

Saana Räikkä

**KOIVUN, MÄNNYN JA KUUSEN PURUN ENTSYMAATTI-
NEN HYDROLYYSSI**

**Opinnäytetyö
CENTRIA-AMMATTIKORKEAKOULU
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Kesäkuu 2014**



European Union
European Regional
Development Fund

forest
refine

Cross-border cooperation over mountain and sea

**This thesis has been carried out as a part of ForestRefine project.
Printing costs of thesis is covered by the project.**



REGION
VÄSTERBOTTEN



Österbottens förbund
Pohjanmaan liitto



Länsstyrelsen
Västernorrland



REGIONAL COUNCIL OF
CENTRAL OSTROBOTHNIA



European Union
European Regional
Development Fund

Botnia-Atlantica
Cross-border cooperation over mountain and sea

TIIVISTELMÄ OPINNÄYTETYÖSTÄ

Yksikkö Kokkola-Pietarsaari	Aika Kesäkuu 2014	Tekijä/tekijät Saana Räikkä
Koulutusohjelma Kemiantekniikka		
Työn nimi KOIVUN-, MÄNNYN- JA KUUSENPURUN ENTSYMAATTINEN HYDROLYYSI		
Työn ohjaaja Jana Holm		Sivumäärä 30
Työelämäohjaaja		
<p>Opinnäytetyön aiheena oli koivun- männyn- ja kuusepurun entsyymaattinen hydrolyysi. Toimeksiantajana oli Centria-ammattikorkeakoulu. Aihe liittyi Forest Refine –projektin tutkimustyöhön, jossa tutkittiin kuitulietteen entsyymaattista hydrolyysia. Opinnäytetyö toteutettiin kevään 2014 aikana.</p> <p>Aihe on noussut esille kasvavasta biopolttoaineiden tarpeesta. Uusia raaka-aineita ja tekniikoita kehitetään koko ajan. Biopolttoaineilla pyritään korvaamaan fossiiliset polttoaineet tulevaisuudessa yhä enemmän. Biopolttoaineiden valmistusprosessia on pyritty kehittämään niin, että se olisi kannattavaa taloudellisesti. Prosessista on pyritty karsimaan ylimääräisiä vaiheita, jotta prosessista tulisi kannattavampi.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, onnistuuko entsyymaattinen hydrolyysi puupuru- näytteille ilman esikäsitteilyvaihetta. Tuloksista laskettiin lopullinen kokonaissokerinsaanto, jonka perusteella pystyttiin arvioimaan, onko kannattavaa käyttää puupurua yhtenä biopolttoaineen raaka-aineena. Tuloksista selvisi, että puupurunäytteistä saatiin irrotettua sokeria ilman esikäsitteilymenetelmiä. Saanto jäi noin alle 20% puupuruissa, joten kovin korkeita saantomääriä ei onnistuta tällä menetelmällä saavuttamaan. Kokeet suoritettiin laboratoriomittakaavassa.</p> <p>Lignoselluloosaa biopolttoaineen raaka-aineena on tutkittu paljon ympäri maailmaa. Monimutkainen kemiallinen rakenne tekee lignoselluloosasta hankalan sokerin raaka-aineen. Hydrolyysimenetelmät ovat kalliita ja teknisesti haastavia.</p>		
Asiasanat biopolttoaine, entsyymit, entsyymaattinen hydrolyysi, lignoselluloosa		

ABSTRACT

Unit Kokkola-Pietarsaari	Date June 2014	Author/s Saana Räikkä
Degree programme Chemical engineering		
Name of thesis ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIRCH, PINE AND SPRICE		
Instructor Jana Holm		Pages 30
Supervisor		
<p>The topic of this thesis was enzymatic hydrolysis of birch, pine and spruce. The commissioner was Centria University of Applied Sciences. The subject was interlinked with the research of the Forest Refine – project which studied the enzymatic hydrolysis of fiber sludge. Thesis was carried out during the spring 2014.</p> <p>The topic of my thesis has become a current issue because of the increasing need for biofuels. New raw materials and techniques are being developed all the time. Increasingly, fossil fuels are being replaced by biofuels in the future. Biofuel production process has been developed to become economically viable. There is an aim to eliminate as many phases as possible from the production process to make it more profitable.</p> <p>The aim of this thesis was to investigate if it is possible to implement enzymatic hydrolysis for the wood powder samples without the pretreatment phase. The final total sugar yield was calculated from the results, based on these results it can be evaluated, whether it is advisable to use wood powder as a raw material for biofuel. The results indicated that the sugar can be removed from the wood powder samples without pre-treatment methods. The yield was about 20 % which means that with this method it is not possible to achieve high yield levels. Experiments were carried out on a laboratory scale.</p> <p>Ligno-celluloclose as a raw material for biofuels has been studied extensively around the world. The complex chemical construction of the lignocellulosic biomass makes it difficult raw material for sugar. Hydrolysis methods are expensive and technically challenging.</p>		

Key words

Biofuel, enzymes, enzymatic, hydrolysis, lignocellulose

**TIIVISTELMÄ
ABSTRACT**

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 BIOPOLTTOAINEET	2
3 LIGNOSELLULOOSA N KOOSTUMUS	
3.1 Ligniinin kemiallinen rakenne	3
3.2 Selluloosan kemiallinen rakenne	4
3.3 Hemiselluloosan kemiallinen rakenne	5
4 KUITULIETE LISÄNÄYTTEENÄ	6
5 HYDROLYYSI	7
5.1 Hydrolyysi prosessit	7
5.2 Entsymaattinen hydrolyysi	9
5.3 Happohydrolyysi	10
6 SOKEREIDEN FERMENTOINTI	12
6.1 SHF-prosessi	12
6.2 SFF-prosessi	13
7 ETANOLIN SAANTOON VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ	14
8 ENTSYMAATTISEN HYDROLYYSIN KEHITYS	15
9 UV/VIS- SPEKTROFOTOMETRI	16
10 KOKEELLINEN OSUUS	17
10.1 Työn suunnittelu	17
10.2 Työntoteutus	19
11 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI	21
12 LOPPUPÄÄTELMÄT	30
LÄHTEET	31

KUVIOT

KUVIO 1. Ligniinin rakenne	4
KUVIO 2. Selluloosan rakenne	5
KUVIO 3. Lehtipuun glukomannaanin osarakenne	5
KUVIO 4. Kuituliete	6
KUVIO 5. Lignoselluloosan rakenne	7
KUVIO 6. Eri hydrolyysimenetelmät ja sokereiden fermentointi	8
KUVIO 7. Entsymaattinen jakautuminen selluloosassa	10
KUVIO 8. SHF-prosessi	12
KUVIO 9. SSf-prosessi	13
KUVIO 10. Koelaitteisto hydrolyysi	18
KUVIO 11. Hydrolyysin jälkeen valmiit näytteet	19
KUVIO 12. Kuusipurunäyte	22
KUVIO 13. Koivupurunäyte	23
KUVIO 14. Mäntypurunäyte	24
KUVIO 15. Kuusi-, mänty- ja koivupurunäytteiden vertailua	25
KUVIO 16. Mäntyjauhe näyte	26
KUVIO 17. Mäntynäytteiden vertailua	27
KUVIO 18. Kuitulietenäyte	28
KUVIO 19. Kuitulietteen ja mäntyjauheen vertailu	28
KUVIO 20. Sakkaa näyteputkilon pohjalla	29

TAULUKOT

TAULUKKO 1. Puiden kemiallinen koostumus	3
TAULUKKO 2. Kuusipurunäyte	22
TAULUKKO 3. Koivupurunäyte	23
TAULUKKO 4. Mäntypurunäyte	24
TAULUKKO 5. Mäntyjauhenäyte	25
TAULUKKO 6. Kuituliete näyte	27

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö toteutettiin kevään 2014 aikana, ja työn tilaajana oli Centria-ammattikorkeakoulu. Tämän työn tarkoituksena oli tutkia puupuru-näytteiden entsymaattista hydrolyysia, ilman esikäsittelymenetelmiä. Työn aihe liittyy Forest Refine -projektin aikaisempaan tutkimustyöhön, jossa tutkittiin kuitulietteen entsymaattista hydrolyysia. Forest Refine -projektin tarkoituksena on tutkia uusia mahdollisuuksia hyötyä käyttää metsien omia biomassoja sekä uusiokäyttää metsä- ja paperiteollisuudesta syntyviä jätteitä hyödyksi.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli selvittää, miten hydrolyysi onnistuu ilman näytteen esikäsittelyä. Puupuru on kuitulietettä haastavampi näyte. Tutkimusongelmana on, pystytäänkö entsymaattinen hydrolyysi toteuttamaan ilman esikäsittelyä, onko sokerin saanto hyvä, ja kannattaako esikäsittely vaihe ohittaa. Puupurua on tarkoitus käyttää etanolin valmistuksessa, ja etanolia voidaan sitten jatko jalostaa biopolttoaineeksi. Etanolin käyttö biopolttoaineena on puhututtanut autokantaan soveltuvuutensa vuoksi. Butanoli on ominaisuuksiltaan vielä etanolia parempi vaihtoehto.

Biopolttoaineita on pyritty tutkimaan ja kehittämään paljon viime vuosien aikoina. Uusille tekniikoille, ja eettisesti oikein oleville materiaaleille, on suuri tarve tulevaisuudessa. Puupurua syntyy sivutuotteena sahateollisuudessa, ja siksi se olisi eettisesti oikea ratkaisu. Lisäksi sivutuotteen hyötykäyttö on kannattavampaa yrityksille, koska se vähentäisi mm. syntyvän jätteen määrää.

2 BIOPOLTTOAINEET

Biopolttoaineet ovat puhututtaneet jo pidempään. Mahdollisia uusia tekniikoita on yritetty kehittää, jotta useat yritykset voisivat hyödyntää sivutuotteiden jatkokäsittely biopolttoaineeksi. Fossiilisia polttoaineita korvaavia biopolttoaineiden kehittäminen on vilkastunut etenkin uusien jätelakien ja hintojen nousun takia. EU:n ja Suomen ilmastostrategia pyrkii hidastamaan ilmaston muutosta, näin ollen myös yritykset ovat pyrkineet parantamaan toimintaansa ympäristö asioissa. Biopolttoaineiden käyttö tavoitetta on pyritty nostamaan jo vuosien aikana. (ilmasto.org)

Eettiset kysymykset ovat tulleet vastaan esimerkiksi pohdittaessa ruokaviljan käytettävyyttä liikennepolttoaineen etanoliksi. Elintarvikkeista on valmistettu biopolttoainetta jo pitkään. Biopolttoaineen valmistus elintarvikkeista on nostanut elintarvikkeiden hintaa, ja tämän vuoksi on pyritty kehittelemään uusia menetelmiä, jotka ei ole eettisesti väärin ja eivätkä aiheuta muiden kustannuksien nousua.

Selluloosapohjaiset biopolttoaineet ovat yksi tutkituimmista ja potentiaaleimista raaka-aineista korvaamaan fossiiliset polttoaineet.. Uusia valmistuslaitoksia on alkanut jo käynnistyä. Kajaaniin on suunnitteilla sahalla syntyvästä puupurujätteestä valmistava bioetanoli laitos. Ympäri Suomea on kaavailtu jo muun muassa; biodieseliä valmistava laitos sellutehtaan yhteyteen, sekä bioöljyä biomassasta valmistava laitos. Kehitys näkyy uusina laitos hankkeina, tämä on hyvä merkki sillä laitokset takaavat puhtaampaa polttoainetta ja lisää työpaikkoja Suomeen.

3 LIGNOSELLULOOSAN KOOSTUMUS

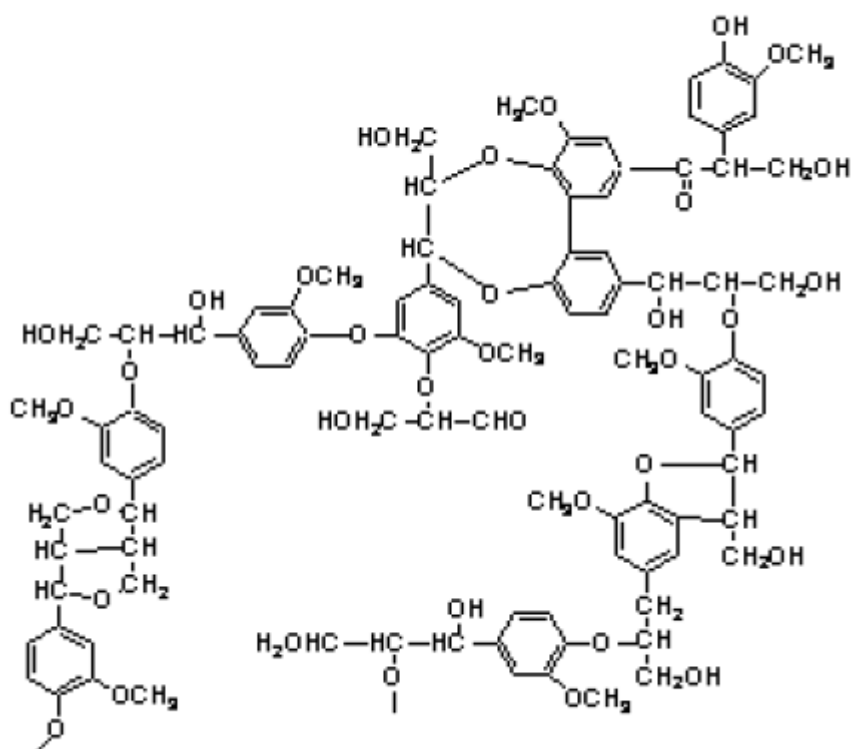
Puun kemiallinen rakenne on monimutkainen, ja rakenteen pilkkominen sokereiksi on hankalaa. Ligniini on tiukasti sidoksissa muhin puun rakenteisiin ja toimii rakenteessa niin sanottuna lujite aineena. Puuaines koostuu kolmesta eri komponentista, jotka ovat ligniini, selluloosa ja hemiselluloosa. Kaikilla puulajeilla on myös ominaispiirteitä jotka vaikuttavat hydrolyysi menetelmään. Lignoselluloosaa voidaan saada useista eri lähteistä. Päälähteenä ovat havupuut, ja muita lähteitä ovat muun muassa maa- ja metsätalousjäte, teollisuusjäte sekä erilaiset yhdyskunnanjätteet (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628). Oheisessa Talukossa 1 on eroteltu Suomen puiden kemiallinen rakenne. Puuaineksessa on myös uuteaineita ja pieniä epäorgaanisia yhdisteitä, kuten glukaaneja, galaktaaneja ja pektiinejä. Pienien määrien vuoksi näitä polysakkarideja ei voida hyödyntää raaka-aineena teollisessa tuotannossa. (Virtanen 2006, 3-4).

	SELLULOOSA	HEMISELLULOOSA	LIGNIINI	UUTEAINEET
MÄNTY	42 %	26 %	27 %	5 %
KOIVU	40 %	37 %	20 %	3 %
KUUSI	42 %	28 %	28 %	2 %

TAULUKKO 1. Puiden kemiallinen koostumus (Virtanen 2006, 3)

3.1 Ligniinin kemiallinen rakenne

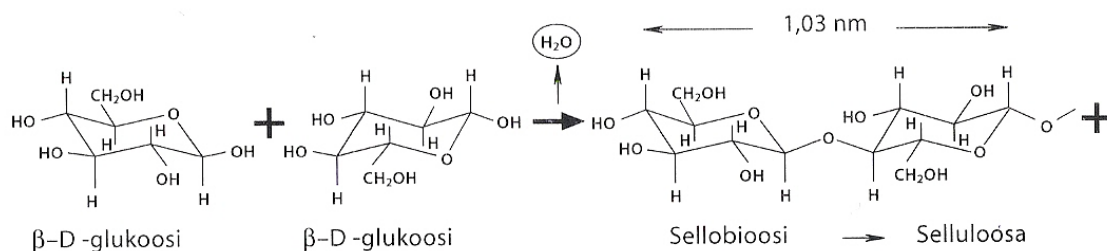
Ligniini koostuu fenyylipropaaniyksiköistä (C₆C₃-yksiköt), jotka sisältää monimutkaisia polymeerejä (KUVIO 1). Ligniinin on amorfinen yhdiste, jonka tarkkaa rakennetta ei ole pystytty selvittämään, useista tutkimuksista huolimatta (Isotalo 2004, 41-44). Ligniini toimii sidosaineena, joka sitoo kuidut toisiinsa tiukasti, lisäten mekaanista lujuutta. Kolmesta komponentista ligniini on kaikkein vaikein hydrolysoituvaa. Yleensä ligniini erotetaan hydrolysoinnin jälkeen, liukenemattomana kiintoaineena. (Pollard 2005).



KUVIO 1. Ligniinin rakenne. (Virtanen 2006, 4)

3.2 Selluloosan kemiallinen rakenne

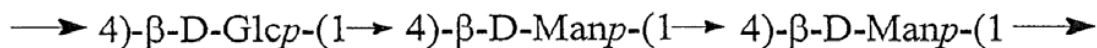
Selluloosa on kemialliselta rakenteeltaan polysakkaridi, ketjumaisesti yksiköistä muodostunut hiilihydraatti. Selluloosa rakentuu kahdesta glukoosianhydridistä, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa 1,4-glykosidisisidoksella, ja nämä muodostavat sellobioosiyksikön. Useamman yksikön liittyessä toisiinsa, rakentuu selluloosa. (KUVIO 2). Selluloosa on muodollisesti hankala hydrolysoitava aine, sillä toinen glukoosianhydridi on kiertynyt 180 astetta. (Isotalo 2004, 41-43).



KUVIO 2. Selluloosan rakenne. (Isotalo 2004, 41)

3.3 Hemiselluloosan kemiallinen rakenne

Hemiselluloosat ovat polysakkarideja. Hemiselluloosa muodostuu erilaisista pentooseista, heksooseista, heksuronihapoista sekä deoksiheksooneista (Vanninen 2009,9). Rakenteeltaan hemiselluloosa on haaroittunut ja niiden polymerointiaste on 100-200. Ketju rakenteesta johtuen hemiselluloosa on amorfisia ja hydrolysoituvat esimerkiksi , hapoilla selluloosaa paremmin. Hemiselluloosan sokereiden hajoamisesta syntyy mannoosia, galaktoosia, glukoosia, ksyloosia ja arabinoosia. Sokereiden hajotessa vielä furfuraaliksi ja hydrosimetyylifurfuraaliksi, nämä tuotteet inhiboivat hydrolyysiprosessia (Galbe M & Zacchi 2002, 68-628). Havupuun ja lehtipuun hemiselluloosa eroavat toisistaan rakenteellisesti. Havupuussa hemiselluloosat ovat, ensisijaisesti galaktoglukomannaaneja (glukomannaani) ja arabinoglukuronoksyylaaneja (ksylaani) Lehtipuussa hemiselluloosat ovat enimmäkseen glukomannaaneja (Alén, R. 2000). (KUVIO 3)



KUVIO 3. Lehtipuun glukomannaanin osarakenne. (Vanninen 2009, 10).

4 KUITULIETE LISÄNÄYTTEENÄ

Kuituliete on teollisuudessa sellun valmistuksesta syntyvää sivutuotetta. Yleisin hyötykäyttö kuitulietelle on polttaa se lämpöenergiaksi tehtaan omaan käyttöön. Kuitulietettä on tutkittu viime aikoina paljon, ja on todettu että se on potentiaalinen biopolttoaine raaka-aineen. Kuituliete on selluloosarikas, mutta ligniiniköyhä fraktio. (Holm 2013, 25-27).

Kuituliete on vesipohjainen liete, joka sisältää runsaasti selluloosaa. Kuituliete sisältää myös hyvin pieniä määriä epäpuhtauksia sellun keittokemikaalien vuoksi. Kuitulietteen rakenne on pääasiassa seuraava: 80 % α -selluloosaa, 13 % β -selluloosaa ja 7 % γ -selluloosaa. Ennen jatko käsittelyä etanoliksi, kuituliete (KUVIO 4) tulisi kuivattaa ja hienontaa kuulamylyssä jolloin sitä on helpompi jatko jalostaa biopolttoaineeksi. (Holm 2013, 25-27)



KUVIO 4. Kuituliete (<http://www.balticdeal.eu/measure/fiber-clay/>)

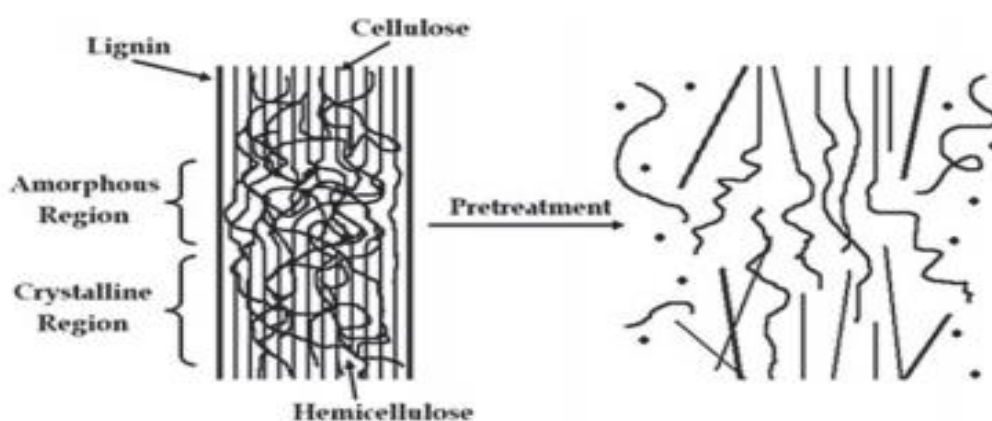
Kuituliete on luokiteltu Suomessa jätteeksi, ja siitä täytyy maksaa lain mukainen jätevero 50 e/t. Suomessa kuitulietettä syntyy teollisuuden sivutuotteena n. 314 000 t/ vuosi. Teollisuudelle olisi taloudellisempaa kehittää sivutuotetta hyötykäyttöön. (Holm 2013, 25-27).

5 HYDROLYYSI PROSESSIT

Energian lähteenä biopolttoaineet ovat erinomaisia vaihtoehtoja korvaamaan fossiiliset polttoaineet. Tämän vuoksi hydrolyysiprosessia on pyritty kehittämään entistä enemmän, jotta saataisiin hyödynnettyä puujalostamoiden jätteiden suuri potentiaalinen energia. Biomassan hankalan rakenteen vuoksi on kallista saada toimiva prosessi, jolla saadaan irrotettua halutut sokeri jalostettavaan muotoon.

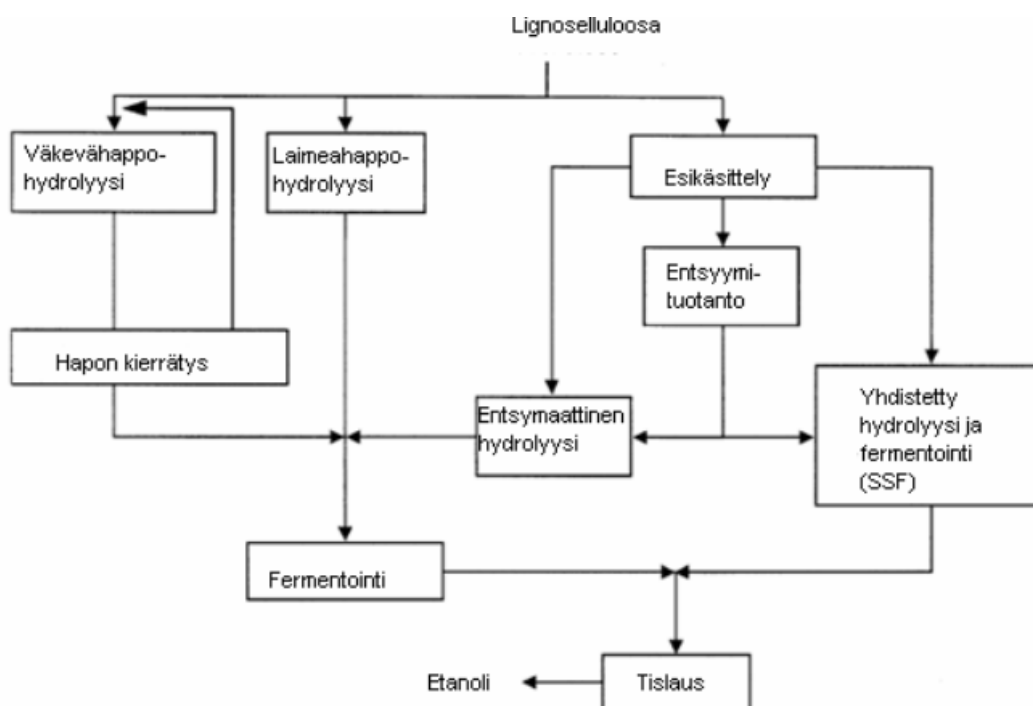
5.1 Hydrolyysi prosessi

Hydrolyysiprosesseissa on useita eri prosessivaihtoehtoja. Hydrolyysi prosessit voidaan jakaa kahteen pääryhmään; happohydrolyysiin ja entsymaattiseen hydrolyysiin. Voidaan myös käyttää tehtäväspesifiä ioninesteitä biomassojen esikäsittelyyn, jolloin ei ole enää tarvetta käyttää entsyymejä tai happoja biomassan käsittelyyn ollenkaan. Happohydrolyysi voidaan toteuttaa joko väkevällä tai laimealla hapolla. (Galbe, M & Zacchi 2002, 618-628). Sokerin irrottamiseksi biomassasta, täytyy massa pilkkoa osiksi; ligniiniksi, selluloosaksi ja hemiselluloosaksi. Sokeria saadaan hiilihydraattipolymeereistä joita on selluloosassa ja hemiselluloosassa. (Holm 2013, 546-547). (KUVIO 5).



KUVIO 5 Lignoselluloosan rakenne. (Holm 2013, 547.)

Usein hydrolyysin ensimmäinen vaihe on esikäsittelyvaihe, näin saadaan usein paremmat sokerin saannot. Ensimmäisessä vaiheessa biomassassa esikäsitellään yleensä laimealla hapolla, jotta saadaan hemiselluloosa hajoamaan. Hemiselluloosa on lignoselluloosasta helpoiten erotettava komponentti. Esikäsittelyn jälkeen biomassassa pestään ja erotellaan hemiselluloosan sokerit. Kiinteään aineeseen jää esikäsittelyn jälkeen vain selluloosaa ja ligniiniä. Toisessa vaiheessa selluloosa hydrolysoidaan glukoosiksi, joka lopuksi erotellaan ligniinistä. (Virtanen. 2006, 5-6). Ligniiniä voidaan hyödyntää prosessissa sähkön ja lämmön tuotannossa. Käytännössä puusta saadaan hyödynnettyä n. 30 % sen sisältämästä energiamäärästä. Energia ja massataseen perusteella raaka-aineen energiasta saadaan 50 % etanolina ja 36 % kiinteänä polttoaineena hyödynnettyä. (Galbe M & Zacchi 2002, 68-628).



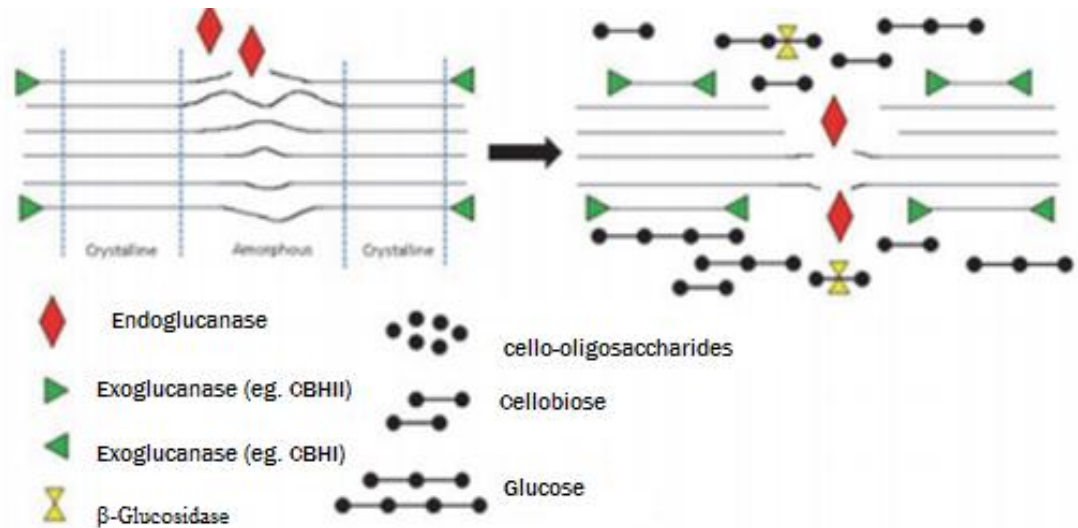
KUVIO 6. Eri hydrolyysimenetelmät ja sokereiden fermentointi. (Virtanen 2006,6)

5.2 Entsymaattinen hydrolyysi

Sellulaasi entsyymit auttavat selluloosaa hydrolysoitumaan glukoosiksi entsyymaattisessa hydrolyysissä. Entsyymien tuotantoon käytetään sieniä. Tutkimuksen mukaan *Tricoderma* sieni on tehokkain, ja tämän avulla voidaan valmistaa usean sellulaasin seos. Muita käytettäviä sieniä ovat mm. *Penicillium* ja *Aspergillus*-sukuiset. Entsyymien välillä on synergia, joka takaa paremman entsyymiaktiivisuuden, kuin yksittäisillä entsyymeillä. β -glukosidaasi entsyymi pilkkoo tehokkaasti kahden eri glukoosiyksikön disakkarideja ja sellubiooseja, jotka inhiboivat muiden entsyymien toimintaa. β -glukosidaasi on yksi merkittävimmistä rooleista hydrolyysiprosessissa, vaikkei se ole sellulaasi. Sellubioosien pilkkoutuessa syntyy glukoosia, joka voi inhiboida β -glukosidaasien toimintaa. Hyvä tapa estää inhiboitumisia hydrolyysiprosessissa on käyttää matalia kuiva-ainepitoisuuksia. (Galbe, M & Zacchi 2002, 618-628).

Selluloosaa hydrolysoivia entsyymejä kutsutaan sellulaaseiksi. Sellulaaseihin kuuluu suuri joukko endo- ja ekso-glukanaaseja, jotka hydrolysoivat 1,4-glukoosidoksiin selluloosaketjuista. Entsyymien vaikutus kohdistuu yleensä yhdenlaisien sidosten hajottamiseen. Selluloosan hajottamiseen tarvitaan siis useita eri entsyymejä. Selluloosan endoglukosidaasia tarvitaan sisäsidosten pilkkomiseen, eksoglukosidaasi katkaisee sidosten päädyt sellubioosiyksiköiksi, ja sillä voidaan myös hydrolysoida kiteistä selluloosaa (Viikari & Alén 2011).

Hemiselluloosa tarvitsee omat entsyyminsä pilkkomaan sidokset. Yleisimmät hemiselluloosaryhmät havu ja lehtipuissa ovat ksylaanit ja glukomannaanit. Hydrolyysissä käytetään yleisesti endoksylanaasia ja endomannaasia, jotka pilkkovat tehokkaasti hemiselluloosaryhmät. Ksylaanien ja glukomaanien sisältämät sivuketjut hydrolysoidaan yleisimmin pienempiin rakenteisiin erikoistuneilla entsyymeillä, jotta kaikki mahdollinen sokeri saadaan talteen. (Viikari & Alén 2011)



KUVIO 7. Entsymaattinen jakautuminen selluloosassa. (Holm 2013, 37)

Entsymaattinen hydrolyysi voi olla hyvin spesifinen selluloosahydrolyysi. Saannot ovat hyviä, ja sivutuotteena syntyviä haitallisia yhdisteitä on vähän. Optimaaliseen entsyymiaktiivisuuteen päästää noin 50 °C:n lämpötilassa, pH:n ollessa 4-5. Entsymaattiseen hydrolyysiin vaikuttavia tekijöitä ovat myös; raaka-aine, lämpötila, viipymäaika ja käytetyistä entsyymeistä. Esimerkiksi mitä pitempi viipymäaika on, sitä matalampi lämpötila voi olla. pH:n kohotessa lähelle 5,3, lämpötilan merkitys pienenee. (Holm 2013,37). Entsymaattinen hydrolyysi on kallis prosessi ja prosessissa käytettävät entsyymit ovat kalliita. (Pollard, G, 2005)

5.3 Happohydrolyysi

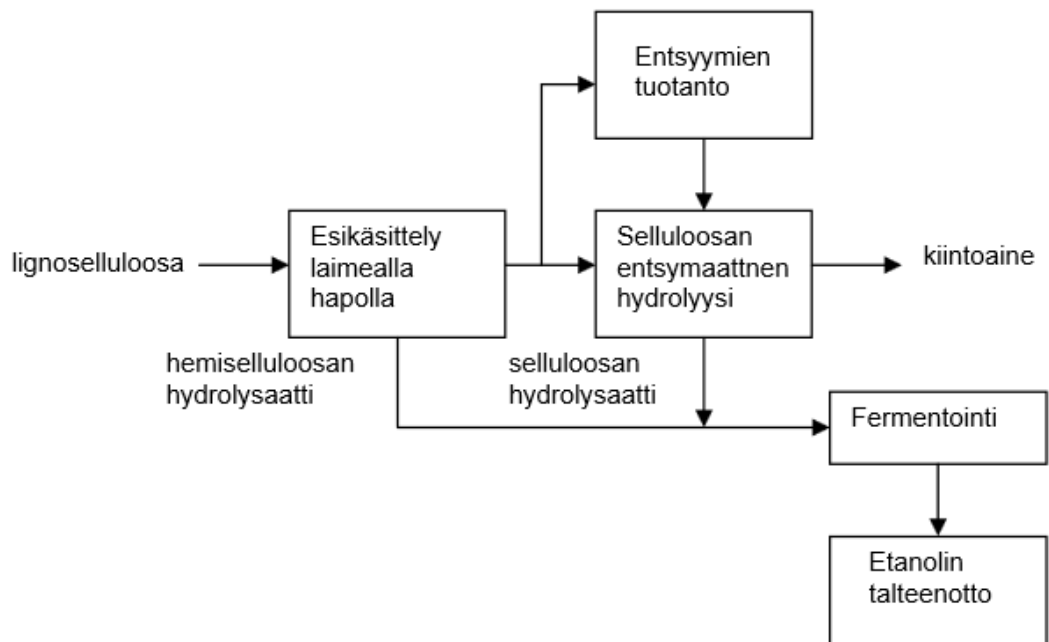
Happo hydrolyysi on jo 1800-luvulta lähtien tuttu hydrolyysimenetelmä. Happo hydrolyysi on yleensä entsyymattista hydrolyysia halvempi vaihtoehto. Hydrolyysia voidaan suorittaa niin väkevilla hapoilla, kuin laimealla hapollakin, myös orgaaniset hapot käyvät hydrolyysiprosessiin. Tunnetuimpia happoja, joita käytetään hydrolyysiprosessissa ovat rikkihappo, vetykloridi, vetyfluoridi, fosforihappo ja muurahaishappo. Happohydrolyysissa hapon kierrätys on ongelmallista, jolloin myös tuotantokustannukset nousevat. (Galbe, M & Zacchi 2002, 618-628).

Happohydrolyysissa hapoilla ja emäksillä saadaan avattua hyvin selluloosan rakennetta. Hydrolyysissa selluloosa katkeaa β -D-glukoosiyksiköiden muodostamasta sidoksesta hajottaen happisillan sidoksie väliltä. Glukoosiyksiköiden päihin muodostuu uusi hydroksidi ryhmä. (Isotalo 2004, 44-45)

Happohydrolyysilla voidaan päästä korkeisiin saantoihin jopa 90 % esimerkiksi vahvoilla hapoilla. Haitoiksi happohydrolyysissa tulevat korroosio ongelmat. Laimeat hapot tarvitsevat korkeammat lämpötilat hydrolysoitumiseen. Saanto jää myös hiukan vähäisemmäksi n. 50-60 % :n. Happoa tarvitaan laimean hapon hydrolyysissa vähemmän kuin väkevää happoa väkevän hapon hydrolyysissa. (Galbe , M & Zacchi 2002, 618-628).

6 SOKEREIDEN FERMENTOINTI

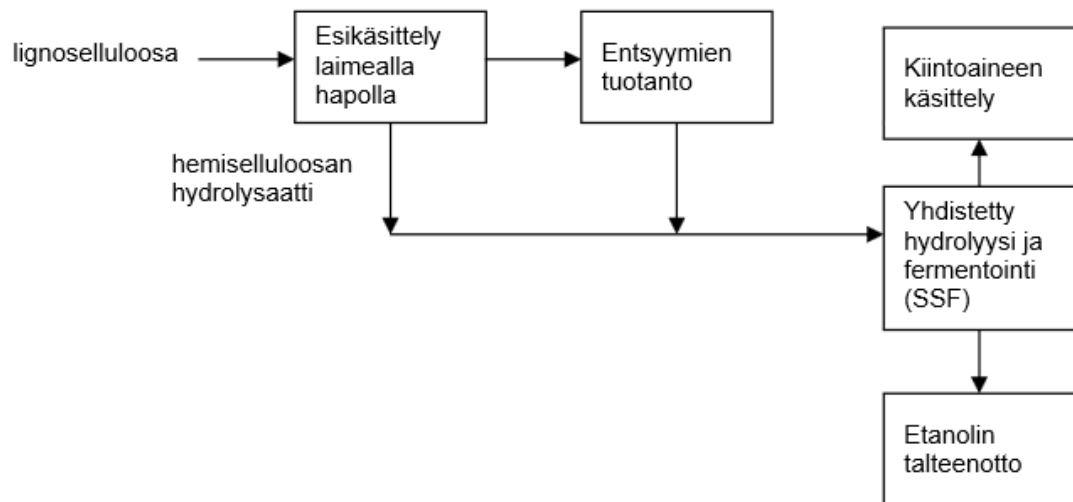
Fermentointi eli käyminen, on eräänlainen käymis prosessi jossa hydrolyysista saadut sokerit fermentoidaan etanoliksi. Fermentointi voidaan suorittaa joko erillisenä prosessina SHF-prosessina (SHF = separate hydrolysis and fermentation) (KUVIO 8) tai yhdistettynä hydrolyysi- ja fermentointi prosessina. SSF-prosessina (SSF = simultaneous saccharification and fermentation) (KUVIO 9). (Galbe, M & Zacchi 2002, 618-628).



KUVIO 8 SHF-prosessi. (Virtanen 2006, 14)

6.1 SHF-prosessi

Erillisessä SHF-prosessissa (SHF = separate hydrolysis and fermentation) on etuna se, että molemmat prosessit voidaan suorittaa optimaalisissa olosuhteissa. Esimerkiksi hydrolyysissa optimaalinen lämpötila on 50 °C, kun fermentoinnissa optimaalinen lämpötila on 30 °C. Erillisessä prosessissa on myös se etu, että entsyymien mikro-organismeja voidaan kierättää, ja prosessi on jatkuva toiminen. Hydrolyysissa vapautuneet sokerit saattavat inhiboida entsyymien toimintaa tässä menetelmässä (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628).



KUVIO 9. SSF-Prosessi (Virtanen 2006, 15).

6.2 SSF-prosessi

Yhdistetyssä SSF-prosessissa prosessina (SSF = simultaneous saccharification and fermentation) hydrolyysi ja fermentointi tapahtuvat samassa reaktorissa. Prosessin etuna on se että, kun sokerit pilkotaan välittömästi, eivät ne alenna entsyymien vaikutusta. Fermentoinnissa syntynyt etanoli ei myöskään inhiboi hydrolyysiä yhtä paljon kuin sellobioosit ja glukoosi. Kustannukset ovat halvemmat sillä reaktoreita tarvitaan kahden sijasta vain yksi. Ero optimaalisista olosuhteista aiheuttaa sen, että prosessissa on tehtävä kompromisseja. Entsyymien ja fermentoivien mikro-organismien välillä optimaalinen lämpötila voi vaihdella laajasti, pH vaihtelut ovat vähäisempiä. (Virtanen 2006, 15).

Kompromississa on päädytty usein n 35 °C asteeseen. Tämä edellyttää mikro-organismien tehokasta lämmön sieto kykyä. Mikro-organismit sekoittuvat SSF-prosessissa ligniiniin, joten niitä ei voida kierättää uudelleen käyttöön kuten SHF-prosessissa. Näin ollen tuotanto kustannukset kasvavat (Virtanen 2006, 15-16). Glukoosikonsentraatio on koko ajan pienempi SSF-prosessissa, ja siksi SHF:ssä on suurempi kontaminaatoriski kuin SSF:ssä (Stenberg, Bollok, Reczey, Galge, Zacchi 2000, 204-210). Tämän riskin vuoksi, SSF-prosessia ei yleensä ajeta jatkuva toimitus. SSF-prosessilla päästään usein myös korkeimpiin etanoli saantoihin ja tuottavuus on parempaa. Lopullisen saannon ajat voivat jopa puolittua SSF-prosessissa verrattuna SHF-prosessiin. (Stenberg, Bollok, Reczey, Galge, Zacchi 2000, 204-210)

7 ETANOLIN SAANTOON VAIKUTTAVIA TEKIJÖITÄ

Etanolin lopullinen saanto riippuu monen tekijän yhteisvaikutuksesta. Teoreettinen saanto havupuista on 455 l/kuivatonna kohden. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628). Käytännössä määrä jää kuitenkin puolet vähemmäksi. Tähän saannon määrään vaikuttavat sokereiden saanto ja fermentoitavuus. Viipymisaika hydrolyysiprosessissa on yksi merkittävimmistä tekijöistä sokereiden saantoon. Entsyymien konsentraatiolla on myös merkitys hydrolyysin nopeuteen. Hydrolyysissa voidaan kasvattaa sellulaasipitoisuutta, jolloin sokereiden saanto kasvaa. Korkeita entsyymikonsentraatioita voidaan käyttää havupuiden kohdalla, ilman että seos kyllästyisi. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628).

Entsyymien toimintakykyä saattavat alentaa, lähtöaineiden komponenteista tulevat haitalliset yhdisteet. Kuten puun kuoren mukana tulleita ulkoisia kiinto aineita, muun muassa hiekka, pöly ym. Haitalliset yhdisteet saattavat olla vahingollisia entsyymeille. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628). Glukoosin hajoamiseen vaikuttavia reaktorimateriaaleja on tutkittu paljon. Eri metallien käyttö reaktoreissa aiheuttaa eroa suuresti. Esimerkiksi teräksellä on suuri vaikutus glukoosin hajoamiseen, mutta kuparin vaikutus on vähäinen. (Virtanen 2006)

Entsyaattisen hydrolyysin prosessikokonaisuuden löytäminen on hankalaa. Esikäsittelyvaiheessa halutaan maksimoida hemiselluloosan ja selluloosan konversio. Nämä kaksi komponenttia kuitenkin vaativat erilaisia esikäsittelyvaiheita. Prosessissa syntyy usein myös inhiboivia sivutuotteita jotka vaikeuttavat esikäsittelyn valintaa entisestään. Esikäsittelyvaiheesta on siksi kehitelty niin sanottu kaksivaiheinen esikäsittelymenetelmä. Näin on pyritty parantamaan etanolin kokonaissaantoa. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628).

Inhiboivat tuotteet alentavat fermentointia. Tämän vuoksi on pyritty löytämään korvaavia esikäsittelyaineita. Kuten esimerkiksi rikkihappokylläste on vaihdettu rikkioksidikyllästeeseen. Lopputuotteena saatavat sokerit voivat aiheuttaa myös inhibointia. (Virtanen, 2006). Tätä ongelmaa on pyritty vähentämään käyttämällä matalia kuiva-ainepitoisuuksia sekä SSF-prosessia. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628).

8 ENTSYMAATTISEN HYDROLYYSIN KEHITYS

Entsymaattinen hydrolyysiprosessi kaipaa itsessään vielä kehitystä tulevaisuudessa. Prosessin vaiheita, tulisi saada vähennettyä, jolloin myös energian kulutus ja jätteen määrä vähenisivät. (Virtanen 2006, 19). Tämän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää pystyttäisiinkö esikäsittelyvaihe jättämään pois työskennellessä puupurun kanssa. Etanolin tuotantoa on pyritty yhdistämään erinlaisten laitosten yhteyteen, esimerkiksi sellutehtaan yhteyteen. Myös sähkön ja lämmöntuotantoon olisi helppoa ja taloudellista yhdistää etanolin valmistus. Tuotantolaitosten yhdistäminen voisi alentaa jopa 20 % kustannuksia. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628).

Entsymaattisessa hydrolyysissa tuotannon kannalta ratkaiseva tekijä on entsyymien hinta. Puusta valmistetun etanolin tuotantokustannukset vaihtelevat laajasti. Raaka-aine kustannukset muodostavat n. 25-40 % kustannuksista. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628). Suuri haaste tulevaisuudessa on kehittää entsyymejä parempilaatuisiksi, ja saada entsyymien kustannukset pienemmiksi. Tällä hetkellä kaksi suurinta entsyymien valmistajaa ovat Genencori ja Novozymes. Entsyymejä valmistetaan pääasiassa eri tarkoitukseen kuin hydrolyysiin. (Galbe M & Zacchi 2002, 618-628) Tässä työssä käytettiin Novozymesin tuottamia entsyymejä.

9 UV/VIS SPEKTROMETRI

Spektrometriassa käytetään hyödyksi sähkömagneettisen säteilyn ja tutkittavan aineen välistä vuorovaikutusta, sillä sen avulla saadaan tunnistettua aineita ja määriteltyä pitoisuuksia (Jaarinen & Niiranen 2005,46). Säteilylähde emittoi, eli luovuttaa fotoneja, hiukkasten irrotessa valonnopeudella, tyhjiössä 299 792,5 km/s, ne alkavat värähdellä vakiotajuudella. Fotonin liikkuma matka yhden värähtelyjakson aikana, on aallon pituus. (Törmä 2000, 78).

Aallonpituusalue sähkömagneettisessa säteilyssä on laaja. Ultraviolettisäteily (UV) ja näkyvä valo (Vis) muodostavat yhdessä sähkömagneettisen spektrin, jossa näytteitä voidaan tutkia. UV-säteily ulottuu n. 200 nanometristä 400 nanometriin ja Vis-säteilyn n. 380 nanometristä 770 nanometriin. (Lajunen & Perämäki 2004, 17-8, Saarinen & Lajunen 2004, 181).

Aineen kemiallinen koostumus määrittää sen millä aallon pituudella absorptio tapahtuu. Näytteen absorbanssi ilmaistaan valon imeytymisestä näytteeseen eli absorboitumisesta (Törmä 2000, 81). Absorptio saadaan vähentämällä taustan osuus näytteen absorptiosta. Näyteastian kyvetin pintojen heijastuksista ja näytepohjan absorptiosta muodostuu spektrometrin tausta. Spektrometriassa voidaan käyttää kahta eri tekniikkaa näytteen taustan vähentämiseksi: yksisädelaitetta tai kaksisädelaitetta. Yksisädelaitteella spektrin mittaus on hankalampaa, laitetta käytetään lähinnä näytteen absorbanssin mittaamiseen tietyllä aallonpituudella. Kaksisädelaitte on säteenjakaja, jolla saadaan määritettyä näyteaineen absorboiman säteilyn osuus koko näytteestä (Jaarinen & Niiranen 2005, 55-56; Lajunen & Perämäki 2004, 82-83; Saarinen & Lajunen 2004, 195).

10 KOKEELLINEN OSUUS

Tämä työ koostuu noin puoleksi kokeellisesta osiosta. Kokeet suoritettiin Centria-ammattikorkeakoulun kemianlaboratoriossa. Työ oli jaettu noin neljään eri koeajojärjestelyyn. Näytteitä oli kolmea eri puulajia, jotka olivat koivu, mänty ja kuusi. Kahtena ylimääräisenä koeajona koitettiin myös jauhettua mäntynäytettä ja kuitulietenäytettä, joissa verrattiin näytteen koostumuksen merkitystä tuloksiin.

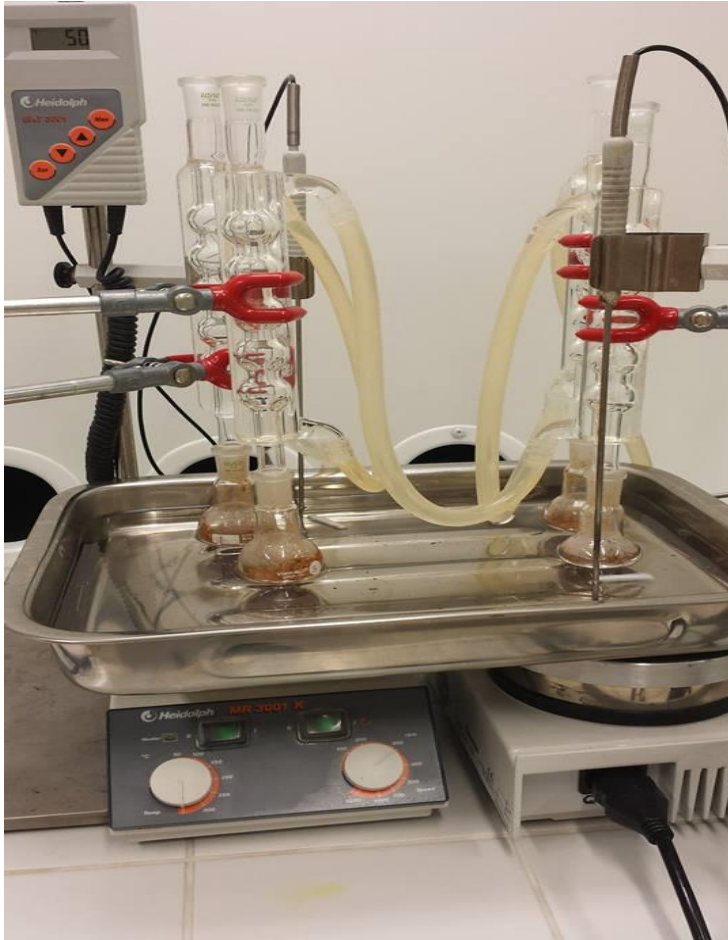
Puupurua on aikaisemminkin tutkittu ja käytetty biopolttoaineen raaka-aineena, ja puupuru on tehokas raaka-aine. Puupurua on yleisesti esikäsitelty eri menetelmin, ennen hydrolyysi vaihetta. Tämän työn kokeellisessa osiossa oli tarkoitus selvittää, kuinka hyvä sokerin saanto voidaan saada ilman esikäsitelyvaihetta. Ilman esikäsitelyvaihetta, säästyisi yksi prosessin vaihe ja tulisi taloudellista säästöä.

Kokeet suoritettiin kolmella eri puunäytteellä ja jauhetulla mäntynäytteellä. Puupurunäytteille suoritettiin samat alkuvalmistelut ja koe suoritettiin viiveaikoja muuttamalla. Lämpötila ja pH pysyivät samana kaikkien kokeiden aikana. Hydrolyysi on nopea reaktio, joten lyhin viiveaika oli 5 min ja pisin viiveaika 90 min.

10.1 Työn suunnittelu

Ensimmäisenä suunniteltiin näytteiden määrä, viiveajat ja optimaalinen lämpötila hydrolyysin kannalta. Entsyymit määrittivät kokeessa käytetyksi lämpötilaksi n.50°C. Tämä on optimaalinen lämpötila, jossa entsyymien vaikutus on tehokkain. pH oli kokeessa 5. Ph:n pysyminen optimaalisessa tilassa varmistettiin puskuriliuoksen avulla. Puskuriliuoksena työssä käytettiin sitruunahappo/natriumsitraatti liuosta. Liuoksen suhde oli 1:2 ja pH oli 5. Hydrolyysi on nopea reaktio, ja siksi viiveajoiksi valittiin 5-90 min. Ensimmäisen puolen tunnin aikana näytteitä otettiin 5min välein. Tämän 30 min :n jälkeen näytteitä otettiin 10min :n välein. Pisimpään ollut näyte otettiin 90 min :n kohdalla. Samat viiveajat, lämpötilat ja pH toistettiin jokaisen puulajinäytteiden kohdalla.

Työ toteutettiin pienessä mittakaavassa haudelaitteistossa koulun laboratoriossa (KUVIO 10). Laitteisto koostui öljyhauteesta, kahdesta keittolevystä, neljästä kolvista ja jäähdytysputkista. Lämpötilaa tarkkailtiin mittaristojen avulla.



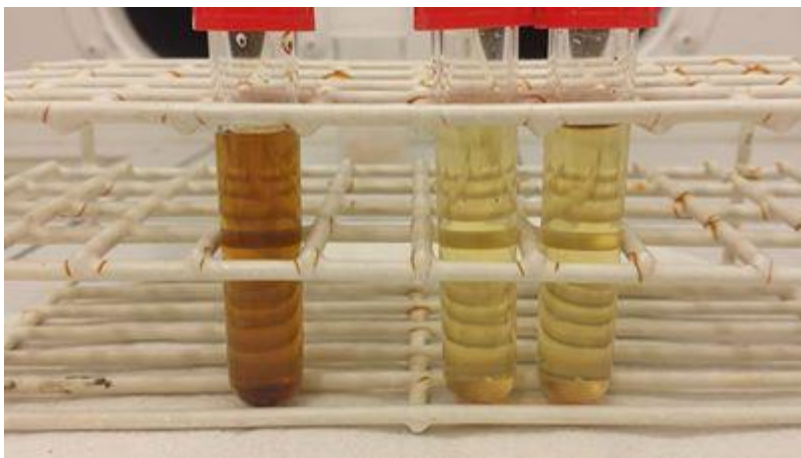
KUVIO 10. Hydrolyysin koelaitteisto

Hydrolyysireaktion jälkeen näytteet jatkokäsiteltiin. Lopulliset näytteet analysoitiin UV-spektrometrin avulla ja saaduista tuloksista laskettiin sokerin kokonaissaanto.

10.2 Työn toteutus

Näytteet valittiin ruotsalaisen yrityksen toimittamista purunäytteistä, koivu (12B7), mänty (8T1) ja kuusi (12G1). Puupuraa punnittiin 50 mg haihdutuskolviin. Kolviin lisättiin n. 4950 μl puskuriliuosta (natriumsitraatti/sitruunahappo), sekä entsyymit: 50 μl selluloosi sekoitusta endo- ja eksoglukanaaseja (NS22086) ja 6 μl β -glukoosia (NS22118). Molemmat entsyymit ovat Novozymes in (tanska) valmistamia valmisteita. NS22086 sekoitus sisältää β -1,4-glukanaasia, exo- β -1,4-glukanaasia ja β -glukanaasia. Sellulaasientsyymiseosta käytetään edistämään jakautumista selluloosamateriaalista glukoosiksi. Endo-, β -1,4-glukoosi pilkkoo sattumanvaraisesti rakenteen keskeltä selluloosaketjua vaihtaen ja antaen lyhyempiä sellodekstriinejä. Glukaanit toimivat selluloosaketjun lopussa, tuloksena on sellubioosin reaktiotuote. Lisäksi β -glukosidaasi hydrolysoi sellubioosia ja tuottaa glukoosia reaktiotuotteena.

Kolvit asetettiin haudelaitteistoon ja katsottiin haluttu viiveaika. Halutun viiveajan jälkeen näytteet otettiin hauteesta ja kolvista otettiin n. 1 ml näytettä koeputkeen. Hydrolyysin jälkeen on nopeasti pysäytettävä entsyymien vaikutus. Tämäpysäyttäminen tapahtui upottamalla näytekoeputket kiehuvaan veteen n. 5 min:n ajaksi. Näytettä otettiin 50 μl koeputkeen, sekä 250 μl tislattua vettä ja näytteeseen lisättiin 300 μl DNS reagenssia. Koeputki laitettiin uudestaan kiehuvaan veteen n.5 min: n ajaksi. Näyte jäähdytettiin tämän jälkeen juoksevan vesihanalla, jonka jälkeen näytteeseen lisättiin 2,4 ml tislattua vettä. (KUVIO 11)



KUVIO 11. Hydrolyysin jälkeen valmiit näytteet.

Hydrolyysin jälkeen saadut näytteet analysoitiin UV-spektrometrian avulla. Saadut tulokset UV:n avulla ovat tarpeeksi tarkkoja tämän työn kohdalla. Aallonpituutena käytettiin 540 nm. Lopullinen sokerin saanto laskettiin seuraavan kaavan avulla.

$$\text{Sokerin saanto (\%)} = \frac{\text{Sokerin paino}}{\text{Puupurun paino}} \times 100$$

Tuloksista piirrettiin Excel-ohjelman avulla kuvaajat, joista sokerinsaanto tulokset ovat helpommin luettavissa. Näytteitä tehtiin jokaista puunäytettä kohden 12 kpl. Koe suoritettiin useamman kerran samoilla ajoilla, samoille puunäytteelle, jotta tulokset olisivat varmoja.

11 TULOKSET JA NIIDEN ARVIOINTI

Tulokset taulukoitiin Excelin avulla (TAULUKOT 2,3,4,5 ja 6) ja laskettiin kokonaissokerinsaannon määrä prosentteina. Jokaisen puulajin tuloksista tehtiin kuvaajat (KUVIOT 12, 13 ja 14) jotka ovat modifoituja. Lopuksi vertailtiin kaikkien puulajien kuvaajia keskenään (KUVIO 15). Ylimääräisinä näytteinä olivat kuivattu kuitulietenäyte (KUVIO 18), sekä puupurusta jauhettu mäntynäyte (KUVIO 16). Kaikki sokerinsaannot on laskettu edellä esitetyn kaavan mukaan.

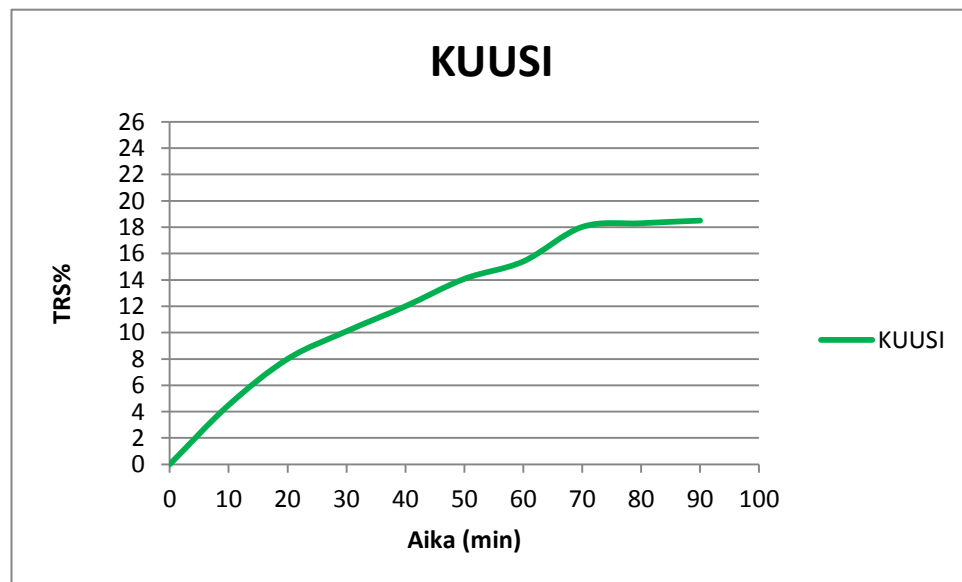
Esimerkkilasku: Otetaan esimerkiksi kuusipurunäyte, jonka viipymä aika oli 10 min hydrolyysiprosessissa. Alkupaino näytteellä oli 52,4 mg. Lasketaan Sokerinsaantoprosentti TRS % kaavan mukaan.

$$(0,078 \times 6 \times 5) / 52,4 \text{ mg} \times 100 = 4,465649 \%$$

UV/Vis-spektrometriasta saatu konsentraatiotulos (0,078) kerrottiin 6 :lla, joka saatiin laskusta (300 µl / 50 µl = 6). Tämä tulos kerrottiin vielä näytteen alkuperäisellä kokonaismäärällä eli 5 ml (4,95 ml puskuria + 50 µl entsyymiä (NS22086) + 5µl entsyymi (NS22118) = 5 ml). Kertolaskun tulos jaettiin näytteen painolla 52,4 mg ja tulos kerrottiin 100: lla jotta saatiin prosentteina vastaus.

TAULUKKO 2. Kuusi-puru näyte

Aika (min)	Paino mg	Kons. mol/dm ³	TRS	%
10	52,4	0,078	0,044656	4,465649
15	52,3	0,14	0,080306	8,030593
20	50,9	0,173	0,101965	10,19646
25	53,4	0,135	0,075843	7,58427
30	50,8	0,141	0,083268	8,326772
40	52,2	0,245	0,140805	14,08046
50	52	0,267	0,154038	15,40385
60	50,43	0,303	0,18025	18,02499
70	54,9	0,255	0,139344	13,93443
80	53,7	0,277	0,154749	15,47486
90	53,9	0,278	0,154731	15,4731

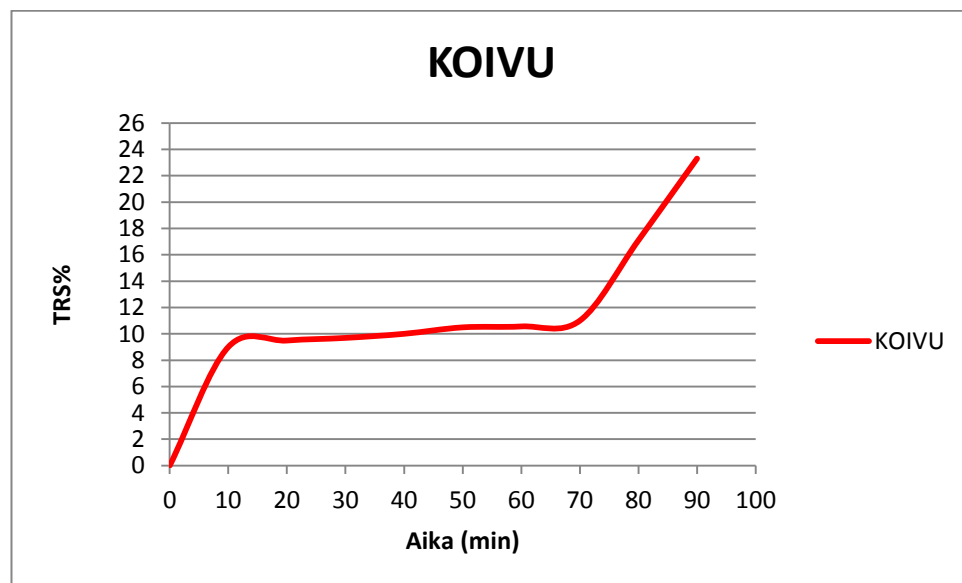


KUVIO 12. Kuusi-puru näyte

Kuviosta 12 voi suoraan lukea että korkein sokerin saanto oli korkeimmillaan 60 min:n kohdalla, jolloin saanto oli 18,02%. Suora on tasaisesti nouseva niin kuin teoriassa oletettiin.

TAULUKKO 3. Koivupurunäyte

Aika (min)	Paino mg	Kons. mol/dm ³	TRS	%
10	51	0,153	0,09	9
20	52,1	0,149	0,085797	8,579655
30	49,5	0,16	0,09697	9,69697
40	50,5	0,184	0,109307	10,93069
50	50,3	0,176	0,10497	10,49702
60	51,1	0,18	0,105675	10,56751
70	50,7	0,186	0,110059	11,00592
80	50	0,285	0,171	17,1
90	50,2	0,3885	0,232171	23,21713

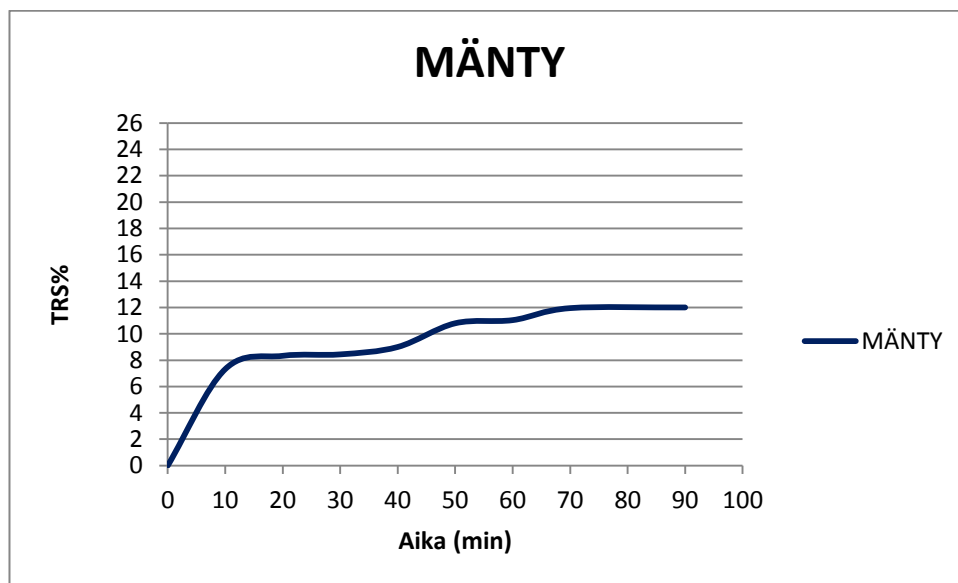


KUVIO 13. Koivupurunäyte

Kuviosta 3 voi lukea, koivun sokerin korkein saanto oli 90 min:n kohdalla, jolloin saanto oli 23,2 %. Kuviosta voi huomata selvän jyrkän nousun 70-90 min aikana.

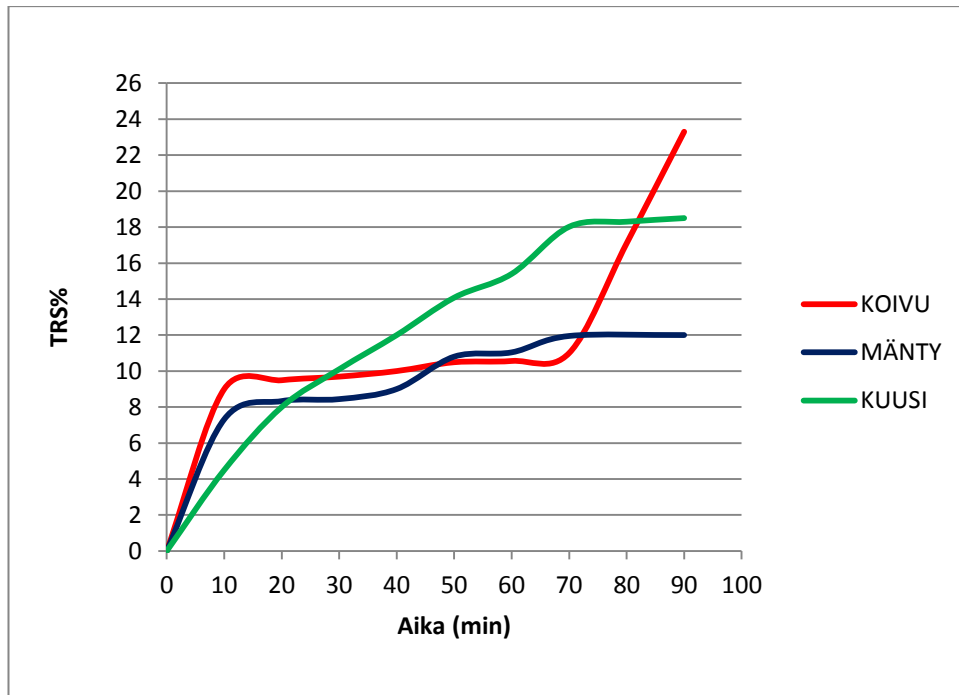
TAULUKKO 4. Mäntypurunäyte

Aika(min)	Paino mg	Kons. mol/dm ³	TRS	%
10	50,8	0,124	0,073228	7,322835
20	50,7	0,143	0,084615	8,461538
25	51,8	0,144	0,083398	8,339768
30	52,6	0,145	0,0827	8,269962
40	50,3	0,181	0,107952	10,79523
50	50,8	0,187	0,110433	11,04331
60	50,2	0,2	0,119522	11,95219
70	50,8	0,169	0,099803	9,980315
90	51,5	0,19	0,11068	11,06796



KUVIO 14. Mäntypurunäyte

Kuviosta 14 voidaan suoraan lukea, männyn korkein sokerin saanto oli 60 min:n kohdalla, noin 11,95%. Mänty näytteessä oli mukana puun kuorta, joka voi vaikuttaa tuloksiin, ulkoisten kiintoaineiden vuoksi, esimerkiksi hiekan.

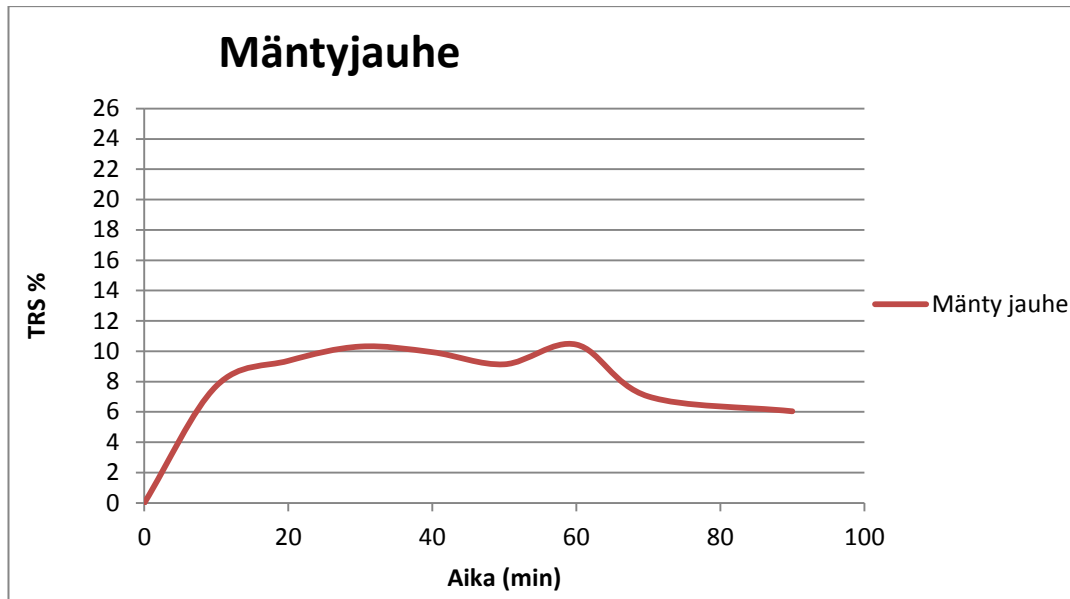


KUVIO 15. Kuusi-, mänty- ja koivupurunäytteiden vertailua.

Kuviosta 15 voidaan hyvin nähdä, että kuusi näytteet ovat antaneet parhaimpia tuloksia jo 30min:n jälkeen. Mäntynäytteiden tulokset olivat tasaisimmat, ja koivu näytteet tekivät selvän jyrkän nousun 70 min:n kohdalla. Lehtipuut ovat rakenteeltaan hankalampia hydrolysoitavia kuin havupuut.

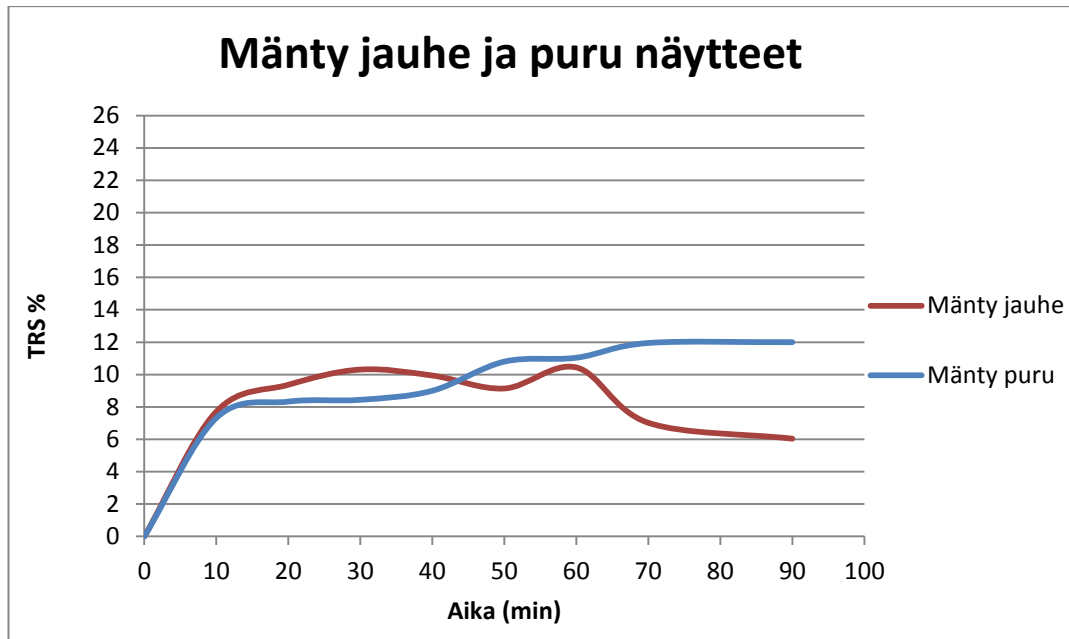
TAULUKKO 5. Mäntyjauhenäyte.

Aika (min)	Paino (mg)	Kons. mol/dm ³	TRS	%
10	53,3	0,137	0,077111	7,711069
20	53,1	0,166	0,093785	9,378531
30	54,1	0,186	0,103142	10,31423
40	52,2	0,173	0,099425	9,942529
50	53,5	0,163	0,091402	9,140187
60	53,4	0,186	0,104494	10,44944
75	51,6	0,124	0,072093	7,209302
90	53,1	0,107	0,060452	6,045198



KUVIO 16. Mäntyjauhenäyte

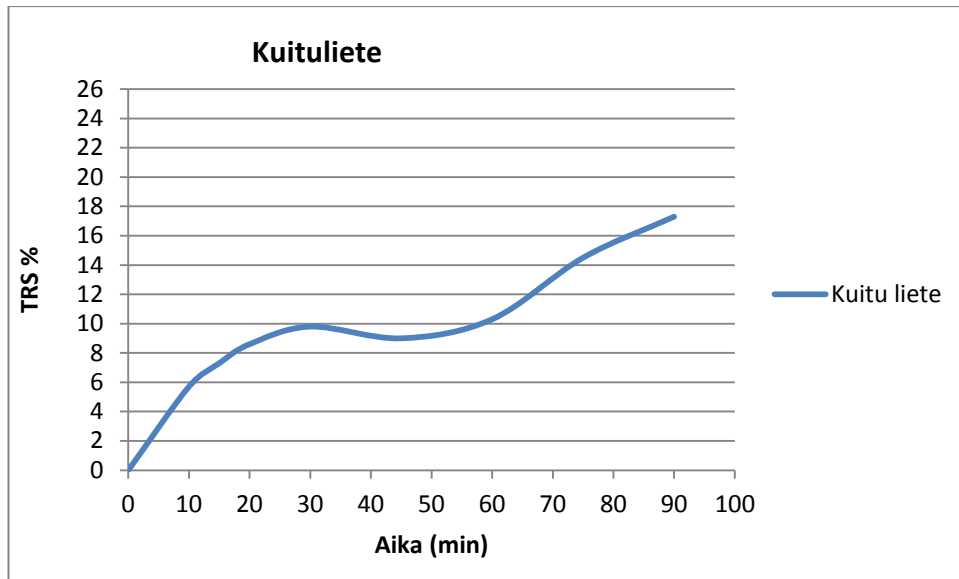
Kuviosta 16 voidaan lukea että, jauhetun mäntynäytteen korkein sokerinsaanto 60 min:n kohdalla, 10,44 %. Jauhe näytteen saannon odotettiin olevan purunäytettä korkeampi. Myös yllättävä jyrkkä lasku 70-90 min:n kohdalla on epätodennäköinen, joten on varmaa että prosessissa on tapahtunut virhe. Verrataan mäntyjauheen ja purun näytettä toisiinsa. (KUVIO 17). Huomataan että, jauheen pinta-ala on suurempi jonka vuoksi TRS-saantojenkin täytyisi olla suuremmat. Kaaviosta voidaan päätellä, prosessissa tapahtuneen virhe n. 50 min:n kohdalla, jonka jälkeen saadut tulokset jauhenäytteestä ovat huonommat kuin purunäytteestä saadut. Jauhenäyte koe suoritettiin ainoastaan yhden kerran, vähäisen näytteen vuoksi.



KUVIO 17. Mäntynäytteiden vertailu.

TAULUKKO 6. Kuitulietenäyte.

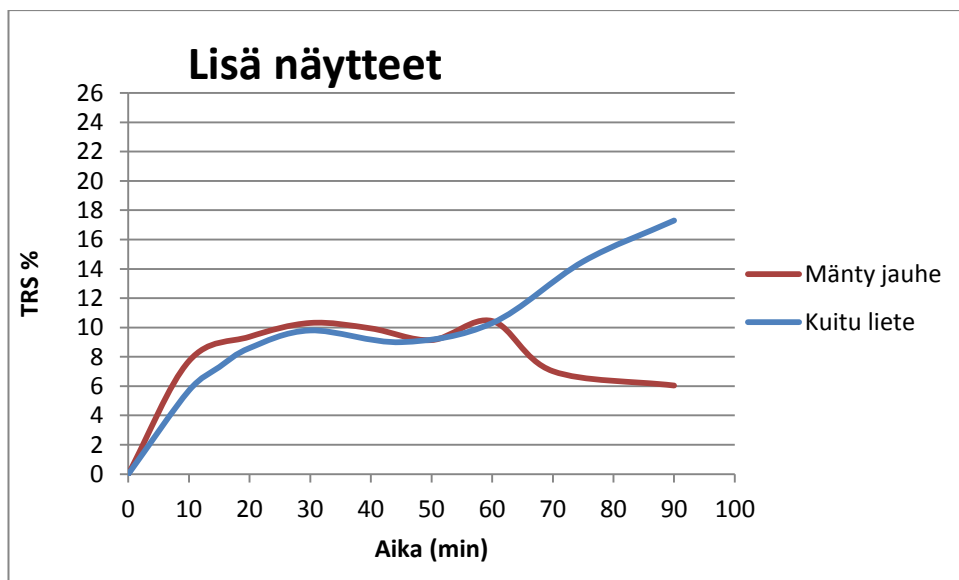
Kons. mol/dm ³	m (mg)	aika (min)	%
0,099	51,5	15	0,05767
0,169	51,6	30	0,098256
0,13	52,8	20	0,073864
0,146	50,4	10	0,086905
0,156	52	45	0,09
0,251	51,8	60	0,145367
0,175	50,6	75	0,103755
0,292	50,6	90	0,173123



KUVIO 18. Kuitulietenäyte.

Kuviosta 18 voidaan lukea, että kuivatun kuitulietteen korkein sokerinsaanto on 90 min :n kohdalla, 17,3 %. Suora on tasaisesti nouseva. Saannot olivat teoreettisesti odotettavissa.

Lisä näytteiden vertailua:



KUVIO 19. Kuitulietteen ja mäntyjauheen vertailu.

Kuviosta 19 näkyy hyvin kuinka jauhettun mäntynäytteen tulokset ovat verrattavissa kuitulietenäytteen käyrään. Näytteiden arvot ovat hyvin lähellä toisiaa. Mäntynäytteen jyrkkä lasku 70-90 min:n kohdalla johtuu todennäköisesti prosessissa tapahtuneesta virheestä. Näin voidaan päätellä että onnistuneessa kokeessa tulokset olisivat samaa luokkaa kuin kuitulietteessä 70-90 min:n kohdalla.

Kuituliete on niin sanottu ligniinihöyhä näyte. Kuitulietteen TRS-saantojen pitäisi siis teoriassa olla korkeammat kuin jauhenäytteen, jossa hydrolyysia hankaloittaa ligniinin tiukka sidosrakenne. Tässä kokeessa jauhenäytteen korkeammat saannot, voivat johtua prosessista. Jauhe oli erittäin hienoksi hienonnettua, joten todennäköisesti jauhetta on ollut mukana kiintoaineena vielä näytteessä kun sitä on ajettu UV/VIS-laitteistolla, jolloin saannot ovat korkeammat. Näytteiden valmistamisessa oli haasteena näyteputkiloihin kertynyt sakka (KUVIO 20).



KUVIO 20. Sakkaa näyteputkilon pohjalla

12 LOPPUPÄÄTELMÄT

Teoriaosuuden pohjalta voidaan päätellä, että puupurusta saadaan irrotettua sokereita jatkojalostusta varten. Kokeellisessa osiossa prosessi onnistui ja saantojen suuruus oli samaa luokkaa kuin oletettavissa oli. Yllättävintä tuloksissa oli, että kuusi- ja koivunäytteet antoivat paremmat tulokset kuin mäntypurunäyte.

Hydrolyysiprosessi onnistui esikäsittelmättömälle puupurunäytteille, näillä kahdella käytettävissä olevalla entsyymeillä. Sokerin saanto oli sitä, mitä lähtötietojen perusteella oli odotettavissakin. Sahalla jätteenä jäävää puupurua voidaan siis hyvin käyttää tulevaisuudessa biopolttoaineen raaka-aineena. Kokeellisessa osiossa vertailtiin myös kahta ylimääräistä näytettä, kuitulietettä ja jauhattua mäntynäytettä. Myös nämä molemmat soveltuisivat hyvin biopolttoaineen raaka-aineeksi. Esikäsittelyvaihe takaisin todennäköisesti vielä paremmat saannit, ja prosessista tulisi taloudellisempi sekä tehokkaampi. Kuitulietettä on tutkittu myös esikäsiteltyinä. (Holm 2013). Näissä tutkimuksissa saatiin erittäin hyviä tuloksia, joten todennäköisesti esikäsittelyvaihe takaisi puupurunäytteistäkin vielä paremmat saantitulokset.

Kokeellisen osion tuloksien vaihtelevuuteen vaikuttavat myös monet ulkoiset tekijät. Centria-ammattikorkeakoulun laboratoriolaitteistot eivät aina toimineet, kuten pitäisi. Kyvettien pinnat olivat tosi naarmuisia ja likaisia, mikä johti osin virheellisiin tuloksiin. Kokeita toistettiin useamman kerran, jotta saataisiin todenmukaiset tulokset. Tähän työhön on poimittu vain keskimääräisistä tuloksista lasketut arvot, joiden uskottiin olevan lähimpänä todellisuutta. Itse prosessivaiheessa tuotti hankaluuksia puupuru. Hydrolyysin jälkeen näytettä ottaessa pipettiin nousi mukaan välillä myös puupurua. Puupuru aiheutti ylimääräistä sakkaa näyteputkilon pohjalle (KUVIO 20). Sakkaa on voinut todennäköisesti kulkeutua myös lopullisiin näytteisiin, jotka ajettiin UV-spektrometrilla. Tulevaisuudessa kokeellisessa osiossa tutkittaessa puupurunäytteitä, voisi testata suodattaa näytteet, jotta sakka ei aiheuttaisi viallisia tuloksia. Suodattamisessa on vain vaarana, että sokeria jää myös suodatinpaperiin.

LÄHTEET

Alén, R. 2000. Structure and chemical composition of biomass. Toimittanut Alén R. Biorefining of forest resources. Papermaking science and technology. Paper engineer's association/ paperi ja puu Oy.

Appl Microbiol Biotechnol. mini review. Www-dokumentti. Saatavissa:
http://cepac.cheme.cmu.edu/pasi2008/slides/stuart/library/reading/Review_production_ethanol_from_softwood.pdf

Luettu 28.3.2014

Fiber clay Www-dokumentti saatavissa:

<http://www.balticdeal.eu/measure/fiber-clay/>

Luettu 28.5.2014

Galbe, M.& Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology and Biotechnology

Energy gov Www-dokumentti. Saatavissa:

<http://energy.gov/eere/office-energy-efficiency-renewable-energy>

Luettu 4.4.2014

Holm J , 2013. Catalytic pretreatment and hydrolysis of fibre sludge into reducing sugars. University of Oulu.

Isotalo, K.. 2004. Puu- ja sellukemia, 2. painos, Hakapaino Oy. Helsinki.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. uusittu painos. Helsinki: Edita Publishing Oy

Kaipainen, M, 2003. Männyn, kuusen ja koivun kemiallinen koostumus, Pro gradu - tutkielma, Jyväskylän yliopisto, Kemian laitos, Soveltavan kemian osasto

Lajunen ja Perämäki 2004, Spectrochemical Analysis by Atomic, Absorption and Emission. Royal society of chemistry.

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

Saarinen, H. & Lajunen, L.H.J. 2004. Analyyttisen kemian perusteet. 4. painos. Oulun yliopisto

Stenberg, K., Bollók, M., Réczey, K.,Galge, M & Zacchi,. G.2000. Effect of Substrate Concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Softwood for Ethanol Production. Biotechnology and Bioengineering

Törmä, A. 2000. Fotometri – yhä olennainen osa kliinistä laboratoriota. Moodi 24.

Vanninen 2009. Tyypillisten biomassamateriaalien kemiallinen koostumus. Jyväskylän yliopisto. Soveltavan kemian osasto.

Virtanen Suvi 2006. Lignoselluloosan hydrolyysi. Lappeenranta-tekniillinen yliopisto. Kemiantelekniiikan osasto.

Viikari, L. & Alén, R. 2011. Biochemical and Chemical Conversion of Forest Biomass. Toimittanut Alén, R. Biorefining of Forest Resources. Papermaking Science and Technology. Paper Engineer's Association/Paperi ja Puu Oy.