

Opinnäytetyö (AMK)

Prosessi- ja materiaalitekniikka

2020

Matti Koivisto

LIGNIININ HYÖDYNTÄMINEN JA ENTSYMAATTINEN KÄSITTELY

Matti Koivisto

LIGNIININ HYÖDYNTÄMINEN JA ENTSYMAATTINEN KÄSITTELY

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää eri lakkaasientsyymivariaatioiden soveltuvuutta ligniinin muokkaamiseen, sekä kartoittaa mahdollisuuksia ligniinin kaupalliseen hyödyntämiseen. Toimeksiantajana toimi Metgen Oy, joka tuottaa yrityksille räätälöityjä ratkaisuja biomassan hyödyntämiseen korkean arvon jatkojalosteiksi.

Kokeellisessa osuudessa verrattiin eri lähteistä peräisin olevien entsyymiprototyyppien aktiivisuustasoa kahdella mallisubstraatilla ja selvitettiin, korreloiko aktiivisuus mallisubstraateilla aktiivisuuteen ligniinin muokkauksessa. Tarkastelun kohteina olivat ligniinin radikalisaatio, demetylaatio, depolymerisaatio ja repolymerisaatio. Kokeissa käytettiin muuttujina prosessilämpötilaa, entsyymien annostusta sekä liuokseen liunneen hapen määrää. Lisäksi työn aikana tarkasteltiin käytettyjen analyysimenetelmien soveltuvuutta lakkaasientsyymien vaikutusten mittaukseen.

Kokeet tehtiin laboratoriomittakaavassa 125 ml erlenmeyer-astioissa, joista kerättiin tietyn väliajoin näytteet analyyseja varten. Näytteet analysoitiin spektroskopisesti demetylaation ja aktiivisuuden selvittämiseksi sekä kromatografisesti de- ja repolymerisaation havaitsemiseksi.

Työn tuloksena saatiin tietoa eri entsyymivariaatioiden soveltuvuudesta ligniinin muokkaamiseen sekä prosessiolosuhteiden vaikutuksista ligniinin rakenteeseen, aktiivisuuteen ja partikkelikokoon liuoksessa. Lisäksi kirjallisessa osuudessa selvitettiin eri ligniinityyppien ominaisuuksia sekä kartoitettiin nykyisiä ja tulevia mahdollisuuksia ligniinin kaupalliseen hyödyntämiseen.

ASIASANAT:

ligniini, entsyymit, valorisaatio, hyödyntäminen

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Chemical and materials engineering

2020 | number of pages 70

Matti Koivisto

LIGNIN VALORISATION AND ENZYMATIC TREATMENT

The goal of this thesis was to study the suitability of different laccase enzyme variants for lignin modification and to survey the possibilities for commercial utilization of lignin. The client was Metgen Oy which produces tailored solutions for companies for biomass utilization in processed high value products.

In the experimental part different enzyme prototypes from various sources were studied by comparing the activity level of two model substrates to determine whether the activity of the model substrates correlates with the activity in lignin modification. The subjects of investigation comprised lignin radicalization, demethylation, depolymerization and repolymerization. As variables, process temperature, enzyme dosage and the amount of dissolved oxygen in the solution were deployed. Additionally, the suitability of the analysis methods selected for measuring the effects of the laccase enzymes was reviewed.

The experiments were made at laboratory scale in 125 ml Erlenmeyer flasks, from which the samples were collected at certain intervals for analysis. The samples were analyzed spectroscopically for the determination of demethylation and activity, and chromatographically for the detection of de- and repolymerization.

Information about the suitability of different enzyme variants for lignin modification was gathered as well as the effects of different process parameters on the structure, activity and particle size of the lignin in solution. In the literature survey also the properties of different lignin types were studied, and present and future possibilities for commercial utilization of lignin were surveyed.

KEYWORDS:

lignin, enzymes, valorization

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	9
2 LIGNIINI	11
2.1 Ligniinin kemiallinen koostumus	11
2.2 Ligniinityyppien luokittelu	14
2.3 Tekninen ligniini	15
3 LIGNIININ HYÖDYNTÄMINEN	19
3.1 Ligniinin entsyymaattinen konversio/depolymerisaatio	19
3.2 Ligniinin jatkojalosteet	22
4 ENTSYYMIT	33
4.1 Entsyymien jalostus ja tuotanto	34
4.2 Bioreaktorit	36
5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	39
6 TULOSTEN TARKASTELU	46
6.1 Aktiivisuus mallisubstraateille	46
6.2 Ligniinin liukoisuus	51
6.3 Entsyymien stabiilius ligniiniliuoksessa ja vaikutus ligniinin demetylaatioon	52
6.4 Ilmastus	55
6.5 Lämpötila	58
6.6 Partikkelijakauma (HPLC/SEC)	62
7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	65
8 LÄHDELUETTELO	67

KAAVAT

Kaava 1. Beer-Lambertin laki	44
Kaava 2. Transmittanssi	44
Kaava 3. Absorbanssi	44
Kaava 4. Vertailuarvo	47
Kaava 5. Entsyymien aktiivisuus	50
Kaava 6. Entsyymien suhteellinen aktiivisuus	50

KUVAT

Kuva 1. Lehtipuiden ligniinin rakenne.	12
Kuva 2. Havupuiden ligniinin rakenne.	13
Kuva 3. Ligniiniyksiköt, prekursorit ja sidosten nimeäminen.	13
Kuva 4. Kupariatomien koordinaatioverkosto ja niiden nimeäminen lakkaasi-molekyylissä.	21
Kuva 5. Avain-lukkomekanismi.	33
Kuva 6. Aktiivilieteraktorin osat.	37
Kuva 7. ABTS-molekyylin hapettumisreaktio.	40
Kuva 8. Ehdotettu reaktiomekanismi lakkaasikatalysoidun 2,6-dimetoksifenolin hapettumiselle. 3,3',5,5'-tetrametoksibifenyyli-4,4'-dioliiksi.	39
Kuva 9. Syringaldehydin molekyylirakenne.	40
Kuva 10. Vanilliinin molekyylirakenne.	40
Kuva 11. Kraft-ligniinin demetylaatioreaktio.	41
Kuva 12. Tetraasiini-molekyylin muodostumisen reaktiomekanismi.	42
Kuva 13. Kokoekskluusiokromatografiamenetelmä.	43
Kuva 14. Graafinen kuvaus UV-VIS-spektrofotometriasta.	45

KUVIOT

Kuvio 1. Standardientsyymien aktiivisuuskuvio.	47
Kuvio 2. Entsyymien vertailuarvot ja keskihajonta.	48
Kuvio 3. Esimerkki vertailukertoimien vaihtelusta laimennoskertoimien välillä.	49
Kuvio 4. Entsyymien aktiivisuudet ($\mu\text{kat/l}$) ja mittausten keskihajonta.	51
Kuvio 5. Ligniinin demetylaatioaste.	54
Kuvio 6. Entsyymien aktiivisuus ligniinille.	55
Kuvio 7. Liuenneen hapen vaikutus aktiivisuuteen.	56
Kuvio 8. Liuenneen hapen vaikutus demetylaatioasteeseen.	57
Kuvio 9. Lämpötilan vaikutus aktiivisuuteen.	58
Kuvio 10. Lämpötilan vaikutus demetylaatioasteeseen.	59
Kuvio 11. Puhdistetun ja puhdistamattoman entsyymien aktiivisuuden vertailu.	60
Kuvio 12. Syringaldehydin ja vanilliinin demetylaatioaste.	61
Kuvio 13. Partikkelikokojakauma 40 ml tilavuudessa eri aikapisteissä.	63
Kuvio 14. Partikkelikokojakauma 100 ml tilavuudessa eri aikapisteissä.	64

TAULUKOT

Taulukko 1. Fenyylipropanoidien jakauma ligniinilähteiden välillä.	14
Taulukko 2. Yksiköiden sidosten jakauma ligniinilähteiden välillä.	14
Taulukko 3. Teknisten ligniinien luokittelu.	15
Taulukko 4. Eri ligniinien ominaisuuksia.	18
Taulukko 5. Fenolihydroksyyliipitoisuudet ligniininäytteissä.	18
Taulukko 6. Ligniinin jatkojalosteet, markkinat ja arvo.	20
Taulukko 7. Esimerkkejä ligniinipohjaisista tuotteista ja niiden käyttötarkoituksista.	32
Taulukko 8. Esimerkkejä entsyymien reaktionopeuksia	34

KÄYTETYT LYHENTEET ¶ .

ABTS	2,2'-atsino-bis-(3-etylibentsotiatsoliini-6-sulfonihappo)
AFEX	ammoniakkiräjäytys, ammonia fiber expansion
BTX	bentseeni, toluene, xyleeni
DMP	2,6-dimetoksifenoli
DNA	deoksiribonukleiinihappo
EH	entsymaattinen hydrolyysi
G	guajakoliyksikkö
GFC	geelisuodatuskromatografia, gel-filtration chromatography
GPC	geeliläpäisykromatografia, gel-permeation chromatography
H	parahydroksyylifenylyyksikkö
HP	havupuu
HPLC	korkean suorituskyvyn nestekromatografia, high performance liquid chromatography
Kr	kraft
LDM	ligniinidemetylaasientsyymi, lignin demethylase enzyme
LP	lehtipuu
MDF	vaneri-, lastu- ja kuitulevy, medium-density fibreboard
MH	maissihaastari
Mn	keskimääräinen molekyylipaino, number average molecular weight
Mw	painokeskimääräinen molekyylipaino, weight average molecular weight
Os	organosolv
PDI	polydisperteetti-indeksi, polydispersity index
RNA	ribonukleiinihappo
S	syringyyliyksikkö
SEC	kokoeksklusiokromatografia, size-exclusion chromatography
So	sooda

Su	sulfiitti
UV-VIS	ultravioletti-näkyvä valo, ultraviolet-visible
VK	vehnänkorsi

1 JOHDANTO

Ligniinin jatkojalostukseen kohdistuu suurta kiinnostusta ympäri maailmaa, sillä kasvava väestö, lisääntynyt tarve polttoaineille sekä kemikaaleille yhdessä luonnonvarojen rajallisuuden kanssa ovat saaneet aikaan suuren tarpeen valmistaa kemikaaleja fossiilisten raaka-aineiden sijaan uusista lähteistä.

Ligniini on selluloosan jälkeen yleisin luonnossa esiintyvä polymeeri ja suurin aromaattisten yhdisteiden lähde. Ligniiniä tuotetaan arviolta 70 miljoonaa tonnia pääasiassa paperi- ja selluteollisuuden sivutuotteena ja tästä ainoastaan 1,3 miljoonaa tonnia jalostetaan kemikaaleiksi lopun päätyessä poltettavaksi energiaksi. Koska ligniinin saatavuus on hyvä ja hinta edullinen, on sillä huomattavaa potentiaalia toimia korvaajana useille kemianteollisuuden vaatimille kemikaaleille, kuten BTX-yhdisteille (bentseeni, tolueni, xyleeni).

Ligniini on kuitenkin erittäin heterogeeninen makromolekyyl, jonka rakenne riippuu sekä ligniinin luonnollisesta lähteestä, että käytettävästä erottelumenetelmästä, ja näistä syistä sen jalostukseen liittyy myös suuria haasteita. Ligniinin jalostukseen on kehitetty useita erilaisia lähetysmistapoja viimeisten vuosien aikana, mutta lopullinen läpimurto on vielä saavuttamatta.

Kaarinassa toimiva vuonna 2008 perustettu Metgen Oy on keskittynyt kehittämään eri kemianteollisuuden yrityksille räätälöityjä ratkaisuja, joilla ligniinin jalostusaste pystyttäisiin nostamaan riittävän korkealle, jolloin prosessointi olisi taloudellisesti kannattavampaa kuin käyttö energiaksi. Yrityksessä on lähestytty käyttämällä entsyymikatalysoitua ligniinin muokkausta yhdistettynä jatkuvatoimiseen suodatukseen. Työn tarkoituksena oli verrata eri lähteistä peräisin olevien entsyymiprototyypin aktiivisuustasoa kahdella mallisubstraatilla, ja selvittää korreloiko aktiivisuus mallisubstraateilla aktiivisuuteen ligniinin muokkauksessa, sekä löytää paras prototyyppi ligniinin muokkaamiseen alkaalisissa olosuhteissa.

Opinnäytetyössä tarkastellaan laboratoriomittakaavassa prosessiolosuhteiden kuten lämpötilan, ilmaston ja entsyymien annostuksen vaikutusta lakkaasin aktiivisuuteen, stabiilisuuteen sekä ligniinimolekyylin demetylaatiotasoon. Vaikutusten arviointi tehdään käyttämällä aktiivisuusmittauksia ABTS- ja DMP-mallisubstraateilla, Purpald-menetel-

mää demetylaatiotason mittaukseen ja kokoekskluusiokromatografiaa partikkelikokoja-
kauman selvittämiseen. Lisäksi kirjallisessa osuudessa käydään läpi jalostetun ligniinin
potentiaalisia käyttökohteita.

2 LIGNIINI

Ligniini (lat. *lignum*, puu) on selluloosan jälkeen yleisin luonnossa esiintyvä polymeeri, josta koostuu 20-40 % puiden ja 15-20 % ruohokasvien massasta. Ligniini täyttää selluloosan ja hemiselluloosan jättämät aukot kasvisoluseinämässä sitoen lignoselluloosarakenteen yhteen ja tehden soluseinämästä ja täten myös koko kasvista mekaanisesti vahvan. Koska ligniini on antimikrobinen kestävä yhdiste, se myös suojaa kasvia sitä vastaan hyökkääviltä patogeeneilta ja muilta ulkoisilta rasituksilta. (Zobiolo et al., 2012)

Kasvit kuljettavat vettä, ravinteita, hivenaineita, yhteyttämistuotteita ja jätteitä putkimaisen solukudosten läpi. Tämä johtosolukko kasveissa koostuu soluista, joiden seinämät sisältävät ligniiniä. Toisin kuin selluloosa ja hemiselluloosa, on ligniini hydrofobinen molekyyli, jonka johdosta se toimii eristeenä vedenkuljetuskanavien solujen seinämissä, jolloin vesi ja siihen lieunneet molekyylit kulkeutuvat kasvin niitä tarvitseviin osiin tai poistuvat juuriston kautta maaperään. (Zobiolo et al., 2012)

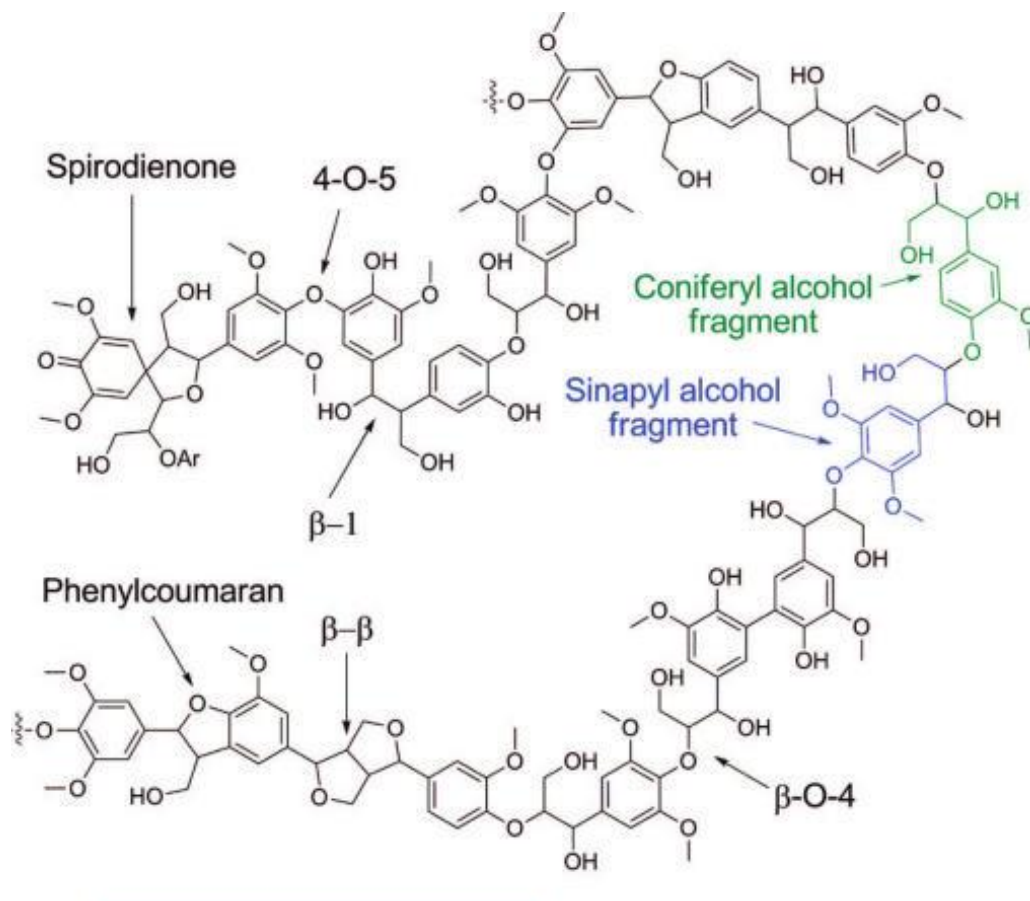
Ligniini on haluttu materiaali kemikaalien raaka-aineeksi, vaikka se on rakenteeltaan monimutkainen makromolekyyli ja sen käyttöön liittyy tästä syystä myös suuria vaikeuksia. Ligniini sisältää suuren määrän fenolisia ja aromaattisia yhdisteitä, joita pidetään potentiaalisena korvaajana muun muassa kemianteollisuuden vaatimille maaöljystä peräisin oleville bentseenille, tolueenille ja xyleenille, eli nk. BTX-yhdisteille. (Zhuohua Sun et al., 2018)

Koska ligniiniä tuotetaan vuodessa arviolta 70 miljoonaa tonnia pääasiassa paperi- ja selluteollisuuden sivutuotteena ja ainoastaan 1,3 miljoonaa tonnia jatkojalostetaan kemikaaleiksi, on sen saatavuus hyvä ja hinta edullinen (Orbis Research, 2017). Tämän lisäksi ligniini on myrkytön, biohajoava sekä uusiutuva materiaali (Huang et al., 2019).

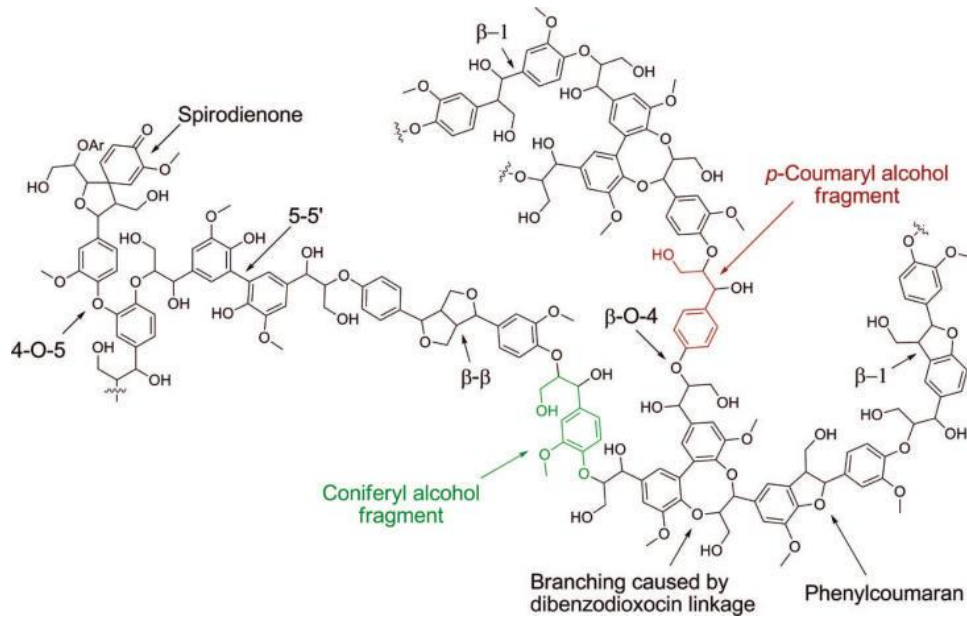
2.1 Ligniinin kemiallinen koostumus

Ligniini on heterogeeninen makromolekyyli ja rakenneosien suhteellinen esiintyvyys vaihtelee ei ainoastaan eri kasvien välillä (Kuva 1, Kuva 2), vaan myös saman kasvin eri kudosten välillä, eikä analyysimenetelmien nopeasta kehityksestä huolimatta tarkkaa rakennetta tunneta. Ligniinimolekyyli syntetisoiutuu pääasiassa kolmesta fenyylipropa-

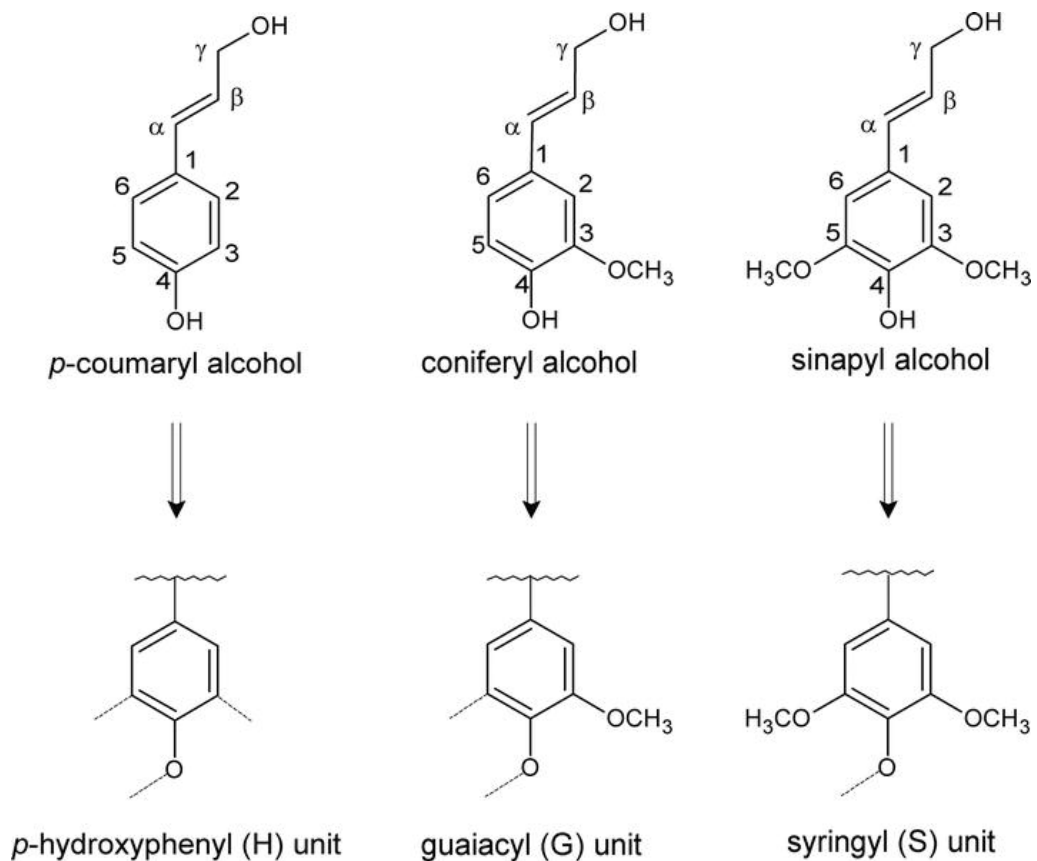
noideihin kuuluvasta monolignolista: p-kumaryylialkoholi, koniferyylialkoholi, ja sinapyyli-alkoholista. Monolignolit liittyvät toisiinsa erilaisin sidoksien, joista yleisin on β -O-4-aryyleetterisidos. Muut pääasialliset sidostyyppit ovat β -5-fenylikumaraani-, 5-5-bifenyyli-, 4-O-5-diaryyleetteri-, β -1-(1,2-diaryyipropaani)-, β -O-4-aryyleetteri- ja β - β -resinolisidos. Monolignolit ovat prekursoreita ja liittyessään toisiinsa muodostuu niistä parahydroksyyli-fenylyli- (H), guajakoli- (G) ja syringyyliyksiköitä (S) (Kuva 3). Taulukossa 1 on esitetty yksiköiden lukumäärän ja jakauman vaihtelu eri ligniininlähteisen välillä ja taulukossa 2 yksiköiden välisten sidosten vaihtelu. Havupuu- eli guajakoliligniini koostuu pääasiassa koniferyyliyksiköistä ja pienestä määrästä sinapyyliyksiköitä. Myös lehtipuuligniini sisältää koniferyyli- ja sinapyyliyksiköitä, mutta ne esiintyvät eri suhteissa kuin havupuissa. Ruohokasvi- eli guajakoli-syringyyliigniini koostuu guajakoli-, sinapyyli-, ja kumaryyliyksiköistä. (Azadi et al., 2013; Huang et al., 2019; Zakzeski et al., 2010)



Kuva 1. Lehtipuiden ligniinin rakenne. Näkyvässä koniferyylialkoholi- (vihreä) ja sinapyyli-alkoholiyksikkö (sininen) Kuvan lähde: (Zakzeski et al., 2010).



Kuva 2. Havupuiden ligniinin rakenne. Näkyvissä koniferyylialkoholi- (vihreä) ja parakumaryylialkoholiyksikkö (punainen) Kuvan lähde: (Zakzeski et al., 2010).



Kuva 3. Ligniiniyksiköt, prekursorit ja sidosten nimeäminen. Ylhäällä: parakumaryyli-, koniferyyli- ja sinapyylialkoholi. Alhaalla: parahydroksyylifenyyl-, guajakoli- ja syringyyliyksikkö kuva: (Schoenherr, 2018)

Taulukko 1. Fenyylipropanoidien jakauma ligniinilähteiden välillä (Azadi et al., 2013).

Kasvilaji	Ligniini (wt %)	Kumaryyli	Koniferyyli	Sinapyyli
Havupuut	27-33	-	90-95	5-10
Lehtipuut	18-25	-	50	50
Ruohokasvit	17-24	5	75	25

Taulukko 2. Yksiköiden sidosten jakauma ligniinilähteiden välillä (Azadi et al., 2013).

Kasvilaji	β -O-4	α -O-4	4-O-5	β -5	β -1	β - β	5-5
Havupuu	46	6-8	3,5-4	9-12	7	2	9,5-11
Lehtipuu	60	6-8	6,5	6	7	3	4,5

2.2 Ligniinityyppien luokittelu

Ligniinin rakenne, molekyylipaino, ja sidosten lukumäärä ja laatu eroavat paitsi alkuperäisen luonnollisen lähteen, myös erotteluprosessin mukaan. Eri ligniinityypit voidaan luokitella usealla eri tavalla. Pääasiassa ne nimetään erotuksessa käytettyjen menetelmien mukaan, mutta myös yksityiskohtaisempia luokittelutapoja on käytössä.

Erottelumenetelmän mukaan ligniinit voidaan jaotella kraft- (kraft-, eli sulfaattiprosessi), sooda- eli alkaliligniiniksi (soodaprosessi), sekä lignosulfonaateiksi (sulfiittiprosessi). Näistä kraft-prosessi on maailmanlaajuisesti yleisesti käytetyin. Edellä mainittujen prosessien lisäksi on olemassa huomattavasti vähemmän käytettyjä menetelmiä ligniinin erotteluun biomassasta, kuten erilaisia variaatioita happohydrolyysistä, höyryräjäytys ja organosolv-esikäsitteily. Ligniiniä on mahdollista erotella biomassasta sekä happamissa, että emäksisissä olosuhteissa. Happohydrolyysi, höyryräjäytys, sulfiittiprosessi ja suurin osa organosolv-prosesseista tapahtuvat happamisessa olosuhteissa. Kraft- ja soodaprosessit tapahtuvat emäksisissä olosuhteissa, kuten myös osa organosolv-prosesseista ja niin kutsuttu ammoniakkiräjäytysprosessi (AFEX, ammonia fiber expansion). Edellä mainittujen luokitteluperusteiden lisäksi luokittelussa voidaan ottaa huomioon ligniinin sisältämän rikin määrä, varsinkin kun jaottelua on tarpeen tehdä käyttökohteen mukaan. Rikkipitoisiin ligniineihin luokitellaan eritoten lignosulfonaatit ja kraft-ligniini, kun taas

sooda-, organosolv-, happohydrolysoitu ja höyryräjäytetty ligniini sisältävät vähän tai ei ollenkaan rikkiä. (Berlin and Balakshin, 2014)

Taulukko 3. Teknisten ligniinien luokittelu. Suomennettu lähteestä (Berlin and Balakshin, 2014).

Ligniinityyppi	Tuotanto	pH-alue	Rikkipitoisuus	Puhtaus
Kraft	Teollinen	Emäs	Kohtalainen	Kohtalainen
Sooda	Teollinen	Emäs	Ei sisällä	Alhainen/kohtalainen
Lignosulfonaatti	Teollinen	Hapan	Korkea	Alhainen
Organosolv	Pilotti/demo	Hapan	Ei sisällä	Korkea
Hydrolyysi	Teollinen/pilotti	Hapan	Ei sisällä/alhainen	Alhainen/kohtalainen
Höyryräjäytetty	Pilotti/demo	Hapan	Ei sisällä/alhainen	Alhainen/kohtalainen
AFEX	Pilotti	Emäs	Ei sisällä	Alhainen/kohtalainen

2.3 Tekninen ligniini

Ligniiniä syntyy vuosittain noin 70 miljoonaa tonnia pääasiassa paperi- ja selluteollisuuden sivutuotteena (Orbis Research, 2017). Teknisen ligniinin rakenne, puhtaus ja ominaisuudet riippuvat ligniinin alkuperäisen lähteen lisäksi käytettävistä menetelmistä sellun keitossa eli delignifikaatiossa. Kemiallisen ja mekaanisen erottelun seurauksena teknisen ligniinin rakenne eroaa merkittävästi luonnosta löytyvästä ligniinistä. Ligniinin hajoaminen tapahtuu pääasiassa β -O-4-sidosten katketessa, vaikkakin mekanismi eroaa eri käsittelyprosessien välillä. Sidosten katketessa muodostuu molekyyliin uusia fenolisia hydroksyyliiryhmiä, karboksyyliiryhmiä ja saturoituneita alifaattisia rakenteita. Samalla molekyylipaino laskee ja alifaattisten hydroksyyliiryhmien ja hapettuneiden alifaattisten yksiköiden määrä vähenee. Sellunkeiton yhteydessä tapahtuu lisäksi useita käänteisiä reaktioita, jotka muokkaavat ligniinin rakennetta entisestään, kuten kondensoituminen ja yksiköiden uudelleenjärjestäytyminen. Jälkimmäisten reaktioiden seurauksena molekyylipaino jälleen kasvaa ja reaktiivisuus vähenee, mutta reaktioaste riippuu prosessiolosuhteista kuten lämpötilasta, pH:sta ja ajasta.

Alkaalisissa reaktio-olosuhteissa pääreaktiotuotteena on koniferyyli-alkoholiyksiköt, joita muodostuu β -O-4-sidosten katketessa kinonimetidi-välituotteen vaikutuksesta. Koniferyyli-alkoholiyksiköt eivät kuitenkaan akkumuloidu ligniinin, vaan käyvät läpi toissijaisia uudelleenjärjestäytymisreaktioita muodostaen alifaattisia (aryyli-) happoja. Ligniinissä

olevia β -5 ja β -1-tyyppin sidoksia ei pystytä katkaisemaan, mutta niistä muodostuu stilbeeni-tyyppisiä rakenteita, jotka kerääntyvät ligniinin rakenteeseen. (Berlin and Balakshin, 2014; Gosselink, 2011)

Seuraavissa kappaleissa käymme läpi yleisimpien ligniinityyppien erotteluprosesseja sekä ominaisuuksia.

(Kalami, 2018) on vertaillut tutkimuksessaan eri ligniinityyppien rakennetta ja ominaisuuksia niiden erottelumenetelmän ja luonnollisen lähteen mukaan. Tässä kappaleessa tutkittaviin ominaisuuksiin kuului rikki- ja tuhkapitoisuus, fenolihappojen ja α -hydroksyylien osuus, molekyylipaino, polydispersiteetti-indeksi eli näytteen polymeerijakauman taseisuus, ja lukukeskimääräinen moolimassa, jolla tarkoitetaan polymeerien keskimääräistä kokoa näytteessä. Selvennyksenä kerrottakoon, että tässä yhteydessä tuhkaista puhuttaessa tarkoitetaan epäorgaanisia mineraaleja.

Lignosulfonaatissa oli tutkimuksen mukaan suurin tuhkapitoisuus ja organosolv-ligniinillä pienin. Koska lignosulfonaatin erottelussa käytetään rikkidioksidia ja kraft-ligniinin erottelussa natriumsulfidia, suurempi tuhkapitoisuus näissä näytteissä saattaa johtua korkeammasta rikkipitoisuudesta, tai saostusvaiheessa emäksisen lipeän neutralointiin käytetyistä natriumista tai kaliumista. Vaikka näytteistä kaksi oli havupuista peräisin ollutta kraft-ligniiniä, oli tuhkapitoisuus erilainen. Tämä johtuu mahdollisesti eroista erotteluprosessissa, kuten lämpötilasta, pH:sta tai ajasta.

Erotteluprosesseissa joissa ei käytetä rikkiä, kuten organosolv-prosessissa, on tuloksena ligniiniä, jonka rikkipitoisuus on erittäin alhainen. Maissin korjuujätteestä maissihaastarista eroteltu ligniini sisälsi kuitenkin suuremman määrän tuhkaa, kuin havu- ja lehtipuista eroteltu ligniini. Tämä voitaneen selittää sillä, että ruokakasveissa kuten maississa on lähtökohtaisesti korkeampi silikapitoisuus, kuin puusta saadussa biomassassa. Kuitenkin vehnäkorsista erotetussa ligniinissä tuhkapitoisuus oli suhteellisen korkea (1,78 %). Tähän selitykseksi ehdotetaan joko vehnän korkeampaa silikapitoisuutta, tai vaihtoehtoisesti rikin tai rikkihapon käyttöä ligniinin saostuksessa.

Kuten muutkin taulukossa 4 esitetyt ominaisuudet, myös ligniinin rakenne ja molekyylipaino riippuvat ligniinin lähteestä ja erottelumenetelmästä. Kaksi tutkimuksessa (Kalami 2018) käytettyä lehtipuuligniini-näytettä, L1-Kr-LP ja L5-Os-LP sisälsivät muita näytteitä enemmän syringyyliyksiköitä. Lehtipuut sisältävät muita kasvilajeja enemmän heikkoja eetterisidoksia muodostavia syringyyliyksiköitä. Eetterisidokset katkeavat sellunkeitto-prosessissa helposti hajottaen ligniinimolekyyliä pienempiin yksiköihin. Guajakoli- sekä

p-hydroksifenyyliyksiköt kykenevät muodostamaan kestäviä C-C-sidoksia kasvin biosynteesissä. Tästä syystä paljon em. yksiköitä sisältävät ligniinit ovat oletettavasti molekyylipainoltaan suurempia. Toisaalta, kuten taulukosta 5 näkee, kraft-ligniinit L3-Kr-HP ja L8-Kr-HP sisältävät suuremman määrän guajakoli- ja *p*-hydroksifenyyliyksiköitä, kuin organosolv-menetelmällä erotettu L4-Os-HP-näyte ja niillä on myös pienempi molekyyli-massa. Tutkimuksessa ehdotetaan tämän selittyvän heikkojen β -O-4-eetterisidosten katkeamisella kraft-prosessissa, mutta ei lievemmissä olosuhteissa tapahtuvassa organosolv-prosessissa.

Taulukko 4. Eri ligniinien ominaisuuksia. Sulkeissa esitettyinä standardijakauma viiden analyysin kesken. Taulukko muokattu lähteestä (Kalami 2018).

Näyte	Rikki (%)	Tuhka (%)	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	PDI
L1-Kr-LP	0,20	1,1 (0,1)	1300	3100	2,3
L2-EH-MH	0,16	0,6 (0,1)	2400	5460	2,3
L3-Kr-HP	1,60	4,3 (0,2)	1790	4600	2,6
L4-Os-HP	0,15	0,4 (0,1)	1450	5770	4,0
L5-Os-LP	0,00	0,1 (0,1)	1540	4080	2,6
L6-Su-HP	5,08	11,4 (0,2)	-	-	-
L7-Os-MH	0,62	3,3 (0,2)	2300	9350	4,0
L8-Kr-HP	3,21	1,9 (0,3)	1910	4590	2,4
L9-So-VK	0,61	1,8 (0,2)	1600	4580	2,7

Lyhenteet: LP = lehtipuu, HP = havupuu, MH = maissihaastari, VK = vehnänkorsi, Kr = kraft, EH = entsyymaattinen hydrolyysi, Os = organosolv, So = sooda, ja Su = sulfiitti.

Taulukko 5. Fenolihydroksyyliipitoisuudet ligniininäytteissä. Yksiköt mmol/g. Taulukko muokattu lähteestä (Kalami, 2018).

Näyte	Syringyyli	Guajakoli	<i>p</i> -hydroksifenoli
L1-Kr-LP	2,40	1,00	0,21
L2-EH-MH	0,51	0,68	0,81
L3-Kr-HP	0,00	1,92	0,24
L4-Os-HP	0,00	1,50	0,16
L5-Os-LP	1,55	0,89	0,17
L6-Su-HP	0,00	0,06	0,01
L7-Os-MH	0,35	0,60	0,14
L8-Kr-HP	0,00	2,18	0,25
L9-So-VK	1,27	1,01	0,27

Lyhenteet: LP = lehtipuu, HP = havupuu, MH = maissihaastari, VK = vehnänkorsi, Kr = kraft, EH = entsyymaattinen hydrolyysi, Os = organosolv, So = sooda, ja Su = sulfiitti.

3 LIGNIININ HYÖDYNTÄMINEN

Koska ligniiniä on helposti saatavilla ja sen hinta on edullinen, on se houkutteleva vaihtoehto korvaamaan fossiilista lähteistä saatavia materiaaleja. Ligniini sisältää suuren määrän erilaisia funktionaalisia ryhmiä kuten hydroksyyli-, metoksi-, karbonyyli-, karboksyyli- ja bentseeniryhmiä (Naseem et al., 2016). Tämä mahdollistaa molekyylin monipuolisen muokkaamisen eri käyttötarkoituksiin sopivaksi. Ligniini johdannaisia kemikaaleja voidaan käyttää lukuisiin eri käyttötarkoituksiin, joihin osaan tutustutaan tarkemmin seuraavissa kappaleissa.

3.1 Ligniinin entsymaattinen konversio/depolymerisaatio

Jotta ligniiniä voitaisiin jatkojalostaa arvokkaiksi raaka-aineeksi eri teollisuudenaloille, on se pystyttävä depolymerisoimaan pienempiin aromaattisiin yksiköihin, jotka edelleen hajotetaan pienemmän molekyylipainon yksiköiksi. Taulukossa 6 on esitetty eri jalostusasteen ligniinin hintoja sekä kyseisen tuotteen yleisiä käyttötarkoituksia. Jalostetun tuotteen arvo on suoraan verrannollinen jalostusasteeseen raakan energiaksi käytettävän ligniinin ollessa arvoltaan alhaisinta ja yksinkertaisten pienten molekyylien arvokkaimpaa. (Myriam, 2018)

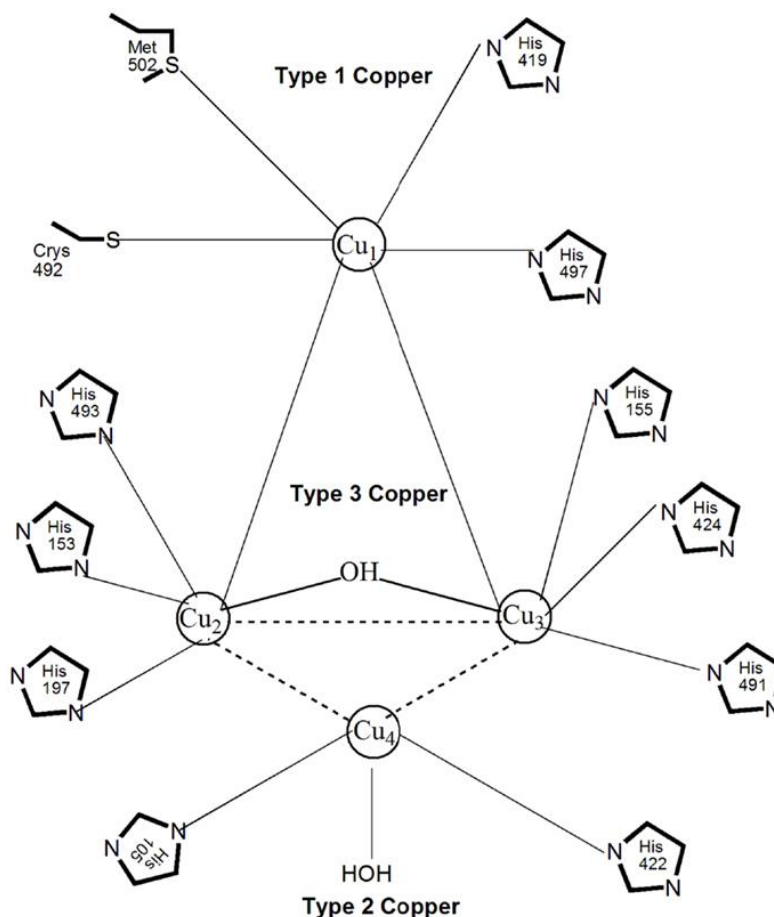
Taulukko 6. Ligniinin jatkojalosteet, markkinat ja arvo. Suomennettu lähteestä (Hämäläinen et al., 2018).

Ligniinityyppi	Molekyylipaino	Reaktiivisuus ja liukoisuus	Sovellus	Korvattava tuote	Öljypohjaisten tuotteiden arvo
Paperi- ja sellu	5-100 kDa	Huono	Poltto energiaksi	Öljy/sähkö	50-150 €/tonni
Liukoinen ligniini	3-50 kDa	Keskiverto	Hartsit ja muut kiinneaineet	Formaldehydi	400-500 €/tonni
Entsyymihapetettu ligniini	Sovelluksen mukaan	Hyvä	Komposiitit	Polymeerit	>1000 €/tonni
Entsyymidepolymerisoitu ligniini	0,3 – 2 kDa	Hyvä	Vaahdotuotteet ja komposiitit	PVA	1000-1500 €/tonni
Entsyymidepolymerisoidut fraktiot	0,3, 0,5, 0,7, ..., 2 kDa	Erinomainen	Uudet materiaalit	Erikoiskemikaalit ja -polymeerit	>1500 €/tonni

Koska ligniini on erittäin heterogeeninen molekyyli sisältäen monia eri sidostyyppisiä sekä rakenneosia, sisältyy depolymerisaatioon ja konversioon useita tekijöitä, jotka vaikuttavat lopputuotteen kemiallisiin sekä fysikaalisiin ominaisuuksiin kuten molekyylipainojakaumaan, isoelektriseen pisteeseen, liukoisuuteen, reaktiivisuuteen, vapaiden fenoli-, hydroksyyli- ja karboksyyli-ryhmien määrään, yhdisteiden aromaattisuuteen, yhdisteiden silloitusasteeseen ja -tyyppiin sekä sitoutuneiden hiilihyaattien jäämiin. (Holladay et al., 2007) Ligniiniä depolymerisoitaessa happamissa tai alkaalisissa olosuhteissa ester- ja osat esterisidoksista katkeaa vapauttaen liukseen aromaattisia reaktiivisia molekyylejä, jotka alkavat helposti uudelleenpolymerisoitumaan ja lopputuloksena saatua olla alkuperäistä ligniiniä kondensoituneempi makromolekyyli (Gosselink, 2011).

Lakkaasit (EC 1.10.3.2, bentseenidioli:happi oksidoreduktaasi) ovat monikuparioksidiasientsyymejä, jotka ovat kykeneväisiä hapettamaan useita erilaisia substraatteja kuten fenoleita, ketoneja, fosfaatteja, askorbaatteja, amiineja ja ligniiniä. Lakkaasissa katalyytteina toimivat neljä kupariatomia, jotka on nimetty T1, T2, T3 α ja T3 β niiden sijainnin mukaan (Kuva 4). T1-kohdan kupari-ioni pelkistyy substraatin kiinnittyessä siihen, jolloin vastavuoroisesti substraatti hapettuu siirtäen elektronin T2-, T3 α ja T3 β -kupareiden muodostamaan kolmiytymiseen klusteriin, jossa molekulaarinen happi pelkistyy ve-

deksi. Koska kyseessä on yksielektroninen hapetusketju ja molekulaarisen hapen pelkistämiseen vedeksi vaaditaan neljä elektronia, voidaan lakkaasin ajatella toimivan akun tavoin säilöön elektroneja yksittäisistä hapettumisreaktioista, kunnes pelkistykseen vaadittava määrä elektroneja on saatavilla. Tähän vaaditaan neljä katalyysikiertoa, joten lakkaasi katalysoi neljä substraattia kahta syntyynyttä vesimolekyyliä kohden. (Desai, 2011)



Kuva 4. Kupariatomien koordinaatioverkosto ja niiden nimeäminen lakkaasi-molekyylissä. Kopioitu lähteestä (Christopher et al., 2014).

Lakkaaseja tuottavat sienet, bakteerit, kasvit ja hyönteiset. Lakkaasientsyymien tarkoitus luonnossa riippuu sekä niitä tuottavasta organismista, että kyseisen organismin elinvaiheesta. Esimerkkeinä sienissä lakkaasin tehtävänä on hajottaa ligniiniä, bakteereissa suojata hapettumiselta ja UV-valolta ja kasveissa katalysoida ligniinin polymerisaatiota. (Mate and Alcalde, 2016)

Metgenissä ligniinin hajottamiseen on valittu alkalifilisiä lakkaasientsyymejä. Yrityksessä tehdyssä tutkimuksessa niiden käytössä on havainnointu huomionarvoisia etuja. Sen lisäksi että ligniini on liukoinen korkeassa pH:ssa, huomattiin alkaalisissa olosuhteissa

ligniinin depolymerisaation lisääntyneen ja aktivaatioasteen nousseen, partikkelikoon laskeneen ja depolymerisaatiota tapahtui polymerisaatiota enemmän. Lisäksi prosessi ei vaadi orgaanisia liuottimia. Tällöin on mahdollista käyttää polymeeripohjaisia ultra-suodattimia, joka on sekä taloudellisesti kannattavaa että skaalautuvaa. (Hämäläinen et al., 2018)

3.2 Ligniinin jatkojalosteet

Sellu- ja paperiteollisuus tuottaa ylivoimaisesti suurimman määrän ligniiniä, mutta alan ollessa erittäin energiantensiivinen ja koska ligniini suuren energiasisältönsä vuoksi on erinomainen energianlähde, yleensä sellunkeitosta ylijäänyt ligniini käytetään kuivatun mustalipeän muodossa prosessienergiaksi. Ligniinin jatkojalostaminen korkeamman arvon tuotteiksi vaatii jatkokäsittelyä. Jatkokäsittelynä ligniinillä on kuitenkin erinomaisia ominaisuuksia ollessaan luonnossa hajoava ja ei-toksinen yhdiste, jota on kemiallisesti mahdollista muokata toiminnalliseksi yhdisteiksi lukuisiin eri käyttötarkoituksiin. (Calvo-Flores et al., 2015)

Ligniinin rakenne ja ominaisuudet riippuvat käytetyistä erottelumenetelmistä sekä ligniinin luonnollisesta lähteestä kuten kappaleessa 2.2 esitettiin, joten eri ligniinityypeillä on myös eri käyttötarkoituksia. Tärkeimmät ligniinijohdannaiset jatkokäyttöä ajatellen ovat kraft-prosessista saatava kraft-ligniini sekä sulfiittiprosessista saatavat lignosulfonaatit. Lignosulfonaattien pääasialliset käyttökohteet ovat erilaisina lisäaineina kuten kosteudenpoistajina, sidosaineina ja reologian muokkaajina. Kraft-ligniinin käyttökohteet ovat vähäisempiä, sillä kraft-ligniini on liuokoisessa muodossa vain yli pH 10:ssä. Vaikka kraft-ligniini on vähemmän reaktiivisempaa on se selvästi yleisin ligniinityyppi ja sen jatkokäsittelyyn kohdistuu huomattavaa mielenkiintoa. (Wang et al., 2010)

Kraft-prosessi, tai sulfaattimenetelmä, on maailmanlaajuisesti yleisin käytössä oleva sellunkeitto-, tai delignifikaatiomenetelmä, sillä prosessi on energiatehokas, siinä käytetyt kemikaalit pystytään tehokkaasti kierrättämään, prosessista saatava sulfaattisellu on fyysiokeemiallisilta ominaisuuksiltaan kestävä, eikä prosessia rajoita käytetty kuidun lähde (Wang et al., 2010). Kraft-ligniinin osuus markkinoista on yli 90 % (Myriam, 2018).

Kraft-prosessissa lignoselluloosamassaa liuotetaan alkaalisissa olosuhteissa natriumhydroksidi-/natriumsulfidiliuoksessa, eli valkolipeässä. Tarkoituksena on saada poistettua riittävän paljon ligniiniä lignoselluloosarakenteesta, jolloin selluloosakuidun erottelu

ja jatkokäyttö olisi mahdollista. (Chakar and Ragauskas, 2004) Suurin osa hemisellulosaasta ja kraft-ligniinistä poistetaan liuoksesta ja jäljelle jäävä mustalipeä kuivataan ja poltetaan energiaksi, sillä kuivattu mustalipeä sisältää suuren määrän energiaa. Kraft-ligniini pystytään saostamaan ulos mustalipeästä laskemalla pH:ta happamalle alueelle (Goldman Valdes, 2019).

Kraft-prosessin tullessa suosituimmaksi keinoksi ligniinin erotteluun on sulfiittiprosessin osuus pudonnut noin kymmeneen prosenttiin. Sulfiittiprosessia on joustava ja sitä voidaan käyttää koko pH-alueella vaihtamalla keittokemikaaleja ja säätämällä annostusta. Prosessissa biomassaa keitetään rikkihapossa 120-180 °C asteessa 1-5 tunnin ajan. Keiton aikana sulfonihappo reagoi α -hiilen kanssa, joka johtaa ligniinin hydrolyysiin. Lignosulfonaattien rikkipitoisuus on suhteellisen korkea (4-8 %) jonka seurauksena lignosulfonaatit liukenevat veteen lähes koko pH-alueella. (Azadi et al., 2013)

Muita menetelmiä delignifikaatioon on sooda- ja organosolv-prosessit, hydrolyysi, pyrolyysi, höyryräjäytys, sekä ammoniakkiräjäytys (AFEX). Näiden ligniinien ominaisuuksia käytiin läpi kappaleessa 2.2., mutta prosesseja ei tarkastella tässä yhteydessä lähemmin.

Ligniini-molekyylillä sisältää suuren määrän reaktiivisia ryhmiä, jotka mahdollistavat useat käyttökohteet. Ligniiniä käytetään useissa sovelluksissa esimerkiksi eri tyyppisinä sidosaineina ja pinnoitteina, kelaatinmuodostajina sekä polymeereina. Edellä mainittujen lisäksi ligniinistä valmistetaan kalvoja, nanopartikkeleita sekä erikoiskemikaaleja kuten vanilliinia. Seuraavissa kappaleissa käydään läpi eri ligniinityyppien kaupallisia käyttökohteita.

Energia ja polttoaineet

Ligniiniä on mahdollista käyttää polttoaineena sellaisenaan kuivauksen jälkeen, tai käyttää lisäaineena erilaisissa kuluttaja- ja teollisuuskäyttöön tarkoitetuissa polttoaineissa.

Hiilipitoisena materiaalina ligniini sisältää suuren määrän energiaa sen lämpöarvon ollessa 26,7 MJ/kg (Jenkins 1998), joka tekee siitä erinomaisen energianlähteen niin teollisuudessa, kuin kotitalouksissa. Kraft-sellunkeittoprosessissa syntyy 7 m³ mustalipeää jokaista tuotettua sellukuutiota kohden. Syntynyt mustalipeä sisältää vielä 50 % puuainesta, joten yleensä se käytetään polttamalla prosessienergiaksi. Ligniinin polttamista

energiaksi ei lasketa kasvihuonekaasuinventaarioon, joka tekee siitä laskennallisesti hiilineutraalin tavan tuottaa energiaa ("Biorefineries—Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions", 2007). Mustalipeän polton yhteydessä kerätään myös sellunkeitossa käytetyt kemikaalit natriumhydroksidi ja natriumsulfidi, joten lisäksi kemikaalien uudelleenkäyttö ja talteenotto tehostuvat prosessin myötä (Calvo-Flores et al., 2015).

Raakaöljypohjaisen energiantuotannon hinnannousun johdosta puu lämmön- ja energiantuotantomuotona on nousemassa uudelleen varteenotettavaksi vaihtoehdoksi myös kotitalouksissa. Puujohdannaisia kuten pellettejä ja brikettejä valmistetaan puristamalla biomassaa korkeassa paineessa korkeatiheyksiksi kappaleiksi, jotka ovat helpompia käsitellä ja puhtaampia kuin puristamaton ja käsittelemätön biomassaa. Koska ligniini on luonnollinen sidosaaine ja sisältää suuren määrän energiaa, toimii se erinomaisena lisäaineena puujohdannaisia polttoaineita valmistettaessa. (Calvo-Flores et al., 2015)

Sidosaineet

Vastaavasti kuten edellisessä kappaleessa biomassasta puristettujen pellettien ja brikettien kanssa, voidaan ligniiniä käyttää sidosaaineena myös energiaksi poltettavia hiilibrikettejä valmistettaessa. Kun hiilibriketit puristettiin antrasiittilastuista (86-92 %), piimetalijauheesta (4,5 %), denaturoidusta kollageenista (0,9 %) ja ligniinistä (2,3-8,6 %) valmistetusta massasta, nousi brikettien energiatiheys 38 %. (Lumadue, 2012)

Myös eläirehujat pelletoidaan samalla periaatteella, kuin polttoaineita. Lignosulfonaattien ollessa ei-toksisia eläimille samalla toimien antioksidanttina sekä luonnollisena antibiootina, niiden käyttö tosiasiallisesti parantaa rehun laatua. Esimerkiksi kalsiumlignosulfonaattia pystytään käyttämään hyvin erilaisten rasva-, vilja-, kuitu- ja lisäainekoostumusten kanssa. Rehupellettien laadun nostamisen lisäksi lignosulfaattit antavat niille kestävyyttä, stabiilisuutta ja suojaavat niitä kosteudelta, jotka kaikki ovat tärkeitä ominaisuuksia logistiikan ja varastoinnin kannalta. (Calvo-Flores et al., 2015)

VTT on patentoinut vuonna 1988 pakkausmateriaalin, joka on tehty täysin kierrätetystä paperista. Materiaaliin on lisätty 20 % kraft- ja organosolv-ligniiniä, joka muodostaa pakkausarkkiin ilman- ja vedenkestävän esteen. Ligniinin lisääminen parantaa materiaalin ominaisuuksia huomattavasti verrattuna pelkkään tavanomaiseen kierrätyspakkausmateriaaliin. (Forss et al., 1988)

Kelaatinmuodostajat

Kelaatinmuodostajat ovat aineita, jotka ovat kykeneväisiä sitomaan metalleja itseensä ja myös vapauttamaan niitä ympäristöönsä. Koska lignosulfonaatit sisältävät lukuisia polaarisia ryhmiä, ovat ne kykeneväisiä muodostamaan kelaattiyhdisteitä. Kelaatteja voidaan käyttää useisiin eri tarkoituksiin, kuten sitomaan metalli-ioneja maaperästä tai vedestä. (Calvo-Flores et al., 2015) Ligniiniä voidaan tällöin käyttää myös ravinteiden ja hivenaineiden kantoaineina kasveihin tai vastaavasti vaarallisten yhdisteiden ja raskasmetallien sitomiseen ja poistamiseen maaperästä tai vedestä. Perinteisesti raskasmetallien poistamiseen jätevedestä on käytetty menetelmiä kuten kemiallista saostusta, liuotinuuttoa, ioninvaihtohartseja, käänteisosmoosia ja adsorptiota. Kyseisillä menetelmillä on kuitenkin useita negatiivisia ominaisuuksia, kuten korkea hinta, tarvittavien kemikaalien suuri määrä ja saasteiden vajaavainen poistuminen vedestä. (Laus, 2010)

Bio- ja lääketiede

Kuten rehun sidosainetta käsittelevässä kappaleessa sivulla 24 todettiin, on ligniinillä antibioottisia sekä antioksidatiivisia ominaisuuksia. Tämän lisäksi ligniini luokitellaan prebiotiksi, eli aineeksi, joita ruoansulatuskanavaa tasapainottavat mikrobit (probiotit) käyttävät ravinnokseen. Edellä mainitut ominaisuudet ovat yleisesti yhdistetty ruoansulatuskanavan terveyteen ja täten ligniinin lisäys ruokavalioon voi mahdollisesti parantaa hyötyeläinten terveyttä (Baurhoo, 2008).

Ligniinin ollessa turvallinen antioksidantti levitettynä iholle tai silmiin, on sen käyttöä kosmetiikassa tutkittu korvaamaan nykyisin käytössä olevia yhdisteitä (Ugartondo, 2008; Vinardell, 2008). Lisäksi tutkimusaineistoa löytyy ligniinin mahdollisuuksista toimia antiviraalisena, antimikrobisena, immuniteettia vahvistavana, ja syöpäkasvainten kasvua hidastavana aineena, mutta näitä aiheita ei tässä yhteydessä tarkastella lähemmin. (Calvo-Flores et al., 2015)

Maatalous

Kappaleessa 0 kerrottiin ligniinin soveltuvuudesta eläinrehun sidosaineeksi useista erisyistä. Maataloudessa ligniinillä on kuitenkin myös muita käyttötarkoituksia, pääasiassa

lannoitteiden ja torjunta-aineiden lisääneena. Erityisesti lignosulfonaateista on valmistettu kaupallisia tuotteita, sillä ligniinin lisäys lannoitteisiin parantaa granulaatiota ja vähentää paakkuuntumista säilytyksen aikana. Esimerkiksi fosfaatteja ja ureaa sisältävissä tuotteissa ligniini kasvattaa granuleiden kovuutta ja pitkäaikaista kestoa. (Calvo-Flores et al., 2015)

Kraft-ligniiniä on tutkittu lannoitteiden pinnoitusaineena, jossa sen tarkoituksena on vapauttaa vesiliukoisia ravinteita maaperään hallitusti, sillä kasvit eivät kykene käyttämään kaikkia ravinteita tehokkaasti, mikäli ne vapautetaan maaperään kerralla (García, 1996). Myös tässä yhteydessä ligniinin mahdollisuus muodostaa kelaatteja on tärkeää, koska hivenaineiden kuten kobolttin, sinkin, raudan, mangaanin, kuparin ja boronin puutteita maaperässä voidaan korjata ligniini-kelatoituilla tuotteilla (Calvo-Flores et al., 2015).

Kuten lannoitteiden kanssa, myös torjunta-aineiden vapautumista maaperään voidaan kontrolloida lisäämällä yhdisteisiin ligniiniä. Jos lannoitteet tai torjunta-aineet vapautetaan maaperään liian nopeasti, ne eivät pysty sitoutumaan kasveihin tai maaperään, vaan valuvat vesistöihin, joissa ne aiheuttavat saastumista ja ylirehevoitymistä. Sen lisäksi, että ligniini toimii sidosaineena, kantoaineena, kelaattina ja pinnoitteena, on sen havaittu myös suojaavan valolle herkkiä yhdisteitä UV-säteilyltä, tehden niistä kestävämpiä auringonvalolle altistettaessa. (Calvo-Flores et al., 2015)

Polymeerit ja komposiitit

Ligniinin käyttöä polymeerien ominaisuuksien parantajana on tutkittu vuosikymmenien ajan, mutta toistaiseksi tulokset ovat olleet melko vaatimattomia. Tässä kappaleessa käymme läpi käyttötarkoituksia pintapuolisesti, jättäen valmistusmenetelmät käsittelemättä.

Alalla on tutkittu sekä muokkaamattoman, että muokatun ligniinin lisäämistä polymeereihin. Ligniini voidaan lisätä polymeeriin makromolekyylinä tai lisääneena. Makromolekyylinä lisättäessä on ligniinillä oltava vastaavia toiminnallisia ryhmiä kuin polymeerilla tai kopolymeerilla, ja sen on oltava kykeneväinen tuottamaan samanlaisia reaktioita kuten esteröityminen, kondensoituminen ja amidien muodostaminen, jotta liittäminen polymeeriketjuun olisi mahdollista. Käytettäessä ligniiniä lisääneena, se ei muodosta reaktioita tai yhdisteitä muiden monomeerien kanssa, vaan on sekoitettuna yhdisteeseen. Tällöin

ligniinin antioksidatiiviset vaikutukset lisäävät polymeerin kestoja suojaten sitä hapettumiselta, valolta ja kumiin, polyalkeenien, polyesterien ja muiden synteettisten polymeerien kohdalla myös lämmöltä. (Calvo-Flores et al., 2015)

Vaneri-, lastu- ja kuitulevyjä (MDF) valmistettaessa käytetään pääasiassa urea-formaldehydi- ja fenoli-formaldehydi-sidosaineita. Sisätiloihin käytettäväksi suunnitellut vanerit valmistetaan käyttäen sidosaineena urea-formaldehydiä, joka on edullinen, mutta ei sovellu ulkotiloihin huonon vedenkestävyyden vuoksi. Ulkokäyttöön suunnitellut vanerit valmistetaan käyttäen fenoli-formaldehydi-sidosainetta, joka on kestävä, mutta samalla myrkyllistä sekä ihmiselle, että ympäristölle. Tästä syystä valmistajat pyrkivät korvaamaan fenoli-formaldehydi-sidosaineita vähemmän haitallisilla yhdisteillä. Ligniiniä lisätään sidosaineeseen, sillä ligniini on kykeneväinen sitomaan formaldehydiä itseensä estäen sen vapautumista ympäristöön. (Calvo-Flores et al., 2015) Toinen lähestymistapa on ollut korvata fenoli ligniinillä, sillä halvan hinnan ja hyvän saatavuuden lisäksi on ligniini ympäristölle ja ihmiselle turvallinen (Pizzi, 1994). Fenoli voidaan korvata 50 %:sti Kraft-ligniinillä tai lignosulfonaatti-ligniinillä vaikuttamatta lopputuotteen ominaisuuksiin merkittävästi (Donmez Cavdar, 2008).

Polyuretaanit ovat polymeerejä, jotka koostuvat toisiinsa karbamaattisidoksin (uretaani) liittyneistä orgaanisista yksiköistä. Polyuretaaneista valmistetaan mm. vaahtomuoveja ja kestäviä elastomeerejä kuten renkaita ja muita kuluttajatuotteita. Ligniiniä on mahdollista käyttää makromonomeerinä polyuretaanin synteesissä, koska ligniini sisältää suuren määrän hydroksyyliiryhmiä, jotka muodostavat karbamaattisidoksia ligniinin ja muiden kopolymeerien välille. Lopullisen polymeerin ominaisuudet riippuvat kuitenkin ligniinin tyypistä, sekä käytetystä määrästä. (Calvo-Flores et al., 2015) Esimerkiksi lisäämällä 0,5 m-% sooda-ligniiniä polyeetteripolyolista syntetisoituun polyuretaanivaahtoon, parantuivat sekä mekaaniset ominaisuudet, että lämpöstabiilius (Li, 2011).

Arboform on vuonna 1996 Pfitzerin ja Nægelen kehittämä materiaali, joka koostuu pääasiassa ligniinistä (n. 30 %) ja selluloosasta (n. 60 %). Materiaali sekoitetaan luonnollisiin lisäaineisiin, kuten vahaan. Materiaalia pystytään muovaamaan ja käsittelemään esimerkiksi ruiskuvalulaitteissa kuten perinteistä öljypohjaista muovia, ja se on ominaisuuksiltaan polyamidia vastaavaa. Monenlaisia tuotteita kuten kaiuttimia, soittimia, kypäriä, kelloja, kodinkonetarvikkeita, huonekaluja, auton sisustusosia, leluja ym. voidaan valmistaa Arboformista. Lopullinen tuote näyttää kiillotetulta puulta, tai vaihtoehtoisesti mattapintaisena ulkonäkö muistuttaa perinteistä muovia. Muovi on lisäksi hyvin kierrätettävä

ja onkin yksi laajimmin käytetyistä ligniinipohjaisista polymeereista. (Calvo-Flores et al., 2015)

Hydrogeelit ovat ristisilloitettuja polymeerejä, jotka ovat kykeneväisiä sitomaan itseensä moninkertaisen määrän vettä painoonsa nähden. Biolääketieteen alalla hydrogeeleillä on useita käyttötarkoituksia, kuten implantit, piilolinssit, kirurgiset materiaalit. Suurimman osan hydrogeeleistä tulee olla bioyhteensopivia elävän kudoksen kanssa ja valmistukseen käytetäänkin usein selluloosaa pääraaka-aineena. (Calvo-Flores et al., 2015) Selluloosa-ligniini-pohjaisia hydrogeelejä on tutkittu käytettäväksi polyfenolien hallittuun vapauttamiseen, joilla tiedetään olevan lukuisia biologisia vaikutuksia (Ciolacu, 2011).

Ligniiniä käyttämällä on mahdollista myös muodostaa epäorgaanisten ja orgaanisten polymeerien komposiitteja. Niin kutsuttuja polyuretaani-geokomposiitteja käytetään erotte-luun, suodatuksen, rakennusmateriaalien vahvistamiseen, veden poistamiseen sekä sidontaan. Kraft- ja lignosulfonaatti-ligniiniä, molasseja ja polyuretaanin polymerisaa-tiossa käytettävää isosyanaattiliuosta injektoidaan hiekkaan, jolloin hydroksyyli-ryhmät ligniinissä ja molassissa muodostavat ristisilloittuneen vaahdottuneen rakenteen orgaa-nisen ja epäorgaanisen aineen kesken. (Hatakeyama, 2005)

Niin kutsuttuja konduktiivisia polymeerejä käytetään energiaa sitovana materiaalina esi-merkiksi räjähteiden, polttoainesäiliöiden tai tutkassa havaitsemattomien lentokoneiden pinnoitteissa. Koska kyseiset polymeerit ovat lisäksi kykeneväisiä pelkistämään reaktii-visia aineita, estävät korroosiota ja ovat sekoitettavissa suureen joukkoon erilaisia sidos-aineita ja pinnoitteita, on konduktiivisten polymeerien lisääminen seoksiin lisäaineena on yleinen tapa parantaa aineiden käsiteltävyyttä sekä stabiilisuutta. (Calvo-Flores et al., 2015)

Nanopartikkelit ja ohutkalvot

1-100 nm kokoisia partikkeleja kutsutaan nanopartikkeleiksi. Nanopartikkeleilla on useita käyttötarkoituksia materiaalitieteissä, orgaanisessa ja epäorgaanisessa kemiassa, mo-lekyylibiologiassa, lääketieteessä sekä elektroniikassa. Koska ligniinipohjaiset nanopar-tikkelit ovat luonnossa hajoavia sekä ympäristön kannalta turvallisia, on niiden käyttö herättänyt laajalti kiinnostusta. Suuri osa nykyään käytetyistä nanopartikkeleista ovat metallipohjaisia ja tällöin niiden käyttöön liittyy rajoituksia toksisuuden vuoksi, ja lisäksi

niiden valmistukseen käytettävät synteesisimenetelmät ovat monesti ympäristöä rasittavia. Ligniini-pohjaisia nanopartikkeleita voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti käyttää biologisissa nesteissä sekä elimissä, geenien kuljetuksessa, rokotteissa, keskushermoston hoidossa, sekä lääkeaineiden kuljetuksessa. (Calvo-Flores et al., 2015; Xu, 2007)

Pölynsidonta

Päälystämättömät hiekkatiet ja -kentät ovat suuri lähde ilmassa esiintyville partikkeleille. Lignosulfonaatteja on käytetty 1920-luvulta lähtien sitomaan pölyä ja vahvistamaan hiekkateiden pintaa niiden ollessa halvempi ja ympäristölle turvallisempi vaihtoehto kloridisuoloille. Tienpinnan vahvistaminen perustuu näiden aineiden kyvylle sitoa kosteutta itseensä, estäen sen imeytymisen maahan. Lignosulfonaatteja käytetään ruiskuttamalla niitä vesiliuoksessa tienpintaan, jolloin vesi haihtuu ajan myötä jättäen erittäin viskoosin ligniini-kerroksen tienpintaan, joka pölyn sitomisen lisäksi toimii luonnollisena kiinnäineenä tehden pinnasta kiinteän. Lisäksi auringon lämmittäessä osasta lignosulfonaateista tulee kokonaan veteen liukenematonta ja sateen levittäessä savimaata, sulkee se pinnassa olevat poreet ja aukot vähentäen veden läpäisyä entisestään. (Calvo-Flores et al., 2015)

Betonin lisäaine

Betoni valmistetaan pääasiassa sementistä, vedestä sekä aggregaatista, eli kiviaineksesta. Valmistuksessa käytetään lisäksi monia apuaineita, joilla on useita käyttötarkoituksia kuten betonin valun parantaminen, asettumisajan hidastaminen tai nopeuttaminen, kutistumisen vähentäminen tai estäminen, aiheuttamaan lievää laajenemista, kontrolloimaan sementtimaidon tai veden erottumista betonista, estämään lajittumista, parantamaan pumpattavuutta, vähentämään painumista, estämään raudoituksen ruostumista jne. Natrium- ja kalsiumlignosulfonaatteja voidaan lisätä suoraan betonimassaan vähentämään veden määrää. Noin 10 % vedestä voidaan poistaa lisäämällä 0,2 – 0,3 % ligniiniä seokseen. Ligniini lisää sekoituskapasiteettia, betonin elinikää sekä kestävyyttä jäätyksen/sulamisen aikana. Lisäksi työstettävyyttä paranevat, sillä asettumisaika viivästyy ligniinin lisäyksen johdosta. Mekaanisten ominaisuuksien lisäksi on huomioitava, että toisin kuin kloridisuoloja ja emäksisiä aineita käytettäessä, ligniini ei aiheuta teräsbetonissa raudan ruostumista. (Calvo-Flores et al., 2015)

Dispersantti, emulgointiaine ja tensidi

Ligniini kykenee heikentämään pintajännitystä nesteissä ja sitä voidaan täten käyttää dispersanttina. Dispersanteiksi kutsutaan aineita, jotka pystyvät pitämään partikkelit nesteessä erillään ja estämään niiden saostumista ja sakkautumista. Suurin osa ligniinipohjaisista dispersanteista valmistetaan lignosulfonaatista, jossa sulfoniryhmät ovat ionisoituneina suoloiksi ja täten lignosulfonaatista valmistetut aineet lasketaan anionisiin, eli negatiivisen varauksen omaaviin dispersantteihin.

Maataloudessa käyttöä tällaisille aineille löytyy esimerkiksi torjunta-aineiden valmistuksessa, joissa niitä käytetään kostutusaineina. Kostutusaineiden tarkoituksena on vähentää torjunta-aineliuoksen pintajännitystä, saaden sen leviämään tasaisemmin ympäristöön tehostaen sen toimintaa. (Calvo-Flores et al., 2015)

Tensidit, eli pinta-aktiiviset aineet tai surfaktantit, ovat molekyylijä, joilla on sekä hydrofobinen, että hydrofiilinen pää. Tällaisia molekyylijä kutsutaan amfifiiliseksi (Tieteen termipankki, 2014). Tensidien yleisimpiä käyttötarkoituksia ovat pesuaineet, sillä sen lisäksi, että tensidit vähentävät veden ja öljyn ja/tai lian välistä pintajännitystä irrottaen lian pinnasta, pystyvät ne myös sitomaan irronneet partikkelit liuokseen (The Essential Chemistry Industry, 2013). Kyky sitoa polaarisia ja polaarittomia yhdisteitä samaan liuokseen on mahdollistanut myös sovelluksia ympäristönsuojelussa, sillä muun muassa yhdysvaltalainen yritys Texaco on valmistanut useita lignosulfonaatti-amiini-yhdisteitä öljyn sidontaan ympäristöstä (Calvo-Flores et al., 2015).

Nahkan parkitsemisessa tarkoituksena on muuttaa kollageenia ja muita vastaavia proteiineja kestävimiksi kemiallisella käsittelyllä. Kromiparkitus on yleisin käytössä oleva menetelmä tehokkuutensa vuoksi, mutta koska kromisuolat ovat erittäin haitallisia ympäristölle ja ihmisille, estää se nahkan kierrättämisen. Toinen yleinen tapa on kasviparkitus. Siinä käsittelyyn käytetään kasveista saatavia luonnollisia yhdisteitä, jolloin menetelmä on ympäristöystävällinen ja mahdollistaa nahkan kierrättämisen. Kasviparkitseminen on kuitenkin kromiparkitsemista kalliimpaa ja rajoittaa lopullisen tuotteen värivalikoimaa. Pelkkää sulfiittiligniiniä käytettäessä nahkasta tulee ohutta ja kovaa, mutta käytettäessä yhdessä kasviparkitsemisessa käytettyjen yhdisteiden kanssa, on lopputuloksesta täyteläinen ja hyvin asettuva nahka. (Calvo-Flores et al., 2015)

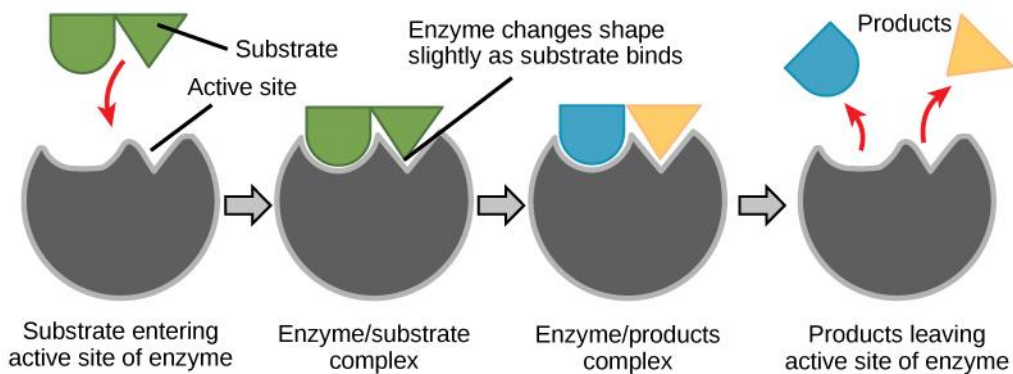
Tensidien kohdalla puhuttaessa käsiteltiin ligniinin amfifiilisiä ominaisuuksia, jotka mahdollistavat toisiinsa liukenemattomien yhdisteiden sitomisen yhteen. Magnesiumlignosulfonaattia sekoitetaan lisäaineeksi valmistettaessa tulenkestävää keramiikkaa, sillä puristettaessa kappaleita muotoon, toimii magnesiumlignosulfonaatti sidonta-aineena pitäen massan homogeenisenä ja estäen rakennetta heikentävien hiutaleiden muodostumisen. Lisättyinä asfalttiseokseen lignosulfonaatit toimivat vastaavanlaisesti vahvistaen ja stabiloiden materiaalia, sekä lisäksi pidentäen asfaltin elinikää antioksidatiivisten ominaisuuksien vuoksi. Kolmas vastaava käyttötarkoitus on nestemäisten musteiden valmistuksessa, jossa lignosulfonaatit estävät vedestä ja kiinteistä partikkeleista valmistetun musteen paakkuuntumista ja pitävät suspension homogeenisena. (Calvo-Flores et al., 2015)

Taulukko 7. Esimerkkejä ligniinipohjaisista tuotteista ja niiden käyttötarkoituksista.

Polttoaineet	Sidosaineet	Kelaatinmuodostajat	Bio- ja lääketiede	Maa- ja metsätalous	Polymeerit	Muut	Korkean arvon jaloitteet
Prosessienergia	Hiilibriketit	Vedenpuhdistus	Kosmetiikka	Lannoitteet	Fenoli-ligniini-formaldehydi	Betonin lisäaine	Vanilliini
Lämmitys ja energia	Pakkausmateriaalit	Kantoaineet	Nanopartikkelit ja ohutkalvot	Torjunta-aineet	Polyolefiini-ligniini	Pinta-aktiiviset aineet	Dimetyylisulfidi
	Rehupelletit		Antioksidantit	Maaperän säilyttäminen	Akryyliamidi-ligniini	Kellunta-aineet	Dimetyylisulfoksidi
	Vaneri-, lastu- ja kuitulevyt			Biohiili	Polyuretaani-ligniini		Aktiivihiihi
					Biomuovit		Hiilikuitu
					Hydrogeelit		
					Vaahtomuovit		
					Konduktiiviset polymeerit		
					Epoksihartsit		

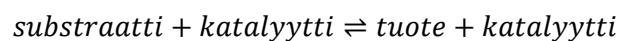
4 ENTSYYMIT

Entsyymit ovat biologisia katalyytteja, joiden tehtävänä on nopeuttaa reaktioita organismeissa. Esimerkiksi tämän opinnäytetyön kokeellisessa osiossa entsyymejä on käytetty ligniinin aktivointiin ja depolymerisaatioon. Entsyymit ovat muutamia poikkeuksia kuten RNA:sta koostuvia ribotsyymejä lukuunottamatta proteiineja. Entsyymien toiminta perustuu niin kutsuttuun Fisherin avain-lukkoperiaatteeeseen, jossa substraatti (avain) kulkeutuu entsyymiin substraatille spesifiseen aktiiviseen osaan (lukko). Entsyymi muuttaa muotoaan sitoakseen substraatin ja muodostaa entsyymi-substraattikompleksin. Entsyymi katalysoi reaktion substraatin muuttamiseksi tuotteeksi ja vapauttaa tuotteet ympäristöön, jonka jälkeen entsyymi palautuu takaisin alkuperäiseen muotoonsa ja on valmis vastaanottamaan uuden substraatin ja katalysoimaan uuden reaktion. Mekanismi on esitetty yksinkertaistettuna kuvassa 5.



Kuva 5. Avain-lukkomekanismi. Vasemmalta: substraatti liittyy entsyymiin aktiiviseen kohtaan, entsyymi-substraatti-kompleksi, entsyymi-tuote-kompleksi, tuotteet poistuvat entsyymin aktiivisesta kohdasta. Lähde: (OpenStax, 2017)

Reaktio voidaan kuvata yksinkertaisella yhtälöllä



Entsyymit katalysoivat reaktioita alentamalla reaktion aktivaatioenergiatasoa, jolla tarkoitetaan reaktion käynnistymiseksi vaaditun energian määrää. Entsyymit ovat elämälle elintärkeitä molekyylejä, sillä ilman entsyymiä reaktiot samoissa olosuhteissa tapahtuisivat organismeille liian pitkän ajan kuluessa, eikä elämän ylläpito olisi mahdollista. Koska entsyymit eivät kulu reaktiossa, pystyvät ne muuntamaan suuren määrän substraattia

tuotteeksi pienissäkin konsentraatioissa. Reaktiionopeutta (*eng. turnover number*) kuvataan vakiolla k_{cat} , ja se kertoo kuinka monta moolia substraattia entsyymi kykenee muuttamaan reaktiotuotteeksi yhdessä sekunnissa. Seuraavassa taulukossa esimerkkejä eri entsyymien reaktiionopeuksista:

Taulukko 8. Esimerkkejä entsyymien reaktiionopeuksia (Robinson, 2015).

Entsyymi	Reaktiionopeus (moolia tuotetta s^{-1} moolia entsyymiä $^{-1}$)
Hiilihappoanhydraasi	600 000
Katalaasi	93 000
β -galaktosidaasi	200
Kymotrypsiini	100
Tyrosinaasi	1

Koska entsyymit ovat hyvin spesifisiä, eivätkä tuota ei-haluttuja sivutuotteita, on niillä käyttöä lukuisissa teollisissa ja kaupallisissa prosesseissa kuten paperi- ja selluteollisuudessa, bioetanolin valmistuksessa, makeutusaineiden tuotannossa, antibioottien muokkauksessa, puhdistusaineissa lian hajottajina, elintarviketekniikassa, tekstiilien ja nahkan tuotannossa sekä biokemiallisissa analyyseissä ja sovelluksissa. (Patel, 2014; Robinson, 2015)

4.1 Entsyymien jalostus ja tuotanto

Entsyymit ovat hyvin käytännöllisiä molekyyliä johtuen niiden kyvystä säilyttää katalysoivat ominaisuutensa myös isäntäorganismista eristämisen jälkeen. Lisäksi entsyymit ovat luonnossa hajoavia ja ei-toksisia, joten niiden käsittely on turvallista ja edullista. Tämä mahdollistaa entsyymien laajamittaisen teollisen tuotannon ja niiden käytön useilla eri teollisuudenaloilla.

Ensimmäinen teollisesti tuotettu entsyymi oli sienestä saatava amylaasi takadiastaasi, joka hajottaa ruuan tärkkelystä. Sitä käytettiin 1800-luvulta lähtien helpottamaan ruuan sulatusvaikeissa, vaikka entsyymeistä ei tuohon aikaan tiedetty paljoakaan. (Jha, 2015) Nykyään 4000 tunnetusta entsyymistä noin 200 on kaupallisessa käytössä ja valtaosa näistä on tuotettu mikro-organismeissa (*Microbial Applications: Recent Advancements and Future Developments*, 2016).

Tuotanto tapahtuu suurissa bioreaktoreissa, jossa reaktiot tapahtuvat aerobisissa tai anaerobisissa olosuhteissa. Entsyymien tuotantoprosessi koostuu mikro-organismien eristyksestä, kannan jalostuksesta, kasvatusolosuhteiden optimoinnista, mikrobien kasvatuksesta, sekä tuotteen keräämisestä ja puhdistuksesta. Nämä prosessit käsitellään pin-tapuolisesti seuraavissa kappaleissa. (*Microbial Applications: Recent Advancements and Future Developments*, 2016)

Mikro-organismien eristys

Tuotanto aloitetaan valitsemalla sopivat organismit. Tärkeimmät kriteerit valintaan ovat mahdollisimman suuri halutun entsyymien tuotanto ja samalla vähäinen määrä muita aineenvaihduntatuotteita, lyhyt kasvatusaika ja vaaditun kasvatusliemen alhaiset kustannukset. (*Microbial Applications: Recent Advancements and Future Developments*, 2016)

Kannan jalostus

Luonnollisessa ympäristössä mikrobien entsyymien tuotanto on yleensä melko vähäistä, joten jotta entsyymiä olisi mahdollista tuottaa riittäviä määriä bioreaktorissa, on tuotokantaa jalostettava. Tähän käytetään pääasiassa kahta eri tekniikkaa. Ensimmäinen on yhdistelmä-DNA-tekniikka, jossa haluttua proteiinia koodaava geeni siirretään alkuperäisestä isännästä uuteen isäntään, josta voidaan tuottaa lukematon määrä klooneja, joilla kaikilla on identtinen DNA. Etuna tekniikassa on, että samoissa kasvatusolosuhteissa voidaan tuottaa useita eri proteiineja käyttämällä samaa tuottajaorganismia ainoana erotuksena lisätty geeni, joka koodaa kulloinkin haluttua proteiinia. Prosessissa eristetään isäntäorganismista DNA, joka katkaistaan kahdesta kohdasta niin, että haluttu geeni irtoaa DNA-juosteesta. Geeni monistetaan polymeerasiketjureaktiolla, jonka jälkeen monistettu geeni liitetään uuteen DNA:han. Tässä vaiheessa DNA:han lisätään myös jokin antibioottiresistenssiä aiheuttava geeni. Organismit eivät ole kovin vastaanottavaisia uuden DNA:n suhteen, joten isäntäorganismia on ennen transformaatiota heikennettävä. Tähän löytyy useita eri tekniikoita mikrobista riippuen. Transformaation onnistuminen varmennetaan kasvattamalla kantaa kasvualustalla, johon on lisätty antibioottia. Koska mikrobiin siirrettävään uuteen DNA:han lisättiin myös kyseiselle antibiootille resistenssiä

aiheuttava geeni, ainoastaan uuden DNA:n vastaanottaneet mikrobit kasvavat maljalla. Tämän jälkeen mikrobit ovat valmiita käytettäväksi tuottokannaksi. (Toppr, 2018)

Toinen laajalti käytetty tekniikka, on niin kutsuttu suunnattu evoluutio. Menetelmän ideana on matkia luonnollista evoluutiota, mutta koska luonnossa evoluutiota tapahtuu varsin hitaasti, on kehitetty menetelmä, jolla tätä prosessia voidaan vauhdittaa. Sopivan kantajaorganismien löydyttyä aiheutetaan sen DNA:han satunnaisia mutaatioita haluttua proteiinia koodaavaan geeniin. Kun haluttuun geeniin on luotu mutaatioita, voidaan tuotetut entsyymit altistaa erilaisille olosuhteille, kuten korkeammalle lämpötilalle tai eri pH-alueille. Tämän jälkeen uusista olosuhteista ”selvinneet” proteiinit valikoidaan ja jalostusta jatketaan taas tuottaen uusia mutaatioita ja valikoiden parhaimmat vaihtoehdot, kunnes halutut ominaisuudet on saavutettu. Menetelmän eduksi on laskettava, ettei tutkijalta vaadita tietoa siitä, minkälaisia mutaatioita halutaan, vaan jalostukseen riittää tieto mutaatioiden luomisesta sekä sellaisen valintakokeen pystyttämisestä, jolla ominaisuuksien kehittymistä voidaan mitata. (Huovinen, 2017)

Kasvatusolosuhteiden optimointi

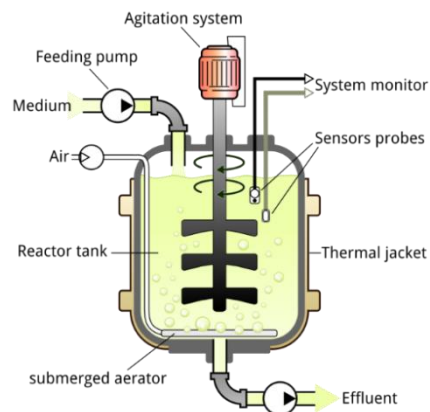
Kun haluttu mikro-organismi on valittu, eristetty ja jalostettu, pyritään tuotanto maksimoimaan muokkaamalla organismia geneettisesti haluttujen ominaisuuksien korostamiseksi ja optimoimalla kasvatusolosuhteita kuten lämpötilaa, pH:ta, liuenneen hapen ja hiilidioksidin määrää, sekoitusnopeutta sekä kasvuliemen ravinne- ja hivenvainekoostumusta muokatulle kannalle mahdollisimman suotuisiksi. Olosuhteita muokkaamalla voidaan vaikuttaa kasvunopeuteen, tuotespektriin ja saantoon, organoleptisiin ominaisuuksiin kuten ulkonäköön, makuun, hajuun ja rakenteeseen, toksiinien muodostumiseen sekä muihin fysiokemikaalisiin ominaisuuksiin. (*Microbial Applications: Recent Advancements and Future Developments*, 2016)

4.2 Bioreaktorit

Bioreaktori on sateenvarjotermi useille eri tyyppisille kasvatussäiliöille, joissa biokemialliset reaktiot tapahtuvat kontrolloiduissa olosuhteissa (Kato et al., 2015). Seuraavissa kappaleissa käsitellään ainoastaan kahta yleistä tekniikkaa: aktiiviliete- ja kantoainekasvatusta.

Aktiivilietekasvatus

Aktiivilietereaktorissa (activated sludge reactor) (Kuva 6) kasvatus tapahtuu tilavuudeltaan jopa 1000 m³ suuruisissa säiliöissä kasvatusliemessä tarkkaan kontrolloiduissa olosuhteissa. Mikrobien hajottaessa ravinteita muodostavat ne aineenvaihduntatuotteina haluttuja entsyymejä kasvatusliemeen. Koska mikrobit kuluttavat koko ajan ravinteita liuoksesta, lisätään säiliöön uutta kasvatuslientä joko jatkuvasyötteisesti tai tietyn ajanjaksoin kasvatuskierron päättyessä, riippuen käytettävästä menetelmästä. Aktiivilietereaktorissa olosuhteita kuten lämpötilaa, pH:ta, hapenkulutusta ja hiilidioksidin muodostumista seurataan ja kontrolloidaan jatkuvasti, jolloin kasvatukselle säilyy optimaaliset olosuhteet koko prosessin ajan. Ennen kuin tuotetta voidaan käyttää, pitää se kerätä ja erotella kasvatusliemestä. Suurin osa teollisista entsyymeistä ovat ekstrasellulaarisia, eli mikrobit tuottavat näitä molekyyliä solun ulkopuolelle kasvatusliemeen. Liemessä olevat entsyymit voidaan konsentroida esimerkiksi haihduttamalla, membraanisuodatuksella tai kiteyttämällä. Mikäli tuotteen korkea puhtaus on vaatimuksena, käytetään puhdistusmenetelmänä yleensä geeli- tai ioninvaihtokromatografiaa. (*Microbial Applications: Recent Advancements and Future Developments*, 2016)



Kuva 6. Aktiivilietereaktorin osat. Ylhäältä myötäpäivään: sekoitusmoottori, systeemi-monitorointi, sensorisauvat, lämpösuoja, poistokanava, upotettu ilmastin, reaktoritankki, ilman sisäänmeno, kasvatusmediumin sisäänvienti ja syöttöpumppu. (Wikimedia Commons, 2009)

Kantoainekasvatus

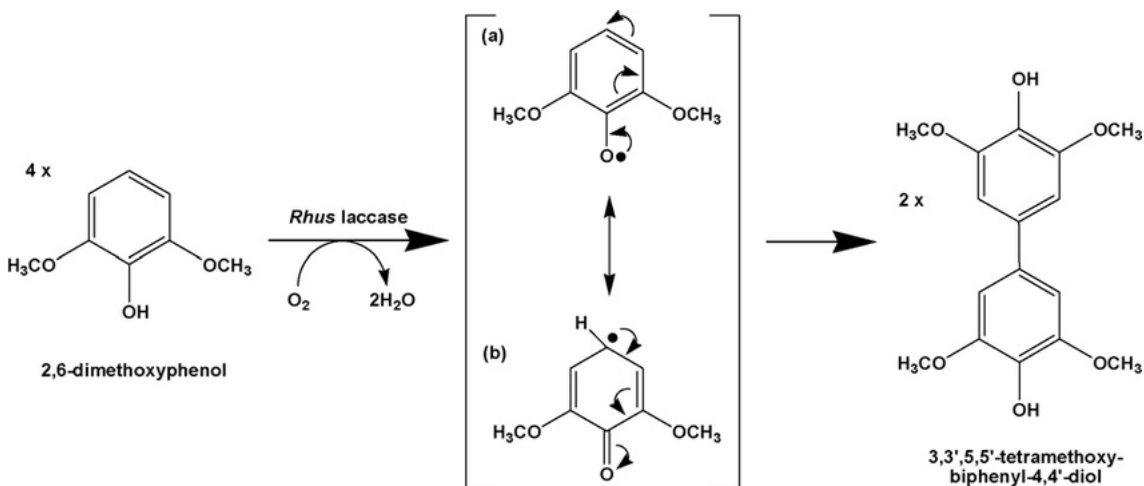
Kantoainereaktorissa mikrobien kasvatus tapahtuu kiinteällä kasvualustalla kuten jyvillä, riisin tai viljan leseillä, sokeriruokomassassa tai vehnä- ja maissijauhossa. Mitä alustaa

kulloinkin käytetään riippuu pääasiassa siitä, mitä on helposti ja edullisesti saatavilla, mutta myös partikkelikoko ja käytetyn alustan kosteus ovat ratkaisevia tekijöitä valintaa tehtäessä. Pienempien partikkelien etuna voidaan pitää suurempaa pinta-alaa, mutta toisaalta pienempien partikkelien muodostama tiiviimpi rakenne saattaa estää hapen kulkeutumista mikrobien käytettäväksi, joka heikentää kasvuston muodostumista ja täten vähentää entsyymintuotantoa. Suurempia partikkelikokoja käyttämällä taataan hapen ja ilman kierto systeemissä, mutta tällöin kasvuun vaadittava pinta-ala vähenee. Näistä syistä johtuen kasvualustan valinta onkin usein kompromissi. Kantoainereaktorissa kosteutta ei säädetä erikseen, vaan itse kasvualustan pitää sisältää mikrobien kasvuun vaatima vesi. Veden määrällä kasvualustassa on myös vaikutusta itse kasvualustan fyysio-kemikaalisiin ominaisuuksiin, ei ainoastaan mikrobien kasvuun. (*Microbial Applications : Recent Advancements and Future Developments*, 2016)

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

DMP

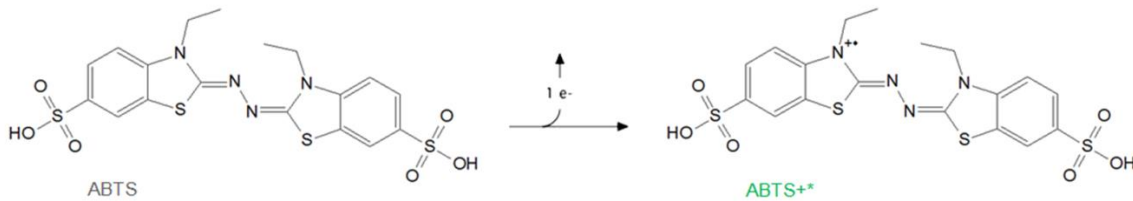
2,6-dimetoksisfenoli (DMP, DMOP, Syringoli) on ligniinissä esiintyvän sinapyylialkoholin johdannainen, jota käytetään substraattina entsyymien aktiivisuutta mitattaessa. (Wan et al., 2010) ovat esittäneet reaktiomekanismin, jossa lakkaasi hapettaa DMP-molekyylin 2,6-dimetoksi-fenoksyyliradikaaliksi ja kaksi radikaalia yhdistyessään muodostavat 3,3',5,5'-tetrametoksibifenyyli-4,4'-diolin (Kuva 7). 3,3',5,5'-tetrametoksibifenyyli-4,4'-dioli havaitaan liuoksessa haalean keltaisena värinä, jonka intensiteettiä mittaamalla (λ 450 nm) määritetään entsyymien aktiivisuus.



Kuva 7. Ehdotettu reaktiomekanismi lakkaasikatalysoidun 2,6-dimetoksisfenolin hapettumiselle. 3,3',5,5'-tetrametoksibifenyyli-4,4'-dioliksi. (Wan et al., 2010)

ABTS

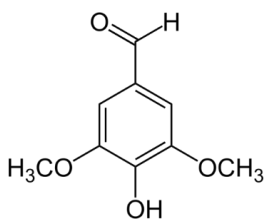
Lakkaasientsyymien aktiivisuuden mittaaminen suoritettiin spektrofotometrisesti käyttäen menetelmää, jossa lakkaasi hapettaa 2,2'-atsino-bis-(3-etylibentsotiatsoliini-6-sulfonihapon) (ABTS) tuottaen ABTS⁺ kationin (Kuva 88). Kationi havaitaan liuoksessa sinivihreänä värinä, jonka intensiteettiä spektrofotometrisesti (λ 420 nm) vertaamalla standardientsyymien tuottaman värin intensiteettiin, määritetään tutkittavan entsyymien aktiivisuus. ABTS on yksi yleisimmistä mallisubstraateista entsyymien aktiivisuuden mittaamiseen, sillä erotuksena fenolisiin yhdisteisiin, ABTS ei ole riippuvainen pH:sta alueella 2-11 ja menetelmä on yksivaiheinen. (Terrón et al., 2004)



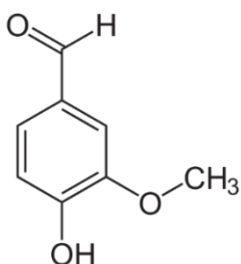
Kuva 8. ABTS-molekyylin hapettumisreaktio.

Syringaldehydi ja vanilliini

Syringaldehydi (4-hydroksi-3,5-dimethoksibentsaldehydi) (Kuva 9) ja vanilliini (4-hydroksi-3-metoksybentsaldehydi) (Kuva 10) ovat ligniinissä esiintyviä aldehydejä, joita käytettiin tutkimuksessa mallisubstraattina mitattaessa lakkaasientsyymien aktiivisuutta. Toisin kuin luonnollinen ligniini, ovat näiden molekyylin rakenteet hyvin tunnettuja ja käytettäessä synteettisiä valmisteita vältetään ligniinin depolymerisaatiossa muodostuvien muiden molekyylin vaikutukselta reaktioon. Syringaldehydiä sekä vanilliinia muodostuu, kun ruohokasvien tai lehtipuiden ligniiniä depolymerisoidaan hapettavissa olosuhteissa. Syringaldehydin ja vanilliinin tuotto reaktiossa on verrannollinen syringyyli- ja guajakoliyksiköiden esiintyvyyteen ligniinimolekyylissä ja lisäksi tuotteiden saanto riippuu käytetyistä menetelmistä. (ChemicalBook, 2017; Esteves da Costa, 2017)



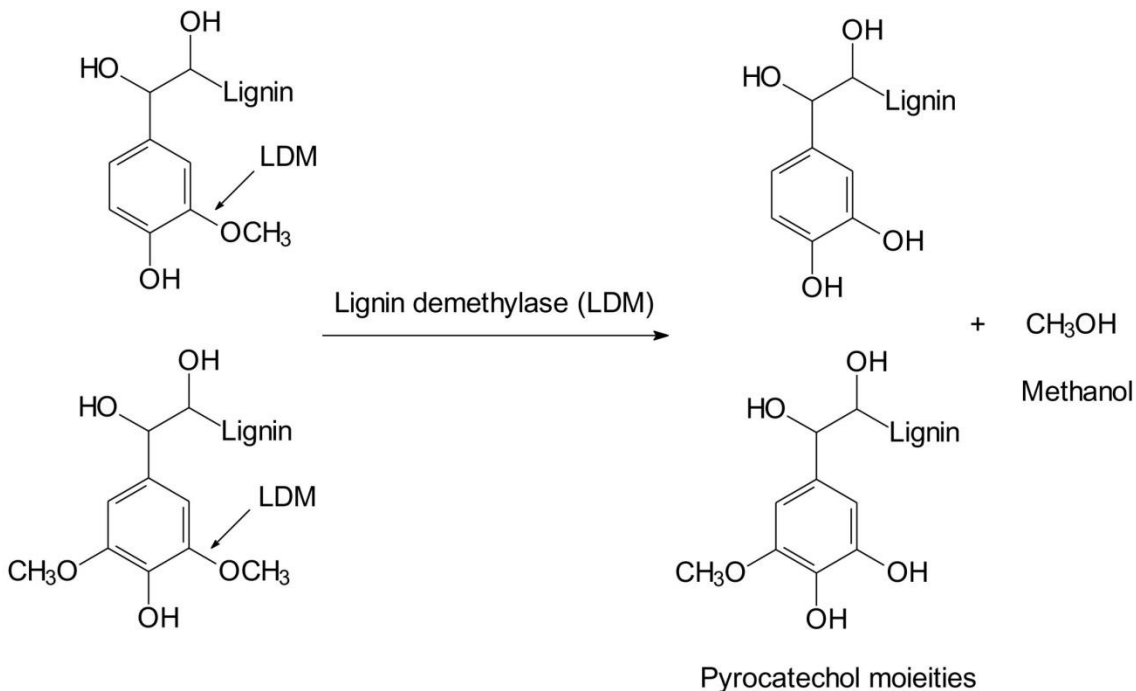
Kuva 9. Syringaldehydin molekyylirakenne. (Wikimedia Commons, 2007)



Kuva 10. Vanilliinin molekyylirakenne. (Wikimedia Commons, 2016)

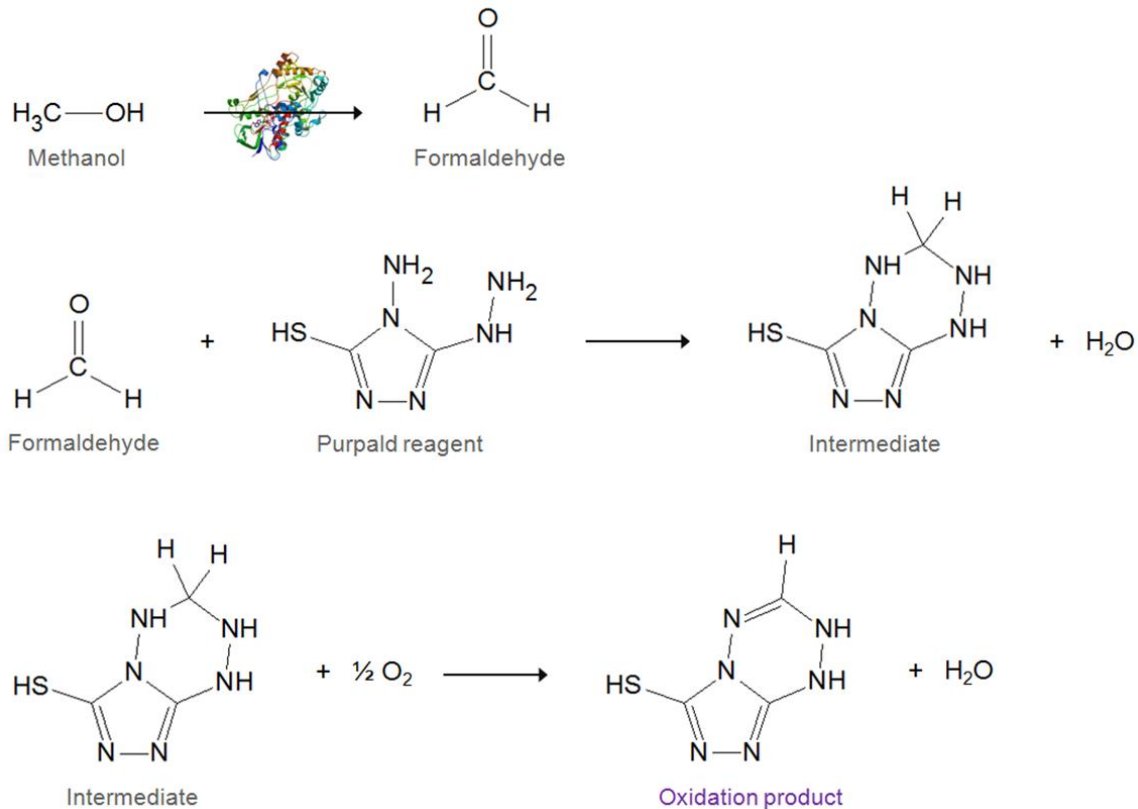
Purpald

Ligniinin demetylaatiassa lakkaasientsyymi katkaisee alkaalisissa olosuhteissa ligniiniin liittyneen katekolyksikön ja *O*-metyyliryhmän välisen sidoksen korvaten metyyliiryhmän hydroksyyliiryhmällä ja muodostaen tuotteena metanolimolekyylin (Kuva 11) (Venkatesagowda 2018).



Kuva 11. Kraft-ligniinin demetylaatioreaktio. Ligniinidemetylaasientsyymi (LDM) katkaisee *O*-metyyliryhmän ja pyrokatekolin välisen sidoksen (vas.) muodostaen reaktiossa metanolia (oik.). (Venkatesagowda, 2018)

Demetylaatiotason määrittämiseksi käytettiin Purpald-menetelmää, jossa alkoholioksidasientsyymi reagoi metanolin kanssa muodostaen formaldehydi-molekyylin. Purpald-reagenssi (4-amino-3-hydratsino-5-merkpto-1,2,4-triatsoli) reagoi alkaalisissa olosuhteissa formaldehydin kanssa muodostaen välituotteena syklistä aminaalia, joka taas reagoi hapen kanssa tuottaen violetin tetraasiini-väriyhdisteen (Kuva 12) (Anthon and Barrett, 2004). Väri mitataan spektrofotometrisesti (λ 560 nm), ja värin intensiteetin perusteella määritetään metanolipitoisuus liuoksessa ja täten ligniinin demetylaatiotaso.



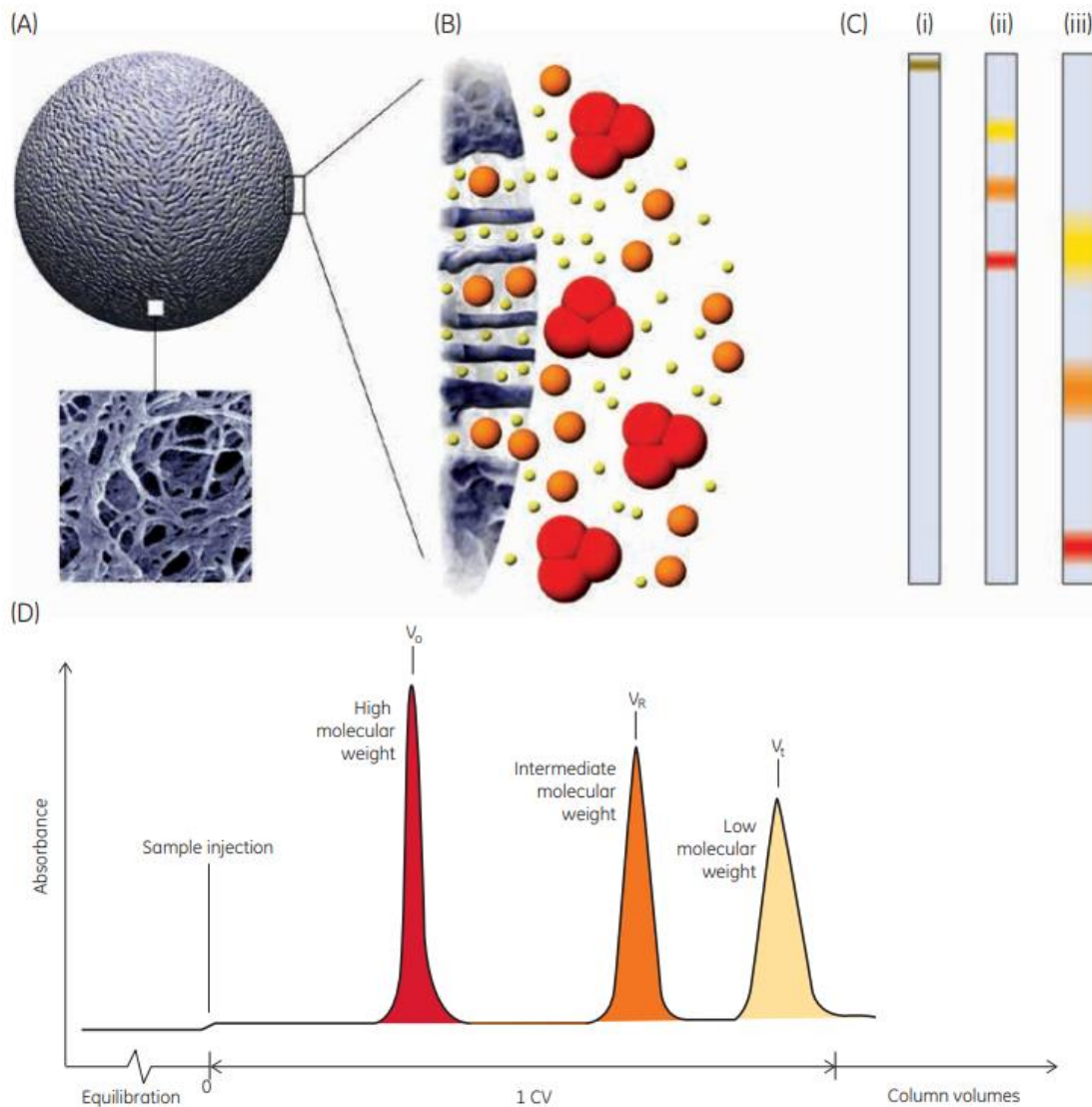
Kuva 12. Tetraasiini-molekyylin muodostumisen reaktiomekanismi. Ylhäältä: alkoholioksidasientsyymi reagoi metanolin kanssa muodostaen formaldehydi-molekyylin, formaldehydin ja Purpald-reagenssin reaktiotuotteena muodostuu syklinen aminaali, joka hapen kanssa reagoiessaan tuottaa hapetustuotteena tetraasiini-väriyhdisteen. (Julien A. Jendral et al., 2011)

Kokoekskluusiokromatografia

Ligniini hajoaa entsyymattisen käsittelyn tuloksena eri suuruisiksi molekyyleiksi, joiden jakaumaa sekä pitoisuutta tarkasteltiin kokoekskluusiokromatografisesti (SEC, size-exclusion chromatography, GPC, gel-permeation chromatography, GFC, gel-filtration chromatography) entsyymien vaikutusten arvioimiseksi.

Kokoekskluusiokromatografinen erottelu perustuu eroihin eluutioajassa partikkelin koon mukaan. SEC-kolonnissa stationäärifaasi on kemiallisesti ja fysikaalisesti stabiilia ja inerttiä huokoista pallomaista materiaalia, jonka rakenteisiin partikkelit tarttuvat. Pienemmät partikkelit pysyvät huokosissa suurempia partikkeleita pidempään ja täten eluutuvat myöhemmin (Kuva 13). Kokoekskluusiokromatografinen erottelu sopii hyvin biomolekyyleille, jotka ovat herkkiä olosuhteiden kuten pH:n ja lämpötilan muutoksille eikä erottelu häiriinny esimerkiksi ionien läsnäolosta, sillä erottelu perustuu molekyylin kokoon eikä

polariteettiin kuten normaali- ja käänteisfaasikromatografiassa. (GE Healthcare Life Sciences, 2017)



Kuva 13. Kokoeksklusiokromatografiamenetelmä: (A) havainnekuva materiaalista ja elektronimikroskooppikuva (B) havainnekuva molekyylien erottelusta koon perusteella. (C) Graafinen kuvaus erottelusta: (i) näyte saapuu kolonniin; (ii) pienin molekyyli (keltainen) kulkeutuu kolonnissa suurempia molekyyliä (punainen) hitaammin; (iii) suurin molekyyli eluoituu kolonnista ensimmäisenä. (D) Havainnekuva kromatogrammista. Vasemmassa punaisella ensimmäisenä eluoituneet suuret molekyylit, oikealla keltaisella viimeisenä eluoituneet pienet molekyylit. (GE Healthcare Life Sciences, 2017)

UV-VIS-spektroskopia

UV-VIS (ultraviolet-visible) -spektroskopia perustuu aineen kykyyn absorboida tai emitoida tiettyjä aallonpituuksien aineen kemiallisesta koostumuksesta riippuen. UV-VIS spektroskopiaa ei tavallisesti käytetä aineen tunnistamiseen, vaan kvantitatiiviseen määrittelykseen.

Spektrofotometrillä mitataan aineeseen lähetetyn ja aineen läpäisseen valon intensiteettien suhteita ja pitoisuus voidaan laskea Beer-Lambertin lain avulla. Beer-Lambertin laki (kaava 1) esitetään tavallisesti muodossa

$$A = \epsilon b c$$

Kaava 1. Beer-Lambertin laki

missä A on absorbanssi, ϵ molaarinen absorptiokerroin, b valon liuoksessa kulkema matka ja c aineen konsentraatio.

Absorbanssi lasketaan negatiivisena logaritmina transmittanssista, joka on kyvetin läpi kulkeneen valon intensiteetti jaettuna lähetetyn valon intensiteetillä. Transmittanssin laskemiseen käytetään kaavaa 2.

$$\text{Transmittanssi } (T) = \frac{I_t}{I_0}$$

Kaava 2. Transmittanssi

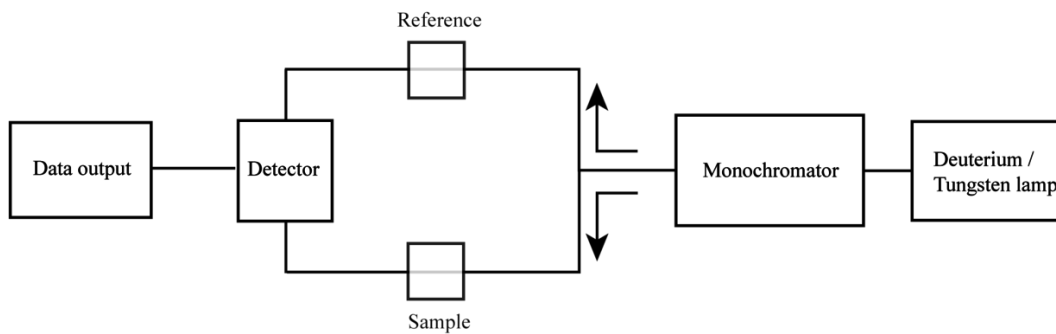
jolloin absorbanssin laskemiseen voidaan käyttää kaavaa 3.

$$\text{Absorbanssi } (A) = -\log(T) = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right)$$

Kaava 3. Absorbanssi

UV-VIS-spektrofotometrin toiminnan kannalta oleelliset osat ovat tungsten- tai wolframivalonlähde näkyvälle valolle ja deuterium₂- tai vetyvalonlähde UV-valolle, monokromaattori, hila, näyte- ja referenssikyvetti, valovastus/detektorit sekä kirjoitin (Kuva 14).

Peili ohjaa valonsäteen monokromaattoriin, jossa polykromaattisesta säteestä eristetään jokin monokromaattinen aallonpituusalue. Ulostuloaukkoa säätämällä suodatetaan ylimääräiset aallonpituudet ja ainoastaan haluttu aallonpituus ohjataan näytekyvetiin. Osa säteilystä absorboituu kyvetissä olevaan aineeseen, jonka jälkeen aineen läpäisemän säteilyn intensiteetti mitataan detektorissa valovastuksen avulla ja tieto siirretään kirjoittimelle analyysia varten. (Vo and Chemistry LibreTexts Library, 2018)



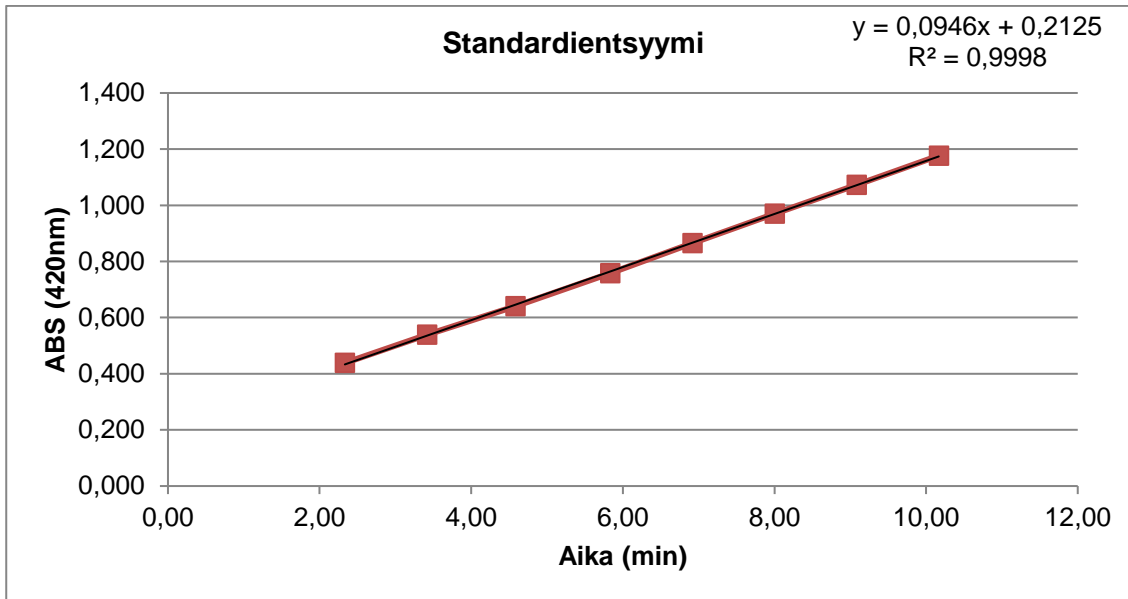
Kuva 14. Graafinen kuvaus UV-VIS-spektrofotometrasta. Spektrofotometrin osat oikealta vasemmalle: valonlähde, monokromaattori, näyte- ja referenssikyvetti, detektor ja kirjoitin. (Wikimedia Commons, 2016)

6 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä osiossa kootaan yhteen tärkeimpiä kokeista saatuja tuloksia ja avataan niiden merkitystä prosessin suhteen. Kokeita tehtiin huomattavasti suurempi määrä kuin opinäytetyössä on esitetty, mutta työn kokeellisen luonteen takia kaikkia tuloksia ei voida pitää erityisen merkittävänä kokonaisuuden kannalta, eikä niitä tulla käsittelemään tässä yhteydessä. Osion aluksi tarkastellaan lakkaasientsyymien aktiivisuutta mallisubstraateille sekä ligniiniliuoksisuutta alkaalisissa olosuhteissa. Koska tarkoituksena on optimoida prosessiolosuhteita, käydään osiossa myös läpi prosessiolosuhteiden muutosten kuten lämpötilan, ilmastuksen ja entsyymien annostuksen vaikutusta lakkaasin aktiivisuuden ja stabiilisuuden ligniiniliuoksessa, ligniinien demetyloitumisasteeseen sekä partikkelikokojakaumaan.

6.1 Aktiivisuus mallisubstraateille

Kokeellisen osuuden aluksi useista eri bakteereista peräisin olevien lakkaasientsyymien aktiivisuuksia verrattiin potentiaalisimpien vaihtoehtojen löytämiseksi jatkotutkimuksia varten. Tutkittavien entsyymien joukossa oli lisäksi entsyymien villityyppejä, mutatoituja versioita sekä entsyymejä samojen prototyyppien eri tuotantoeristä. Mittaukset tehtiin spektrofotometrisesti käyttäen ABTS- (0) sekä DMP-menetelmää (0), joissa kummassakin entsyymi hapettaa mallisubstraattia muodostaen liuoksen, jonka värin intensiteettiä ajan funktiona mittaamalla määritetään entsyymien kyky muuntaa lähtöainetta tuotteeksi. Kustakin näytteestä tehtiin laimennokset 1:10, 1:50, 1:100 ja 1:200 lyysispuskuriin. ABTS-mittauksissa näytteet pipetoitiin natriumasetaattia sisältävälle 96-kuoppalevyille, ja DMP-mittauksissa 96-kuoppalevyllä käytettiin natriumasetaatin sijaan 40 mM Britton-Robinson pH 9 puskuria. Entsyymaattinen reaktio käynnistettiin lisäämällä näytteisiin mallisubstraatti, jonka jälkeen mittauksia suoritettiin tasaisin väliajoin noin kymmenen minuutin ajan. Tulokset käsiteltiin taulukkolaskentaohjelmassa sijoittamalla absorbanssi y-akselille ja mittausaikapiste x-akselille. Kulmakertoimen perusteella määritettiin entsyymien aktiivisuus. **Virhe. Viitteen lähde ei löytynyt.**:ssä esitetään esimerkkinä standardientsyymille tehty aktiivisuusmittaus.



Kuvio 1. Standardientsyymiin aktiivisuuskuvio.

Kullekin mitattavalle entsyymille laskettiin vertailuarvo, jossa otetaan huomioon taustan absorbanssi sekä käytetty laimennuskerroin. Vertailuarvo lasketaan kaavalla 4.

$$\text{vertailuarvo} = (k_{\text{näyte}} - k_{\text{kontrolli}}) * \text{laimennuskerroin}$$

Kaava 4. Vertailuarvo

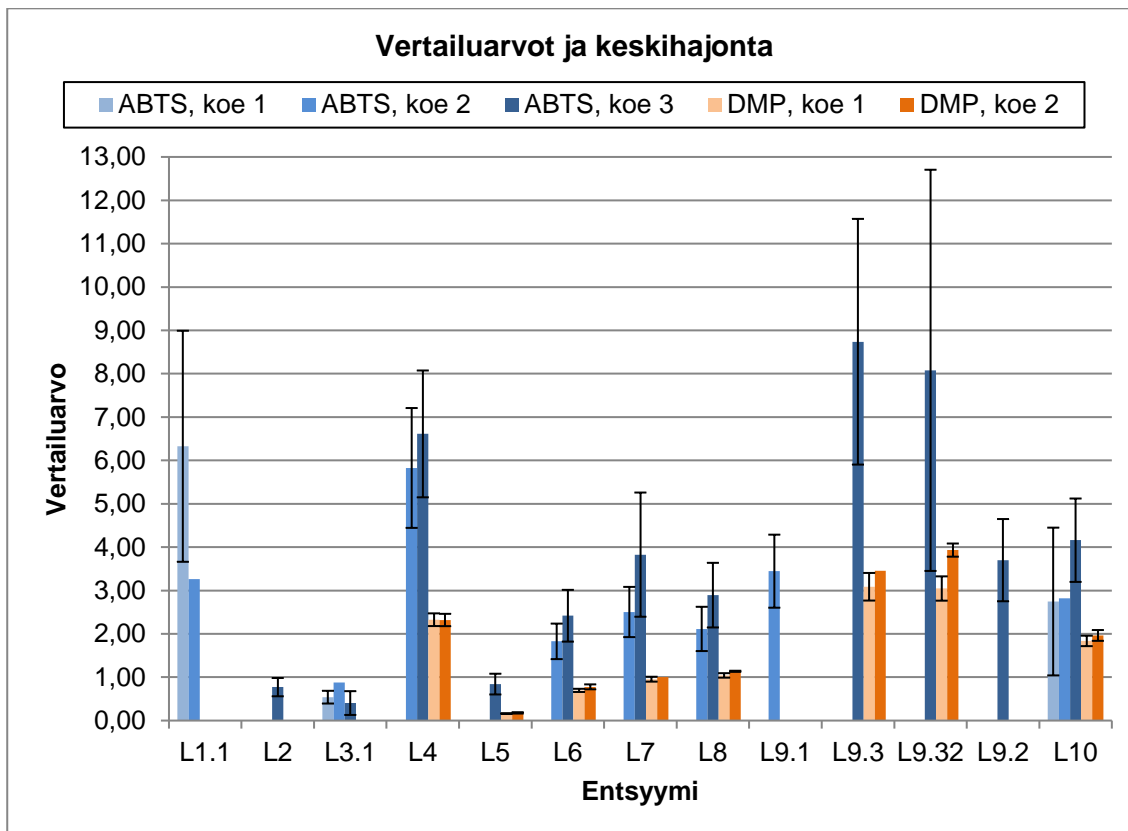
jossa k = kulmakerroin. Eri laimennossuhteiden vertailuarvoista laskettiin keskiarvo ja tulokset sijoitettiin Kuvio 2. Entsyymien vertailuarvot ja keskihajonta:een.

Suurimman vertailuarvon entsyymit (L1.1, L3.1, sekä L10) valittiin jatkotutkimuksiin ja muiden tuotantokantojen sekä mutaatioiden entsyymit tiputettiin pois.

Koska ensimmäisessä testuserässä havaittiin laimennosten 1:100 ja 1:200 olevan vaikea mitata luotettavasti, kokeita jatkettiin määrittämällä kullekin entsyymille laimennuskertoimet, joissa entsyymiin aktiivisuus on mitattavissa lineaarisella alueella, eikä näytteen absorbanssi ylitä mittauslaitteen saturaatiopistettä. Testeihin otettiin mukaan uusia entsyymeitä, joiden vertailua pidettiin hyödyllisenä kokonaiskuvan kannalta.

Arvot sijoitettiin kuvioon ja lisättiin mukaan keskihajonta eri laimennuskertoimilla tehtyjen mittausten välillä (Kuvio 2).

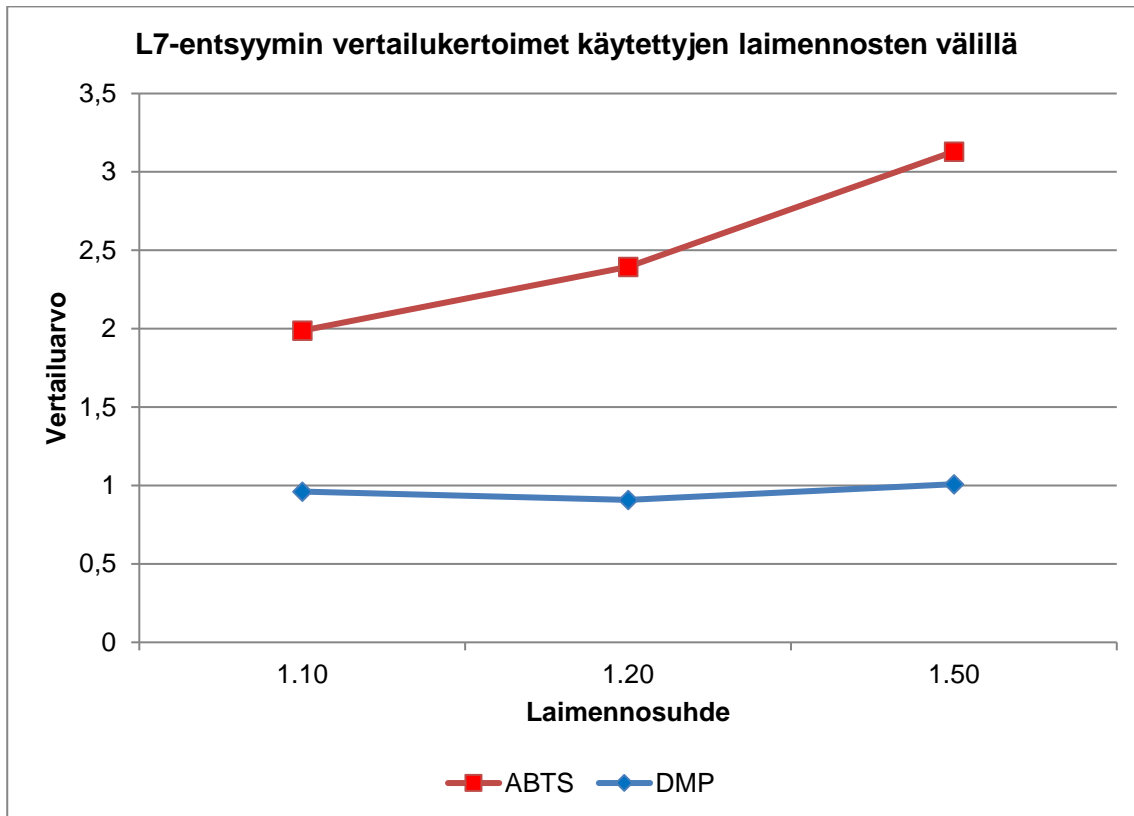
Tuloksista huomataan, että keskihajonta on huomattavasti suurempaa ABTS- kuin DMP-mallisubstraattia käytettäessä. Vastaava trendi havaittiin kaikissa mittaustuloksissa, joissa käytettiin ABTS-menetelmää.



Kuvio 2. Entsyymien vertailuarvot ja keskihajonta

Kun tarkastellaan yksittäisen entsyymiin vertailuarvoa eri laimennuskertoimien välillä, havaitaan vertailuarvon kasvavan laimeampia näytteitä mitattaessa (Kuvio 3) ABTS:llä, mutta ei DMP:llä. Kuten (Terrón et al., 2004) tutkimuksessaan esittävät, ABTS-menetelmä soveltuu paremmin alkaalisissa olosuhteissa käytettävien entsyymien aktiivisuuksien määrittämiseen, ja koska ABTS on menetelmänä sensitiivisempi, saadaan laimeammista näytteistä vaste. Tämän lisäksi ligniinin väri aiheuttaa taustaa DMP-mittauksissa, joka häiritsee tulosten tulkintaa. ABTS-menetelmä on ollut edellä mainituista syistä yrityksessä laajalti käytössä, joten kokeita jatkettiin samalla menetelmällä, vaikka DMP-mittauksissa saadut tulokset olivat laimennuskertoimien välillä johdonmukaisempia. Koska ongelma on tunnistettu, tulevaisuissa mittauksissa ei enää

käytetty eri laimennuskertoimia, vaan entsyymien annostus suhteutettiin mitattujen aktiivisuuksien mukaan, jolloin mittauksia tehdessä oli mahdollista käyttää samoja laimennuskertoimia.



Kuvio 3. Esimerkki vertailukertoimien vaihtelusta laimennuskertoimien välillä.

L9.3- ja L9.4-entsyymien aktiivisuudet mitattiin uudestaan hieman poikkeavalla tavalla, sillä L9.4:n aktiivisuus on mitattu aikaisemmin toisessa tuotantolaitoksessa, ja tarkoituksena oli tehdä mittaus vastaavalla tavalla, jotta aktiivisuuden mahdollinen lasku varastoinnin aikana voitaisiin määrittää. Näytteet laimennettiin natriumasetaattiin, jonka jälkeen laimennettua näytettä pipetoitiin 20 µl ja natriumasetaattia 8980 µl 15 ml falcon-putkiin. Liuosta pipetoitiin 900 µl 1,5 ml eppendorf-putkeen. Näytteet, ABTS ja nollanäyte lämmitettiin 60 asteeseen ja inkuboitiin 10 minuuttia. 100 µl ABTS:ää pipetoitiin eppendorfeihin ja vorteksoitiin nopeasti reaktion käynnistämiseksi. Absorbanssi mitattiin 405 nm aallonpituudella minuutin kuluttua reaktion käynnistämisestä. Kokeet tehtiin käyttäen yhtä rinnakkaisnäytettä ja arvot laskettiin näiden keskiarvosta. Nollanäytteenä käytettiin 898 µl natriumasetaattia + 2 µl RO-vettä + 100 µl ABTS:ää.

Entsyymien aktiivisuudet mikrokataleina laskettiin käyttämällä kaavaa 5.

$$\text{Entsyymin aktiivisuus (kat/l)} = \frac{\Delta c(\text{ABTS}\cdot)}{\Delta t} * \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ent}}} = \frac{\frac{\Delta A(\text{ABTS}\cdot)_{405\text{nm}}}{\varepsilon(\text{ABTS}\cdot)_{405\text{nm}}} * \frac{V_{\text{tot}}}{\Delta t}}{\frac{\{\Delta A(\text{test})_{405\text{nm}} - A(\text{blank})_{405\text{nm}}\}}{\varepsilon(\text{ABTS}\cdot)_{405\text{nm}}} * \frac{V_{\text{tot}}}{\Delta t}} * \frac{V_{\text{tot}}}{V_{\text{ent}}}$$

Kaava 5. Entsyymin aktiivisuus

jossa c = konsentraatio, t = reaktioaika, V = tilavuus, ε = molaarinen absorptiokerroin, A = absorbanssi.

Sijoittamalla L9.3-entsyymin arvot kaavaan 5, saadaan määritettyä entsyymin aktiivisuus mikrokataleina per litra:

$$\text{Entsyymin aktiivisuus} = \frac{(1,7739 - 0,2529)}{36800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}} * \frac{1 * 10^{-3} \text{ l}}{2 * 10^{-6} \text{ l}} * 10 = 0,003444 \text{ kat/l} = 3444 \text{ }\mu\text{kat/l}$$

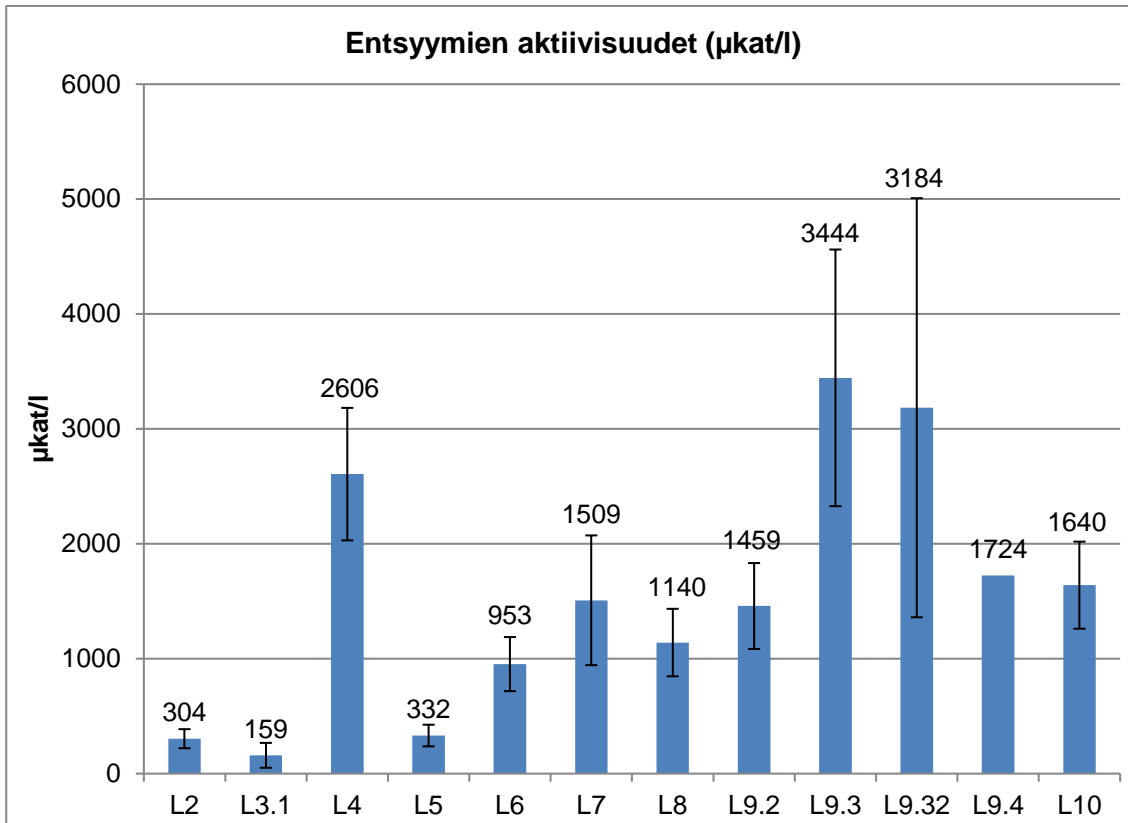
ABTS:n molekulaarisena absorptiokertoimena on käytetty Sigma-Aldrichin ilmoittamaa arvoa. Laskussa on lisäksi otettu huomioon käytetty laimennoskerroin (1/10).

L9.3-entsyymin mitatun aktiivisuuden perusteella määritettiin myös muille entsyymeille aktiivisuudet suhteuttamalla Kuvio 2:ssa esitetyt vertailuarvot L9.3 vertailuarvoon kaavalla 6.

$$\text{Entsyymin aktiivisuus} = \frac{\text{Vertailuarvo}_{\text{ent}}}{\text{Vertailuarvo}_{\text{L9.3}}} * \text{aktiivisuus}_{\text{L9.3}}$$

Kaava 6. Entsyymin suhteellinen aktiivisuus

Entsyymien aktiivisuudet mikrokataleina on esitetty kuviossa 4.



Kuvio 4. Entsyymien aktiivisuudet (µkat/l) ja mittausten keskihajonta. Vaaka-akselilla käytetyn entsyymin tunnus.

Mallisubstraateilla tehtyjen kokeiden perusteella tiputettiin tulevista testeistä pois pienimmän aktiivisuuden versiot entsyymeistä ja testausta jatkettiin aktiivisuuden mittaamisella ligniiniliuoksessa.

6.2 Ligniinin liukoisuus

Ligniinin liukoisuutta natriumhydroksidiliuokseen tutkittiin lämmittämällä 300 ml NaOH-liuosta 50 °C lämpötilaan ja säätämällä pH halutulle tasolle. Kuivattua ligniiniä liuotettiin 16,51 g, jotta saavutettiin 50 g/l ligniinikonsentraatio. Laskussa on otettu huomioon ligniinin kuiva-ainepitoisuus, joka on yrityksessä aiemmin tehtyjen mittausten perusteella kyseisellä ligniinityypillä 90,86 %.

$$m = \frac{50 \text{ g/l} * 0,3 \text{ l}}{90,86 \%} * 100 \% = 16,51 \text{ g}$$

Liutusta jatkettiin 15 minuutin ajan, jonka jälkeen liuos jaettiin ennalta punnittuihin 50 ml falcon-putkiin ja sentrifugoitiin 20 min ajan 4000 rcf:ssä. Liuos dekantoitiin mittalasiin, liuos ja mittalasi punnittiin ja falcon-putkiin jäljelle jääneet pelletit sekä lisäksi 3 x 30 ml liuennutta ligniiniä sisältävää liuosta kuivattiin yön yli 105 °C:ssa ja punnittiin uudelleen. Liuenneen ja liukenemattoman ligniinin osuus näytteessä saadaan vertailemalla tyhjien ja kuivattua näytettä sisältävien falcon-putkien painoja. Koska 300 ml 0,1 M NaOH-liuosta sisältää 1,2 g NaOH:ia ja liuotetun ligniinin kuivapaino oli 15 g, saadaan teoreettiseksi maksimipainoksi 16,2 g. Liuenneen ja ei-liuonneen ligniinin yhteispaino oli 16,24 g, joka on hyvin lähellä teoreettista maksimia ja tulosta voidaan pitää luotettavana. Liuenneen ligniinin osuus yhteispainosta oli 13,27 g, jolloin liukoisuusprosentiksi saadaan

$$13,27 \text{ g} / 16,24 \text{ g} * 100 \% = 82 \%$$

Mittausmenetelmien vertailun vuoksi dekantoidusta liuoksesta otettiin näyte, joka mitattiin UV/VIS-spektroskoopilla ja tulosta verrattiin vastaavalla ligniinityypillä tehtyyn standardiin. Mittausten perusteella kolmen näytteen keskiarvoksi saatiin 34,7 g/l, joka on alhaisempi, kuin punnitsemalla saatu tulos (50 g/l * 82 % = 41 g/l). Tämä voidaan ainakin osittain selittää NaOH:in osuudella punnituksissa, sekä UV-mittauksen ja standardin virhemarginaalilla. Lisäksi epävarmuutta aiheuttaa, ettei UV-mittausta tehtäessä voida olla varmoja, onko liuotukseen käytetty NaOH sitoutunut liuenneseen tai liukenemattomaan ligniiniin, vai onko se vapaana liuoksessa. Mittauksessa käytettiin 290 nm aallonpituutta, mutta menetelmä on vielä kokeellinen, eikä kyseisen ligniinin tarkkaa absorptioaallonpituutta tunneta, jolloin kyseessä on jonkinasteinen kompromissi. Kokeiden edetessä tehtiin kolme liukoisuusmittausta käyttäen nopeampaa UV-menetelmää, sillä sitä pidettiin riittävän toistettavana vertailtaessa samaa ligniinityyppiä ja -erää.

6.3 Entsyymien stabiilius ligniiniliuoksessa ja vaikutus ligniinin demetylaatioon

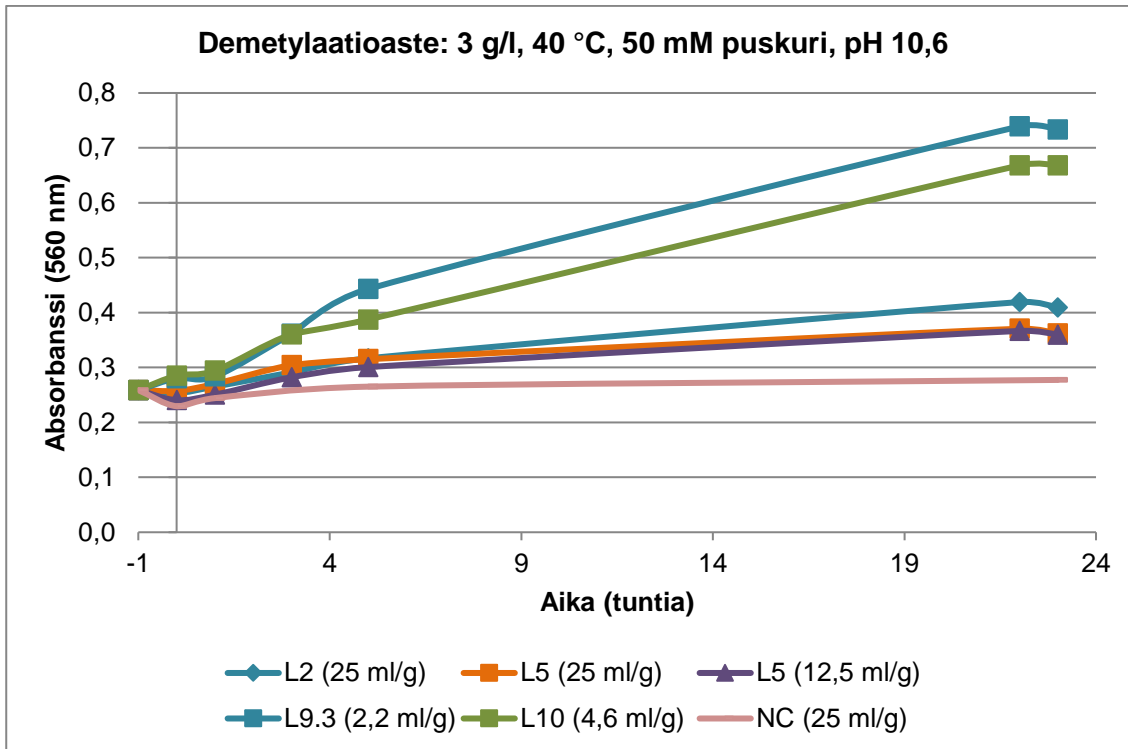
Entsyymien stabiiliutta ligniiniliuoksessa tutkittiin käsittelemällä liuennutta ligniiniä 125 ml:n erlenmeyer-astioissa pH 10,6:ssa. Liuosta sekoitettiin 150 rpm nopeudella noin vuorokauden ajan ottamalla 1 ml:n näytteitä tietyin väliajoin ja jäädyttämällä ne välittömästi. Entsyymien aktiivisuutta eri aikapisteissä verrataan ensimmäiseen mittauspisteeseen, jolloin entsyymi on juuri lisätty ligniiniliuokseen. Myös pH:n muutosta kokeen edetessä seurattiin. Kokeissa vertailtiin eri parametrien vaikutuksia. Muuttujina olivat käytetty puskuriliuos, lämpötila, käytetty liuoksen tilavuus, entsyymien annostus, sekä ligniinikonsentraatio liuoksessa.

Kokeessa entsyymien annostelu oli suhteutettu aikaisempien kokeiden perusteella (Kuvio 2) L2-entsyymin aktiivisuuteen, jonka keskimääräinen aktiivisuus oli alhaisin. Tämän tarkoituksena oli saada aktiivisuudet tarpeeksi lähelle toisiaan, jolloin aktiivisuuden mitauksessa on mahdollista käyttää kaikille entsyymeille samaa laimennuskerrointa, ja jotta entsyymien vaikutusta ligniiniin testattaessa voitaisiin käyttää samaa aktiivisuustasoa.

Kokeissa havaittiin kaikkien tarkasteltavien entsyymien säilyttäneen aktiivisuutensa vielä 23 h käsittelyn jälkeen. L5-entsyymistä käytettiin kahta eri annosta. Tämän perusteella havaittiin, ettei annoksen kaksinkertaistaminen aiheuta kaksinkertaista vaikutusta ligniiniin mitattaessa vapautuvan metanolin määrää tai demetylaatiotasoa. Jatkotutkimuksissa päädyttiin käyttämään alhaisempaa 12,5 mL/g annostusta, sillä tarkoituksena on päästä mahdollisimman alhaiseen annostukseen suhteessa vaikutukseen ligniiniin. Aikaisemman kokeen perusteella tiedettiin L9.3- ja L10-entsyymien olevan aktiivisimpia ja näiden annostusta laskettiin huomattavasti. Mittaukset osoittivat annostusten suhteutuksen onnistuneen hyvin, sillä aktiivisuudet ovat huomattavan lähellä toisiaan.

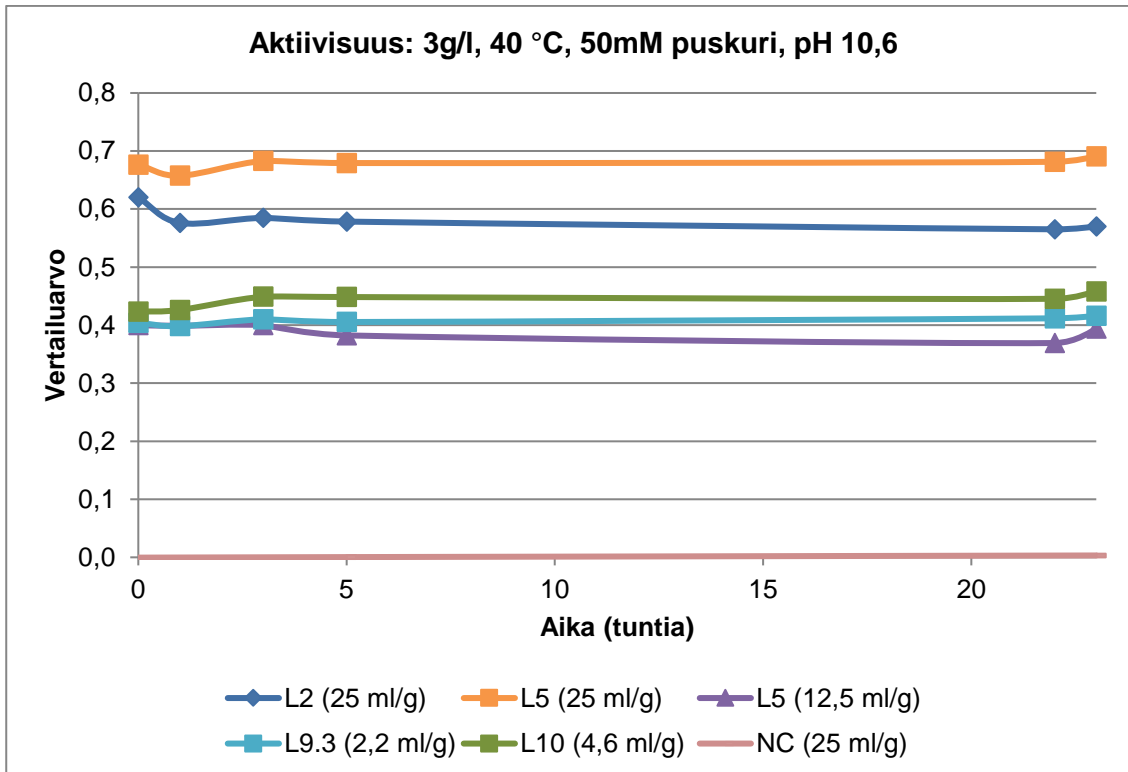
Toinen tapa tarkastella entsyymien aktiivisuutta on mitata ligniinin demetylaatioastetta (Kuvio 5), joka kertoo lakkaasin vaikutuksesta ligniiniin. Ligniinin demetylaatioissa fenolisten OH-ryhmien määrä per ligniinimolekyyli kasvaa ja on yksi tapa lisätä ligniinin reaktiivisuutta.

Lakkaasientsyymien hapettaessa ligniinimolekyyliä alkaalisissa olosuhteissa irtoaa molekyylistä pienemmän molekyylipainon radikaaleja ja reaktion edetessä liuokseen muodostuu metanolia. Ligniinin demetylaatio johtaa fenolisten OH-ryhmien muodostumiseen. (Hämäläinen et al., 2018) Muodostuneen metanolin ja täten myös demetylaation edistymisen mittaukseen käytetään kohdassa 0 esitettyä Purpald-menetelmää.



Kuvio 5. Ligniinin demetylaatioaste. NC = negatiivinen kontrolli. Sulkeissa käytetty annostus.

Kuten kuvio 6:ta tarkastelemalla havaitaan, ei entsyymien mitattu aktiivisuus ABTS:llä korreloi ligniinin demetylaatioasteeseen. L5-entsyymien kohdalla nähdään, että annostuksella ei ollut havaittavaa eroa demetylaatioasteeseen, eikä selvästi aktiivisempi L2-entsyymi kyennyt demetyloimaan ligniiniä merkittävästi L5:ttä enempää. Toisaalta taas L9.3 ja L10 olivat alhaisempia aktiivisuudeltaan, mutta demetylaatioaste oli huomattavasti korkeampi.

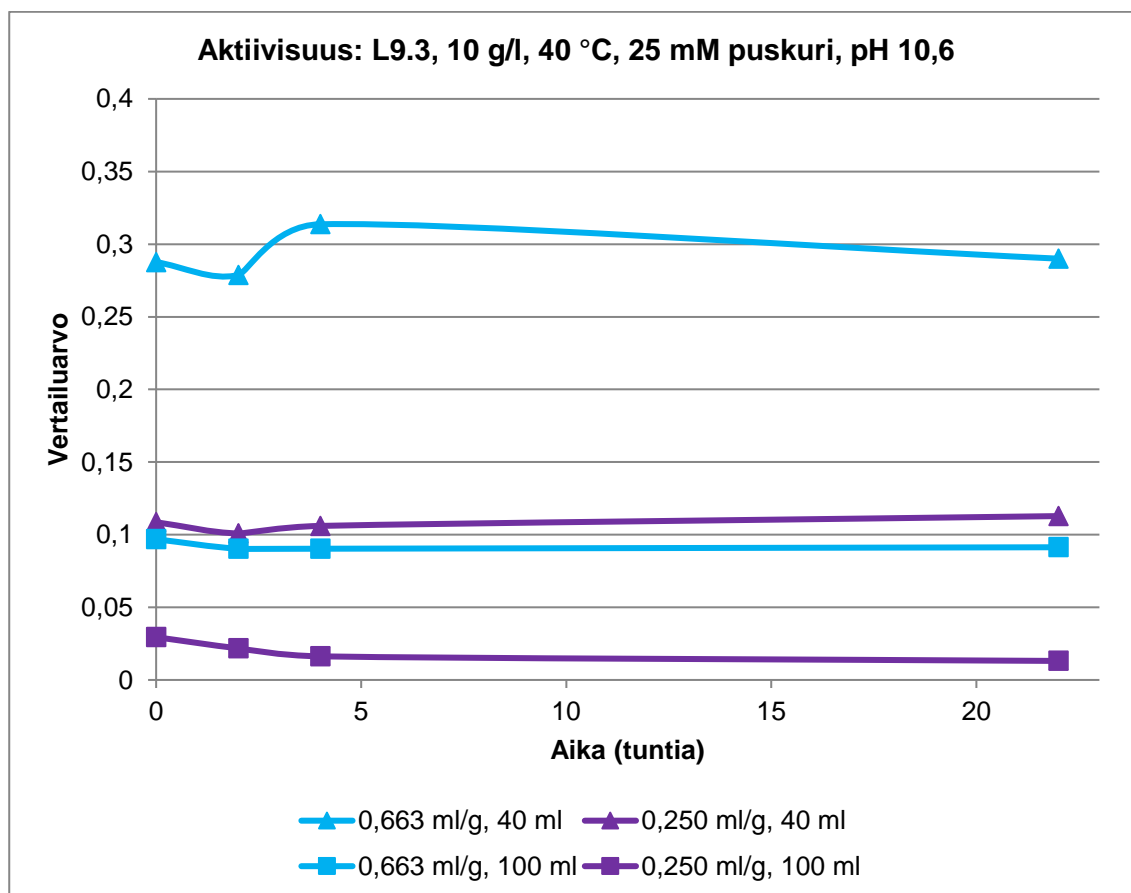


Kuvio 6. Entsyymien aktiivisuus ligniinille. NC = negatiivinen kontrolli. Sulkeissa käytetty annostus per grammaa ligniiniä.

6.4 Ilmastus

Kuten lakkaasin hapetusmekanismia kuvaavassa kappaleessa sivuilla 20-21 esitettiin, käyttää lakkaasientsyymi molekulaarista happea substraatin, tässä tapauksessa ligniinin, hapettamiseen. Liuenneen hapen vaikutusta entsyymin aktiivisuuteen tutkittiin kokeessa, jossa 125 ml erlenmeyer-pulloissa sekoitettiin 100 ml ja 40 ml ligniiniliuosta, joihin lisättiin toisiaan vastaavat annostukset entsyymiä. Erlenmeyer-pullon kartiomaisen rakenteen vuoksi suurempaa tilavuutta käytettäessä pienenee liuoksen ja ilman rajapinnan pinta-ala, joka oli kokeissa tärkein muuttuja näytteiden välillä käytetyn annostuksen lisäksi. Lisäksi pienempi pinta-ala tarkoittaa pienempää turbulenssia, joka vähentää ilman kanssa reagoivaa pinta-alaa entisestään. Yrityksessä ei ole mahdollisuutta mitata suoraan liuenneen hapen osuutta laboratoriomittakaavan kokeissa, eikä täten todellista pitoisuutta tunneta. Hapen liukenemiseen vaikuttavat ominaisuudet kuten turbulenssi ja pinta-ala kuitenkin tunnetaan hyvin (Fondriest Environmental, 2013).

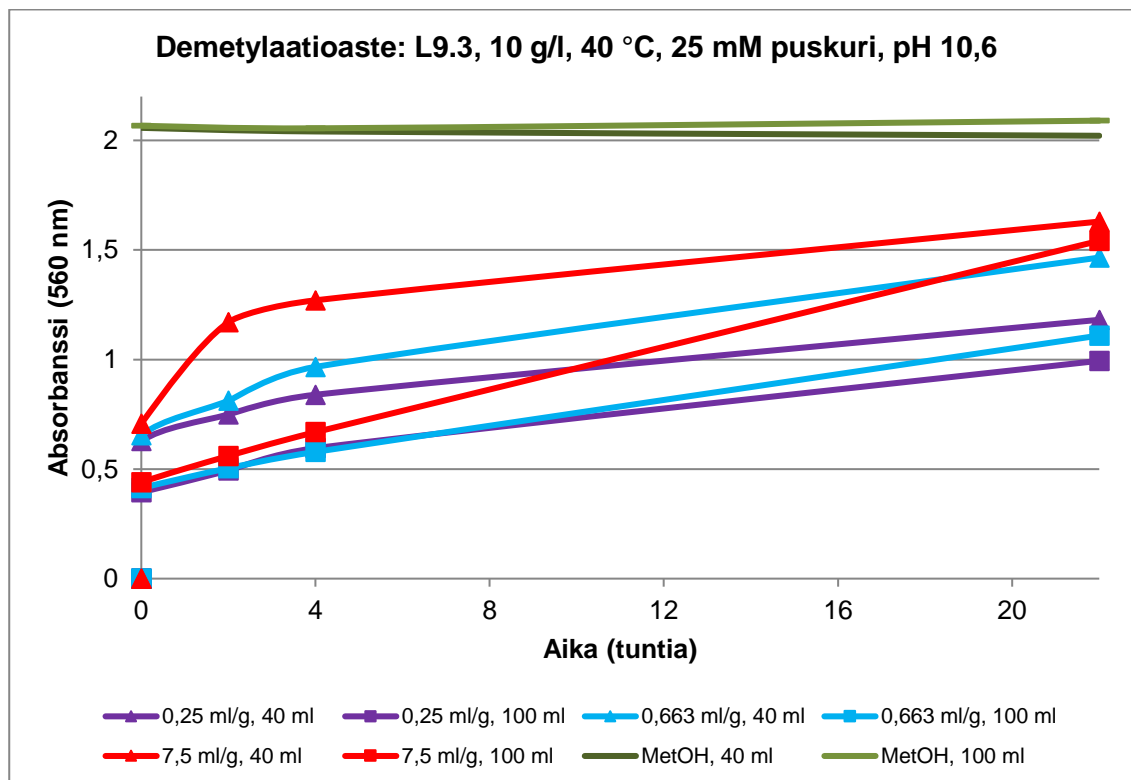
Vertailemalla eri tilavuudessa tehtyjä kokeita havaittiin suuremman pinta-alan sekä tehokkaamman sekoituksen nostavan aktiivisuutta merkittävästi (Kuvio 7). Tämä voi ainakin osittain johtua ligniiniliuoksessa lakkaasin vaikutuksesta muodostuvien radikaalien reagoimisesta ABTS:n kanssa. Käyttämällä 62 % pienempää annostusta (0,250 ml/g) 40 ml tilavuudessa saavutettiin jopa hieman korkeampi aktiivisuus, kuin korkeammalla 0,663 ml/g annostuksella 100 ml tilavuudessa. Lisäksi havaittiin aktiivisuuden erojen olevan suhteessa korkeampia pienissä annostuksissa, joka saattaa viitata liuenneen hapen olevan aktiivisuutta rajoittava tekijä korkeammissa annostuksissa. Koska suurempia annostuksia käytettäessä myös aktiivisuus laskee ajan myötä, voi myös se indikoida entsyymin kuluttavan enemmän happea kuin liuokseen liukenee sekoituksen vaikutuksesta, tällöin vähentäen entsyymin aktiivisuutta, vaikka entsyymi ei muuten menettäisikään aktiivisuuttaan. Kokeissa oli mukana lisäksi 7,5 ml/g annostus, jota ei esityksen selvyiden vuoksi lisätty kuvioon. Ero aktiivisuudessa oli 0,250 ml/g annostuksella noin viisinkertainen, 0,663 ml/g annostuksella noin kolminkertainen ja 7,5 ml/g annostuksella noin kaksinkertainen verrattaessa 40 ja 100 ml:n tilavuuksia.



Kuvio 7. Liuenneen hapen vaikutus aktiivisuuteen.

Kun samoista aikapisteistä otetuista näytteistä mitattiin demetylaatiotasoa, huomattiin suuremman liunneen hapen määrän nostavan myös demetylaatioastetta kaikilla annostuksilla (Kuvio 8. Liunneen hapen vaikutus demetylaatioasteeseen.). Merkittävää on huomata, että pienemmissä tilavuuksissa on demetylaatioaste jo lähtökohtaisesti korkeampi, kuin 100 ml tilavuudessa. Tämä voi aiheutua liunneen hapen kyvystä demetyloidä ligniiniä alkaalisissa olosuhteissa, sillä vaikka lakkaasientsyymi katalysoi reaktiota, eivät entsyymit tuota uusia reaktioita, vaan katalysoivat reaktioita, jotka tapahtuisivat muutenkin, mutta huomattavasti hitaammin. Koska liuoksia sekoitettiin lämpötilan tasaamiseksi noin 30 minuutin ajan ennen entsyymin lisäystä, ehtii liuoksiin liueta happea eri määrä, joka mahdollisesti aiheuttaa erilaisen lähtötilanteen demetylaatiotasossa.

Demetylaatioastetta Purpald-menetelmällä mitattaessa mitataan käytännössä muodostuneen metanolin määrää liuoksessa, kuten kohdassa 0 esitettiin. Tästä syystä koeasetelmaan lisättiin myös 40 ja 100 ml 2,5 mM metanolia sisältävät erlenmeyer-pullot, jonka metanolipitoisuus mitattiin kokeen alussa ja lopussa. Havaittiin, ettei metanoli haihdu merkittävästi kokeen aikana, eikä näin ollen vääristä mittaustuloksia.

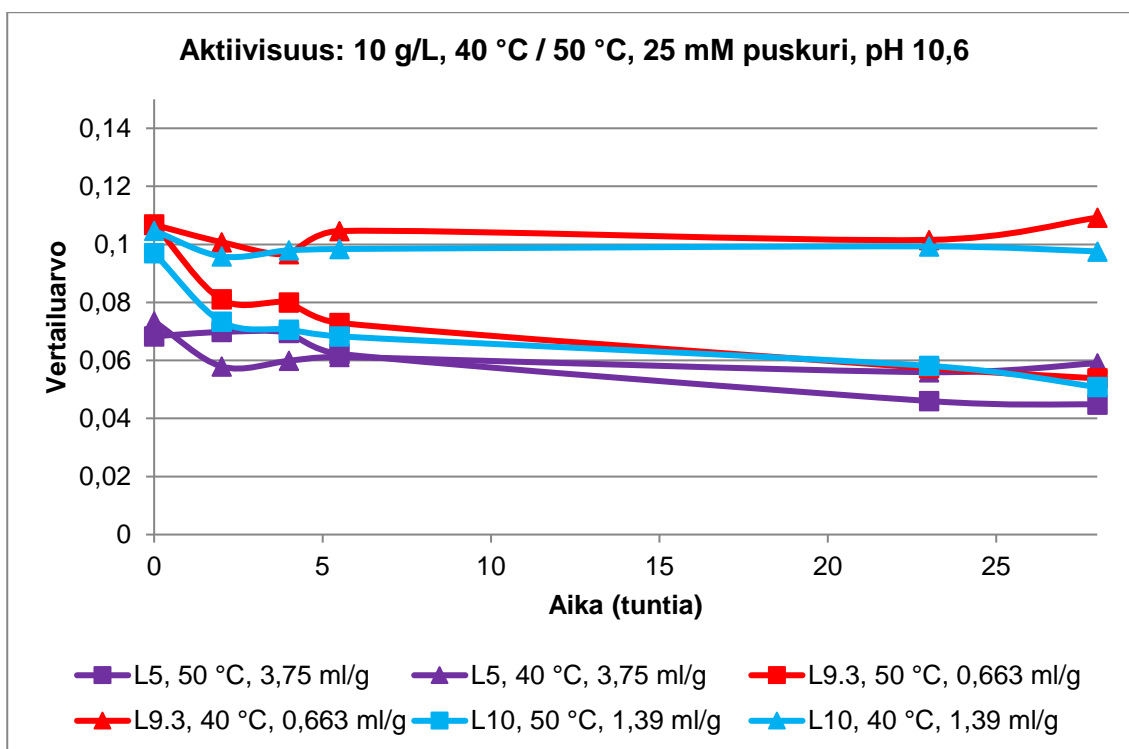


Kuvio 8. Liunneen hapen vaikutus demetylaatioasteeseen.

6.5 Lämpötila

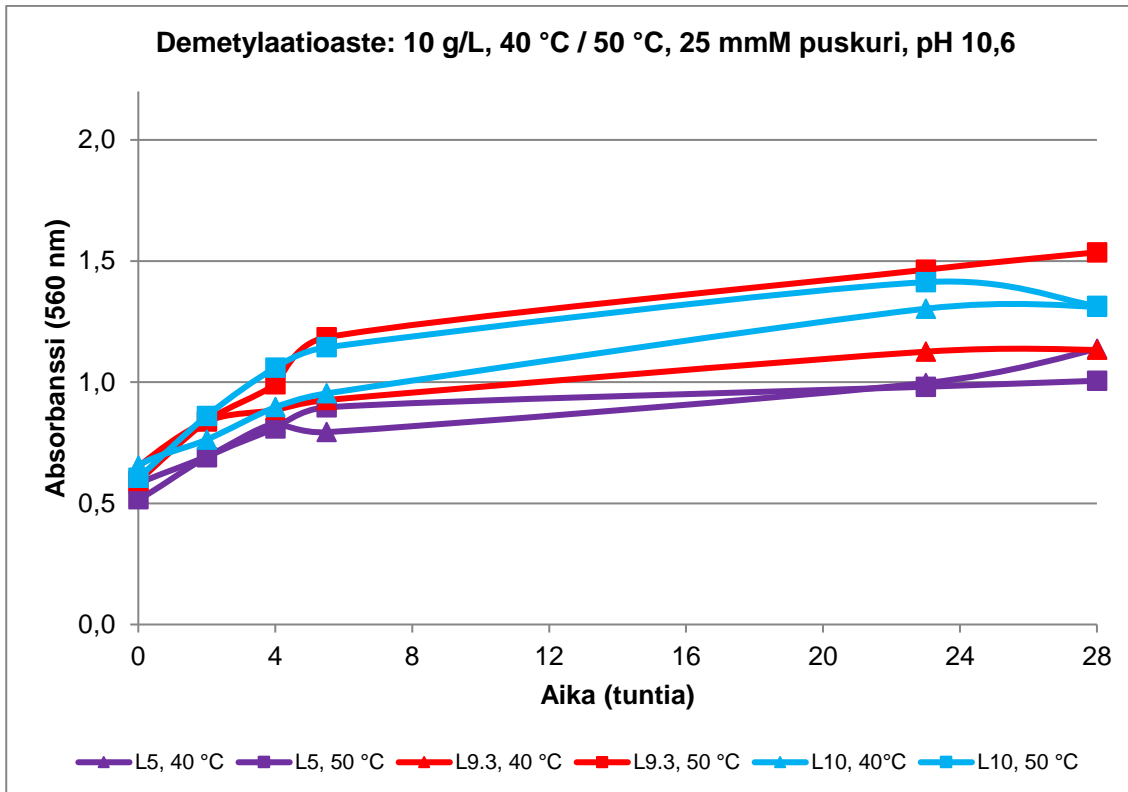
Koska entsyymit ovat erittäin lämpötilariippuvaisia, työn seuraavassa vaiheessa tarkasteltiin lämpötilan vaikutusta sekä aktiivisuuteen, että demetylaatioasteeseen.

L9.3- ja L10-entsyymit menettivät korkeammassa 50 asteen lämpötilassa lähes 30 % aktiivisuudestaan heti kokeen ensimmäisten tuntien aikana, kun 40 asteessa aktiivisuus säilyi alkuperäisellä tasolla koko 28 tunnin tarkastelujakson aikana. L5-entsyymi oli kokonaisuudessaan vähiten aktiivinen, mutta aktiivisuus myös laski vähiten lämpötilaa nostettaessa. (Kuvio 9)



Kuvio 9. Lämpötilan vaikutus aktiivisuuteen.

Kuten aktiivisuudenkin suhteen, oli L5:llä demetylaation suhteen vähiten eroa lämpötilojen välillä. L9.3 keskimääräinen demetylaatioaste oli 16 % ja L10:n 8 % alhaisempi 40 asteessa, kuin 50:ssä (Kuvio 10. Lämpötilan vaikutus demetylaatioasteeseen..

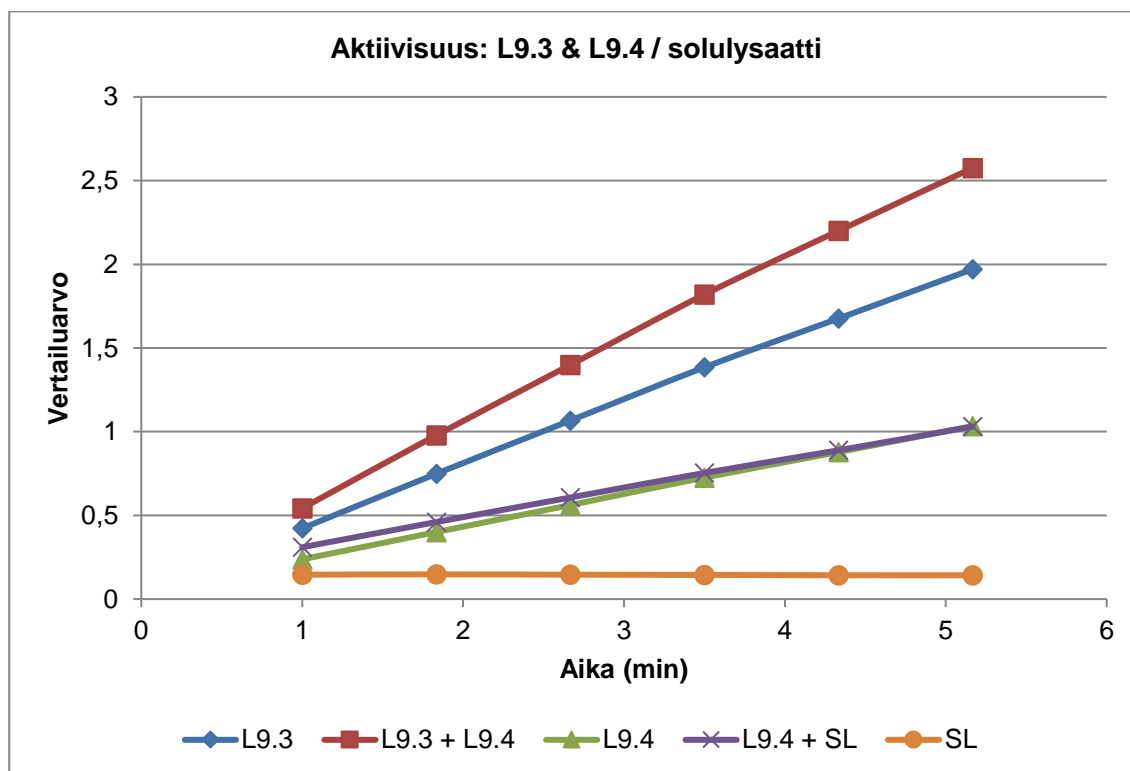


Kuvio 10. Lämpötilan vaikutus demetylaatioasteeseen.

Kaikki tutkimuksessa tähän mennessä käytetyt entsyymit ovat olleet puhdistamattomia, eli entsyymi on kasvatusliuoksessa, eikä sitä ole eroteltu solulysaatista. Koska lysaatti sisältää lukuisan määrän tuntemattomia yhdisteitä ja komponentteja, haluttiin tutkimuksen yhteydessä selvittää, inhiboiko tai indusoiko solulysaatin läsnäolo entsyymin toimintaa. Kokeisiin valmistettiin viisi yhdistettä, jotka kaikki sisälsivät kokonaisuudessaan saman määrän entsyymiä: L9.3, jossa on puhdistamaton entsyymi solulysaatissa, L9.3 + L9.4, jossa on 50/50-suhteessa puhdistamatonta ja puhdistettua entsyymiä, L9.4, jossa on ainoastaan puhdistettua entsyymiä, sekä L9.4 + SL, jossa on 50/50-suhteessa puhdistettua entsyymiä sekä solulysaattia. Pelkkää solulysaattia käytettiin myös negatiivisena kontrollina.

Jos entsyymit toimivat vastaavalla tavalla riippumatta siitä, sijaitseeko entsyymi lysaatissa vai ei, voidaan vertailuarvojen ajatella olevan erikseen mitattuna ja yhteenlaskettuna vastaavia kuin samaan liuokseen sekoitettuna, sillä entsyymin kokonaisannostus pysyy samana. Kuitenkin erikseen mitattuna näytteiden L9.3 ja L9.4 yhteenlaskettu vertailuarvo oli 11,34, kun taas yhdessä mitattuna yhteenlaskettu arvo oli 9,78, joka on noin 14 % alhaisempi.

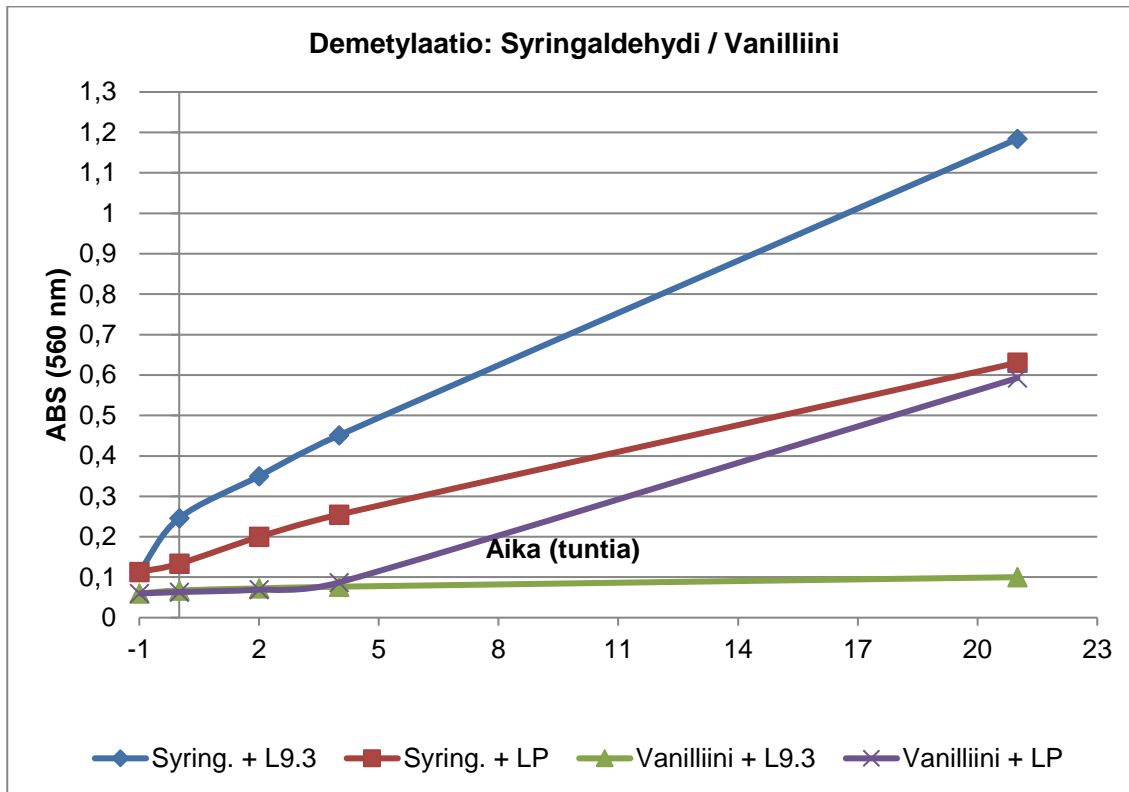
L9.4 ja L9.4 + SL näytteitä vertailemalla huomataan, että aktiivisuudet ovat lähes toisiaan vastaavia (Kuvio 11. Puhdistetun ja puhdistamattoman entsyymin aktiivisuuden vertailu. L9.3 = puhdistamaton entsyymi, L9.4 = puhdistettu entsyymi, SL = solulysaatti ilman entsyymiä.. Jos solulysaatilla on vaikutus entsyymin aktiivisuuteen, on sen merkitys melko vähäinen ja erot voivat selittyä myös osin mittausvirheellä. Tästä voidaan päätellä, että solulysaatti itsessään ei inhiboi tai indusoi entsyymin aktiivisuutta. L9.4 on puhdistettu versio entsyymistä ja koska sen valmistuksessa on käytetty useita formulointikemikaaleja entsyymin stabilointiin, on mahdollista, että sekoitettuna puhdistamattomaan entsyymiin, inhiboivat L9.4:ssa olevat formulointikemikaalit tällöin L9.3 entsyymin toimintaa. L9.4:sta ei ole saatavilla versiota, joka ei sisällä formulointikemikaaleja, joten tätä mahdollisuutta ei voitu kokeiden yhteydessä tarkemmin tutkia.



Kuvio 11. Puhdistetun ja puhdistamattoman entsyymin aktiivisuuden vertailu. L9.3 = puhdistamaton entsyymi, L9.4 = puhdistettu entsyymi, SL = solulysaatti ilman entsyymiä.

Kokeiden viimeisessä vaiheessa haluttiin tarkastella lakkaasin vaikutusta syringaldehydinin ja vanilliinin demetylaatioon, joka indikoi malliaineiden reaktiivisuutta (Kuvio 12. Syringaldehydinin ja vanilliinin demetylaatioaste.). Syringaldehydi ja vanilliini ovat aromaatti-

sia aldehydejä, joita muodostuu hapetettaessa ligniiniä alkaalisissa olosuhteissa. Syringaldehydiä muodostuu S- eli syringyyliyksiköistä ja vanilliinia G- eli guajakoliyksiköistä. Syringaldehydistä ja vanilliinista kerrottiin tarkemmin kappaleessa 0.



Kuvio 12. Syringaldehydinin ja vanilliinin demetylaatioaste. Syring. = syringaldehydi, LP = lehtipuuligniini.

Kuten Taulukko 1:ssä on esitetty, lehtipuusta saatu ligniini sisältää n. 50 % syringyyliyksiköitä ja havupuut ainoastaan n. 5 %. Kokeessa haluttiin mallintaa eroa, joka oli nähty aiemmissa kokeissa havu- ja lehtipuiden välillä demetylaatiotasossa.

Koe suoritettiin lehtipuusta saadulla ligniinillä. Syringaldehydinin demetylaatiotasot ovat huomattavasti korkeampia kuin vanilliinilla, joka on yhteneväinen aiempien havaintojen kanssa. Sen lisäksi, että lehtipuuligniini sisältää enemmän syringaldehydi-yksiköitä, on vanilliini, eli guajakolin ja glyoksyylihapon johdannainen, huomattavasti heikommin lakkaasin kanssa reagoiva yhdiste (Schutyser et al., 2018).

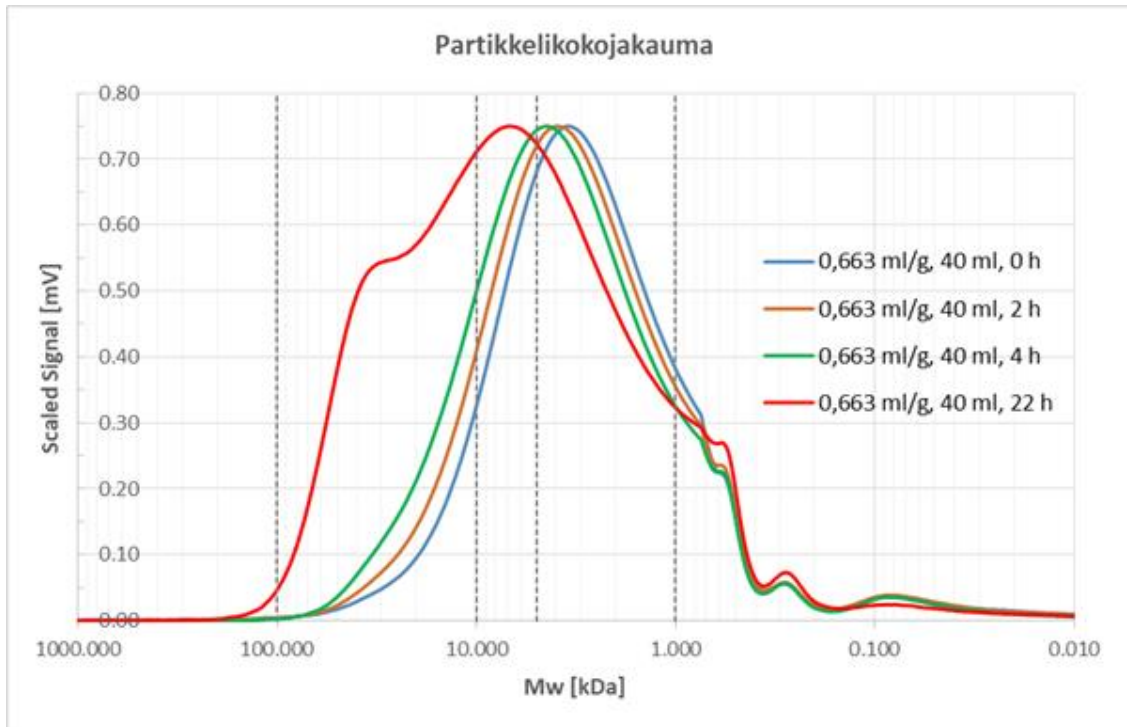
Toisaalta havaittiin myös, että vanilliini pelkässä lyysispuskurissa ilman entsyymiä alkaa reagoimaan hapen kanssa neljän tunnin aikapisteen kohdalla muodostaen liuokseen metanolia, joka kertoo molekyylin demetyloituneen.

6.6 Partikkelijakauma (HPLC/SEC)

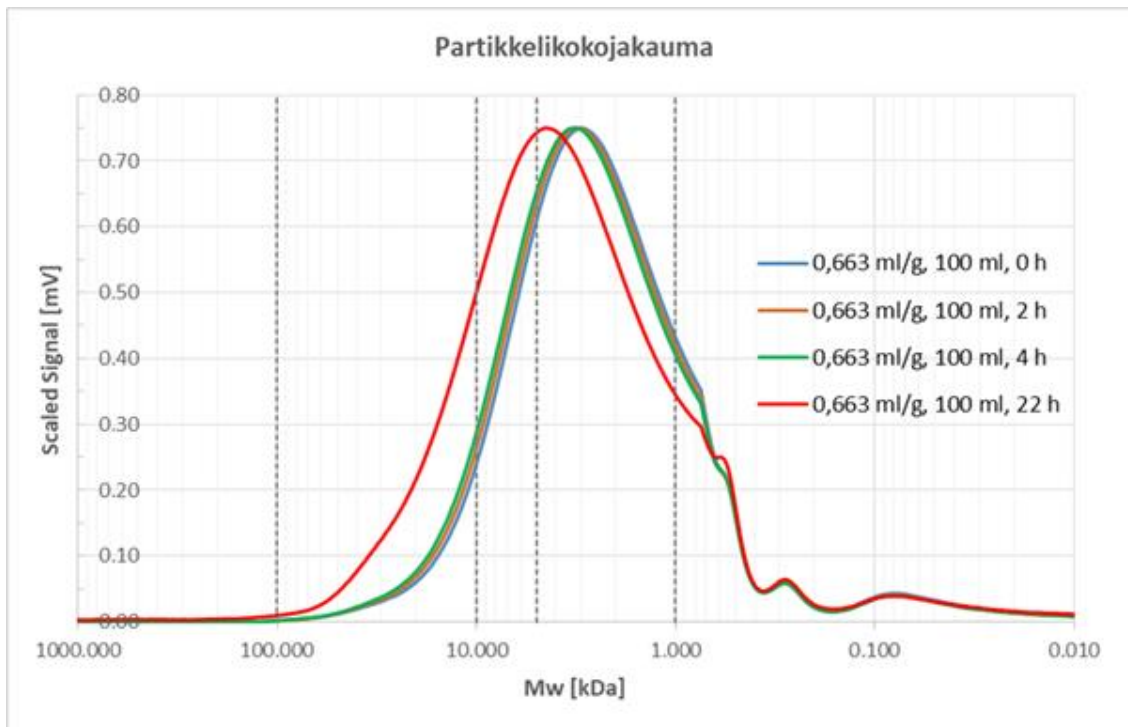
Ensyymit hajottavat ligniiniä pienimpiin partikkeleihin ja tätä jakaumaa tutkittiin käyttäen kokoekskluusiokromatografiaa. Kerätyt näytteet sulatettiin ja sentrifugoitiin 18000 rcf 4,5 minuutin ajan. Alikvootti näytteistä laimennettiin 0,1 M natriumhydroksidiliuokseen niin, että liuenneen ligniinin pitoisuudeksi tuli 0,5 g/L. Mittauksessa käytettiin Agilent Technologiesin 1200 CompactLC kromatografia UV-detektorilla, Polymer Standards Servicen MCX 1000 Å + 100 000 Å 10 µm, 8 x 300 mm kokoekskluusiokolonilla ja saman valmistajan MCX 10 µm 8 x 50 mm esikolonilla. Liikkuvafaasina käytettiin 0,1 M natriumhydroksidia 0,6 ml/min virtauksella huoneenlämmössä. Ajoaika näytteelle oli 45 minuuttia. Näytteet mitattiin 358 nm aallonpituudella. Vaikka ligniininäytteiden mittaamisen käytetään yleensä 280 nm aallonpituutta, on MetGenin kokemuksen mukaan 358 nm parempi. 358 nm alueella näytteessä olevien proteiinien tausta jää vähäisemmäksi ja vastaavasti alhaisen molekyylipainon fraktioiden intensiteetti saadaan paremmin esille.

Kokeessa haluttiin verrata liuenneen hapen määrän vaikutusta partikkelikokoon. Koe tehtiin käyttämällä samaa annostusta ja ligniinikonsentraatiota molemmissa kokeissa, mutta tilavuutta muutettiin, jolloin liuokseen liukenee enemmän happea pienessä tilavuudessa ilman ja liuoksen rajapinta-alan kasvaessa, kuten on selitetty kappaleessa 6.4. Käytetyt näytteet ovat samoja.

Partikkelikokojakaumaa kuvio 13:ssa tarkastellessa huomataan, että joka aikapisteellä kokojakauma on siirtynyt hieman suurempaan suuntaan. Kuitenkin 22 h käsittelyn jälkeen on huomattavissa, että liuoksessa on tapahtunut selkeää aggregoitumista molekyylien kesken. Kun liuokseen lisätään happea, muodostuu enemmän monomeerejä ja dimeerejä, jotka toimivat itsessään katalyytteina aiheuttaen uudelleenpolymerisaatiota. Verrattaessa kuvio 14:sta, havaitaan ettei vastaavaa tapahtunut samoissa määrin käytetäessä suurempaa tilavuutta, eli pienempää ilmastusta.



Kuvio 13. Partikkelikokojakauma 40 ml tilavuudessa eri aikapisteissä. Partikkelikoko pienenee vasemmalta oikealle.



Kuvio 14. Partikkelikokojakauma 100 ml tilavuudessa eri aikapisteissä. Partikkelikoko pienenee vasemmalta oikealle.

7 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön aikana kerättiin perustavanlaatuista tietoa uusien entsyymien toiminnasta lehtipuuligniinin kanssa. Samalla kun heikompia versioita pudotettiin pois jatkotutkimuksista, rajattiin tutkimusta koskemaan ainoastaan potentiaalisimpia vaihtoehtoja. Entsyymien ominaisuuksia mitattiin useilla tavoilla: liukoisuutta, muutosta pH:ssa, aktiivisuutta mallisubstraateilla ja ligniiniliuoksessa, demetylaatiotasoa ja vaikutusta liuoksen partikkelikokojakaumaan. Muuttujina näissä mittauksissa oli lämpötila, annostus ja liuenneen hapen määrä. Näiden tulosten lisäksi kerättiin tietoa eri analyysimenetelmien heikkouksista, puutteista ja vahvuuksista.

Tuloksista tehtiin seuraavia johtopäätöksiä. Mitattujen lakkaasientsyymivariaatioiden välillä havaittiin aktiivisuudessa suuria eroja, joiden perusteella voitiin vähemmän potentiaaliset vaihtoehdot jättää pois ja keskittyä jatkokehittämään parhaiten toimivia versioita. Tutkimuksissa havaittiin liuenneen hapen lisäämisen aiheuttavan ligniiniyksiköiden repolymerisaatiota, kasvanutta signaalia ABTS-mittauksessa sekä korkeampaa demetylaatiotasoa. Kun lakkaasi hapettaa ligniiniä syntyy radikaaleja, jotka katalysoivat ligniiniä tehden siitä reaktiivisempaa ja aiheuttaen täten mahdollisesti repolymerisaatiota. Koska ABTS:lle ominainen väri syntyy ABTS-molekyylin hapettumisesta, on mahdollista, että kasvanut signaali ABTS-mittauksissa johtuu näiden radikaalien hapettamisesta ABTS-molekyyleistä, eikä entsyymin suoranaisestä vaikutuksesta. Molekulaarinen happi itsessään aiheuttaa ligniinin demetylaatiota, joka voi selittää myös nousseen demetylaatiotason liuenneen hapen määrää kasvatettaessa.

L9.3-entsyymin optimilämpötila stabiiliuden sekä demetylaation suhteen pystyttiin rajaamaan 40:n ja 50:n celsius-asteen välille. Lisäksi havaittiin L9.3:n sekä L10:n demetyloivan ligniiniä merkittävästi, mutta L2 ja L5 entsyymit eivät olleet tähän kykeneväisiä. Havaitut erot eri lähteistä peräisin olevien entsyymien suhteen osoittavat, että osa samaan luokkaan kuuluvista entsyymeistä ovat kykeneväisiä aikaansaamaan ligniinin demetylaatiota kun taas toiset eivät. Sama havaittiin kyvyssä vaikuttaa ligniinin radikalisoitumiseen sekä de- ja repolymerisaatioon.

Analyysissä käytettävistä menetelmistä tehtiin huomioita, joiden perusteella jatkotutkimuksissa tulisi pyrkiä karsimaan muuttujia, jotka aiheuttavat taustasignaalia ja kasvattavat virhemarginaalia. ABTS-mittauksissa havaittiin, että kuparin käyttö lyysispuskurissa ei kasvata signaalia mitattaessa aktiivisuutta. Tämä huomio on tärkeä, sillä kuparia käytetään yleisesti säilöntäaineena puskurissa. Toisaalta samaa menetelmää käytettäessä ongelmia tulosten tulkinnassa aiheutti signaalin vahvuuden epälineaarinen riippuvuus käytetystä laimennoskertoimesta. Käytettäessä Purpald-menetelmää demetylaatiotason mittaamiseen, on tulevaisuudessa oleellista saada erotettua lakkaasin katalysoima sekä normaalista hapettumisesta aiheutuva demetylaatio, sekä hapettumisesta aiheutuva signaalia häiritsevä karbonyyliryhmien muodostuminen ligniinimolekyylisiin, jolloin lakkaasin todellinen aktiivisuus pystyttäisiin määrittämään nykyistä luotettavammin. Myös Purpald-menetelmään liittyen tutkittiin voiko tuloksia vääristää ligniini-lakkaasiliuoksessa syntyneen metanolin mahdollinen haihtuminen kokeiden aikana, mutta tällaisesta ei löytynyt viitteitä.

Metgenin toiminnan ytimessä on prosessien kehitys tässäkin opinnäytetyössä käytettyjen muuttujien avulla. Saatujen tietojen perusteella on entsyymien toimintaa mahdollista ohjata haluttuun suuntaan. Yhtenä ongelmana on havaittu mono- ja dimeeriradikaalien aiheuttamat re- ja depolymerisaatioreaktiot. Vaikka laboratoriomittakaavassa hallitun ilmastuksen ja suodatuksen toteuttaminen oli mahdotonta, on bioreaktoreissa mahdollista optimoida liuenneen hapen määrä ligniiniliuoksessa. Lisäksi jatkuvatoimisella suodatuksella voidaan kyetä poistamaan pienet aktivoituneet fraktiot ennen kuin uudelleenpolymerisaatiota ehtii tapahtua. Kuten tässä opinnäytetyössä on tuotu esille, on eri kokoisilla ligniinifraktioilla erilaisia käyttösovelluksia. Mikäli pienimmät aktivoituneet fraktiot pystytään erottamaan liuoksesta, on niillä merkittävä kaupallinen potentiaali olleensa suuria fraktioita arvokkaampia. Muokatun ligniinin yksi mielenkiintoisimmista käyttökohteista on fenolisten yhdisteiden korvaaminen sidosaineissa. Sidosaaineiden valmistus vaatii ligniinin aktivoinnin lisäämällä reaktiivisia ryhmiä molekyylisiin, jotka mahdollistavat sidosten syntymisen moniin eri molekyyliin. Reaktion ohjaaminen demetylaation ja aktivoinnin suuntaan esimerkiksi pH:ta nostamalla ja entsyymien annostusta sekä liuenneen hapen määrää säätelemällä mahdollistaa entistä tehokkaamman ja hallitun prosessin.

8 LÄHDELUETTELO

- Anthon, G.E., Barrett, D.M., 2004. Comparison of Three Colorimetric Reagents in the Determination of Methanol with Alcohol Oxidase. Application to the Assay of Pectin Methyl-esterase. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 3749–3753. <https://doi.org/10.1021/jf035284w>
- Azadi, P., Inderwildi, O.R., Farnood, R., King, D.A., 2013. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 21, 506–523. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.12.022>
- Baurhoo, B., 2008. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals—A review. *Anim.Feed Sci.Technol.* 144, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.10.016>
- Berlin, A., Balakshin, M., 2014. Industrial Lignins: Analysis, Properties, and Applications, in: Gupta, V.K., Tuohy, M.G., Kubicek, C.P., Saddler, J., Xu, F. (Eds.), *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Elsevier, Amsterdam, pp. 315–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00018-8>
- Biorefineries—Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions, 2007. *Chemistry International -- Newsmagazine for IUPAC* 29. <https://doi.org/10.1515/ci.2007.29.3.25a>
- Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., Isac-García, J., Martín-Martínez, F.J., 2015. *Lignin and Lignans As Renewable Raw Materials: Chemistry, Technology and Applications*. John Wiley & Sons, Incorporated, New York.
- Chakar, F.S., Ragauskas, A.J., 2004. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops & Products* 20, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.016>
- ChemicalBook, 2017. Syringaldehyde.
- Christopher, L.P., Yao, B., Ji, Y., 2014. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. *Frontiers in Energy Research* 2, 12.
- Ciolacu, D., 2011. New cellulose–lignin hydrogels and their application in controlled release of polyphenols. *Materials Science & Engineering C*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.11.018>
- Desai, S.S., 2011. Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* 3, 98–124. <https://doi.org/10.3923/ajbkr.2011.98.124>
- Donmez Cavdar, A., 2008. Some of the properties of oriented strandboard manufactured using kraft lignin phenolic resin. *Journal of Materials Processing Tech.* 202, 559–563. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.10.039>
- Esteves da Costa, C.A., 2017. *Vanillin and Syringaldehyde from Side Streams of Pulp and Paper Industries and Biorefineries*. University of Porto.
- Fondriest Environmental, I., 2013. Dissolved Oxygen.
- Forss, K.G., Fuhrmann, A.G.M., Toroi, M., 1988. Procedure for manufacturing lignocellulosic material products.
- García, M.C., 1996. Use of Kraft Pine Lignin in Controlled-Release Fertilizer Formulations. *Ind Eng Chem Res* 35, 245–249. <https://doi.org/10.1021/ie950056f>
- GE Healthcare Life Sciences, 2017. *Size Exclusion Chromatography - Principles And Methods*. GE Healthcare Life Sciences.
- Goldman Valdes, W.M., 2019. Valorization of pine kraft lignin by fractionation and partial depolymerization 29.
- Gosselink, R.J.A., 2011. Lignin as a renewable aromatic resource for the chemical industry.
- Hämäläinen, V., Grönroos, T., Suonpää, A., Heikkilä, M.W., Romein, B., Ihalainen, P., Malandra, S., Birikh, K.R., 2018. *Enzymatic Processes to Unlock the Lignin*

- Value. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 6, 20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00020>
- Hatakeyama, H., 2005. Thermal and mechanical properties of polyurethane-based geocomposites derived from lignin and molasses. *Composites Part A* 36, 698–704. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2004.03.022>
- Holladay, J.E., White, J.F., Bozell, J.J., Johnson, D., 2007. Top Value-Added Chemicals from Biomass - Volume II—Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. United States. <https://doi.org/10.2172/921839>
- Huang, J., Fu, S., Gan, L., 2019. *Lignin Chemistry And Applications*. Elsevier.
- Huovinen, T., 2017. Suunnatun evoluution saavutuksia. *Tieteessä tapahtuu* 35, 29–33.
- Jha, N., 2015. *Enzyme Technology: Application and Commercial Production of Enzymes*. Biology Discussion.
- Julien A. Jendral, Yulia B. Monakhova, Dirk W. Lachenmeier, 2011. Formaldehyde in Alcoholic Beverages: Large Chemical Survey Using Purpald Screening Followed by Chromotropic Acid Spectrophotometry with Multivariate Curve Resolution. *International journal of analytical chemistry* 2011, 797604–11. <https://doi.org/10.1155/2011/797604>
- Kalami, S., 2018. Comparative analysis of different lignins as phenol replacement in phenolic adhesive formulations. *Industrial Crops & Products* 125, 520–528. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.037>
- Katoh, S., Horiuchi, J., Yoshida, F., 2015. *Biochemical Engineering : A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists (2nd Edition)*. John Wiley & Sons, Incorporated, Somerset.
- Laus, R., 2010. Adsorption and desorption of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions using chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate as the adsorbent. *J.Hazard.Mater.* 183, 233–241. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.016>
- Li, C.Y., 2011. Preparation and Test of Polyurethane Foam Composites with Alkali Lignin/Renewable PUF. *Advanced Materials Research* 150, 1167–1170. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.150-151.1167>
- Lumadue, M.R., 2012. Lignin as both fuel and fusing binder in briquetted anthracite fines for foundry coke substitute. *Fuel* 97, 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.02.061>
- Mate, D.M., Alcalde, M., 2016. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial biotechnology* 10, 1457–1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- Microbial Applications : Recent Advancements and Future Developments*, 2016. . De Gruyter, Inc., Berlin/Boston.
- Myriam, A.A., 2018. Conversion of Lignin to Heat and Power, Chemicals or Fuels into the Transition Energy Strategy, in: *Lignin*. IntechOpen, Rijeka, p. Ch. 6. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71211>
- Naseem, A., Tabasum, S., Zia, K.M., Zuber, M., Ali, M., Noreen, A., 2016. Lignin-derivatives based polymers, blends and composites: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 93, 296–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.030>
- OpenStax [WWW Document], 2017. . OpenStax - Enzymes. URL https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@10.120:MnC6GuJi@7/Enzymes
- Orbis Research, 2017. *Lignin Products Global Market Size, Sales Data 2017-2022 & Applications in Animal Feed Industry*.
- Patel, B., 2014. *Commercial applications of enzymes*.
- Pizzi, A., 1994. *Advanced wood adhesives technology*.
- Polymer Properties Database [WWW Document]*, 2015. . Polymer Properties Database. URL <http://polymerdatabase.com/polymer%20classes/Lignin%20type.html> (accessed 1.6.20).

- Robinson, P.K., 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry* 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Schoenherr, S., 2018. Lignin Degradation Processes and the Purification of Valuable Products, in: Mehrdad Ebrahimi (Ed.), *Lignin*. IntechOpen, Rijeka, p. Ch. 2. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71210>
- Schutyser, W., Kruger, J.S., Robinson, A.M., Katahira, R., Brandner, D.G., Cleveland, N.S., Mittal, A., Peterson, D.J., Meilan, R., Román-Leshkov, Y., Beckham, G.T., 2018. Revisiting alkaline aerobic lignin oxidation. *Green Chem.* 20, 3828–3844. <https://doi.org/10.1039/C8GC00502H>
- Terrón, M.C., López-Fernández, M., Carbajo, J.M., Junca, H., Téllez, A., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., González, T., González, A.E., 2004. Tannic acid interferes with the commonly used laccase-detection assay based on ABTS as the substrate. *Biochimie* 86, 519–522. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.07.013>
- The Essential Chemistry Industry, 2013. *The Essential Chemical Industry*.
- Tieteen termipankki, 2014. *Tieteen Termipankki - amfiifilinen*.
- Toppr, 2018. *Processes of Recombinant DNA Technology*. Toppr-guides.
- Ugartondo, V., 2008. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresour. Technol.* 99, 6683–6687. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.038>
- Venkatesagowda, B., 2018. Enzymatic Kraft lignin demethylation and fungal O-demethylases like vanillate-O-demethylase and syringate O-demethylase catalyzed catechol-Fe³⁺ complexation method. *Journal of Microbiological Methods* 152, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.07.021>
- Vinardell, M.P., 2008. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crops & Products* 27, 220–223. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.07.011>
- Vo, K., *Chemistry LibreTexts Library*, 2018. *Spectrophotometry*.
- Wan, Y.-Y., Lu, R., Xiao, L., Du, Y.-M., Miyakoshi, T., Chen, C.-L., Knill, C.J., Kennedy, J.F., 2010. Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *International Journal of Biological Macromolecules* 47, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.07.003>
- Wang, K., Xu, F., Sun, R., 2010. Molecular Characteristics of Kraft-AQ Pulping Lignin Fractionated by Sequential Organic Solvent Extraction. *International journal of molecular sciences* 11, 2988–3001. <https://doi.org/10.3390/ijms11082988>
- Wikimedia Commons, 2016. *Wikimedia Commons [WWW Document]*. Wikimedia Commons. URL https://en.wikipedia.org/wiki/File:Simplified_UV-vis_diagram.png (accessed 12.30.19).
- Wikimedia Commons, 2009. *Wikimedia Commons [WWW Document]*. Wikimedia Commons. URL https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bioreactor_principle.svg (accessed 12.30.19).
- Wikimedia Commons, 2007. *Wikimedia Commons [WWW Document]*. Wikimedia Commons. URL <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Syringaldehyde.png> (accessed 12.30.19).
- Xu, T., 2007. Modification of nanostructured materials for biomedical applications. *Materials Science & Engineering C* 27, 579–594. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.029>
- Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerius, A.L., Weckhuysen, B.M., 2010. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chemical reviews* 110, 3552–3599. <https://doi.org/10.1021/cr900354u>
- Zhuohua Sun, Bálint Fridrich, Alessandra de Santi, Saravanakumar Elangovan, Katalin Barta, 2018. Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform Chemicals. *Chemical Reviews* 118, 614–678. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00588>

Zobiolo, L., dos Santos, W., Bonini, E., Ferrarese-Filho, O., Kremer, R., Júnior, R., Constantin, J., 2012. Lignin: From Nature to Industry. pp. 419–435