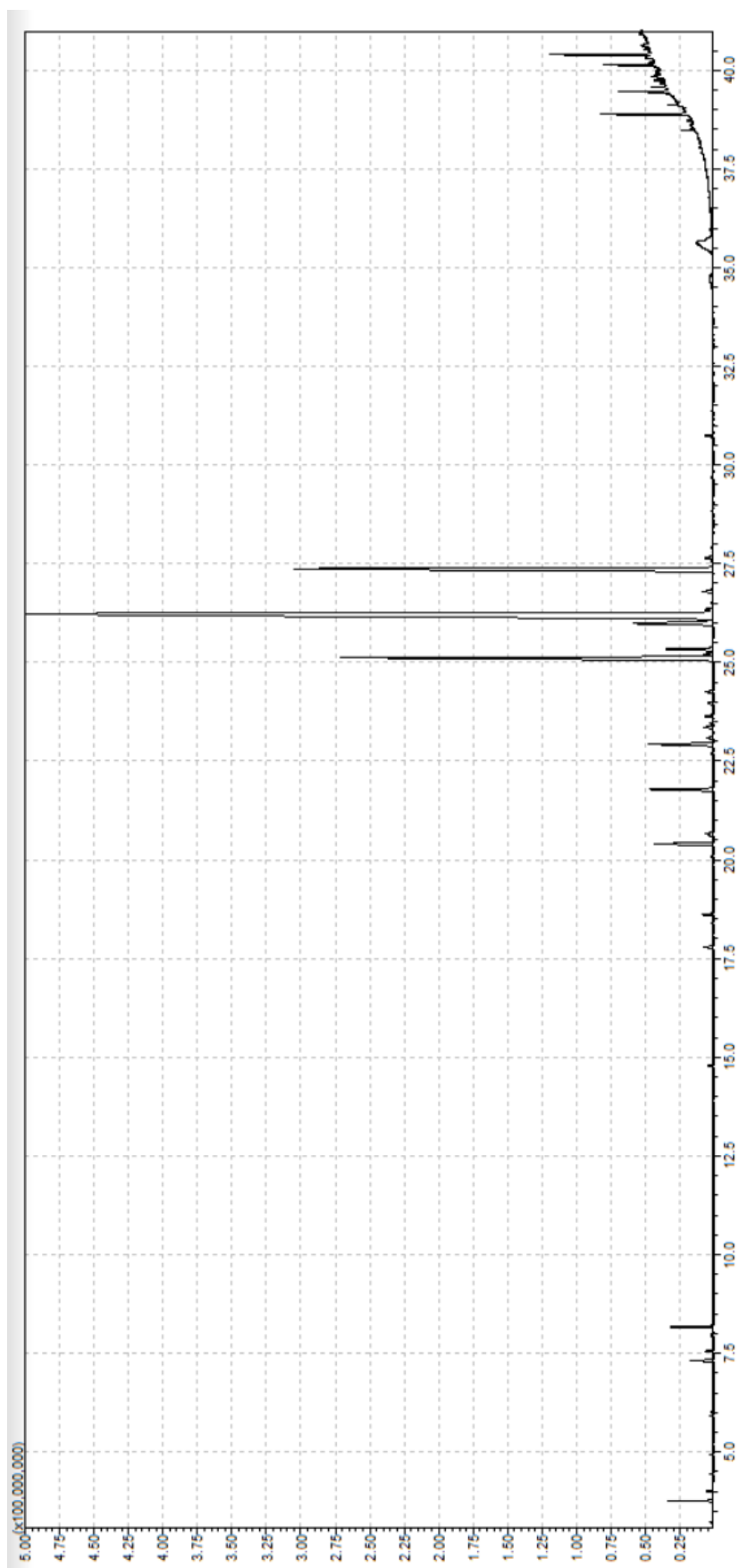
Sjöström, E. 1989. Puukemia: teoreettiset perusteet ja sovellutukset. Espoo: Otakustantamo.

Suomen Biokierto ja Biokaasu ry. Biokaasun käyttö. Viitattu 28.5.2022. Saatavissa

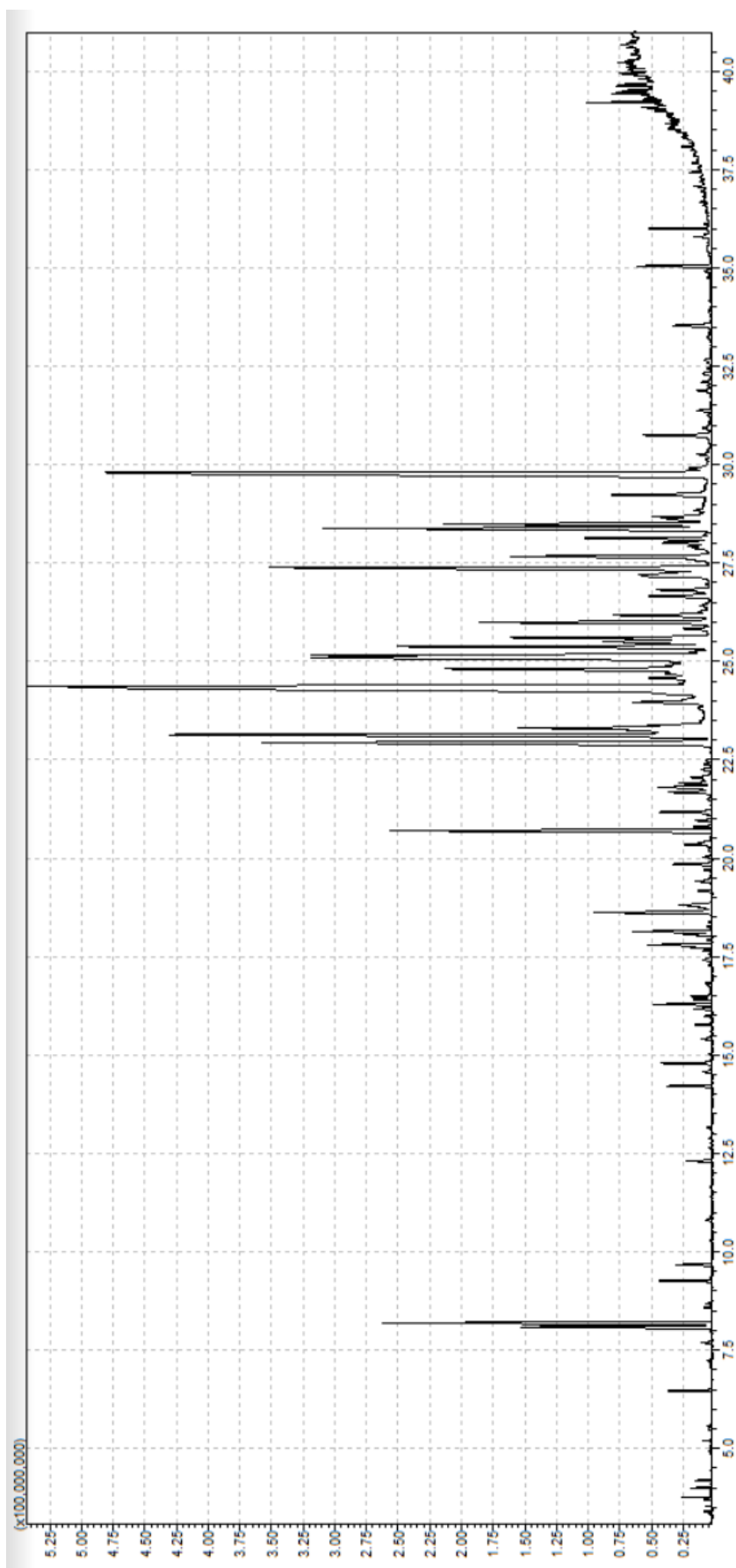
<https://biokierto.fi/biokaasu/kaytto/>

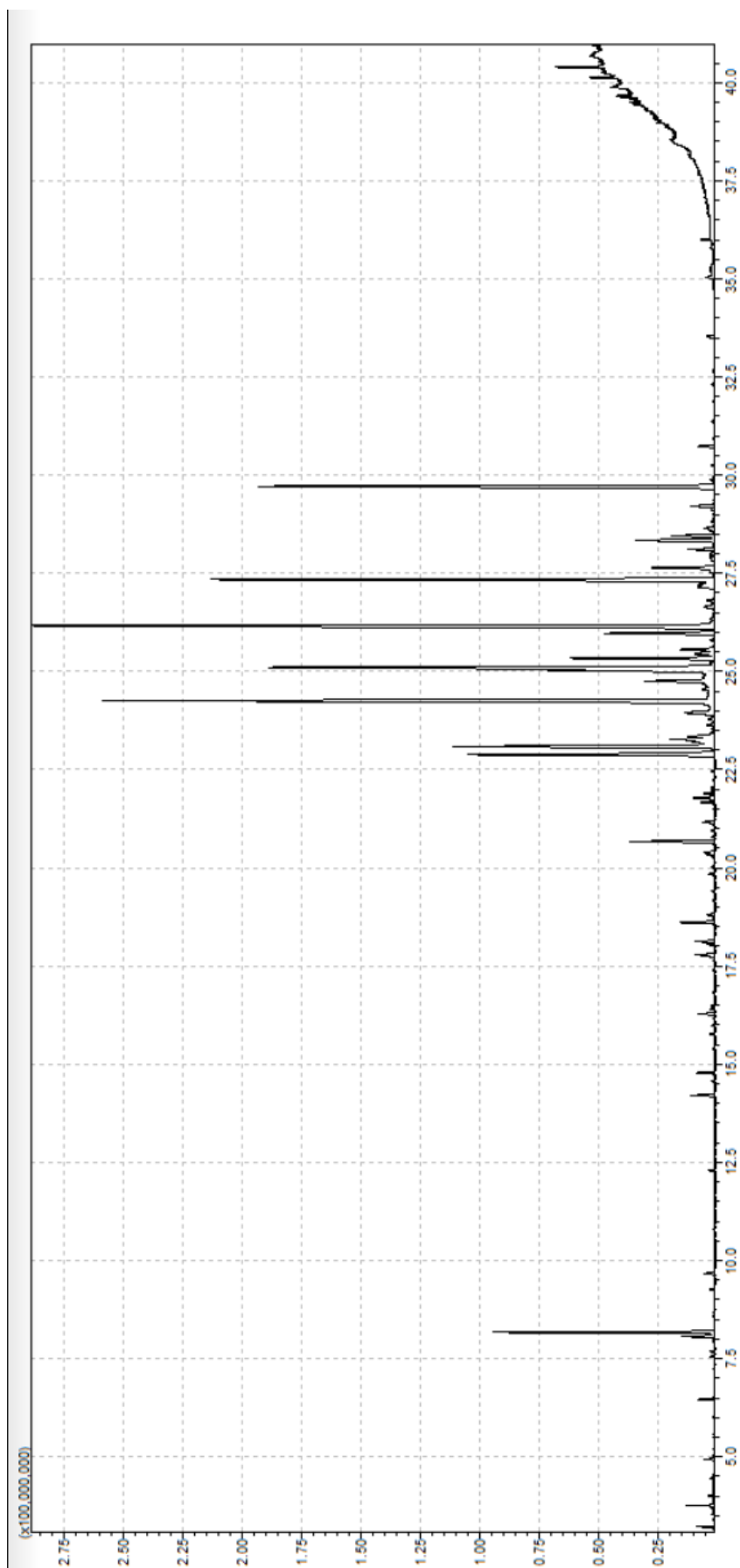
Liite 1. Sahanpurun nollanäytteen ja yhden rinnakkaisnäytteen kromatogrammit





Liite 2. Koivun lehden nollanäytteen ja yhden rinnakkaisnäytteen kromatogrammit





Liite 3. Standardiseoksen kromatogrammi

