

Ville Aspegren

KÄYMISKELPOISTA SOKERIA HYÖTYJÄTTEISTÄ

**Opinnäytetyö
CENTRIA-AMMATTIKORKEAKOULU
Kemiantekniikan koulutusohjelma
Huhtikuu 2018**

TIIVISTELMÄ OPINNÄYTETYÖSTÄ

Yksikkö Tekniikan ja liiketalouden yksikkö	Aika Huhtikuu 2018	Tekijä/tekijät Ville Aspegren
Koulutusohjelma Kemiantekniikka		
Työn nimi KÄYMISKELPOISTA SOKERIA HYÖTYJÄTTEISTÄ		
Työn ohjaaja Jana Holm	Sivumäärä 33	
Työelämäohjaaja		
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli tutkia sahanpurun sekä perunankuorimassan hyödyntämistä käymiskelpoisen sokerin tuotannossa. Kumpaakin hyötyjätettä yhdistävät niiden roolit tuotantoprosessissa, sillä molemmat voidaan mieltää sivuvirraksi varsinaisen tuotteen valmistuksessa. Näin ollen kumpikin aine voisi toimia raaka-aineena esimerkiksi sokerin tuotannossa sekä myöhemmin bioetanolin valmistuksessa.</p> <p>Kokeellisen osuuden suoritin Centrian tutkimuslaboratoriossa Kokkolassa. Tutkimuksessa selvitin, kuinka erilaiset entsyymipitoisuudet vaikuttavat sokerin saantiin. Lisäksi tutkin, kuinka iso merkitys esikäsitteilyllä on lignoselluloosapohjaiselle sahanpurulle. Laboratoriotyössä käytin Novozymesin valmistamia entsyymejä, joita olivat sellulaasikompleksi, β-glukosidaasi sekä glykoamylaasi. Näytteet tutkittiin UV/VIS-spektrofotometrillä, sekä laskettiin TRS-saannot.</p> <p>Tutkimuksessa huomattiin selkeä eroavaisuus saatujen sokerien määrissä. Suurimmat sokeripitoisuudet sahanpurulle saatiin 50 μl sellulaasikompleksin sekä 6 μl β-glukosidaasin yhdistelmällä. Perunankuorella sokeripitoisuus nousi lähes lineaarisesti entsyymimäärän funktiolla. Suurimmalla koeannostelulla, eli 7 μl glykoamylaasientsyymillä päästiin korkeimpaan sokeripitoisuuteen kuorinäytteistä.</p>		

Asiasanat

Ligniini, selluloosa, hemiselluloosa, entsyymi, hydrolyysi, ionineste, glukoosi

ABSTRACT

Centria University of Applied Sciences	Date April 2018	Author/s Ville Aspegren
Degree programme Degree Programme in Chemical Engineering		
Name of thesis FERMENTABLE SUGAR FROM RECOVERABLE WASTE		
Instructor Jana Holm	Pages 33	
Supervisor		
<p>The aim of this thesis was to examine the ability of sawdust and potato peels to serve as reagent for sugar production. Both recoverable waste are connected by their roles in the field of manufacturing processes, since they can be labelled as a side flow in the main production process. Therefore these substances could be used as raw material for example in making sugar and subsequently in the production of bioethanol.</p> <p>The experimental part of this thesis was conducted in the research laboratory of Centria University of Applied Sciences in Kokkola. The goal of the research was to investigate how different amounts of enzyme affect the final sugar yield. The pretreatment of the lignocellulosic sawdust was also investigated during the experiment. The enzymes used during this experiment were cellulosic complex, β-glucosidase and glucoamylase by Novozymes. Samples were examined by using UV/VIS-spectroscopy and the TRS yield was then counted.</p> <p>Sugar fields were completely different with varied enzyme concentrations. The highest sugar yield for the sawdust was measured by using 50 μl cellulase complex together with 6 μl β-glucosidase. The sugar yield of potato peels rose almost linearly with the function of the enzyme concentration. The highest sugar yield from potato peel sample was measured with 7 μl glucoamylase enzyme added to the solution.</p>		

Key words

Lignin, cellulose, hemicellulose, enzyme, hydrolysis, ionic liquid, glucose

KÄSITTEIDEN MÄÄRITTELY

Entsyymit	Proteiineja, joiden tehtävänä on nopeuttaa kemiallista reaktiota. Biologisia katalyyttejä
Glukoosi	Yleinen sokerityyppi, rypälesokeri
Selluloosa	Kasvien soluseinässä rakenneaineena oleva hiilihydraatti
Ioninen neste	Orgaanista anionia sekä epäorgaanista kationia sisältävä neste
DNS-reagenssi	3,5-dinitrosalisyylihappo, joka reagoi pelkistävien sokerien kanssa muodostaen 3-amino-5-nitrosalisyyli happoa.
Aktivaatioenergia	Reaktion tapahtumiseen vaadittava minimi energiamäärä
Polypeptidi	15-50 aminohappotähteestä koostuva molekyyli
DP	Polymerisaatioaste, jolla kuvataan monomeeriyksiköiden lukumäärää molekyylissä.

**TIIVISTELMÄ
ABSTRACT
KÄSITTEIDEN MÄÄRITTELY
SISÄLLYS**

1 JOHDANTO	1
2 BIOETANOLI – ASKEL TULEVAISUUTEEN	2
2.1 Bioetanolin määritelmä	2
2.2 Bioetanolin käyttökohteet	3
2.3 Bioetanolin ympäristövaikutukset	4
2.4 Bioetanolin tulevaisuus	5
3 LIGNOSELLULOOSA	6
3.1 Selluloosa	6
3.2 Hemiselluloosa	7
3.3 Ligniini	8
4 PERUNANKUOREN JA SAHANPURUN RAKENTEET	10
4.1 Perunankuoren kemiallinen koostumus	10
4.2 Sahanpurun kemiallinen koostumus	11
5 ENTSYMAATTINEN HYDROLYYSI	12
5.1 Entsyymit	12
5.1.1 Sellulaasi	13
5.1.2 Amylaasi	13
5.2 Entsyymien hydrolyysireaktio	14
6 IONINEN NESTE	15
7 SPEKTROMETRINEN ANALYTIikka	16
7.1 Spektrometria käyttökohteena	16
7.2 UV/VIS-spektrofotometria	17
8 KOKEELLINEN OSUUS	18
8.1 Sahanpurun kokeet	21
8.2 Perunankuoren kokeet	25
8.3 DNS-reagenssin valmistelu	26
8.4 UV/VIS-spektrometrin analyysi	27
9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU	28
10 POHDINTA	33
LÄHTEET	34

KUVIOT

KUVIO 1. Etanolin kemiallinen koostumus	3
KUVIO 2. Selluloosamolekyylin kemiallinen koostumus	7
KUVIO 3. Amyloosin sekä amylopektiinin rakenteet	11
KUVIO 4. Entsyymien toiminta substraatin kanssa	13
KUVIO 5. UV/VIS-spektrofotometrin toimintaperiaate	17
KUVIO 6. Sokeripitoisuus sahanpurunäytteissä graafisesti esitettynä	29
KUVIO 7. Sokeripitoisuus perunankuorinäytteissä graafisesti esitettynä	29

KUVAT

KUVA 1. EflexFuel asennussarja	4
KUVA 2. Kuoritut Annabelle-perunat	18
KUVA 3. Kokeessa käytetyt raaka-aineet	19
KUVA 4. Kokeessa käytetty laitteisto	19
KUVA 5. Työympäristö	22
KUVA 6. Sahanpuru esikäsitelty [BMIM]Cl-liuoksella	23
KUVA 7. Kolvissa tapahtuva entsyymattainen hydrolyysireaktio	24
KUVA 8. Hydrolyysin jälkeinen näytteen suodatus	24
KUVA 9. DNS-reagenssin valmistus	26
KUVA 10. Näytteet valmiina UV/VIS-spektrofotometriaa varten	27

TAULUKOT

TAULUKKO 1. Hemiselluloosan monosakkaridiyksiköitä	8
TAULUKKO 2. Sahanpurun näytteiden lyhenteet ja entsyymimäärät	20
TAULUKKO 3. Perunankuoren näytteiden lyhenteet sekä entsyymimäärät	20
TAULUKKO 4. Sahanpurun tulokset	28
TAULUKKO 5. Perunankuoren tulokset	28
TAULUKKO 6. Sahanpurunäytteiden TRS-pitoisuus	30
TAULUKKO 7. Perunankuorinäytteiden TRS-pitoisuus	31

1 JOHDANTO

Teknologian kehittymisen sekä Euroopan Unionin antamien direktiivien myötä erilaiset biopohjaiset polttoaineet ovat nousseet ajankohtaisiksi puheenaiheiksi. EU:n asettaman direktiivin 2009/28/EY mukaan vuoteen 2020 mennessä velvoitetaan jäsenmaissa käytettävän energian alkuperän olevan 20-prosenttisesti bioenergiasta koostuva sekä vastaavasti liikennepolttoaineissa 10 prosentin luokkaa. Tästä uudistuksesta hyvänä esimerkkinä on Suomen valtion tavoite saada liikennepolttoaineissa esiintyvän uusiutuvan energian määräksi jopa 20 prosenttiosuutta vuoteen 2020 mennessä (EU:n direktiivi 2009/28/EY). Tällä uudistuksella tavoitellaan merkittävää hiilidioksidipäästöjen vähentämistä. Lisäksi valtiollisesti tarkasteltuna sen odotetaan olevan askeleen edelläkävijän roolissa liikenteestä aiheutuvien päästöjen minimoimisessa. Tästä syystä päätinkin tutkia, miten entsyymeillä voidaan tuottaa biomassasta käymiskelpoista sokeria ja siitä edelleen bioetanolia.

Tätä opinnäytetyötä varten valitsin raaka-aineiksi sahoilta kertyvän, pienen partikkelikoon sahanpurun sekä perunoiden käsittelyssä syntyvän perunankuorimassan. Molempia aineita yhdistävät niiden funktiot prosessissa, sillä ne voidaan mieltää sivuvirraksi. Näin ollen raaka-aine valintani on eettisestikin tarkasteltuna hyvä, sillä tutkin lisäksi jättemateriaalien kelpoisuutta uudelleenkierrätykseen. Sahanpurumateriaalin kokeellista osuutta varten sain Haapaveden Hasa Oy:ltä ja perunankuorimassan Oulusta Luonnosta Oy:ltä.

Kokeellisessa osuudessa tutkin entsyymaattista hydrolyysia prosessina erilaisilla entsyymimäärillä sekä saatuja sokeripitoisuuksia UV/VIS-spektrofotometrillä analysoituna. Entsyymit ovat Novozymes- valmistajalta selluloosan etanolituotannon sarjasta.

2 BIOETANOLI – ASKEL TULEVAISUUTEEN

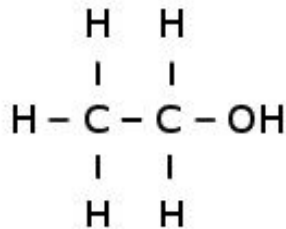
Fossiilisten energialähteiden merkitys yhteiskunnassamme on vielä hyvin suurta, mutta katseemme ovat pikku hiljaa suuntautuneet yhä enemmän bioenergian puolelle. Maailmassa jatkuvasti vähentyvät öljyvarat, kiristyvät uusiutumattomien polttoaineiden verotukset sekä kasvihuonekaasuilmio ovat ajaneet tilanteeseen, jossa ainoana ratkaisuna on antaa isompaa roolia uusiutuvien energialähteiden puolelle. Nykyinen länsimaalainen elämäntyyli on hyvin ison hiilijalanjäljen omaavaa, varsinkin harvaan asutussa, sekä huomattavassa fossiilisten polttoaineiden kulutuksen maissa kuten Suomessa.

Norjan teknillis-luonnontieteellisen yliopiston tekemän tutkimuksen mukaan Suomi sijoittui valitettavan korkealle sijalle Euroopan alueen hiilijalanjälkien mittauksessa tehdyssä tutkimuksessa. Sen mukaan häntäpäätä hallitsivat pikkuruinen Kanariansaaret, kun taas kärkisijalle päätyi lounasrannikolla oleva Ahvenanmaa. Korkeaan sijoitukseen vaikuttavat Suomen ilmaston vaatima suuri lämmitykseen käytettävä sähkön tarve, polttoaineen kulutus sekä asumisjärjestelyt. Suomessa asutaan suurissa asunnoissa, mutta kotitalouksissa ei välttämättä ole montaa asujaa. (IOP Science 2018.) Erilaisten tutkimustulosten vuoksi Suomi todennäköisesti haluaakin osoittaa kykenevänsä olemaan aikansa edelläkävijä etanolipitoisissa liikennepolttoaineissa, ja näin ollen tavoitteena parantaa mainettaan hiilidioksidipäästöjen osalta. Seuraavassa luvussa tarkastellaan, mitä bioetanoli edustaa uusiutuvan energian saralla.

2.1 Bioetanolin määritelmä

Bioetanolilla tarkoitetaan etanolia, jonka tuotanto perustuu mikrobiologiseen fermentointiprosessiin. Perinteiseen etanoliin verrattuna bioetanoli eroaa juurikin uusiutuvien sokeri- sekä tärkkelyspitoisten raaka-aineidensa vuoksi. Raaka-aineina prosessissa käytetään ohraa, riisiä, perunaa, kauraa, maissia, sokeriruokoa sekä sokerijuurikasta. Myös erilaiset biomassat, kuten sahaake sekä biojäte soveltuvat hyvin bioetanolin valmistukseen. Suurimmat liikennekäyttöön tarkoitetun bioetanolin tuottajamaat ovat Yhdysvallat sekä Brasilia, jotka hallitsevat yli 70 % maailman bioetanolin tuotannosta. (Walker 2010, 9–32.)

Fysikaalisilta ominaisuuksiltaan etanolilla on suhteellisen alhainen kiehumispiste 78,5 °C sekä matala jäätymispiste -117 °C. Etanolin leimahduspiste on 12,8 °C, jolla tarkoitetaan alinta lämpötilaa, missä NTP-olosuhteissa muodostuu nestepinnan päälle hyöryjä muodostaen yhdessä ilman kanssa palavan kaasuseoksen. (Walker 2010, 9–14.) NTP-olosuhteilla tarkoitetaan normaalilämpötilaa sekä painetta, joita hyödynnetään fysikaaliskemiallisten prosessien mittauksessa ja laskemisessa. NIST-järjestön määrittelemiä vallitsevia olosuhteita ilmakehässä normaalilämpötilassa ovat 20 °C (293,15K) ja ilmanpaine 1 atm (101 325 Pa) (Wright, Johnson & Moldover 2003.) Etanolin alhaisen leimahduspisteen takia se vaatiikin huomiota logistiikan sekä varastoinnin suhteen.



KUVIO 1. Etanolin kemiallinen koostumus

2.2 Bioetanolin käyttökohteet

Bioetanolin suurin käyttökohde on seosaineena polttoaineissa, sillä etanolilla on korkea puristussuhde, joka tekee siitä hyödyllisen komponentin oktaanien riittävyyden takaamiseksi. Erilaisia maailmalla yleisesti käytettäviä seossuhteita ovat Yhdysvaltojen E10-, Brasilian E70-E85 – sekä Euroopan E85- ja E100-polttoaineet. Etanolipitoisissa polttoaineissa nimessä esiintyy E-kirjain ja tämän jälkeen numeroina seoksen etanolipitoisuus. (Walker, 2010, 10.) Suomessa on käytössä 95 E10-bensiini, joka sisältää 10 tilavuusprosenttia etanolia, sekä 90 prosenttia bensiiniä. Brasiliassa autoista lähes 20 % sekä osa pienlentokoneista pystyy hyödyntämään täysin uusiutuvaa E100-polttoainetta, joka sopii niin flex fuel – kuin etanolikäyttöisille moottoreille (Walker 2010, 10).

Etanolilla on myös negatiivisia vaikutuksia moottorin suhteen tietyn pisteen ylittyessä, sillä liian suuri etanolipitoisuus bensiinin seassa aiheuttaa kylmäkäynnistysongelmia. Tämä voidaan selittää sillä, että etanoli tarvitsee enemmän lämpöä höyrystyäkseen kuin bensiini. Nykyisellä 10-tilavuusprosentin määrällä näitä käynnistysongelmia ei vielä huomaa, mutta pitoisuuden kasvaessa vaatii moottori flex fuel-asennussarjaa. Tämän toimintaperiaattena on laitteen automaattinen E85-polttoaineen määrän ruiskutus moottorin palotilaan. Laite hyödyntää etanolianturia ja näin ollen pystyy toimimaan täysin automaattisesti. Anturi mittaa auton tankista etanolipitoisuutta ja säätelee kulutusta. E85-polttoaineen kulutus on huomattavasti suurempaa verrattuna perinteiseen bensiiniin, sillä E85:n kulutus on noin 28 % suurempaa. (Eflexfuel 2018.).



KUVA 1. EflexFuel asennussarja (Eflexfuel 2018)

Tällä hetkellä E85-polttoaineen käyttäminen ei ole taloudellisesti vielä niin kannattavaa, sillä sen hinta suhteessa kulutukseen ei takaa merkittäviä taloudellisia säästöjä verrattuna tavalliseen E10-polttoaineeseen. Mikäli E85:n hinnoittelupolitiikka muuttuu lähivuosina, tulee myös enemmän flexfuel-autoja arkiseen käyttöön, mikä tarkoittaa myös suurta hiilidioksidipäästöjen alenemaa.

2.3 Bioetanolin ympäristövaikutukset

Ympäristövaikutuksiltaan bioetanolilla voidaan luokitella hyvin ekologiseksi, sillä sen tavoitteena on vähentää fossiilisten polttoaineiden aiheuttamaa kasvihuoneilmiötä.

Bioperäisillä energialähteillä on kasvun aikana tapahtuvan fotosynteesin toiminnan takia merkittävä etu hiilidioksidipäästöissä, kun sitä verrataan fossiilisiin polttoaineisiin. Bioetanolilla voidaan syrjäyttää haitallisena hapettimena toimiva metyyli-tert-butyylieetteri bensiinistä, sekä vähentää muodostuvia saastuttavia päästöjä etanolin paremman palamisen seurauksena. Lisäksi bensiinin myrkylliset komponentit, kuten bentseeni, voidaan korvata bioetanolin käyttämisellä. (Walker 2010, 10.)

2.4 Bioetanolin tulevaisuus

Bioetanolilla on arvioitu olevan suuri merkitys lähitulevaisuudessa energian takaajana. Yhdysvaltalaisen Energy Information Administrationin (EIA) mukaan vuonna 2030 jopa 8.5 %:n osuus kaikesta energian käytöstä on uusiutuvilla polttoaineilla. Maailmassa bioetanolin ennustetaan korvaavan samana vuonna 20 % koko bensiinin käytöstä. (Walker, 2010, 106.) Suomessa bioetanolin suosio on viime vuosina kasvanut huomattavasti, sillä uutisistakin on saanut lukea erilaisista tehdasprojekteista. Hyvänä esimerkkinä voidaan todeta mm. ST1:n sekä SOK:n Pietarsaareen suunnitteilla oleva sahanpurua käyttävä bioetanolitehdas (Yle 2017). Positiivista muutosta saattaa olla myös luvassa Kemin kuntaan, sillä Kaidi-yhtiöllä on suunnitteilla sinne suuren mittaluokan biopolttoainejalostamo Hanke on jo pitkälle suunniteltuna, mutta EU:n byrokraattiset seikat koskien biodieselin raaka-aineita hidastavat projektin etenemistä. Euroopan parlamentin käsittelyssä on raportti, jonka mukaan muun muassa idea biopolttoaineiden valmistuksesta hakepuusta, purusta sekä mäntyöljystä tulisi sulkea pois. (Maaseudun tulevaisuus 2017.)

3 LIGNOSELLULOOSA

Suomi on kansainvälisesti hyvin tunnettu mittavan kokoisista metsävarannoista. Asianmukaisesti hoidettujen harvennushakkuiden sekä joustamattoman metsänhoidon avulla taataan erinomaiset raaka-aine puitteet vielä seuraaville sukupolvillekin. Metsiemme puut ovat arvokasta raaka-ainetta, joista erilaisilla prosesseilla saadaan niin huonekaluja kuin paperia arkiseen elämään. Sahoilla tukkien käsittelyssä syntyvää sahanpurua pyritään myymään energian- ja lämmöntuotantoon voimalaitoksille.

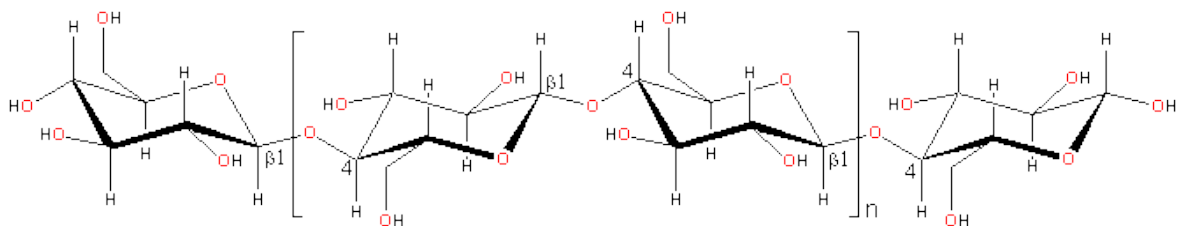
Ongelmia valitettavasti tulee vastaan taloudellisesti siinä kohden, kun sahanpurulle ei ole myönnetty hallitukselta samanlaista tukea kuin esimerkiksi sahakkeelle. Näin ollen kustannustehokkaakamaksi ratkaisuksi jää hakkeen käyttäminen energian tuotannossa, ja sahanpuru jätetään omaan arvoonsa. (Sahateollisuus 2016.) Sahanpurulle löytyy kuitenkin oivallisia käyttökohteita, joista yhtä vaihtoehtoa tutkin tässä projektissa. Jotta ymmärtäisimme tarkemmin lignoselluloosapohjaisen sahanpurun entsyymattista hydrolyysiä, tulee meillä olla käsitys tämän biomassan kemiallisesta puolesta. Seuraavissa luvuissa tarkastellaan lignoselluloosan kolmea tärkeintä kemiallista yhdistettä.

3.1 Selluloosa

Selluloosa on hyvin tärkeä puun komponentti teollisuuden kannalta. Sitä esiintyy kaikissa puissa sekä myös kasveissa. Selluloosan tehtävänä on toimia rakenneaineena soluseinässä sekä antaa kuiduille erinomaista vetolujuutta. Kemianteollisuudessa selluloosaa hyödynnetään mm. kemiallisena massana paperin valmistusprosessissa. Selluloosaa esiintyy pohjoisen puulajeissa noin. 40 % kuiva-aineesta. (Isotalo 2004.)

Kemiallisesti tarkasteluna selluloosa on suoraviivaisen muodon omaava polymeeri. Polymeerillä tarkoitetaan molekyyliä, joka koostuu minimissään 50 pienestä molekyylistä, jotka ovat kemiallisin sidoksin kiinni toisissaan. Selluloosa koostuu glukoosiyksiköistä, jotka muodostavat Van der Waalsin voiman avulla sekä yhdessä toiseen glukoosiyksikköön

vetysidoksin kiinnittymällä sellobioosiyksikön. Glukoosiyksiköt ($C_6H_{10}O_5$) kytkeytyvät toisiinsa β -1,4-glykosidisilla sidoksilla (Kuvio 2) niin, että joka toinen yksikkö on toiseensa nähden kiertyneenä 180 asteen kulmassa. Selluloosamolekyyli koostuu jopa 10 000 glukoosiyksiköstä, ja tätä lukumäärää kuvataan termillä DP eli polymerisaatioasteella. (Isotalo 2004.) Kuviossa 2 on esitetty selluloosan kemiallinen koostumus, jossa nähdään keskellä sellobioosiyksikkö.



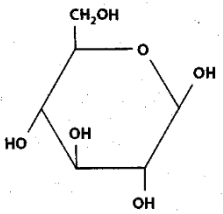
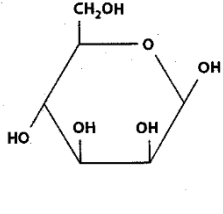
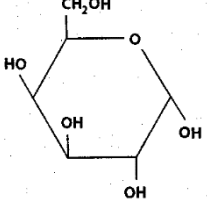
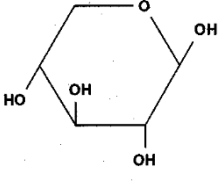
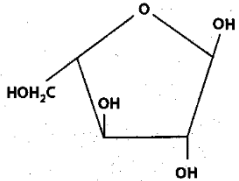
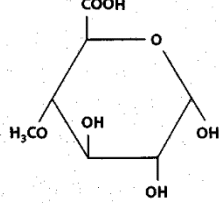
KUVIO 2. Selluloosamolekyylin kemiallinen koostumus (Oregon State University)

3.2 Hemiselluloosa

Hemiselluloosa on toinen yleinen komponenttiryhmä soluseinissä mikrofibriellien välissä. Hemiselluloosan tehtävänä on antaa kuiduille vahvuutta. Kemiallisesti katsottuna hemiselluloosat ovat heteropolysakkarideja koostuen 5- sekä 6-hiilisistä sokereista. Hemiselluloosa on rakenteeltaan amorfinen aine eli sen atomit ovat epämääräisessä järjestyksessä verrattaessa kiteiseen aineeseen, jossa atomit sekä molekyylit ovat selkeässä muodossa. Hemiselluloosan DP on korkeimmillaan 200, eli huomattavasti alhaisempi verrattuna selluloosan jopa 10 000 polymerisaatioasteeseen. Esiintyvyys puissa on 20–35 % puuaineksen kuivapainosta. (Ek, Gellerstedt & Henriksson 2009, 102-106.)

Havupuihin kuuluva mänty koostuu hemiselluloosa-osioltaan galaktoglukomannaaneista sekä arabinoglukuroniksyylaaneista. Galaktoglukomannaaneissa päärunkona on 1-4 glykosidisin sidoksin muodostunut glukomannaaniketju, johon on liittynyt galaktoosiyksikkö. Arabinoglukuroniksyylaanin pääketju muodostuu 1-4 glykosidisin sidoksin kinnittyneistä ksyloosiyksiköistä, johon on liittynyt 1-2 glykosidisin sidoksin uronihappo- sekä arabinoosiryhmiä. (Ek, Gellerstedt & Henriksson 2009, 104-120.)

TAULUKKO 1. Hemiselluloosan monosakkaridiyksiköitä (Eplantscience 2012)

 <p>Glukoosi (β-D-glukopyranoosi)</p>	 <p>Mannoosi (β-D-mannopyranoosi)</p>
 <p>Galaktoosi (α-D-galaktopyranoosi)</p>	 <p>Ksyloosi (β-D-ksylopyranoosi)</p>
 <p>Arabinoosi (α-L-arabinofuranoosi)</p>	 <p>Uronihappo (4-O metyyli-D-glukuronihappo)</p>

3.3 Ligniini

Ligniini on kolmas hyvin tärkeä komponentti puun rakenteessa. Ligniiniä esiintyy puussa välilamelleissa sekä sekundääri-seinämissä. Havupuissa ligniini on liittyneenä hemiselluloosaan kovalenttisin sidoksin. Ligniinin tehtävänä on estää veden kulkua soluseinämien läviste sekä sitoa vahvasti kuituja kiinni toisiinsa eli toimia ns. sidosaineena. Sillä on paperiteollisuuden kannalta negatiivinen asema tuotantoprosessissa, sen selluloosaa sekä hemiselluloosaa voimakkaasti sitovan roolinsa vuoksi. Näin ollen ligniinistä pyritään pääsemään eroon prosessissa mm. sellunkeitolla. (Tian, Fang, Smith, Wu & Liu 2016, 3-8.)

Kemiallisesti tarkasteltuna ligniini on haasteellinen yhdiste, joka rakentuu fenyylipropaaniyksiköiden tekemistä polymeereistä. Näitä yksiköitä kutsutaan prekursoreiksi ja ne ovat liittyneet toisiinsa suurimmaksi osin eetterisidoksin, mutta myöskin ester- sekä hiili-hiili-

sidoksin. Ligniinin rakenneyksiköt voidaan luokitella kolmeen osaan, joita ovat p-hydroksifenyyyliryhmä, syringyyliiryhmä sekä guajasyyliryhmä. Havupuissa esiintyy suurimmassa osin guajasyyli-ligniiniä, jonka pitoisuus on noin 30 prosentin luokkaa. Puulajikkeiden ligniineissä on eroavaisuuksia. Esimerkiksi kovaan puuhun kuuluvalla vaahteralla ligniineissä esiintyy enemmän metoksyyliryhmiä kuin pehmeään luokitellulla männyllä. Termokemiallisilla prosesseilla näistä kovan puun ligniineistä saadaan tuotettua enemmän metanolia, fenolia sekä metaania. Kuitenkin pehmeiden puiden ligniineistä saadaan tuotettua pyrolyysin jälkeen enemmän kondensoituneita struktuureja verrattaen kovaan puuluokkaan. (Tian, Fang, Smith, Wu & Liu 2016, 3-6.)

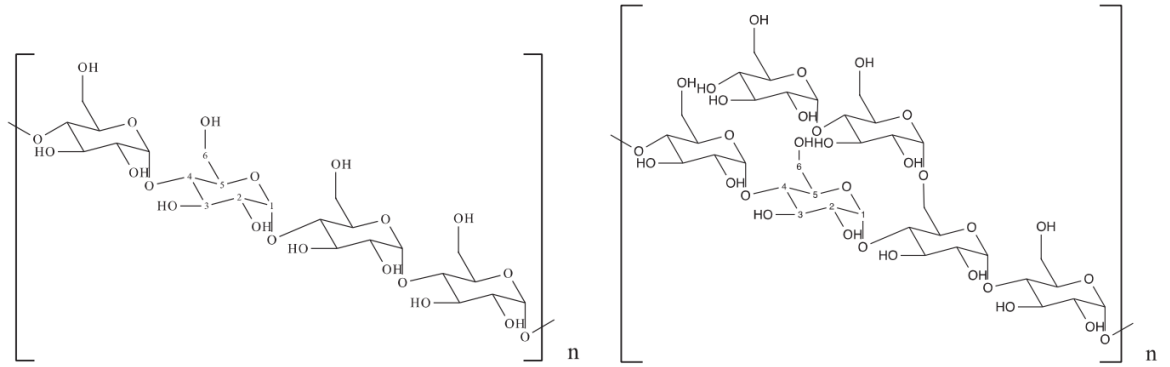
4 PERUNANKUOREN JA SAHANPURUN RAKENTEET

Peruna on hyvin arkinen ruoka-aine monissa kotitalouksissa. Se sisältääkin paljon hyviä terveellisiä ravintoaineita sekä mineraaleja, joita kehomme tarvitsee. Useimmiten perunat kuoritaan ennen syöntiä, jotta haitalliset partikkelit saadaan poistettua. Perunankuori sisältääkin terveydelle haitallisia glykoalkaloideja, luonnon omia toksiineja, joiden tarkoituksena on taistella tuholaisia vastaan ja toimia näin ollen suoja-aineena. Perunankuoressa glykoalkaloideiden pitoisuus on jopa 60 % (Evira 2016). Kuorimisella voidaan merkittävästi vaikuttaa syötävän toksiinin määrään ja välttyä ylimääräisiltä vatsanpuruilta. Perunankuoret itsessään päätyvät biojätteeksi sekä esimerkiksi biokaasun tuotantoon. Tässä opinnäytetyössä tutkin tärkkelyspitoisen kuoren soveltuvuutta sokerin tuotantoon. Seuraavassa luvussa tarkastellaan perunankuoren sekä sahanpurun kemiallista osa-aluetta.

4.1 Perunankuoren kemiallinen koostumus

Perunankuori on tärkkelyspitoinen aines. Tärkkelyksellä tarkoitetaan polysakkaridia eli hiilihydraattia, joka sisältää mono-, di- sekä polysakkarideja. Kasvit tuottavat hiilihydraatteja fotosynteesissä vedestä sekä hiilidioksidista. Tärkkelystä tuottavat muun muassa viljat sekä perunat. Kasvien tärkkelysmolekyylit muodostuvat α -D-glukoosi monomeereistä, joita ovat amyloosi sekä amylopektiini. Näitä monomeerejä voidaan kutsua myös glukaaneiksi. (Hernoux 2013, 25-29.)

Tärkkelyksen painosta noin 20-30 % on amyloosia sekä loput amylopektiinia. Amyloosi on pääasiassa kiinnittynyt α -D-(1,4)-glykosidisiin sidoksin, mutta pienissä osin myöskin haaroittunut α -D-(1,6)-sidoksin. Amylopektiinin sidokset ovat samanlaisia, mutta joka 20-25 glukosiyksikön välein esiintyy haaroittumista α -1,6 sidoksista. Tärkkelyksessä esiintyy amorfisia sekä kiteisiä kerroksia amyloosin sekä amylopektiinin rakenteissa. Koostumuksiltaan amyloosi ja amylopektiini eroavat selvästi. (Hernoux 2013, 29-30.) Kuviossa 3 on esitettyä kummankin monomeerin kemialliset rakenteet.



KUVIO 3. Amyloosin sekä amylopektiinin rakenteet (Hernoux 2013, 30)

Perunan kuoressa esiintyy proteiineja, lipidejä sekä mineraaleja hyvin pienissä määrin. Perunankuori on hyvin fosfaattipitoinen, ja sillä onkin iso rooli fysikaalisissa sekä kemiallisissa ominaisuuksissa. Suurimmaksi osaksi perunatärkkelyksessä esiintyy fosfaatti monoestereitä amorfisilla alueilla glukoosiyksiköissä. Fosfaattimonoesterit tekevät molekyyleistä sähköisesti hylkiviä ja vaikuttavat mm. veden absorptioon. Perunatärkkelyksellä on taipumus sitoa vettä rakenteisiinsa ja aiheuttaa turpoamista. (Hernoux 2013, 31-32.)

4.2 Sahanpurun kemiallinen koostumus

Sahanpurulla tarkoitetaan puumateriaalin sahauksessa syntyvää pienen partikkelikoon omaavaa sivutuotetta. Koostumukseltaan sahanpuru on pääosin selluloosaa, jonka osuus on noin 40–50 % luokkaa. Loppuosa muodostuu hemiselluloosasta, ligniinistä sekä erilaisista orgaanisista uuteaineista. Sahanpurun koostumus vaihtelee hieman riippuen puulajikkeesta muun muassa puumassan hemiselluloosan pitoisuuden osalta. Koostumus vaihtelee myöskin lehtipuiden sekä havupuiden välillä, sillä lehtipuissa esiintyy keskimäärin enemmän uuteaineita. (World Health Organization 2009.)

5 ENTSYMAATTINEN HYDROLYYSI

Entsyymeillä on erityisen tärkeä rooli ympäröivässä maailmassa. Entsyymejä esiintyy kaikkialla eloperäisissä lähteissä. Seuraavassa luvussa tarkastellaan entsyymien toimintaperiaatetta sekä erilaisten entsyymien spesifisiä ominaisuuksia.

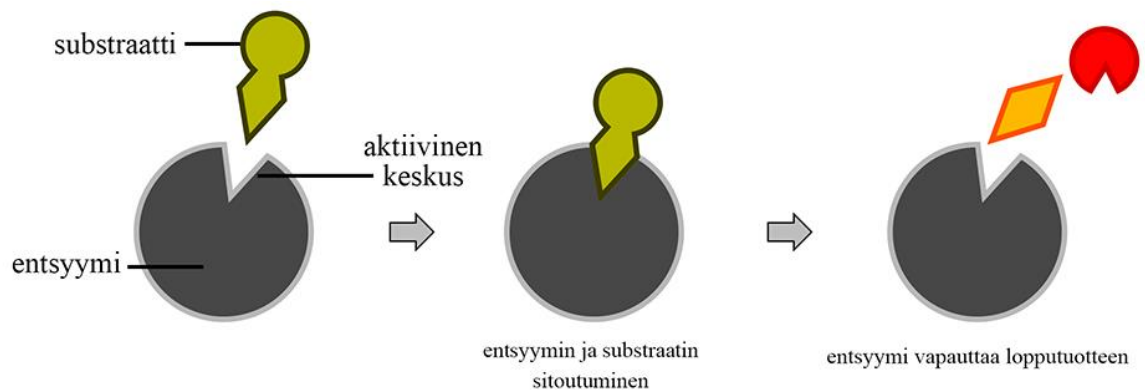
5.1 Entsyymit

Entsyymit ovat orgaanisia substansseja, joiden tehtävänä on mahdollistaa kemiallisten reaktioiden tapahtuminen riittävän nopeasti (Otavan Opisto 2015). Entsyymit voivat nopeuttaa kemiallista reaktioita jopa $1000\text{-}10^{17}$ -kertaisesti (UEF 2012). Näiden toiminta perustuu siihen, että ne nopeuttavat reaktiota alentamalla vaadittavaa aktivaatioenergiaa. Entsyymit myöskin mahdollistavat kemiallisen reaktion tapahtumisen alemmassa lämpötilassa. Entsyymien erityisen hyvänä puolena on se, että ne eivät kulu reaktion aikana. Tämän takia entsyymimäärät reaktioissa ovat hyvin pieniä. (Otavan Opisto 2015.)

Rakenteeltaan entsyymit ovat suurimmaksi osin polypeptidiketjuista muodostuneita proteiineja, mutta myöskin RNA-molekyyleistä muodostuvia harvinaisia entsyymejä tiedetään. Entsyymien perusrunkoa nimitetään apoentsyymiksi, johon saattaa olla liittyneenä kofaktori-lisäosa kuten metalli-ioni. Kofaktoriosaa kutsutaan myöskin nimellä koentsyymi. Mikäli runkoon on kiinnittyneenä kofaktori-osa, silloin kokonaisuutta kutsutaan termillä holoentsyymi. (Otavan Opisto 2015.)

Entsyymien rakenteen tärkeyden takia ne ovat erityisen spesifisiä kohteena oleville aineille. Yleisesti voidaan ajatella, että entsyymit toimivat lukko-avain periaatteella eli rungon erityinen osa sopii yhteen reagoitavan aineen eli substraatin kanssa. Entsyymien sekä substraatin sopivuuteen vaikuttavat kemialliset tekijät, kuten rikki- ja vetysidosten paikat sekä aineen tai sen osan suhtautuminen veteen. Entsyymeille tärkeätä on myös vallitseva

lämpötila sekä happamuus. Vääränlaiset olosuhteet saattavat aiheuttaa denaturoitumista eli hajottaa entsyymien biologisen tehonsa. (Otavan Opisto 2015.)



KUVIO 4. Entsyymien toiminta substraatin kanssa (Otavan Opisto 2015)

5.1.1 Sellulaasit

Sellulaasit ovat mm. sienistä, kasveista, bakteereista sekä alkueläimistä tuotettuja entsyymejä. Niiden tehtävänä on hydrolysoida selluloosassa esiintyviä β -1,4 glykosididoksia. Sellulaasit voidaan luokitella niiden aminohappojärjestyksien sekä kiderakenteen mukaan eri alaluokkiin. Toiminnan mukaan sellulaasit jaetaan kolmeen ryhmään, joita ovat endoglukanaasit, sellobiohydrolaasit sekä β -glukosidaasit. Selluloosan tehokas hydrolysoiminen glukoosiyksiköiksi vaatii yleensä sellulaasien yhdistelmää, koska jokaisella entsyymillä on omat roolinsa selluloosamolekyylin pilkkomisessa. (Zhang & Zhang 2013.)

5.1.2 Amylaasit

Amylaasit ovat tärkkelyksen pilkkomiseen tarkoitettuja biokatalyyttejä. Niiden tehtävänä on katkaista tärkkelyksessä esiintyviä α -1,4- ja α -1,6-sidoksia tuottaen oligosakkaridejä sekä dekstriiniä. Amylaasit voidaan jakaa kolmeen ryhmään, joita ovat α -, β - sekä γ -amylaasit. Näistä yleisimpänä entsyyminä on α -amylaasi, koska sitä käytetään hyvin laajasti teollisuuden puolella, mm. elintarvikkeiden tuotannossa. Hyvänä esimerkkinä voidaan todeta glukoosisiirapin tuotanto maissitärkkelyksestä α -amylaasientsyymien avulla.

Amylaasientsyymejä voidaan eristää mikrobeista, kasveista tai eläimistä. Nykyään on paljon tutkittu mikrobiperäistä α -amylaasientsyymien tuotantoa, ja se olisi potentiaalisin tuotantotapa vastaamaan alati kasvavaa kysyntää. Mikrobiologisesti tuotettuna nämä entsyymit kasvavat todella nopeaa sekä tuottavat paremman tila-hyötysuhteen verrattuna kasveista tai eläimistä tuotettuihin entsyymeihin. Lisäksi mikrobeiden genetiikkaa pystytään modifioida mm. mutaatiolla, jotta saadaan tuotettua spesifisempiä α -amylaasientsyymejä. (Sundarram & Murthy 2014, 166-171.)

5.2 Entsyymien hydrolyysireaktio

Bioetanolin ja ns. platform-kemikaalien valmistukseen lignoselluloosapitoinen biomassa on erityisen hyvä raaka-aine. Biomassan polymeerien hydrolysointi käymiskelpoisiksi sokereiksi voidaan tehdä kahdella eri tavalla, joita ovat happohydrolyysi sekä entsyymaattinen hydrolyysi. Vaikkakin entsyymaattinen hydrolyysi tarvitsee esikäsittelyvaiheen raaka-aineelle, se on sokerin saannon kannalta huomattavasti tehokkaampi vaihtoehto näistä kahdesta. Lisäksi happohydrolyysissä ongelmana on korroosiot sekä laimeahappohydrolyysin kohdalla korkeat lämpötilavaatimukset selluloosan konversion kannalta. Entsyymeiden haittapuolena voidaan todeta taloudelliset haasteet, koska niiden eristäminen ja puhdistaminen on vielä suhteellisen kallista. (Verardi, De Bari, Ricca & Calabrò 2012, 95-105.)

Sellulaasientsyymien hydrolyysi on suhteellisen miedoissa olosuhteissa tapahtuva reaktio. Suurimmat sellulaasientsyymiaktiivisuudet saavutetaan 45–55 °C:een lämpötiloissa pH:n ollessa 4.5–5:n luokkaa. Lämpötilan kontrolloimisessa on reaktion aikana suuri merkitys, sillä lähempänä 60 astetta entsyymiaktiivisuus vähenee jopa 60 %. Selluloosan entsyymaattisessa hydrolyysissä tapahtuu samanaikaisesti kolmea erilaista reaktiota, kun käytössä on yleistä *Trichoderma reesei*-sienestä eristettyä sellulaasia. Reaktiossa tapahtuu muutosta kemiallisesti polymerisaatioasteeseen sekä fyysisten ominaisuuksien muokkaantumista. Lisäksi tapahtuu primääristä ja sekundaarista hydrolyysiä, joista ensimmäisessä vaiheessa vapautuu liuenneita aineita ja toisessa vaiheessa aineiden glukoosiksi muuntumista. (Verardi, De Bari, Ricca & Calabrò 2012, 100-110.)

6 IONINEN NESTE

Ioniset nesteet ovat orgaanisesta kationista sekä epäorgaanisesta anionista koostuva orgaaninen suolasula alle 100 asteen lämpötilassa. Ioniset nesteet ovat oivallisia kemiallisia liuottimia, koska ne ovat huoneenlämpötilassa nestemäisessä olomuodossa. Niiden toiminta perustuu hiilihydraattien liuottamiseen. Liukoisuutta voidaan tehostaa suuremmalla anionipitoisuudella liuottimessa. Halidinesteet, esimerkiksi klooripohjaiset ovat erinomaisia liuottimia, koska kloridianionit ovat voimakkaasti elektronegatiivisia ja kemialliselta kooltaan suppeita. Kloridianionit soveltuvat hyvin selluloosan liuotukseen, mutta aiheuttavat ympäristölle haittapäästöjä, koska kloori itsessään ei ole ekologisesti tarkasteluna kovinkaan järkevä vaihtoehto haitallisuuden vuoksi. (Holm 2013, 21-22.)

Ionisten nesteiden tehokkaita ominaisuuksia ovat mm. niiden hyvä terminen stabiilisuus, ioninen konduktiivisuus, elektrokemiallinen vakaus sekä varsin alhainen höyrynpaine eli haihtuvuutta ei ilmene. Ionisia nesteitä voidaan muokata haluttua prosessia varten muuttamalla anionin tai kationin rakennetta ja parantaa näin ollen esimerkiksi sulamispistettä sekä viskositeettia. Ominaisuuksiin pystytyään vaikuttamaan kationin alkyyliryhmien kautta. Nämä mainitut asiat tekevät ioninista liuottimista erinomaisen haastajan tyypillisemmin käytetyille liuottimille. (Holm 2013, 22.)

Selluloosan esikäsitteily liuottamiseen oivalliseksi löydetty ioninen liuotin on [BMIM]Cl. Sillä pystytään liuottamaan niin ligniiniä kuin polysakkaridejä samaan aikaan. Esikäsitteilyn jälkeen selluloosa voidaan regeneroida hemiselluloosasta sekä ligniinistä lisäämällä liuokseen vettä, koska vesi toimii vastaliuottajana reaktiossa. [BMIM]Cl-liuos voidaan valmistaa syntetisoimalla laboratoriossa. Ionisten liuottimien teho selluloosan liuotuksessa riippuu liuotettavan aineen polymerisaatioasteesta, kiteisyydestä, fysikaalisista ominaisuuksista sekä liuottimessa olevan veden epäpuhtaisuuksista. (Holm 2013, 23.) Tässä työssä käytän [BMIM]Cl-liuosta, koska sen tehokkuus on todettu hyväksi selluloosamateriaalin esikäsitteilyssä.

7 SPEKTROFOTOMETRINEN ANALYTIikka

Spektrofotometria on tärkeä käsite kemian alalla. Sillä tarkoitetaan sellaista mittaussmenetelmää, jossa tunnistetaan erilaisia aineita liuoksessa, puhtauksia sekä pitoisuuksia optisia mittausslaitteita apuna käyttäen. Yleisimpi laitteita, joita käytetään mittaussmenetelmiin, ovat UV/VIS-, -IR sekä AAS-spektrofotometrit. (Sciencing 2018.)

7.1 Spektrofotometria käyttökohteena

Spektrofotometriaa käytetään hyvinkin yleisesti kemian, biologian sekä fysiikan erilaisten kvantitatiivisten analyysien menetelmänä. Toimintaperiaate perustuu Lambert-Beerin lakiin. Lain mukaan sähkömagneettisen säteilyn absorboituminen riippuu absorboivan aineen määrästä eksponentiaalisesti. Tätä lakia hyväksi käyttäen voidaan esimerkiksi selvittää erilaisten väriaineiden pitoisuuksia liuoksessa. Lambert Beerin laki voidaan esittää seuraavanlaisessa muodossa:

$$A = \epsilon bc$$

A = absorbanssi

ϵ = molaarinen absorptiokerroin (M⁻¹, cm⁻¹)

b = näyttilan optisen tien pituus (cm), yleensä 1,0 cm (kyveti)

c = absorboivan aineen konsentraatio (M). (Vo n.d.)

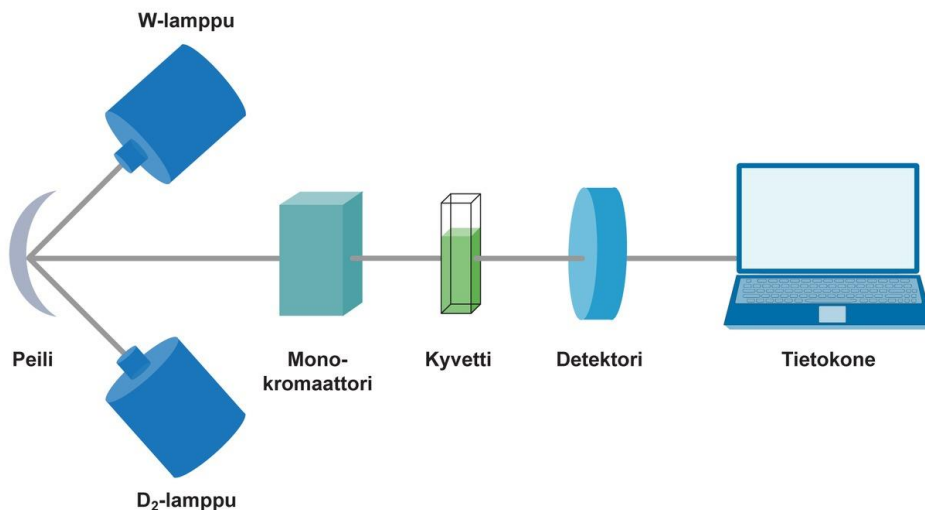
Spektrofotometriset laitteet voidaan jakaa joko yksisäteisiin taikka kaksisäteisiin mittausslaitteisiin. Yksisädelaitteen toiminta perustuu siihen, että yhden lukeman saamiseksi on tehtävä kaksi eri mittausta. Kaksisädelaitteissa taas valolähteen muodostama säde jaetaan rotatoivan sektoripeilin avulla referenssiluoksen sekä näyteliuoksen kautta kulkeviksi säteiksi. (Saarinen & Lajunen 2004, 195.)

7.2 UV/VIS-spektrofotometria

UV/VIS-spektrofotometrian tehtävänä on mitata näytteeseen saapuvan ja siitä läpi kulkeneen säteilyn voimakkuuden suhdetta sekä transmissiota jollakin määrättyllä aallonpituudella. Absorbanssi liittyy vahvasti tähän, sillä se kertoo transmission käänteisluvun suhteen. UV/VIS-spektrofotometriä käytetään monesti kemiassa metalli-ionien, konjugoituneiden orgaanisten yhdisteiden sekä biologisten makromolekyylien määrittämisessä. (Lehtonen & Sihvonen 2009, 216.)

UV/VIS-spektrofotometreistä löytyy kahta erilaista valonlähdettä; Ultravioletivalolle ja näkyvälle valolle. Näkyvän valon alueella käytössä on volframi taikka volframi-halogenilamppu sekä Uv-säteilyssä deteriumlamppu. Toiminta perustuu siihen, että säteilyt valo kerätään sisäänmenoraon läpi peilejä apuna käyttäen kokoon sekä ohjataan monokromaattorin hilalle. Näyte siirretään valonsäteeseen kyveissä, joissa on identtiset yhdensuuntaiset optiset pinnat. Hilalla on tärkeä tehtävä tässä, sillä sen toimintakyky vaikuttaa laitteen aallonpituuksien erottelukykyyhin. (Jaarinen & Niiranen 2005, 55-58.)

UV/VIS-spektrofotometri koostuu valonlähteestä, monokromaattorista, kyvetistä (näyteastia) sekä valodetektorista. Kuviossa 4 on esitetty UV/VIS-toimintaperiaate.



KUVIO 5. UV/VIS-spektrofotometrin toimintaperiaate. (Lampiselkä, Mutanen, Myllyviita & Pernaa 2016)

8 KOKEELLINEN OSUUS

Ennen varsinaisen laboratoriokokeen aloittamista tehtävänäni oli suunnitella itse työn toteutus sekä projektiin vaadittava aikataulus. Päätin toteuttaa laboratorio-osion tammikuussa 2018, joten raaka-aineet koetta varten piti olla hyvissä ajoin hankittuna. Otin marraskuun 2017 aikana yhteyttä Haapaveden HaSa Oy:lle sekä Oulun Luonnosta Oy:lle. Kummastakin firmasta yhteistoiminta raaka-aineiden suhteen meni erinomaisesti ja sain tarvittavat näytteet toimitettuna itselleni. Sahanpurun tutkimusta varten sain 18.12.2017, joten ehdin hyvin kuivatella näytettä kosteuspitoisuuden alentamiseksi. Sahanpurunäyte oli mäntypuun sahauksesta syntynyttä tuoretta tuotetta. Perunankuorimassan sain lähempänä tutkimustyön aloitusta, koska tämä näyte vaati kylmäsäilytyksen pysyäkseen tuoreena. Kuorimassan, joka koostui Annabella sekä Columbia-perunalaaduista, sain itselleni 5.1.2018. Perunat kuorittiin näytteen luovutuspäivänä koneellisesti, josta kuva 2 kertoo.



KUVA 2. Kuoritut Annabelle- perunat

Tutkimuksessa käytetyt entsyymit ovat Novozymes-valmistajan cellulosic ethanol enzyme kit- sarjasta. Valitsin teoriaosion pohjalta entsyymit NS22086, NS22118 sekä NS22035. Tässä järjestyksessä entsyymit olivat sellulaasikompleksi, Beta-glukosidaasi sekä glykoamylaasi, joita olen aiemmin teoriaosiossa tarkastellut. Lignoselluloosapohjaisen materiaalin hydrolysoimisessa käytin NS22086-sellulaasikompleksia sekä NS22118- β -glukosidaasia yhtäaikaaisesti maksimoidakseni reaktion tehokkuuden. Perunankuorelle, joka

on helposti hydrolysoitavissa, käytin NS22035-glykoamylaasia tuottaakseni tärkkelyksestä glukoosia.



KUVA 3. Kokeessa käytetyt raaka-aineet



KUVA 4. Kokeessa käytetty laitteisto

Seuraavana työvaiheena oli suunnitella, montako erilaista koetta tarkoituksena oli tehdä sekä millaisilla entsyymi- ja näytemäärillä. Tutkin internetistä Novozymesin sivuilta suuntaa antavia entsyymimääriä, josta ilmeni, että vaadittu entsyymimäärä riippuu hyvin paljon suoritetusta esikäsitteystä, raaka-aine lähteestä sekä prosessiolosuhteista. Löysin internetistä Forest Refine-projektin Powerpoint-esityksen, jossa oli hyvät sokerisaannot saatu 50 µl sellulaasikompleksin sekä 6 µl β-glukosidaasin yhdistelmällä.

Päätin tehdä sahanpurulle yhteensä neljä koetta, joista yhdessä kokeessa olisi ns. nollatullos. Tämä nollatullos tehtiin ilman mitään esikäsitteystä lisäämällä suoraan vain entsyymit liuokseen. Loput kolme näytettä tein valitsemillani entsyymimäärillä ja esikäsitteilyvaiheen kanssa. Kaikissa kokeissa käytin samaa 50 mg:n näytemäärää. Mainitaan tässä vaiheessa sahanpurunäytteille omat lyhennimenimet ja niihin käytetyt entsyymimäärät:

TAULUKKO 2. Sahanpurun näytteiden lyhenteet ja entsyymimäärät

NÄYTE	ENTSYYMI 1	ENTSYYMI 2
Sahanpurunäyte 0 (Sp0)	50 µl NS22086 sellulaasikompleksia	6 µl NS22118 β- glukosidaasia
Sahanpurunäyte 1 (Sp1)	45 µl NS22086 sellulaasikompleksia	4 µl NS22118 β- glukosidaasia
Sahanpurunäyte 2 (Sp2)	50 µl NS22086 sellulaasikompleksia	6 µl NS22118 β- glukosidaasia
Sahanpurunäyte 3 (Sp3)	55 µl NS22086 sellulaasikompleksia	7 µl NS22118 β- glukosidaasia

TAULUKKO 3. Perunan kuoren näytteiden lyhenteet sekä entsyymimäärät

NÄYTE	ENTSYYMI
Perunanäyte 1 (Pr1)	4 µl NS22035 glykoamylaasientsyymiä
Perunanäyte 2 (Pr2)	6 µl NS22035 glykoamylaasientsyymiä
Perunanäyte 3 (Pr3)	7 µl NS22035 glykoamylaasientsyymiä

Perunankuorimassalle päätin tehdä kolme erilaista koetta myöskin eri entsyymipitoisuuksilla. Näiden hydrolyysissä käytin mainitsemaani NS22035-glykoamylaasientsyymiä Novozymesiltä. Noudatin hydrolyysin aikana valmistajan ilmoittamia optimaalisia arvoja hydrolyysin suhteen, joita olivat 4,5 – 5,5 pH sekä 60 – 70 asteen lämpötila. Glykoamylaasientsyymien optimaalinen toiminta tapahtuu korkeammassa lämpötilassa verrattuna sellulaasientyymeihin. Reaktioon vaadittavat entsyymimäärät ovat hyvin pieniä. Taulukossa 3 on esitettyä perunankuoren laboratoriokokeisiin käytetyt entsyymimäärät.

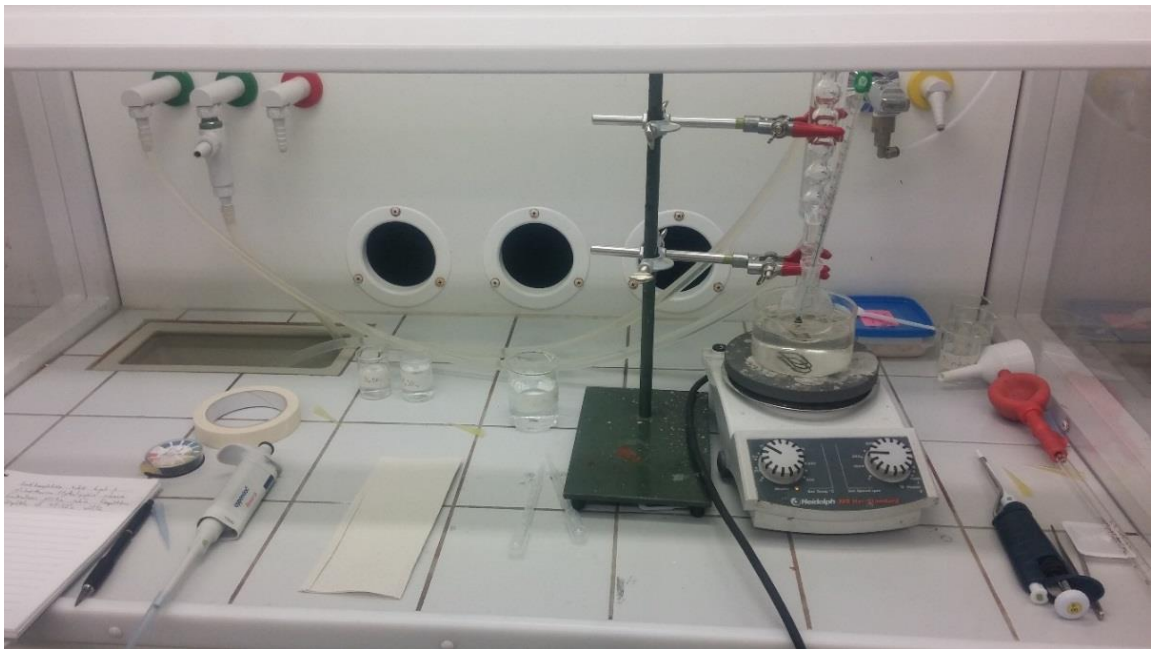
Päätettyäni entsyymien määrät seuraavaksi tehtävänä oli selvittää mitä ainetta käytän lignoselluloosapohjaisen sahanpurun esikäsitteilyyn. Päädyin valitsemaan [BMIM]Cl-liuoksen, koska sen tehokkuus esikäsitteilyssä on todettu hyväksi. Kokkolan Centrian biolaboratoriosta löytyi kolme eri viskositeetilla olevaa [BMIM]Cl-liuosta. Mitä vähemmän kyseisessä liuoksessa on vettä mukana, sen tehokkaampaa se on esikäsitteily kannalta. Kaikista juoksevin neste ei mielestäni soveltunut vahvaan esikäsitteilyyn, ja jäykin neste olisi aiheuttanut mittausongelmia. Päädyin keskimmäiseen vaihtoehtoon, joka oli myöskin viskositeetiltaan sopivan jäykkää.

Viimeisenä suunnitteluvaiheena mietin sopivaa analyysimenetelmää sekä ennalta tehtäviä toimenpiteitä. UV/VIS-spektrofotometria on täydellinen menettelytapa liuoksen sokeripitoisuuden selvittämiseen ja kyseinen laite löytyy Kokkolan Centrian tutkimuslaboratoriosta. Ennen varsinaista analyysiä näytteelle pitää tehdä DNS (3,5-Dinitrosalisyylihapo) käsittely, jotta se olisi sopiva spektrofotometriaa varten.

8.1 Sahanpurun kokeet

Ensimmäisenä vaiheenani oli valmistaa Sp0-näyte. Punnitsin laboratoriovaa'alla 50 mg kuivattua sahanpurua. Pyrin valitsemaan näytteekseni mahdollisimman hienojakoista sahanpurua, jottei mukaan tulisi pitempiä kuitupalasia. Siirsin punnitut sahanpurut 50 ml kaksikaulakolviin, joka oli kiinnitettyä jo statiiviin. Pipetoin mittapipetillä 10 ml tislattua vettä kolviin sahanpurun sekaan ja lisäsin magneetin sekoitusta varten. Lämpölevyssä oli

samassa magneetisekoitus-ominaisuus. pH:n säätelyyn varasin 2M natriumhydroksidia sekä 1M rikkihappoa. Kummatkin liuokset laimensin vastaamaan noin 0,2M sekä 0,1M liuosta, jotta happamuuden säätely onnistuisi helpommin eikä suurempia pH:n hyppyjä tapahtuisi. Lämmitin sahanpuru-vesiliuoksen 50 celsiusasteeseen ja säädin happamuuden 5–5,5 välille. Sekoitusnopeuden pidin noin 150 rpm. Annostelin 50 μ l NS22086 sekä 6 μ l NS22118-entsyymiä sekaan. Entsyymien lisäyksen kannalta oli kiinnitettävä huomiota siihen että kummatkin lisätään liuosspinnan alapuolelle, jotta kontaminaatoriski pienisi.

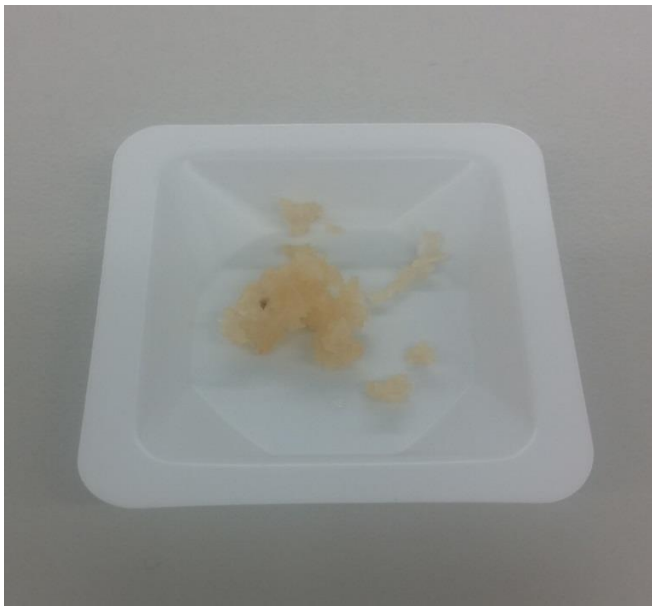


KUVA 5. Työympäristö

Reaktion aikana lämpötila pysyi 50 celsiusasteen kohdalla ja pH oli noin 5. Entsyymittainen reaktioaika oli 50 minuuttia, jonka toistin myöskin esikäsitellyille sahanpuruille. Reaktion jälkeen annoin liuoksen jäähtyä 10 minuuttia ja poistin kolvista magneetin. Pipetoin 0-näytteen 20 ml mittapulloon ja laitoin korkin kiinni.

Esikäsitellyn suoritin kahdessa eri osassa. Ensimmäisessä osassa testasin hiukan pienemmällä erällä, mitenkä kyseinen prosessivaihe onnistuu. Punnitsin laboratoriovaa'alla 50 mg sahanpurua ja siirsin ne 50 ml kaksikaulakolviin. Punnitsin jääkaapista haettua [BMIM]Cl-liuosta 2,5 grammaa 10 ml mittalasiin. Lisäsin punnitun [BMIM]Cl-liuoksen pyörökolviin sahanpurun sekaan. Tiputin sekaan magneetin ja säädin sekoituksen 150 rpm.

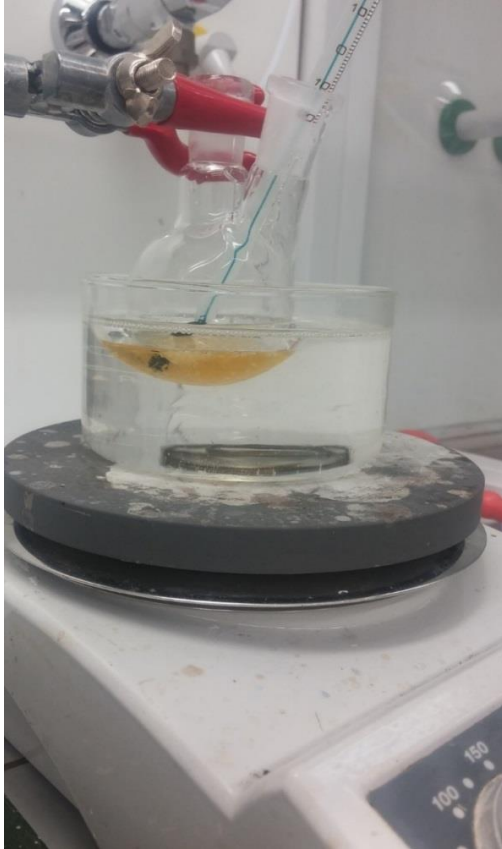
Lämmitin seoksen öljyhauteessa 100 celsiusasteeseen ja pidin tässä lämpötilassa 30 minuutin ajan. Kuumennuksen aikana lämmitin 20 ml dekantterilasissa tislattua vettä, jotta voisin tehdä jälkeinpäin selluloosan saostamisen. Kun 30 minuuttia oli kuumennettu sahanpuruseosta, pipetoin joukkoon 10 ml 76 asteista tislattua vettä. Veden lämpötilalla on suuri merkitys tässä vaiheessa, koska muuten saostusreaktiota ei tapahdu tai tapahtuu pienissä määrin. Annoin seoksen jäähtyä 15 minuutin ajan jolloin selluloosan saostuminen tapahtui. Toistin saman esikäsitelyprosessin 150 mg määrälle sahanpurua kolminkertaisilla [BMIM]Cl-liuoksen ja tislattun veden määrällä, jotta olisi hätävaraa käytössä tarvittaessa.



KUVA 6. Sahanpuru esikäsitelty [BMIM]Cl-liuoksella

Viimeisenä vaiheena ennen varsinaista entsyymaattista hydrolyysiä käsitelty sahanpuru tuli suodattaa ioninesteestä. Tässä vaiheessa oli tärkeää pestä suodatettua näytettä vähintään kolme kertaa tislatulla vedellä, jotta kaikki ioninen neste saatiin sahanpurun pinnalta poistettua. Suodatusprosessi onnistui erinomaisesti. Kuvassa 6 on esitettyä suodatuksen jälkeinen sahanpuru siirrettynä punnitusalustalle.

Varsinaiset entsyymaattiset hydrolyysireaktiot (Sp1, Sp2 sekä Sp3) suoritettiin samalla kaavalla, kuin Sp0-näytteen valmistuksen. Ainoana muuttujana reaktion aikana oli kummakin entsyymin määrät. Jokaisessa kolmessa kokeessa oli punnittuna 50 mg [BMIM]Cl-liuoksella esikäsiteltyä sahanpurua. Kuvassa 7 on esitettyä esikäsitellyn sahanpurun entsyymaattinen hydrolyysireaktio kolvissa.



KUVA 7. Kolvissa tapahtuva entsymaattinen hydrolyysireaktio



KUVA 8. Hydrolyysin jälkeinen näytteen suodatus

8.2 Perunankuoren kokeet

Perunankuorimassan kokeet aloitin pienimmästä entsyymimäärästä, eli näytteestä yksi. Punnitsin laboratoriovaa'alla tarkalleen 50 mg kylmästä otettua kuorimassaa. Siirsin näytteen alustalta kaksikaulakolviin ja pipetoin sekaan 10 ml tislattua vettä. Tiputin sekaan magneetin sekä säädin sekoituksen 150 kierrokseen minuutissa. Lämmitin kolvia öljyhauteessa 60–65 celsiusasteeseen ja säädin pH:n viiteen muutamalla rikkihappotipalla. Annostelin sekaan nestepinnan alapuolelle neljä mikrolitraa glykoamylaasientsyymiä NS22035. Reaktioajaksi valitsin 30 minuuttia jokaiselle perunanäytteen kokeelle. Reaktion jälkeen annoin kolvin jäähtyä noin 10 minuuttia ja siirsin näytteen mittapipetillä 20 ml mittapulloon. Tämän jälkeen toistin samat työvaiheet Pr2- sekä Pr3-näytteille, mutta suuremmilla entsyymimäärillä.

8.3 DNS-reagenssin valmistelu

Seuraavana työvaiheena oli valmistaa hankituista kemikaaleista DNS-reagenssi UV/VIS-spektrofotometriaa varten. Aloitin työn lämmittämällä tislattua vettä 250 ml dekanterilasissa 50 asteiseksi. Kun vesi oli saavuttanut tämän lämpötilan, pipetoin 125 ml vettä mittapipettejä käyttämällä 250 ml:n mittapulloon. Tämän jälkeen punnitsin 45,5 kaliumnatriumtartraattia ($C_4H_4O_6KNa$) sekä tarkalleen 1,575 grammaa 3-5-dinitrosalisyylihappoa tislattun veden sekaan. Lisäsin vielä mittapipettejä käyttämällä 65,5 millilitraa 2M natriumhydroksidia seokseen. Tässä vaiheessa täytyi odottaa, että kaikki punnitut aineet olivat liuenneet täydellisesti, jotta pystyin jatkamaan. Liuoksen tasaannuttua punnitsin joukkoon vielä 1,25 grammaa fenolia ($C_6H_5OH/PhOH$) sekä saman määrän natriumsulfiittia (Na_2SO_3). Annoin liuoksen sekoittua vetokaapissa niin kauan, kunnes havaittavissa oli täysin homogeeninen liuos. Lopuksi pipetoin tislattua vettä 250 millilitran merkkiin saakka ja DNS-reagenssi oli valmis.



KUVA 9. DNS-reagenssin valmistus

8.4 UV/VIS-spektrometrin analyysi

Viimeisenä työvaiheena oli valmistella entsyymikäsitellyt näytteet sopiviksi UV/VIS-spektrofotometriaa varten. Ensimmäisenä rakensin vesialtaat kuumennusta sekä jäähdystä varten. Kuumavesialtaana toimi keittokattila, jossa oli kiehuva vettä. Kylmävesialtaana oli myöskin kattila, johon mittasin kylmää vettä sekä jääpaloja sekaan. Näytteiden valmistusta varten tarvittiin koeputkia sekä teline niille. Pipetoin jokaiseen koeputkeen omaa näytettään sekä DNS-reagenssia 200 μ l:n verran. Koeputkiravistinta hyödyntäen sekoitin jokaista näytettä muutaman sekunnin ajan. Kun kaikki näytteet oli sekoitettu, siirsin ne telineeseen ja kuumavesikattilaan. Kiehutin näytteitä korkki kiinni 5 minuutin ajan jonka jälkeen nopea jäähdytys kylmävesialtaassa. Jäähdytyksen jälkeen pipetoin koeputkiin 2,6 ml tislattua vettä ja sekoitin koeputkiravistimella. Nyt näytteet olivat valmiita analysoitavaksi UV/VIS-spektrofotometrilla 540 nm:n aallonpituudella.



KUVA 10. Näytteet valmiina UV/VIS-spektrofotometriaa varten

9 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Valmistetut näytteet analysoitiin Shimadzun UV-1800-laitteistolla 540 nm:n aallonpituudella. Näytteet siirrettiin mittapulloista 3 ml:n muovisiin kyvetteihin optista mittausta varten. Jokaisen kyvetin kylki puhdistettiin etanolin sekä liinan avulla ennen mittausta, jotta mahdolliset virheet saataisiin minimoitua. Seuraavissa taulukoissa on esitettyä UV/VIS-spektrofotometrillä saadut pitoisuudet näytteille.

TAULUKKO 4. Sahanpurun tulokset

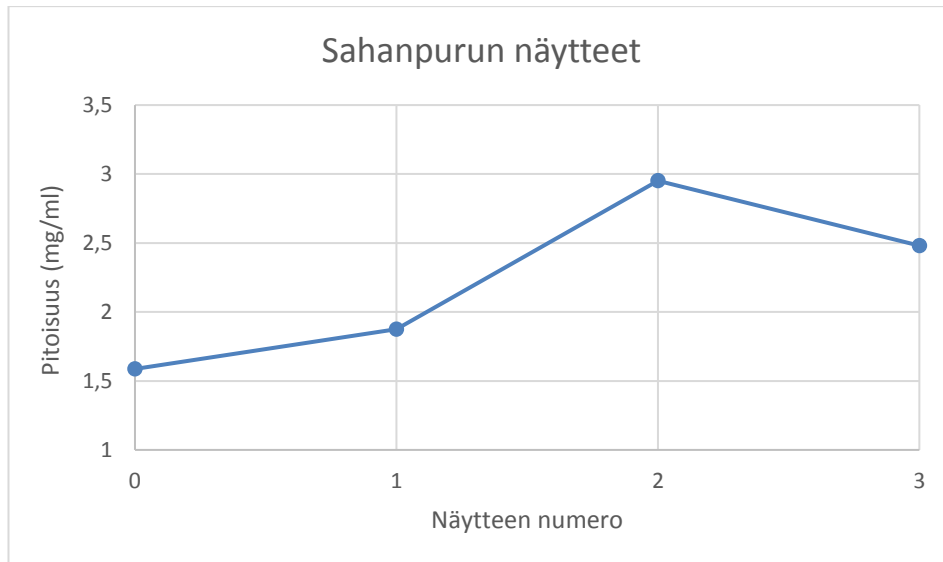
NÄYTE	PITOISUUS (mg/ml)
Sp0	1,587
Sp1	1,874
Sp2	2,951
Sp3	2,482

Taulukosta 4 nähdään, että jokaisen sahanpurunäytteen pitoisuus on erilainen. Suurimpaan pitoisuuteen päästiin Sp2-näytteen avulla, jossa oli prosessi optimoitu parhaimman sokeripitoisuuden saamiseksi. Esikäsiteltyjen Sp1- sekä Sp3-näytteiden sokeripitoisuuksissa oli huomattavasti eroa toisiinsa verrattuna. Varsinaisen 0-näytteen sokeripitoisuus 1,587 mg/ml oli yllättävän suuri ottaen huomioon, että tälle näytteelle ei tehty muuta kuin entsymaattinen hydrolyysi.

TAULUKKO 5. Perunankuoren tulokset

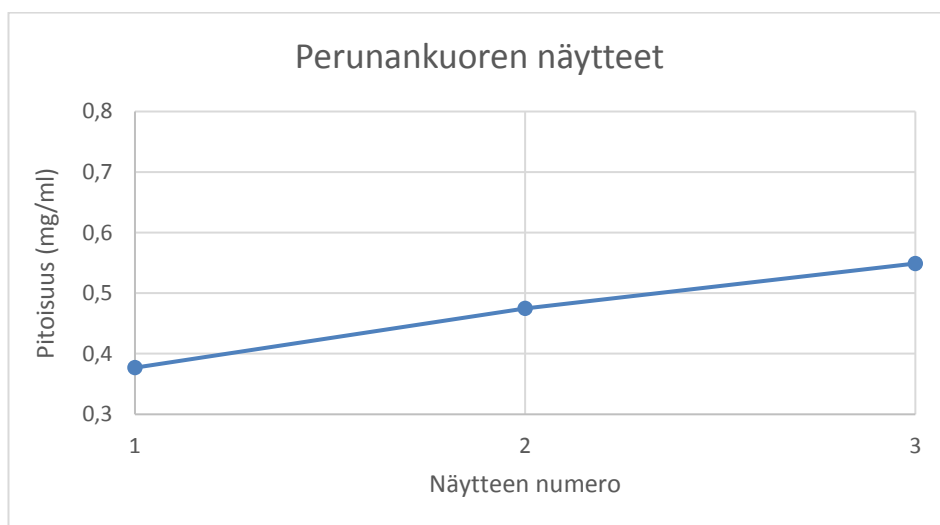
NÄYTE	PITOISUUS (mg/ml)
Pr1	0,377
Pr2	0,475
Pr3	0,549

Taulukosta 5 nähdään, että perunankuorinäytteille suoritettavat entsymaattiset hydrolyysit tuottivat huomattavasti alhaisemmat sokeripitoisuudet verrattuna sahanpurunäytteisiin. Pitoisuudet kasvoivat hyvin tasaisesti jokaisessa näytteessä, mistä kuvio 7 kertoo. Perunankuorimassan kosteuspitoisuus oli huomattavasti korkeampi verrattuna sahanpurunäytteeseen, mikä aiheutti alemmaa sokerisaantoa.



KUVIO 6. Sokeripitoisuus sahanpurunäytteissä graafisesti esitettynä

Kuviosta 6 huomataan, että entsyymien määrän lisääntyessä ei sokeripitoisuus liuoksessa enää kasva. Optimaalisin tulos saavutettiin Sp2-näytteellä, joka oli esikäsitelty [BMIM]Cl-liuoksella sekä käytetty 50 μ l NS22086- ja 6 μ l NS22118- entsyymejä. Entsyymien määrän kasvu johti suhteelliseen jyrkkään sokeripitoisuuden alenemaan. Näytteet Sp2 sekä Sp3 olivat pitoisuudeltaan niin korkeita, että niitä jouduttiin laimentamaan, jotta ne osuisivat UV/VIS-spektrometrissä olevalle standardisuoralle. Laimennus suoritettiin tislattun veden avulla.



KUVIO 7. Sokeripitoisuus perunankuorinäytteissä graafisesti esitettynä

Kuviosta 7 huomataan, että perunankuorista mitattu sokeripitoisuus kasvoi tasaisesti entsyymimäärän mukaan. Korkein pitoisuus liuoksessa mitattiin 7 μ l NS22035 glykoamylaasientsyymin annostelulla.

Saaduista tuloksista pystytään laskemaan TRS-saanto seuraavalla kaavalla:

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

Esimerkkilasku Sp0-näytteelle:

$$\text{Sokerin saanto (\%)} = \frac{(1,587 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 10,056 \text{ml})}{50 \text{ mg}} \times 100 = 31,9177\%$$

Sp0:n mitattu sokeripitoisuus on 1,587 mg/ml. Pitoisuus kerrotaan alkuperäisellä näytteen koolla, joka sisälsi 10 ml tislattua vettä, sekä 50 μ l NS22086 ja 6 μ l NS22118. Tämä tulos jaetaan sahanpurun punnitulla painolla, joka oli tarkalleen 50 mg. Sp2- sekä Sp3- näytteiden laskemisessa lisätään jaettavan puolelle vielä erilliset kertoimet laimennuksen takia. Kertoimeksi tulee 3, sillä ne sisälsivät 2 ml tislattua vettä sekä 1 ml näytettä. Seuraavissa taulukoissa on esitettyinä lasketut TRS-pitoisuudet.

TAULUKKO 6. Sahanpurunäytteiden TRS-pitoisuus.

NÄYTE	TRS%
Sp0	31,92
Sp1	37,66
Sp2	93,40
Sp3	47,21

Taulukosta 6 huomataan, että lasketut TRS-pitoisuudet ovat samassa suhteessa spektrofotometrillä saatuihin pitoisuuksiin nähden. Korkeimman TRS-pitoisuuden saavutti Sp2-näyte, jolla oli myöskin UV/VIS-spektrometrin mukaan korkein sokeripitoisuus.

Lasketut TRS-pitoisuudet voidaan olettaa suhteellisen tarkoiksi, sillä kokeiden aikana ei tapahtunut mittausvirheitä.

TAULUKKO 7. Perunankuorinäytteiden TRS-pitoisuus

NÄYTE	TRS%
Pr1	7,54
Pr2	9,50
Pr3	10,98

Taulukosta 7 huomataan myöskin, että laskettujen TRS-pitoisuuksien lukemat ovat samassa suhteessa analysoituihin pitoisuuksiin. Prosentuaalisesti näytteiden Pr1 ja Pr2 välillä on isompi ero verrattuna näytteiden Pr2 ja Pr3 välille.

Sahanpurunäytteiden TRS-pitoisuudet ovat ennalta odotetuissa lukemissa. [BMIM]Cl-liuoksella esikäsitellyllä, sekä optimaalisella entsyymien annostuksella päästiin kolminkertaiseen saantoon verrattuna 0-näytteeseen, jolle ei esikäsitteilyä tehty ollenkaan. Tämä korkein sokeripitoinen näyte olisi teoriassa voinut saavuttaa vieläkin paremman pitoisuuden, mutta erilaiset prosessiolosuhteisiin vaikuttavat tekijät saattoivat laskea lopullista pitoisuutta, kuten esimerkiksi esikäsitteilyliuottimen epäpuhtaudet. 0-näytteen pitoisuus ei ole huomattavasti pienempi verrattuna Sp1- sekä Sp3- näytteisiin, joille kuitenkin tehtiin esikäsitteilyvaihe. Syynä on varmasti entsyymien annostusmäärä, sillä tässä Sp0-näytteessä käytettiin kuitenkin optimaalista annostusta, verrattuna Sp1:n alimittaiseen sekä Sp3:n ylimitoiteltuun määriin. Uskon, että Sp1:n vertailu samoilla entsyymimäärillä tehtyyn esikäsittelemättömään 0-näytteeseen olisi tuottanut paljon suuremman sokeripitoisuuden erotuksen.

Perunankuorinäytteissä pitoisuudet olivat huomattavasti alhaisempia verrattuna sahanpurunäytteisiin. Tämä oli tiedossa itselläni jo heti tutkimustyön aloitettuani, sillä perunankuorimassan kosteuspitoisuus oli aivan eri luokassa verrattuna sahanpuruun. Saadut pitoisuudet ovat erityisen mielenkiintoisia, sillä ne kasvavat tasaisesti entsyymimäärän mukaan. Prosessiolosuhteet olivat identtisiä kaikkien näiden kolmen kokeiden aikana. Tärkkelysmassan hydrolyysissä vaaditut entsyymimäärät olivat Novozymesin mukaan hyvin pieniä, joten valitsin sen mukaisesti tutkittavat määrät. Perunankuorinäytteiden osalta

olisi voinut tehdä yhden ekstranäytteen tuplasti isommalla entsyymimäärällä, jotta olisi saanut selvitettyä, tapahtuuko samanlainen pitoisuuden alenema kuin sahanpurulla. Uskoisin, että kolme kertaa isommalla entsyymimäärällä olisi saavutettu piste, jossa sokeripitoisuus olisi kääntynyt jo takaisin laskuun.

Perunankuorimassalle olisi voinut myös tehdä oman esikäsittelevaiheen sokeripitoisuuksien parantamiseksi. Spesifisen ionisen nesteen avulla sekä isommalla entsyymiannostelulla olisi varmasti päästy nelinkertaiseen sokeripitoisuuteen verrattuna Sp3-näytteeseen. Hydrolyysireaktioajan pidentämiselläkin olisi varmasti ollut lopulliseen sokeripitoisuuteen positiivisia vaikutuksia, sillä käyttämäni 30 minuuttia oli itse päättämäni reaktioaika teorian perusteella, sillä entsyymaattinen hydrolyysi on suhteellisen nopeasti tapahtuva ilmiö. Uskoisin että 60 minuutin reaktioajalla olisi saavutettu suurempia sokeripitoisuuksia tutkittuun 30 minuutin aikaan verrattuna.

10 POHDINTA

Tutkimustyöni tuloksien perusteella saavutin työlle asetetut tavoitteet onnistuneesti. Suurimpana tavoitteenani oli tuottaa sokeria saamistani sahanpurusta sekä perunankuorimassasta. Lisäksi tavoitteenani oli saada aikaiseksi sokeripitoisuudeltaan eriarvoisia, vertailukelpoisia näytteitä. Näytteiden TRS-pitoisuudet erosivat huomattavasti toisistaan, mikä oli vertailun kannalta oleellinen asia. Esikäsittelyvaiheen merkitys entsyymaattisessa hydrolyysissä hahmottui myös, sillä prosessin optimaallisesti toteutettuna saavutettiin loistavat sokeripitoisuudet. Tutkimustyön aikana oma ammatillinen osaaminen kasvoi merkittävästi niin teoreettiselta kuin käytännön puolelta. Erityisesti oma-aloitteisuus sekä ajankäytön hallinta korostuivat työtä tehdessä, sillä itse oli vastuussa projektin edistymisestä aikataulussa. Sujuva ajankäytön hallinta yhdessä muiden asetettujen tavoitteiden kanssa muodostivat onnistuneen tutkimustyön.

Entsyymaattiselle hydrolyysille uskon löytyvän paljon käyttökohteita tulevaisuudessa, sillä teknologian kehittymisen myötä entsyymien hintoja on onnistuttu pudottamaan huomattavasti. Lisäksi sopivaa raaka-ainetta kyseiseen prosessiin löytyy maailmasta suuria määriä. Eritoten hyötyjätteiden kierrätysprosessissa toivoisin entsyymien saavan isompaa roolia, sillä ne voisivat olla yksi keino taistella kasvihuoneilmiötä sekä ilmastonmuutoksia vastaan. Myös polttoaineiden tulevaisuuden kannalta tällä prosessilla pystytään vastaamaan alati kasvavaan etanolin kysyntään. Kuitenkin ekologisesti ajateltuna työssä käyttämäni esikäsittelyliuotin ei ole järkevä vaihtoehto, sillä se sisältää klooria joka on ympäristölle todella haitallista. Liuottimen puhdistuksen prosessin aikana tai puhtaamman ja samalla spesifisemmän ioninesteen avulla voitaisiin ympäristönäkökulmat ottaa hyvin huomioon.

Tutkimuksessa käytettyjä erilaisia aineita mitattiin ja käytettiin hyvin pieniä määriä. Isommassa mittakaavassa tehdessä uskoisin saatujen tuloksien olevan lähes samankaltaisia. Prosessin aikana joutuisi kuitenkin kiinnittämään laajemmin huomiota mm. lämmön kontrollointiin. Mielestäni olisi todella mielenkiintoista toteuttaa työ isommassa mittakaavassa ja verrata saatuja sokeripitoisuuksia tähän tutkimustyöhön. Kiinnostavaa olisi myös tietää, millä prosessilla Suomeenkin suunnitellut bioetanolitehtaat tulevat tuottamaan raaka-aineesta varsinaista lopputuotetta. Entsyymaattinen hydrolyysi ei liene täysin pois suljettu lähestymistapa etanolin tuotantoprosessissa.

LÄHTEET

Eflexfuel. 2018. Eflex fuelin toimintaperiaate. Saatavissa: <https://eflexfuel.fi/toimintaperiaate>. Viitattu 24.1.2018

Ek, M., Gellerstedt, G., Henriksson, G. 2009. Wood Chemistry and Wood Biotechnology. Berlin: Walter de Gruyter.

Eplantscience. 2012. Composition of Biomass. Www-dokumentti. Saatavissa: http://www.eplantscience.com/index/biotechnology/biotechnology_and_environment/biomass_a_renewable_source_of_energy/biotech_biomass_composition_of_biomass.php. Viitattu 3.3.2018.

EU-maiden hiilijalanjälkien kartoitus. 2017. Norjan teknillis-luonnontieteellinen yliopisto. Tutkimustyö. Saatavissa: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-9326/aa6da9/meta>. Viitattu 23.1.2018.

Euroopan Parlamentin sekä neuvoston direktiivi 2009/28/EY. Saatavissa <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/fi/TXT/?uri=CELEX%3A32009L0028>. Viitattu 23.1.2018

Evira. 2016. Perunan ja raakojen tomaattien glykoalkaloidit. Www-dokumentti. Saatavissa: <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/elintarvikevaarat/elintarvikkeiden-luontaiset-myrkyt/perunan-ja-raakojen-tomaattien-glykoalkaloidit/>. Viitattu 5.2.2018

Hernoux, A. 2013. Catalytic depolymerisation of starch-based industrial waste. University of Oulu.

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. Edita. Helsinki.

Lampiselkä, J., Mutanen, J., Myllyviita, A., Pernaa, J. 2016. Orbitaali 2- Ihmisen ja elinympäristön kemiaa. Jokioinen, Suomi: E-Oppi Oy.

Lehtonen, P. & Sihvonen, M-L. 2009. Laboratorioalan analyttinen kemia. Opetushallitus. Edita Prima Oy.

Maaseudun tulevaisuus. 2017. Uutinen koskien Kaidin maansiirtotöiden lykkääntymisestä. Www-dokumentti. Saatavissa: <http://www.maaseuduntulevaisuus.fi/talous/kaidin-maansiirtot%C3%B6iden-piti-alkaa-kemiss%C3%A4-ensi-viikolla-lykk%C3%A4%C3%A4nty-eu-raportin-vuoksi-1.195394>. Viitattu 25.1.2018.

Oregon State University, Department of Chemistry. Saatavissa: <http://chemistry.oregonstate.edu/courses/ch130/latestnews/ch130ln.htm>. Viitattu 28.1.2018. Viitattu 1.2.2018

Otavan Opisto. 2015. Entsyymit. Www-dokumentti. Saatavissa: http://opinnot.internetix.fi/fi/muikku2materiaalit/lukio/bi/bi2/02_solun_biomolekyylit/05_entsyymit. Viitattu 10.2.2018

Saarinen, H. & Lajunen, L. 2004. Analyttisen kemian perusteet. Oulun yliopistopaino. Oulu.

Sahateollisuus. 2016. Tiedote. Epäonnistunut energiapolitiikka uhkaa pysäyttää vientisahoja. Www-dokumentti. Saatavissa: http://www.sahateollisuus.com/sites/all/files/omat/sahateollisuuden_tiedote_12092016.pdf. Viitattu 25.1.2018.

Sciencing. 2018. Types of Spectrometers. Saatavissa: <https://sciencing.com/types-spectrometers-5444167.html>. Viitattu 28.2.2018

Sundarram, A., Murthy, T. 2014. α -Amylase Production and Applications: A Review. In Sankar, N. S. (Eds.) Journal of Applied & Environmental Microbiology. 166-175.

Tian, X., Fang, Z., Smith, Jr. R. L., Wu, Z. & Liu, M. 2016. Properties, Chemical Characteristics and Application of Lignin and Its Derivatives. In Fang, Z. & Smith, Jr. R.L. (Eds.) Production of Biofuels and Chemicals from Lignin. Singapore: Springer.

University of Eastern Finland. 2012. Entsyymit. Saatavissa: <https://www2.uef.fi/documents/1054012/1063770/Entsyymit+2012.pdf/12d1259f-44e7-46ff-98d3-b720d0fee559>. Viitattu 10.2.2018

Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., Calabrò, V. 2012. Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. In Marco, L. & Alexandra, P. (Eds.) Bioethanol. Rijeka, Croatia: InTech. 95-122.

Walker, G-M. 2010. Science and Technology of Fuel Alcohol. Scotland. University of Abertay.

World Health Organization. 2009. Arsenic, metals, fibres and dusts, volume 100C; A review of human carcinogens. Www-dokumentti.
Saatavissa:<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C.pdf>. Viitattu 13.3.2018.

Wright, J., Johnson, A., Moldover, M. 2003. Design and Uncertainty for a PVTt Gas Flow Standard. In Newbury, D., Marinenko, R. (Eds.) Journal of Research of the National Institute of Standards and Tehnology. 108.

Yle 2017. Suuri bioetanolitehdas suunnitteilla Pietarsaareen. Www-dokumentti.
Saatavissa: <https://yle.fi/uutiset/3-9293298>. Viitattu 21.1.2018.

Zhang, X., Zhang, Y. 2013. Cellulases: Characteristics, sources, production, and applications. In S. Yang, H. El-Enshasy & N. Thongchul (Eds.) Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers. 2nd Edition. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. 131-146.