

KARELIA-AMMATTIKORKEAKOULU
Energia- ja ympäristötekniikan koulutus

Perttu Tarnanen
Jesse Seila

BIOETANOLIA SELLUTEHTAAN KUITUSAVESTA

Opinnäytetyö
Huhtikuu 2021



OPINNÄYTETYÖ
Huhtikuu 2021
Energia- ja ympäristötekniikan
koulutus

Karjalankatu 3
80200 JOENSUU
+358 13 260 600 (vaihde)

Tekijät

Perttu Tarnanen ja Jesse Seila

Nimeke

Bioetanolin sellutehtaan kuitusavesta

Toimeksiantaja

Stora Enso Oyj

Tiivistelmä

Opinnäytetyössä tutkittiin Stora Enson Varkauden tehtaan jätevedenpuhdistamolta alitteena tulevan kuitusaven toimivuutta bioetanolin raaka-aineena. Kyseistä materiaalia on Stora Enson mukaan poltettu aiemmin kuorikattilassa sekä testattu maanrakennus- ja täyteaineena. Kyseistä materiaalia syntyy vuodessa noin 20 000 tonnia. Näin ollen suurelle määrälle "jätettä" olisi järkevää keksiä parempia hyödyntämismahdollisuuksia.

Materiaalia käsiteltiin happoesikäsittelyllä ja entsyymaattisella hydrolyysillä. Entsyymeinä käytettiin *Trichoderma sp.*- ja *Aspergillus sp.*-sellulaasientsyymejä. Kokeita tehtiin yhteensä 13 ja kaksi parhaiten onnistunutta koetta toistettiin. Kokeet suoritettiin Karelia-amk:n laboratoriotiloissa alkuvuodesta 2021.

Happoesikäsittelyllä ei ollut merkittävää vaikutusta etanolin saantoon kyseisellä materiaalilla. Entsyymien huomattiin parantavan etanolin saantoa, mutta muodostuneet määrät olivat silti hyvin pieniä.

Tehtyjen kokeiden perusteella etanolin tuotannon arvioitiin olevan taloudellisesti kannattamatonta johtuen entsyymien korkeista hinnoista.

Kieli

suomi

Sivuja 72

Liitteet 2

Liitesivumäärä 3

Asiasanat

bioetanolin, entsyymit, hydrolyysi, sellulaasit, tislauk, suodatus



THESIS
April 2021
Degree Programme in Energy and
Environmental Engineering

Karjalankatu 3
80200 JOENSUU
FINLAND
+ 358 13 260 600 (switchboard)

Authors

Perttu Tarnanen and Jesse Seila

Title

Bioethanol from the Pulp Mill Sludge

Commissioned by

Stora Enso Ltd

Abstract

The aim of this thesis was to investigate the functionality of pulp mill sludge coming from Stora Enso's Varkaus mill wastewater treatment plant as a raw material for bioethanol. According to Stora Enso, this material has previously been used as energy by burning it in a bark boiler, and it has also been tested as a filler material for soil. Approximately 20,000 tons of this material is generated annually. Therefore, for a large amount of "waste" as this, it would make sense to come up with better recovery options.

The raw material was treated with acid pre-treatment and enzymatic hydrolysis. Enzymes used in the experiments were *Trichoderma* sp. - and *Aspergillus* sp. - cellulase enzymes. A total of 13 experiments were performed and the two most successful experiments were repeated. The experiments were performed in the laboratory facilities of Karelia University of Applied Sciences in early 2021.

From the results of the experiments, the conclusion was that the acid pre-treatment did not have a significant effect on the ethanol yield of the material in question. Enzymes were found to improve ethanol yield, but the amounts that formed were still very small.

Based on the experiments performed, ethanol production could be found to be economically unprofitable due to high enzyme prices.

Language

Finnish

Pages 72

Appendices 2

Pages of Appendices 3

Keywords

ethanol, enzymes, hydrolysis, cellulases, distillation, filtration

Sisältö

1	Johdanto	6
1.1	Taustaa	6
1.2	Toimeksiantaja	6
2	Opinnäytetyön lähtökohdat ja tietoperusta	6
2.1	Bioetanol.....	7
2.2	Bioetanolin valmistus puupohjaisesta raaka-aineesta	8
2.3	Sellulaasientsyymit	9
2.4	Kuitusavi raaka-aineena	10
2.5	Refluksointi.....	12
2.6	Imusuodatus.....	13
2.7	Fermentointi.....	14
2.8	Tislaus	15
3	Opinnäytetyön tarkoitus ja menetelmät	16
3.1	Opinnäytetyön tarkoitus	16
3.2	Työvaiheet ja käytetyt menetelmät	16
3.3	Kokeissa käytetty välineistö	17
4	Koejärjestelyt.....	18
4.1	Koe 1: Trichoderma Sp. 0,25 g, 20 til.-% happoesikäsittely	18
4.2	Koe 2: Aspergillus Sp. 20 ml, 20 til.-% happoesikäsittely	21
4.3	Koe 3: Trichoderma Sp. 0,25 g, 20 til.-% happoesikäsittely	24
4.4	Koe 4: Aspergillus Sp. 20 ml, 20 til.-% happoesikäsittely	26
4.5	Koe 5: Trichoderma Sp. 0,25 g, 30 til.-% happoesikäsittely	28
4.6	Koe 6: Aspergillus Sp. 40 ml, 30 til.-% happoesikäsittely	32
4.7	Koe 7: Trichoderma Sp. 0,25 g, 30 til.-% happoesikäsittely	35
4.8	Koe 8: Aspergillus Sp. 40 ml, 30 til.-% happoesikäsittely	38
4.9	Koe 9: Trichoderma Sp. 0,25 g, 30 til.-% happoesikäsittely 24 h	40
4.10	Koe 10: Aspergillus Sp. 40 ml, 30 til.-% happoesikäsittely 24 h	43
4.11	Koe 11: Trichoderma Sp. 0,25 g ilman esikäsittelyä	46
4.12	Koe 12: Aspergillus Sp. 40 ml ilman esikäsittelyä.....	47
4.13	Koe 13: Verrokkikoe, ilman entsyymiä ja esikäsittelyä	49
4.14	Koe 14: Varmistuskoe kokeesta 1	51
4.15	Koe 15: Varmistuskoe kokeesta 12	54
5	Opinnäytetyön tulokset	56
5.1	Yleistä	56
5.2	Kokeiden tulokset.....	57
6	Tulosten tarkastelu	62
6.1	Esikäsittelyn toimivuus.....	62
6.2	Entsyymien toimivuus	63
6.3	Sokereiden muodostus.....	63
6.4	Entsyymien määrän vaikutus.....	63
6.5	Tulosten vertailua	64
7	Pohdinta.....	67
7.1	Teoreettinen etanolin saanto.....	67
7.2	Taloudellista pohdintaa	67
7.3	Kokeiden epävarmuustekijöitä.....	69
7.4	Valmistuksen ongelmat ja jatkotutkimus	70
	Lähteet	71

Liitteet

Liite 1

Liite 2

Kuitusaven testausseleoste Eurofins Ahma Oy

Etanolitaulukko

1 Johdanto

1.1 Taustaa

Opinnäytetyössä tutkittiin Varkauden Stora Enson sellutehtaan jätevedenpuhdistamolta alitteena tulevan kuitusaven soveltuvuutta bioetanolin raaka-aineeksi. Toimeksiantajan mielenkiinto aiheeseen heräsi keväällä 2020 Karelia Amk:n järjestämän Uusiutuva energiat liikenteessä - kurssin puitteissa tehdyistä laboratorikokeista, joista saatiin positiivisia tuloksista. Näin ollen aiheesta haluttiin tehtävän opinnäytetyö.

1.2 Toimeksiantaja

Opinnäytetyön toimeksiantajana toimi Varkauden Stora Enson tehdas, joka valmistaa aaltopahvin raaka-ainetta. Stora Enso on maailmanlaajuinen toimittaja pakkaus-, biomateriaali-, puutuote- ja paperiteollisuuden uusiutuvien tuotteiden osalta. Stora Enson tehtaita on yli 30 maassa, ja se työllistää noin 25 000 henkilöä. Stora Enso valmistaa paljon erilaisia tuotteita ja pyrkii nyt ja tulevaisuudessa korvaamaan fossiilisia materiaaleja uusiutuvilla materiaaleilla eri käyttökohteissa. (Stora Enso 2020.)

2 Opinnäytetyön lähtökohdat ja tietoperusta

Bioetanolin valmistusta puupohjaisesta raaka-aineesta on tutkittu jonkin verran, mutta asiasta tehdyt tutkimukset ovat usein salaisia tai niistä tehdyt raportit ovat maksumuurin takana. Näin ollen taustatiedon kerääminen oli haastavaa. Lisäksi kokeissa käyttämämme raaka-aine eroaa muista puupohjaisista raaka-aineista oleellisesti sen läpi käymän prosessin perusteella. Kyseisestä raaka-aineesta ei

ole aiemmin tehty tutkimuksia liittyen bioetanolin valmistukseen, pois lukien Uusiutuva energia liikenteessä 2020 - kurssilla tehdyt kokeet.

2.1 Bioetanol

Bioetanol on etanolia, jota valmistetaan eloperäisistä aineksista. Bioetanolia käytetään polttoaineena pääasiassa liikenteessä. Teoriassa etanoli sopii polttoaineeksi sellaisenaan, mutta yleensä sitä käytetään seospolttoaineena bensiiniseassa. Esimerkiksi E10 95- bensiini sisältää enintään 10 % etanolia. Vuonna 2020 kansallinen biopolttoaineiden jakeluvuorituksen mukaan biopolttoaineiden osuuden tuli olla 20 % toimitetusta moottoribensiinin, dieselin ja biopolttoaineiden energiasisällön kokonaismäärästä (Motiva 2021). Bioetanolilla pyritään korvaamaan fossiilisia polttoaineita ja näin ollen vähentämään päästöjä mm. liikenteen osalta. (Weymarn, 2007 7–9.)

Bioetanol sisältää bensiinin verrattuna vähemmän energiaa litraa kohden, mikä on seurausta sen pienemmästä lämpöarvosta. Etanolin suurempi tiheys kuitenkin kaventaa eroa hieman. Bensiinin tiheys on noin 0,75 kg/l ja lämpöarvo noin 43,5 MJ/kg. Etanolilla taas tiheys on noin 0,79 kg/l ja lämpöarvo noin 26,9 MJ/kg. (Taulukot 2021.)

Biopolttoaineet voidaan luokitella sukupolvittain. Ensimmäisen sukupolven biopolttoaineet valmistetaan tärkkelys ja sokeripitoisista kasveista, kuten maissista ja sokeriruokoista. Nämä kasvit toimivat myös eläinten sekä ihmisten ravintona ja on täten rajoittavana tekijänä polttoaineen tuotannossa. Ilmasto ei myöskään ole kaikkialla, kuten pohjoisessa, suotuisa näiden kasvien viljelyyn. (Nevalainen 2012, 3.)

Toisen sukupolven biopolttoaineet vuorostaan muodostuvat kasvi- ja puupohjaisista selluloosista ja jätteistä. Näiden käyttö on kestävämpää ja ne eivät kilpaile ruuantuotannon kanssa toisin kuin ensimmäisen sukupolven biopolttoaineet. Toisen sukupolven biopolttoaineet valmistetaan kierrätettävistä materiaaleista, joten

ne eivät myöskään vaadi maantieteellisesti tiettyjä olosuhteita, vaan ovat saatavilla ympäri maailmaa. (Motiva 2021.)

Kolmannen sukupolven biopolttoaineet ovat tutkimuksen ja kehittämisen alla olevia uusia polttoaineita, mutta niitä ei vielä tuoteta kaupallisesti. Näitä valmistetaan uusista raaka-aineista, kuten esimerkiksi levistä (Autoalan tiedotuskeskus 2021).

2.2 Bioetanolin valmistus puupohjaisesta raaka-aineesta

Puun rakenne koostuu pääosin selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä eri suhteissa riippuen puulajista. Bioetanolin valmistaminen puuperäisestä raaka-aineesta poikkeaa perinteisestä etanolin tuotannosta ainoastaan sen vaatiman esikäsittelyn verran.

Puuraaka-aineella on sokeriruokoon verrattuna haastavampi rakenne biopolttoainetta valmistettaessa. Sen sokerit ovat ketjutettuna toisiinsa, ja ne täytyy saada pilkkottua yksittäisiksi sokereiksi. Näiden sokereiden pilkkomisen lisäksi se täytyy myös saada pehmitettyä, jotta sokereiden pilkkominen onnistuu. Puun ligniini toimii sidosaineena, joka pitää selluloosan rakenteen kasassa ja toimii myös luontaisena puolustusmekanismina muun muassa lahottajasieniä vastaan. Etanolia valmistettaessa puussa oleva ligniini täytyy saada pehmitettyä ja erotettua selluloosasta, jotta sellulaasi-entsyymit pääsevät tunkeutumaan selluloosan rakenteeseen ja pilkkomaan sen käymiskelpoiseksi glukoosiksi. (Nevalainen 2012, 3–4.)

Ligniinin pehmentämiseen on olemassa erilaisia tekniikoita, joista yleisimmät käytössä olevat tekniikat ovat happo-, emäs- ja liuotinesikäsittely, joissa puuta käsitellään kyseessä olevalla nesteellä, sekä höyryräjäytys, jossa nimensä mukaisesti puuta esikäsitellään kuumalla höyryllä. (Suokko 2010, 13–14.) Tässä opinnäytetyössä kuitenkin tarkastellaan happoesikäsittelyllä valmistettua etanolia ja entsyymattista hydrolyysiä eli tapahtumaa, jossa selluloosien pilkkominen sokereiksi tapahtuu entsyymien toimesta.

2.3 Sellulaasientsyymit

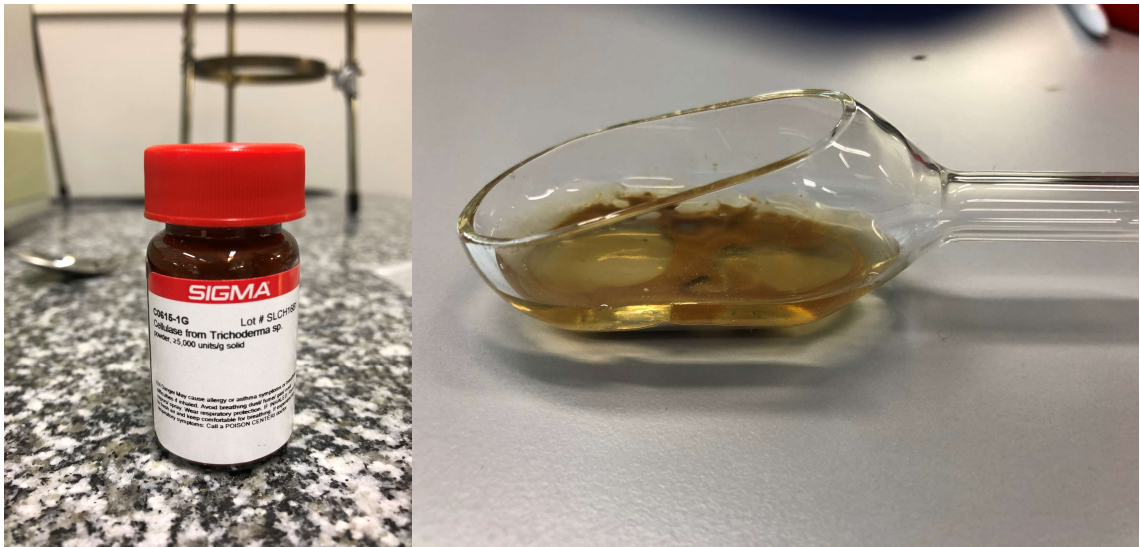
Sellulaasientsyymit ovat entsyymejä, jotka pystyvät hajottamaan puussa olevia selluloosia. Sellulaasientsyymeillä on suuri merkitys tuottaessa bioetanolia puupohjaisesta raaka-aineesta.

Entsyymaattisen hydrolyysin seurauksesta puun selluloosat pilkkoutuvat monosakkarideiksi, eli yksittäisiksi sokereiksi. Hemiselluloosa eroaa selluloosasta siten, että siinä on useita monosakkaridi ketjuja ja ne koostuvat eri sokereista, kuten mannoosista, ksyloosista, arabinoosista, galaktoosista ja glukoosista. (Peda.net 2021.) Selluloosa vuorostaan koostuu vain glukoosista. Esikäsitellyn jälkeen entsyymit pilkkovat sekä hemiselluloosan monosakkaridi ketjun ja selluloosan glukoosit yksittäisiksi monosakkarideiksi. Lopputuotteena syntyy siis halutun glukoosin lisäksi myös muita monosakkarideja, jotka voivat vaikuttaa etanolin saantiin. (Nevalainen 2012, 4–5.)

Selluloosat saadaan entsyymaattisen hydrolyysin seurauksena pilkottua sokereiksi rauhallisesti, käyttämättä väkeviä happoja, korkeita lämpötiloja tai paineita, mutta prosessi on aikaa vievä ja kallis entsyymien korkean hinnan vuoksi (Nevalainen 2012, 5).

Erilaisia sellulaasientsyymejä on olemassa lukemattomia erilaisia. Opinnäytetyön kokeisiin valitsimme testattavaksi kaksi erilaista sellulaasientsyymiä, *Trichoderma* Sp.:n ja *Aspergillus* Sp.:n. Kemianteollisuuden tuotteita valmistavan ja myyvän yrityksen Sigma Aldrichin mukaan nämä entsyymit sopivat hyvin bioetanolin valmistukseen. (Sigma Aldrich 2020.)

Kokeissa käytetyistä entsyymeistä *Trichoderma* sp. oli jauheena ja *Aspergillus* sp. nesteenä. *Trichoderma* sp.:n pakkauskoko oli 1 g ja *Aspergillus* sp.:n 250 ml. Kokeissa käytettiin 2 g. *Trichoderma* sp.:tä ja 250 ml *Aspergillus* sp.:tä. Entsyymien voimakkuudet olivat *Trichoderma* sp.:n osalta $\geq 5,000$ units/g ja *Aspergillus* sp.:n osalta ≥ 1000 units/g. *Trichoderma* sp. laimennettiin ja sekoitettiin veteen annostelun helpottamiseksi (kuva 1). *Aspergillus* sp. oli jo valmiiksi nesteenä, joten sitä ei tarvinnut sekoittaa tai laimentaa.

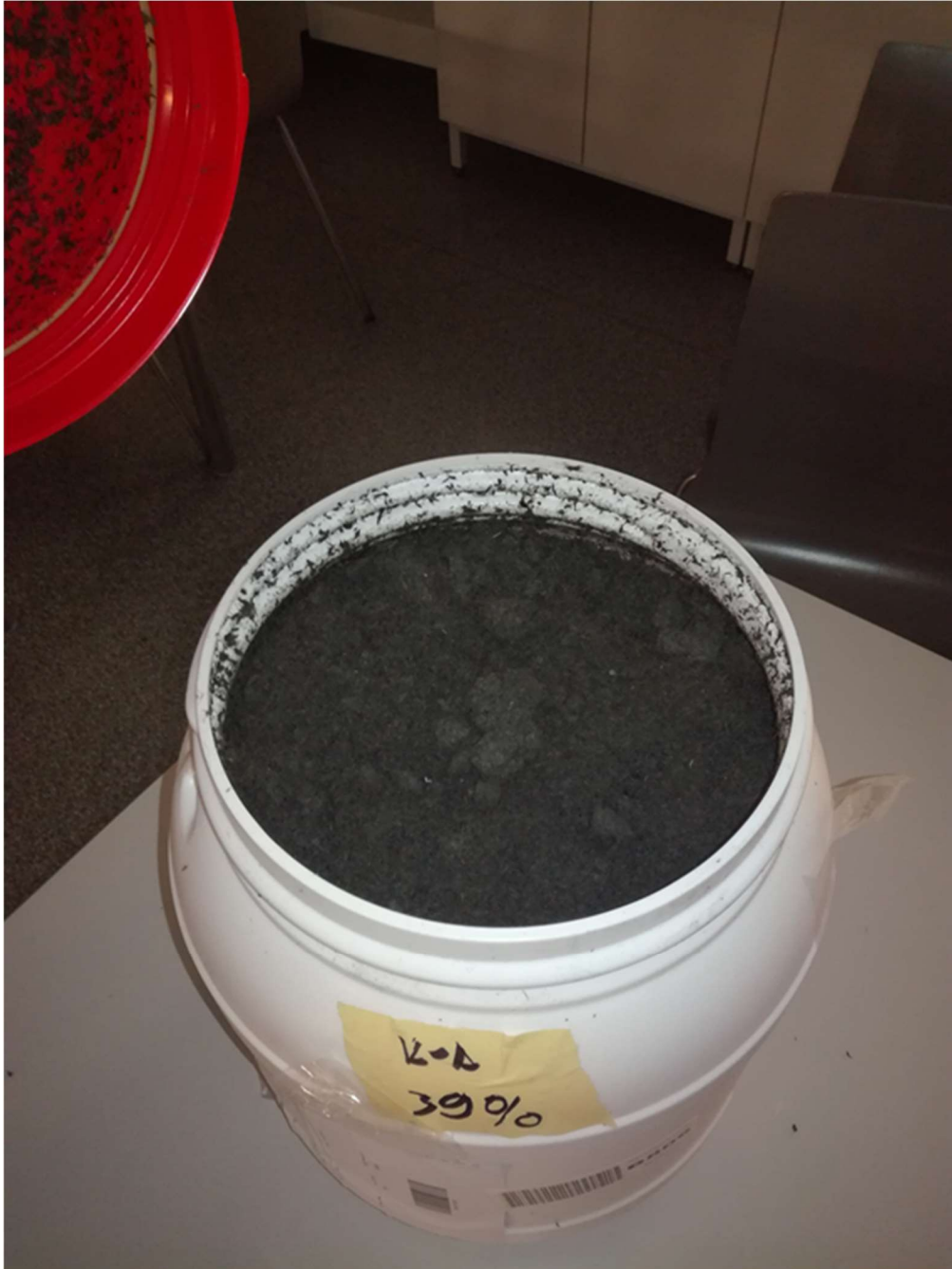


Kuva 1. Trichoderma sp. entsyymi veteen liuotettuna (Kuva: Jesse Seila).

2.4 Kuitusavi raaka-aineena

Kuitusavi on puuperäinen raaka-aine, jota syntyy sellun valmistuksen yhteydessä. Materiaali on Stora Enson Varkauden tehtaan jätevedenpuhdistamolta tulevaa alitetta, jolle etsitään uusia hyödyntämiskohteita. Kyseistä materiaalia on Stora Enson mukaan poltettu aiemmin kuorikattilassa sekä testattu maanrakennus- ja täyteaineena. Kyseistä materiaalia syntyy vuodessa noin 20 000 tonnia (Tiainen 2020, 1). Näin ollen suurelle määrälle ”jätettä” olisi järkevää keksiä parempia hyödyntämismahdollisuuksia. (Pakarinen 2020.)

Toimeksiantajan teettämien laboratoriomittausten perusteella raaka-aine sisältää pääasiassa rikkiä, typpeä ja fosforia sekä lukuisia muita alkuaineita (liite 1). Raaka-aineessa oleva rikin suuri määrä voi vaikuttaa haitallisesti käymisprosessiin. Rikkiyhdisteitä ja sulfiitteja käytetään elintarvikkeissa säilöntäaineena ja näin ollen se voi hidastaa käymisreaktiota (Ruokavirasto 2021).

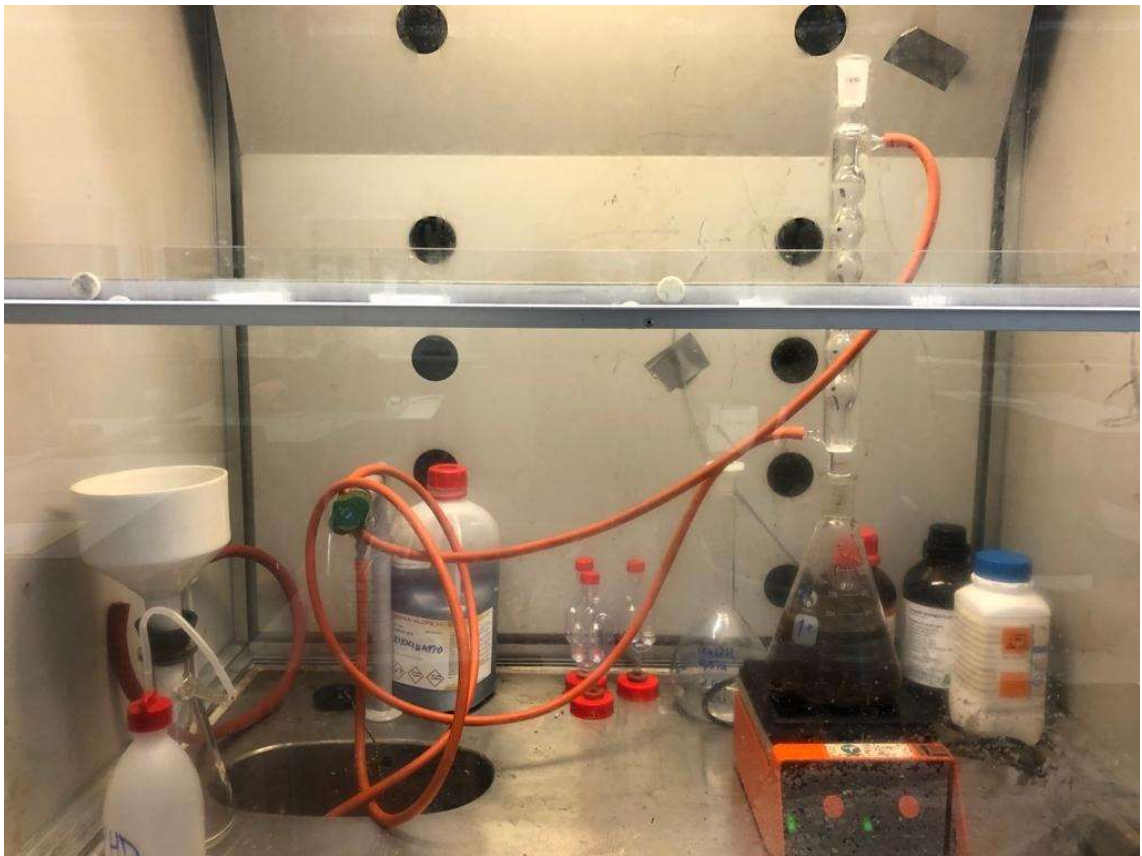


Kuva 2. Kuitusavi (Kuva: Perttu Tarnanen).

Raaka-aine käy tehtaalla matkansa aikana läpi väkeviä kemikaaleja ja muun muassa sulfaattimenetelmän, jossa ligniini poistetaan puusta keittokemikaalien avulla voimakkaissa emäksisissä olosuhteissa. Sulfaattikeitossa keittokemikaalina käytetään natriumhydroksidin ja natriumsulfidin seosta, jota myös kutsutaan valkolipeäksi. (Knowpulp 2021.) Emme voi olla siis varmoja miten paljon raaka-aineessa on enää jäljellä esimerkiksi ligniiniä, mutta oletimme että se täytyi silti esikäsitellä ja erottaa selluloosasta.

2.5 Refluksointi

Refluksoinnissa reaktioseosta keitetään palautusjäähdyttimellä varustetussa kolvissa. Refluksoinnilla voidaan säädellä reaktion nopeutta lämpötilan avulla. Lämpötilan nostolla pystytään nopeuttamaan hidasta reaktiota. Palautusjäähdyttimen tarkoitus on tiivistää keittämisestä syntyvät höyryt ja palauttaa ne takaisin keitinastiaan. Sekoittamisella on tärkeä rooli refluksoinnissa, se edistää reaktion käynnistymistä ja estää pohjaan palamisen. Tämän takia seosta sekoitetaan magneettisekoittimella kuumennuksen ajan. (Virtuaali.tkk 2005.)



Kuva 3. Refluksointilaitteisto vetokaapissa (Kuva: Jesse Seila).

2.6 Imusuodatus

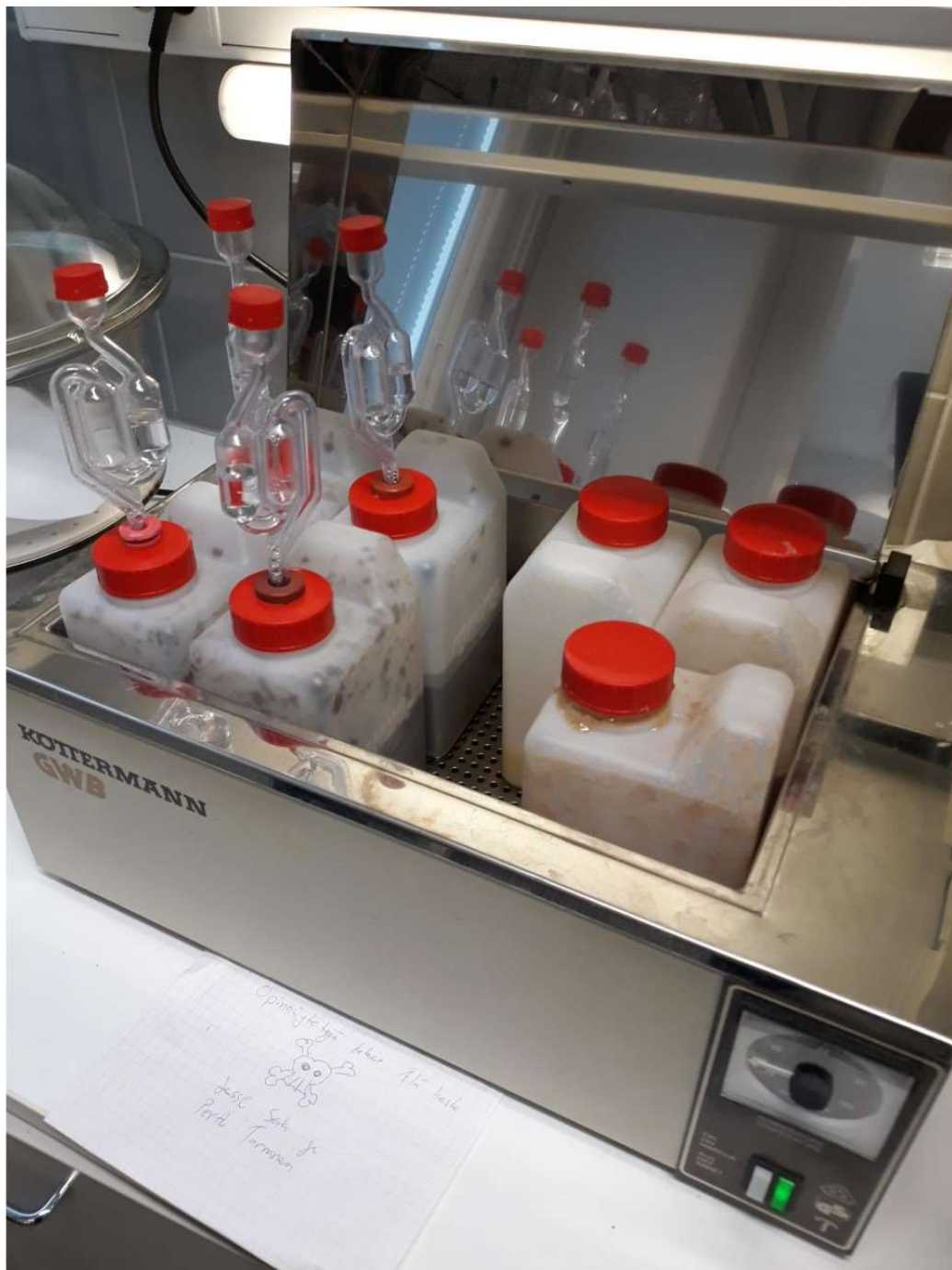
Imusuodatuksessa kiinteä aine erotetaan nesteestä alipaineella tehostaen. Imusuodatuslaitteisto koostuu imupullosta, Büchner-suppilosta, kumitiivisteestä, suodatinpaperista ja imuletkusta (kuva 4). Suppilo kiinnitetään imupulloon kumitiivisteellä tiivistäen. Imupulloon kiinnitetään imuletku, jonka toinen pää kiinnitetään vesihanaan tulevaan liitokseen. Vettä juoksuttamalla saadaan aikaiseksi haluttu alipaine, joka nopeuttaa suodatusta merkittävästi. Suppiloon laitetaan suodatinpaperi, jonka läpi aines suodatetaan. Kiinteäaine jää suodattimeen ja neste päätyy imupulloon. (Virtuaali.tkk 2005.)



Kuva 4. Imusuodatuslaitteisto (Kuva: Jesse Seila).

2.7 Fermentointi

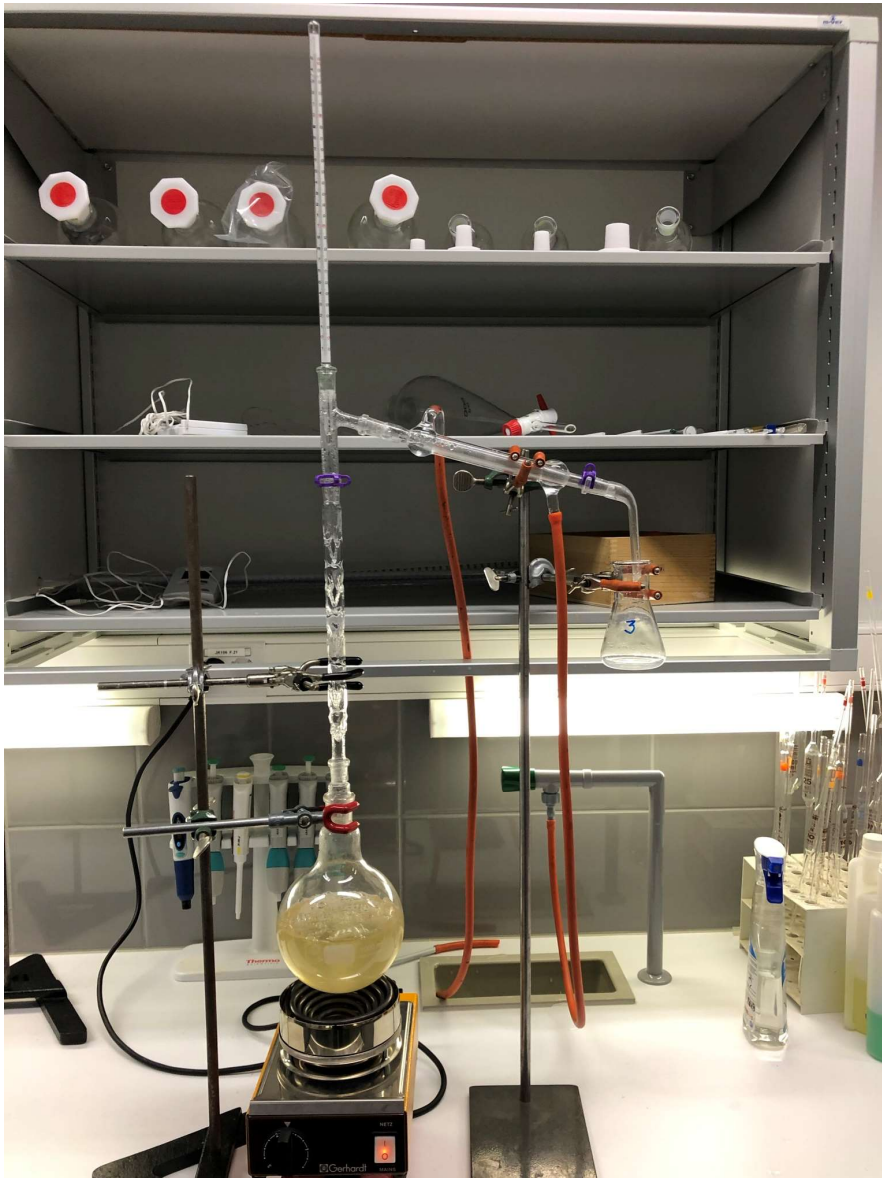
Fermentoinnissa eli käymisreaktiossa hiiva käyttää ravinnokseen entsyymaattisissa hydrolyysissa syntyneitä sokereita ja hiivan aineenvaihdunnan seurauksena syntyy etanolia ja hiilidioksidia (Tiede 2002). Tämä tapahtuu samanaikaisesti, kun entsyymit pilkkovat raaka-aineesta sokereita, niin hiiva käyttää niitä ravinnokseen. Kun raaka-aineesta on käytetty kaikki saatavilla oleva sokeri niin käyminen loppuu.



Kuva 5. Käymisastioita vesihautteessa (Kuva: Esko Tiainen).

2.8 Tislaus

Tislauksessa pyritään erottamaan kaksi nestettä toisistaan niiden eri kiehumispisteiden vuoksi. Etanoli erottuu tislaamalla vedestä sen matalamman kiehumispisteen ansiosta, joka on 78°C ja vedellä 100°C (Etanolin kansainvälinen kemikaalikortti 2020). Tislauslaitteisto koostuu lämmityslevystä ja sen päälle kiinnitettävästä tislauskolvista. Tislauskolvin pohjalle laitetaan muutamia kiehumakiviä, joilla varmistetaan tasainen kiehuminen ja sen jälkeen lisätään tislattava neste. Kolvista nousee ylöspäin vigreux-kolonne, jota pitkin höyry etenee ja sen huipulla on lämpömittari. Lämpömittarin kohdasta lähtee viistosti alaspäin jäähdytinputki, jossa on vesikierto ja siellä höyry tiivistyy takaisin nesteeksi ja valuu putkea pitkin keräyskolviin, jonne tisle muodostuu. (Turunen 2021.)



Kuva 6. Tislauslaitteisto (Kuva: Jesse Seila).

3 Opinnäytetyön tarkoitus ja menetelmät

Ilmaston lämpenemisen seurauksesta biopolttoaineet ovat nousseet suuresti esille ja ovat olleet ja tulevat olemaan merkittävä tutkimuskohde nyt ja myös tulevaisuudessa. Biopolttoainetta tehdään maailmalla suuria eriä mm. maissista ja sokeriruokosta hyvällä menestyksellä, mutta myös pienemmissä määrin jätteistä ja kierrätetyistä materiaaleista. (Sitra 2021.) Näitä jälkimmäisiä kutsutaan toisen sukupolven biopolttoaineiksi, joihin opinnäytetyössä käyttämämme raaka-aine kuuluu.

3.1 Opinnäytetyön tarkoitus

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia, onko Varkauden Stora Enson tehtaalta tulevaa jätekuitua mahdollista ja taloudellisesti kannattavaa jatkojalostaa bioetanoliksi. Tarkoitus oli testata kuitujäte raaka-ainetta bioetanolin tuotannossa käyttäen eri entsyymeitä ja happopitoisuuksia ja selvittää, millä saadaan paras lopputulos. Opinnäytetyössä käytettiin kahta eri entsyymilajiketta, ja niistä tehtiin useita kokeita entsyymiä kohden. Kokeet olivat muuten samanlaisia, mutta niiden happo- ja entsyymipitoisuudet vaihtelevat.

3.2 Työvaiheet ja käytetyt menetelmät

Kokeet tehtiin Karelia-ammattikorkeakoulun Sirkkalan laboratoriotiloissa. Kokeissa käytetyt menetelmät ja työvaiheet:

1. Happo- ja emäsluoksien valmistaminen.
2. Raaka-aineen esikäsittely kuumassa happoliuoksessa refluksointilaitteiston avulla.
3. Raaka-aineen erotus happoliuoksesta imusuodatuslaitteiston avulla.
4. pH:n neutralisointi emäksellä ja ionivaihdetulla vedellä sekä pH:n mittaaminen.
5. Raaka-aineen siirtäminen käymisastiaan sekä entsyymiin ja veden lisäys.

6. Seuraavana päivänä sokereiden mittaus ja hiivan lisääminen käymisastiaan.
7. Viikon päästä nesteen ja kiinteänaineen erotus imusuodatuslaitteiston avulla.
8. Nesteen tislauk tislauk-laitteistolla ja saadun tisleen etanolipitoisuuden määrittäminen massan perusteella. (liite 2.).
9. Tulosten kirjaaminen.

3.3 Kokeissa käytetty välineistö

Opinnäytetyössä käyttämämme välineistä koostui seuraavista:

1. Kosteusanalysointilaitteisto, Precisa XM 50
2. Tarkkuusvaaka, Metler AJ150
3. Tarkkuusvaaka, Ohaus model: AX324
4. Vaaka, Precisa XB 3200C
5. Infrapunalämpömittari, CRX
6. pH-liuskat
7. pipetit 5 ml ja 10 ml
8. finpipet 5 ml
9. Mittalasi
10. Keitinpullot
11. Verensokerimittari, CareSensN
12. Vesihaude, Köttermann GWB
13. Lämmityslevy magneettisekoittajalla, Framo Geratetechnik M21/1
14. Refluksointilaitteisto
15. Imusuodatuslaitteisto
16. Tislauk-laitteisto

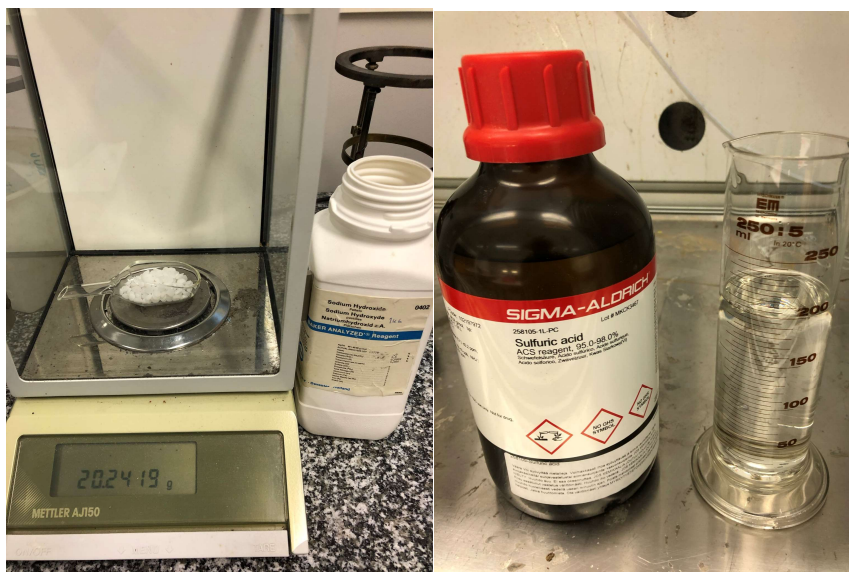
4 Koejärjestelyt

Alla on lueteltuna järjestyksessä kaikki tehdyt laboratorio kokeet. Kohdassa 5 on tarkasteltu tarkemmin tuloksia ja niiden yhteenveto taulukoituna.

4.1 Koe 1: Trichoderma Sp. 0,25 g, 20 til.-% happoesikäsittely

Koe aloitettiin 27.1.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,95 %. Tämän jälkeen raaka-ainetta punnittiin keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 151,85 g ja kuiva-ainetta tästä oli 59,15 g.

Tämän jälkeen tehtiin valmiiksi kokeissa 1–4 tarvittavat rikkihappoliuokset ja natriumhydroksidi emäsluos, joka riitti kaikkiin kokeisiin. Rikkihappoliuos muodostui 400 ml:sta rikkihappoa (95.0–98.0 %) ja 1600 ml:sta ionivaihdettua vettä. Täten rikkihappoliuoksen voimakkuudeksi tuli n. 20 til.-%. Natriumhydroksidiliuokseen laitettiin 20 g natriumhydroksidirakeita ja 1000 ml ionivaihdettua vettä. Natriumhydroksidin moolimassa on n. 40 g/mol. Näin ollen saatiin 1000 ml liuosta, jonka konsentraatio oli 0,5 mol/l.



Kuva 7. Natriumhydroksidin ja rikkihapon mittaaminen (Kuva: Jesse Seila).

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 20 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Lämpötilaa mitattiin välillä infrapunalämpötilamittarilla pullon eri kohdista. Tarkoitus oli nostaa lämpötila noin 100 C°:seen ja pitää sitä määrättyssä lämpötilassa 15 min. Ensimmäisessä kokeessa oltiin varovaisia ja nostettiin lämpötilaa todella varovaisesti kohti 100 C°:tta. Johtuen hitaasta lämpötilan nostosta lämmitettiin seosta yhteensä noin tunnin verran. Hitaalla lämpötilan nostolla ja näin ollen pitkällä lämmitysajalla oli mahdollisesti vaikutusta kokeen lopputulokseen.

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, minkä jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g *Trichoderma sp.* -entsyymiä. Entsyymi oli punnittu aiemmin tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin FinnpiPETillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut tai niitä oli erittäin vähän.



Kuva 8. Entsyymien annostelua käymisastiaan (Kuva: Jesse Seila).

Seuraavana päivänä 28.1.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 20 tunnin jälkeen 5,8 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin noin 2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja astiaa sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 5.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. Ensimmäiseksi imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 600 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 minuuttia. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja lukemasta vähennettiin tyhjän astian massan. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, mikä oli 48,4503 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja näyte punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tisleettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin laske-
tuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tihey-
deksi saatiin 0,9824 g/ml ja toisen näytteen 0,9835 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi
saatiin 0,9830 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan
etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli
n. 9,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 4,6028 g puhdasta etanolia.
Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla,
joka oli 59,15 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konver-
sioasteeksi tuli 7,78 %. Konversioaste kuvaa tuotetun etanolin massan prosent-
tiosuutta sen valmistamiseen käytetyn raaka-aineen kuiva-aineen massasta.

4.2 Koe 2: Aspergillus Sp. 20 ml, 20 til.-% happoesikäsitely

Koe aloitettiin 27.1.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-ai-
neprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,95 %. Tämän jälkeen pun-
nittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi
saatiin vaa'alla 150,47 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,61 g.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 20 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan se-
koitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneet-
tisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon
laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla
sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri koh-
dista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidettiin sitä määrättyssä
lämpötilassa 15 min.



Kuva 9. Lämpötilan mittaaminen kuumasta happoliuksesta (Kuva: Jesse Seila).

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, minkä jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Materiaalin päälle kaadettiin lipeää ja vettä ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 20 millilitraa *Aspergillus sp.* entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli nestemäistä, joten se oli helppo annostella Finnpietillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 28.1.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 20 tunnin jälkeen edelleen "low". Käymisastiaan lisättiin noin

2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 5.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. Ensimmäiseksi imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 550 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 minuuttia. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 6,9431 g.

Johtuen tisleen vähäisestä määrästä tällä kertaa otettiin tisleestä kaksi 5 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näyte tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9799 g/ml ja toisen näytteen 0,9820 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9810 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 11 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 0,7637 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,61 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 1,3 %.

4.3 Koe 3: *Trichoderma Sp.* 0,25 g, 20 til.-% happoesikäsittely

Koe aloitettiin 27.1.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,95 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 153,38 g ja kuiva-ainetta tästä oli 59,74 g.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 20 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidettiin sitä määrättyssä lämpötilassa 30 min.

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, minkä jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g *Trichoderma sp.* entsyymiä. Entsyymi oli punnittu aiemmin tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin Finnpietillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 28.1.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 20 tunnin jälkeen 9,9 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin noin 2

g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 5.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. Ensimmäiseksi imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 600 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.



Kuva 10. Tislauksesta saatu etanolitisle (Kuva: Jesse Seila).

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Kirjattiin saadun tisleen massa ylös, joka oli 24,789 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näytteet tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla

saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9826 g/ml ja toisen näytteen 0,9822 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9824 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 9,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 2,3550 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 59,74 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 3,94 %.

4.4 Koe 4: Aspergillus Sp. 20 ml, 20 til.-% happoesikäsitely

Koe aloitettiin 27.1.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,95 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saimme vaa'alla 154,81 g ja kuiva-ainetta tästä oli 60,30 g.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 20 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidimme sitä määrättyssä lämpötilassa 30 min.

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, minkä jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaih-
dettua vettä sekä 20 ml Aspergillus sp. entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli neste-
mäistä, joten se oli helppo annostella Finnpietillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari
näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 28.1.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustu-
lokseksi saatiin noin 20 tunnin jälkeen edelleen "low". Käymisastiaan lisättiin noin
2 g kuivahiivaa, laitettiin astiaan vesilukko ja sekoitettiin sitä ravistamalla. Käy-
misastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 5.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. En-
simmäiseksi imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin tal-
teen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 550 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan
muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle
valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen
halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 minuuttia. Lämpöä pidettiin noin 95–99
C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin
tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän
astian massa. Kirjattiin saadun tisleen massa ylös, joka oli 27,9801 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näyte tarkkuusvaa'alla,
joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle
laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä
riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin laske-
tuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tihey-
deksi saimme 0,9853 g/ml ja toisen näytteen 0,9826 g/ml. Tiheyksien keskiar-
voksi saatiin 0,9840 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä

olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 8,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 2,3783 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 60,2985 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 3,94 %.



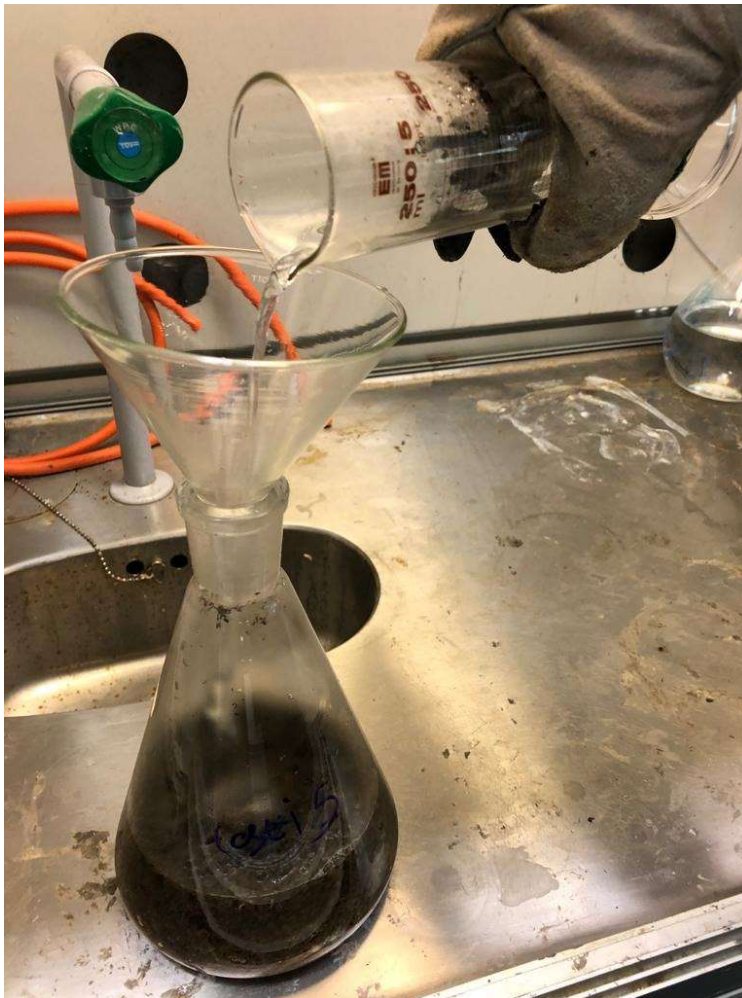
Kuva 11. Kokeiden 1–4 saadut tisleet (Kuva: Jesse Seila).

4.5 Koe 5: *Trichoderma Sp.* 0,25 g, 30 til.-% happoesikäsitteily

Koe aloitettiin 4.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aine prosentti oli 38,95 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 150,68 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,69 g.

Seuraavaksi valmistettiin kokeissa 5 ja 7 tarvittavat rikkihappoliuokset. Rikkihappoliuos muodostui 300 ml:sta rikkihappoa (95.0–98.0 %) ja 700 ml:sta ionivaihdettua vettä. Tästä muodostui n. 30 til.-% rikkihappoliuos.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 30 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullo päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidettiin sitä määrättyssä lämpötilassa 15 min.



Kuva 12. Happoliuoksen lisääminen raaka-aineeseen (Kuva: Jesse Seila).

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, minkä jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin

neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.



Kuva 13. Raaka-aine happokäsittelyn ja imusuodatuksen jälkeen (Kuva: Jesse Seila).

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g *Trichoderma sp.* entsyymiä. Entsyymi oli punnittu aiemmin tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin Finnpipetillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 5.2.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 18 tunnin jälkeen 7,4 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin noin 2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 12.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 7 vuorokautta. Tästä erästä mitattiin glukoosipitoisuus ennen imusuodatusta. Lukemia saatiin 1:n ja 3:n mmol/l väliltä. Eli sokereita oli hieman jäljellä, vaikka käymistä oli kestänyt jo viikon verran. Tämän jälkeen imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 550 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja lukemasta vähennettiin tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 32,0821 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näytteet tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9903 g/ml ja toisen näytteen 0,9902 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9902 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 4,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 1,4437 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,69 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 2,46 %.

4.6 Koe 6: *Aspergillus Sp.* 40 ml, 30 til.-% happoesikäsitteily

Koe aloitettiin 11.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 151,90 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,89 g.

Tämän jälkeen valmistettiin kokeissa 6 ja 8 tarvittavat rikkihappoliuokset. Rikkihappoliuos muodostui 300 ml:sta rikkihappoa (95.0–98.0 %) ja 700 ml:sta ionivaihdettua vettä. Tästä muodostui n. 30 til.-% rikkihappoliuos.

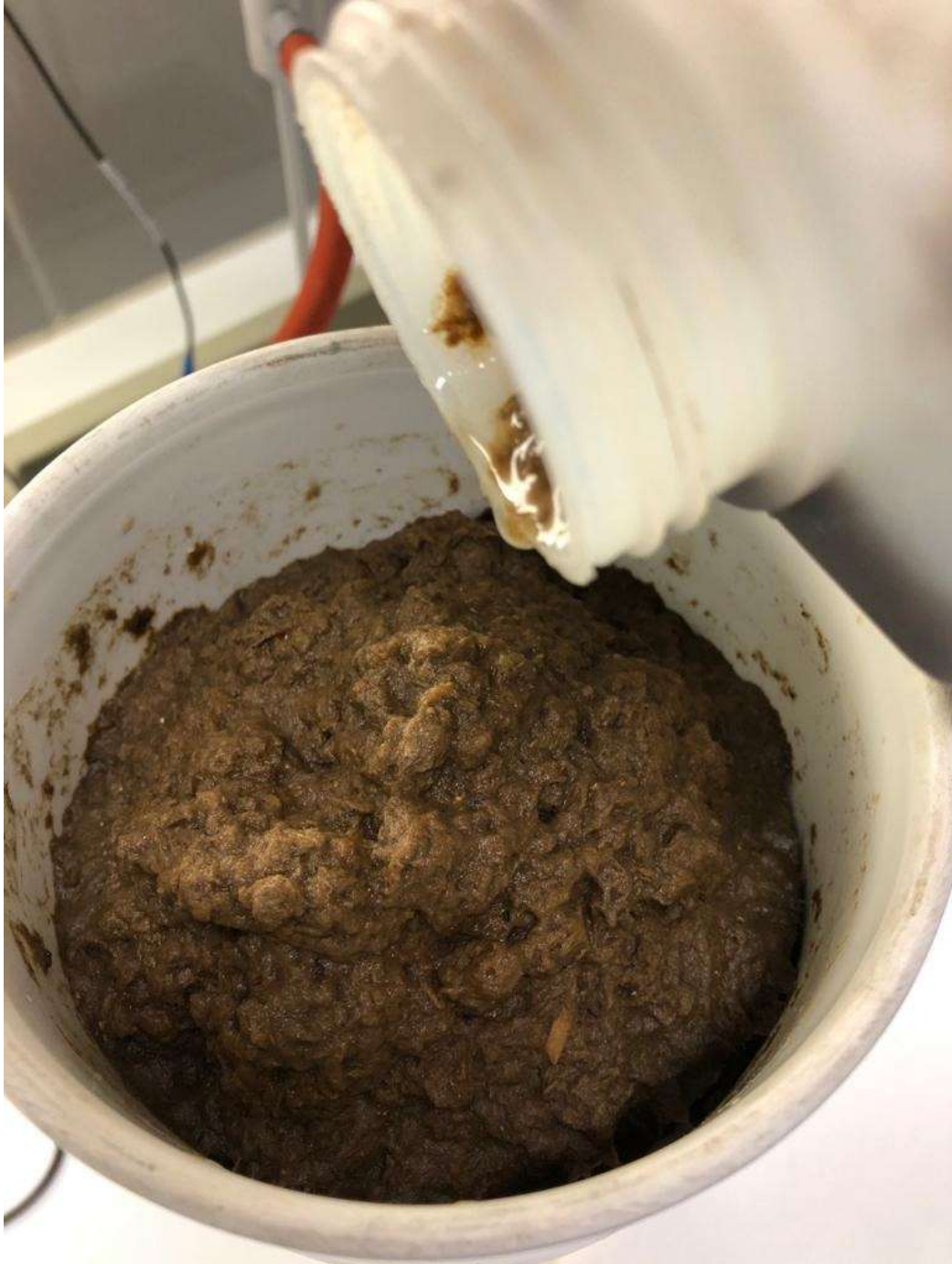
Keitinpulloon lisättiin 500 ml 30 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidettiin sitä määrättyssä lämpötilassa 15 min.

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, jonka jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 40 ml *Aspergillus sp.* entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli neste-mäistä, joten se oli helppo annostella Finnpipetillä.

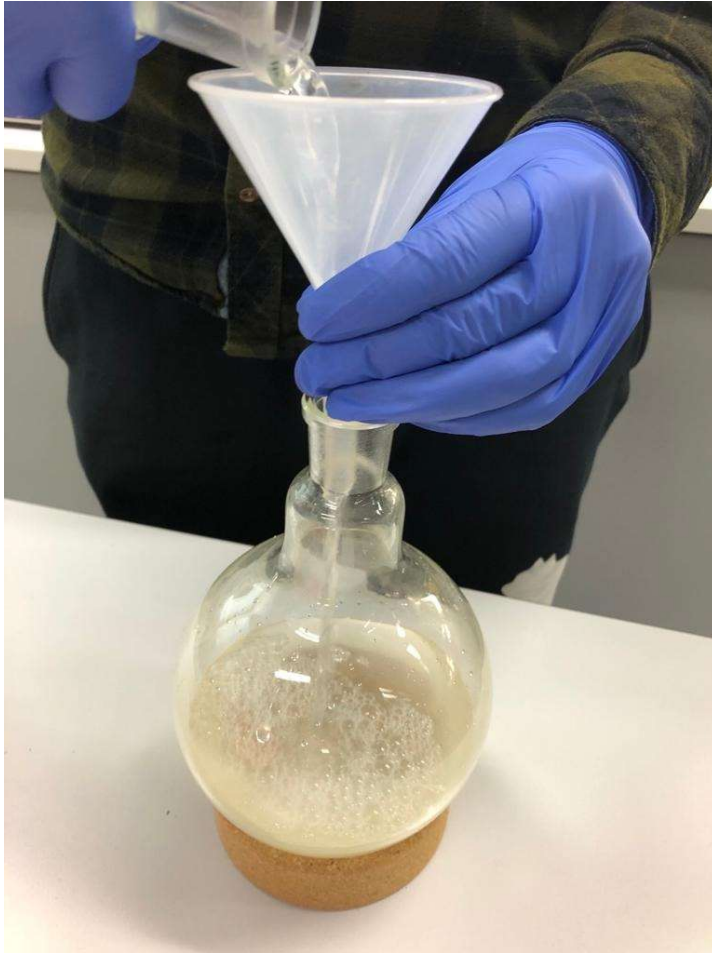
Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 12.2.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 22 tunnin jälkeen edelleen "low". Käymisastiaan lisättiin noin 2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.



Kuva 14. Raaka-aine n. viikon käymisreaktion jälkeen (Kuva: Jesse Seila).

Koetta jatkettiin 18.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 6 vuorokautta. Ensimmäiseksi imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 600 ml.



Kuva 15. Nesteen lisääminen tislaukolviin (Kuva: Jesse Seila).

Seuraavaksi rakennettiin tisluslaitteisto ja laitettiin neste tislaukolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tisluslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 41,6098 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näyte tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin laske-

tuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9871 g/ml ja toisen näytteen 0,9894 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9882 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 5,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 2,2885 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,8916 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 3,89 %.

4.7 Koe 7: Trichoderma Sp. 0,25 g, 30 til.-% happoesikäsitteily

Koe aloitettiin 4.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aine prosentti oli 38,95 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 151,41 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,97 g.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 30 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidettiin sitä määrättyssä lämpötilassa 30 min.

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, jonka jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g *Trichoderma* sp. entsyymiä. Entsyymi oli punnittu aiemmin tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin Finnpietillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 5.2.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 18 tunnin jälkeen 8,3 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin noin 2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

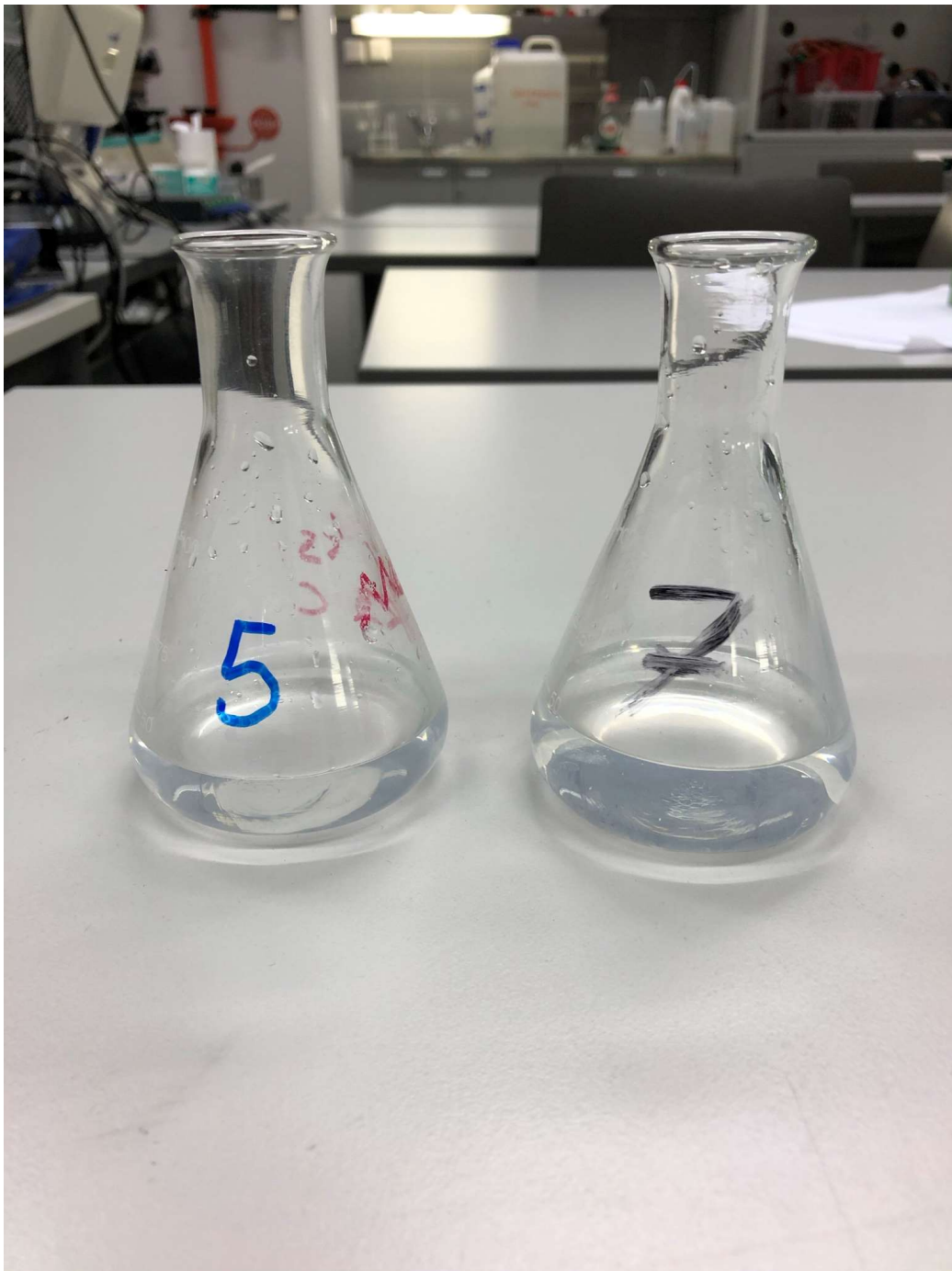
Koetta jatkettiin 12.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 7 vuorokautta. Tästä erästä mitattiin glukoosipitoisuus ennen imusuodatusta. Lukemia saatiin 1:n ja 3:n mmol/l väliltä. Eli sokereita oli hieman jäljellä, vaikka käymistä oli kestänyt jo viikon verran. Tämän jälkeen imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi n. 600 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Pidettiin lämpöä noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 42,2686 g.

Otettiin tisleestä kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näytteet tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla

saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9841 g/ml ja toisen näytteen 0,9880 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9860 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 7,0 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 2,9588 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,97 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 5,02 %.



Kuva 16. Saatujen kokeiden 5 ja 7 tisleet (Kuva: Jesse Seila).

4.8 Koe 8: *Aspergillus Sp.* 40 ml, 30 til.-% happoesikäsitteily

Koe aloitettiin 11.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saimme vaa'alla 148,18 g ja kuiva-ainetta tästä oli 57,45 g.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 30 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle. Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin keskimäärin 100 C°:seen ja pidettiin sitä määrättyssä lämpötilassa 30 min.

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, nostettiin keitinpullo hetkeksi jäähtymään, jonka jälkeen alettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 40 ml *Aspergillus sp.* entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli neste-mäistä, joten se oli helppo annostella Finnpietillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 12.2.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 22 tunnin jälkeen edelleen "low". Käymisastiaan lisättiin noin

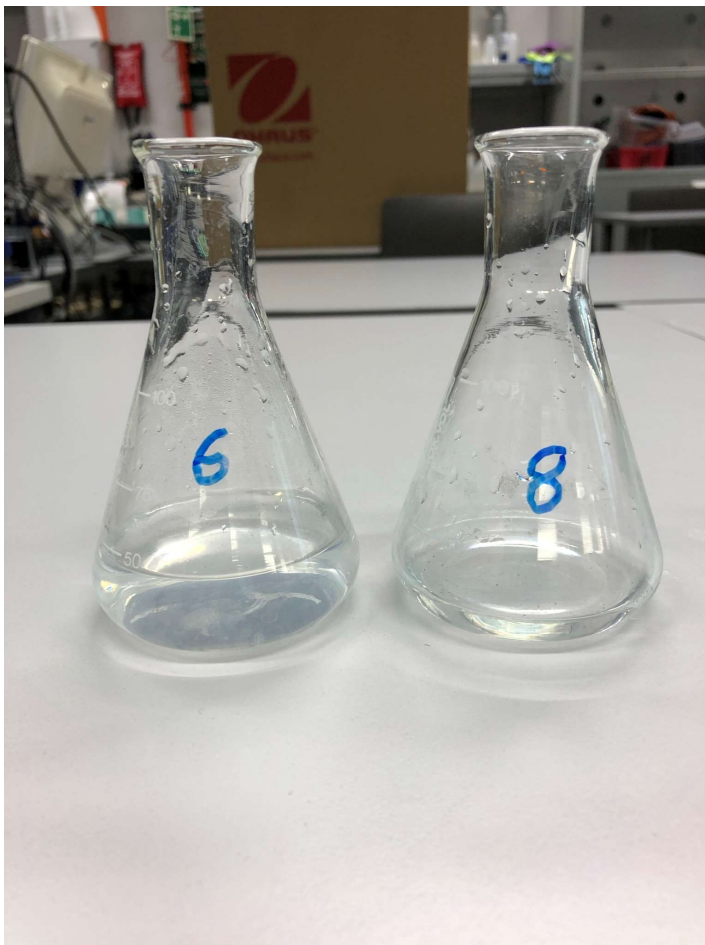
2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Käymisastia jätettiin noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 18.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 6 vuorokautta. Tästä erästä mitattiin glukoosipitoisuus ennen imusuodatusta. Saatiin lukemat "low" ja 1,1 mmol/l. Eli sokereita oli todella vähän jäljellä, kun käymistä oli kestänyt 6 vuorokauden verran. Tämän jälkeen imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 600 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 11,1219 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näyte tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9865 g/ml ja toisen näytteen 0,9879 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9872 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 6,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 0,7229 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä olevan etanolin massan raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 57,45 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 1,26 %.



Kuva 17. Kokeiden 6 ja 8 muodostuneet tisleet (Kuva: Jesse Seila).

4.9 Koe 9: *Trichoderma Sp.* 0,25 g, 30 til.-% happoesikäsittely 24 h

Koe aloitettiin 16.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 151,10 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,58 g.

Valmistettiin kokeissa 9 ja 10 tarvittavat rikkihappoliuokset. Rikkihappoliuos muodostui 270 ml:sta rikkihappoa (95.0–98.0 %) ja 630 ml:sta ionivaihdettua vettä. Tästä muodostui n. 30 til.-% rikkihappoliuos.

Keitinpulloon lisättiin 450 ml 30 til.-% rikkihappoa ja jätettiin pullo huoneen lämpöön noin 25 tunniksi. Muita kokeita vähäisempi rikkihapon määrä johtui siitä, että rikkihappo pääsi loppumaan, joten sitä ei ollut käytettävissä haluttua 500 ml:aa.



Kuva 18. Kokeet 9 ja 10 jätettiin vuorokaudeksi happoliuokseen (Kuva: Jesse Seila).



Kuva 19. Kokeet 9 ja 10 vuorokauden kuluttua (Kuva: Jesse Seila).

Seuraavana päivänä 17.2.2021 tultiin jatkamaan koetta. Ensimmäiseksi neste poistettiin imusuodattamalla. Mitattiin materiaalin pH, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Alettiin neutralisoimaan raaka-ainetta huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja imusuodatettiin se pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7. Tämän kokeen materiaali oli selvästi vaikeampi saada neutralisoitua verrattuna käsittelyihin, jossa materiaali oli vain lyhyen ajan hapossa.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g *Trichoderma sp.* entsyymiä. Entsyymi oli punnittu aiemmin tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin FinnpiPETillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 18.2.2021 tultiin mittaamaan glukoosin määrää. Mittaustulokseksi saatiin noin 24 tunnin jälkeen 13,1 mmol/l. Lisättiin käymisastiaan noin 2 g kuivahiivaa, astiaan laitettiin vesilukko ja sitä sekoitettiin ravistamalla. Jätettiin käymisastia noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 26.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. Ensimmäiseksi imusuodatettiin käymisastiassa oleva materiaali. Neste otettiin talteen ja kiinteä aines hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 500 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto ja laitettiin neste tislauskolviin ja sekaan muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Punnittiin astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta. Alettiin lämmittämään kolvia. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpöä pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvia alettiin lämmittämään.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 26,1496 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja punnittiin näytteet tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tisleettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9855 g/ml ja toisen näytteen 0,9861 g/ml. Tiheyksien keskiarvoksi saatiin 0,9858 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 7,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 1,9612 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,58 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 3,35 %.

4.10 Koe 10: Aspergillus Sp. 40 ml, 30 til.-% happoesikäsittely 24 h

Koe aloitettiin 16.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen raaka-ainetta punnittiin keitinpulloon noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 151,81 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,86 g.

Keitinpulloon lisättiin 450 ml 30 til.-% rikkihappoa ja pullo jätettiin huoneenlämpöön noin 25 tunniksi. Muita kokeita vähäisempi rikkihapon määrä johtui siitä, että rikkihappo pääsi loppumaan, joten sitä ei ollut käytettävissä haluttua 500 ml:aa.

Koetta jatkettiin seuraavana päivänä 17.2.2021. Nesteen poistaminen aloitettiin imusuodatuslaitteistolla. Materiaalin pH mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä.

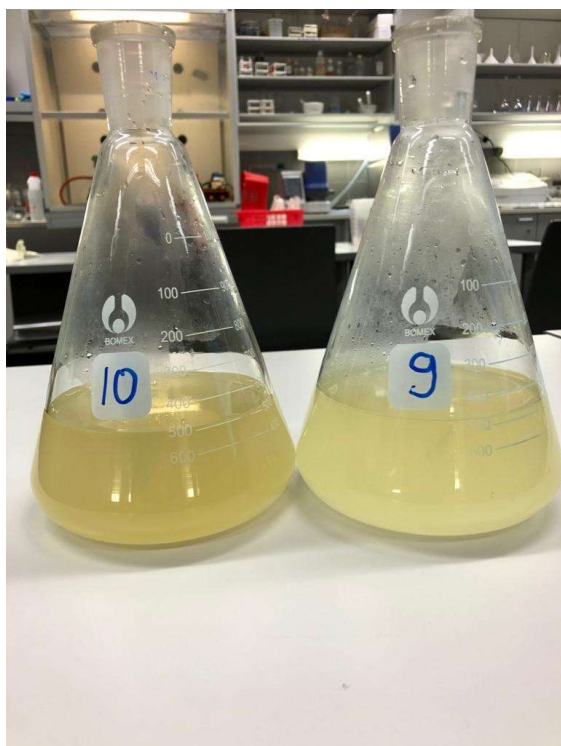
Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja se imusuodatettiin pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7. Tämän kokeen materiaali oli selvästi vaikeampi saada neutralisoitua verrattuna käsittelyihin, joissa materiaali oli vain lyhyen ajan hapossa.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 40 ml *Aspergillus sp.* entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli neste-mäistä, joten se oli helppo annostella Finnpietillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

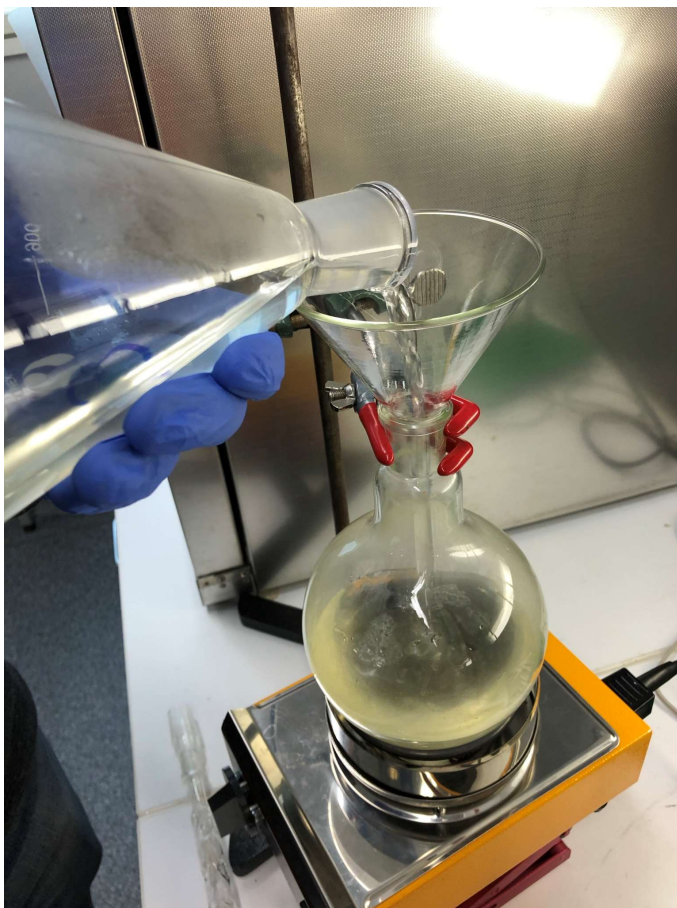
Seuraavana päivänä 18.2.2021 glukoosin määrä mitattiin uudelleen. Mittaustulokseksi saatiin n. 24 tunnin jälkeen 1,1 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin 2 g kuiva-hiivaa ja astia sekoitettiin ravistamalla. Astiaan laitettiin vesilukko ja jätettiin käymään noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 26.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä n. 8 vuorokautta. Käymisastiassa oleva materiaali imusuodatettiin, josta neste otettiin talteen ja kiinteäaine hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 500 ml.



Kuva 20. Kokeiden 9 ja 10 saadut tislattavat nesteet (Kuva: Jesse Seila).

Seuraavaksi rakennettiin tisluslaitteisto. Neste laitettiin tisluskolviin ja sekaan lisättiin muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Astia, johon valmis tisle valuisi tisluslaitteistosta, punnittiin. Seuraavaksi aloitettiin kolvin lämmitys. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpötilaa pidettiin n. 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvin lämmitys aloitettiin.



Kuva 21. Tislattavan nesteen lisääminen tisluskolviin (Kuva: Jesse Seila).

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 22,1997 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäi-

sen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9860 g/ml ja toisen näytteen 0,9860 g/ml. Keskiarvoksi saatiin 0,9860 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 7,0 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 1,5540 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,86 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 2,64 %.

4.11 Koe 11: Trichoderma Sp. 0,25 g ilman esikäsitelyä

Koe aloitettiin 17.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen punnittiin raaka-ainetta käymisastiaan n. 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 150,80 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,47 g.

Tälle kokeelle ei tehty minkäänlaista esikäsitelyä, joten raaka-aineen sekaan käymisastiaan lisättiin 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g Trichoderma sp. entsyymiä. Entsyymi oli punnittu aiemmin tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin Finnpijetillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 18.2.2021 glukoosin määrä mitattiin uudelleen. Mittaustulokseksi saatiin noin 24 tunnin jälkeen 5,6 ja 4,8 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin 2 g kuivahiivaa ja astia sekoitettiin ravistamalla. Astiaan laitettiin vesilukko ja jätettiin käymään noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 26.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. Käymisastiassa oleva materiaali imusuodatettiin, josta neste otettiin talteen ja kiinteäaine hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi n. 500 ml.

Tämän jälkeen rakennettiin tisluslaitteisto. Neste laitettiin tisluskolviin ja sen sekaan lisättiin muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Astia, johon valmis tisle valuisi tisluslaitteistosta, punnittiin. Seuraavaksi aloitettiin kolvin lämmitys. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpötilaa pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvin lämmitys aloitettiin.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 17,8022 g

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9858 g/ml ja toisen näytteen 0,9848 g/ml. Keskiarvoksi saatiin 0,9853 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 7,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 1,6412 grammaa puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,47 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 2,81 %.

4.12 Koe 12: Aspergillus Sp. 40 ml ilman esikäsitelyä

Koe aloitettiin 17.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen raaka-ainetta punnittiin käymisastiaan noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 150,18 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,22 g.

Tälle kokeelle ei tehty minkäänlaista esikäsitelyä, joten raaka-aineen sekaan käymisastiaan lisättiin 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 40 ml Aspergillus sp. entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli nestemäistä, joten se oli helppo annostella Finn-pipetillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 18.2.2021 glukoosin määrä mitattiin uudelleen. Mittaustulokseksi saatiin noin 24 tunnin jälkeen 5,1 ja 4,0 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin 2 g kuivahiivaa ja astia sekoitettiin ravistamalla. Astiaan laitettiin vesilukko ja jätettiin käymään noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

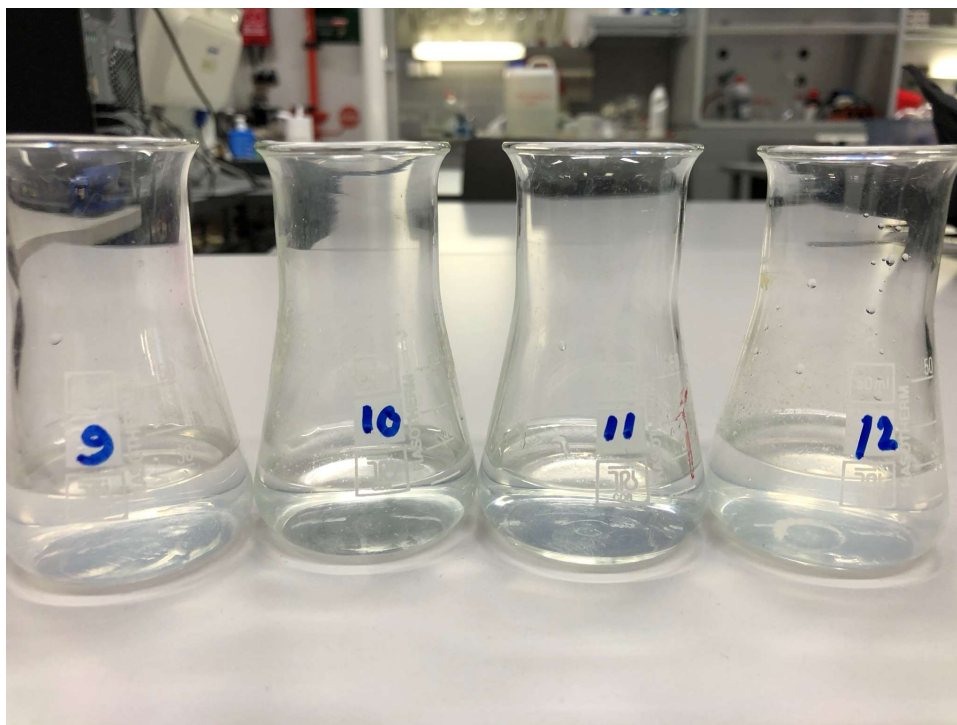
Koetta jatkettiin 26.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 8 vuorokautta. Käymisastiassa oleva materiaali imusuodatettiin, josta neste otettiin talteen ja kiinteäaine hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 500 ml.

Seuraavaksi rakennettiin tislauslaitteisto. Neste laitettiin tislauskolviin ja sen sekaan lisättiin muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta, punnittiin. Seuraavaksi aloitettiin kolvin lämmitys. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpötilaa pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvin lämmitys aloitettiin.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 28,5064 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9745 g/ml ja toisen näytteen 0,9748 g/ml. Kes-

kiarvoksi laskettiin 0,9746 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 15,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 4,4185 grammaa puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,22 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 7,59 %. Tässä erässä tisleen tuoksu oli selvästi muita testejä väkevämpi.



Kuva 22. Kokeista 9–12 saadut tisleet (Kuva: Jesse Seila).

4.13 Koe 13: Verrokkikoe, ilman entsyymiä ja esikäsitelyä

Koe aloitettiin 17.2.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieninäyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen raaka-ainetta punnittiin käymisastiaan n.150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 150,39 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,31 g.

Tälle erälle ei tehty minkäänlaista esikäsitelyä, eikä käytetty entsyymiä, joten raaka-aineen sekaan käymisastiaan lisättiin vain 500 ml ionivaihdettua vettä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei ollut vielä muodostunut.

Seuraavana päivänä 18.2.2021 glukoosin määrä mitattiin uudelleen. Mittaustulokseksi saatiin noin 24 tunnin jälkeen 3,9; 4,3 ja 3,6 mmol/l. Glukoosia alkoi siis muodostua ilman entsyymiäkin. Käymisastiaan lisättiin 2 g kuivahiivaa ja astia sekoitettiin ravistamalla. Astiaan laitettiin vesilukko ja jätettiin käymään noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.



Kuva 23. Käymisreaktion jälkeinen nesteen erotus imusuodattamalla (Kuva: Jesse Seila).

Koetta jatkettiin 25.2.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 7 vuorokautta. Käymisastiassa oleva materiaali imusuodatettiin, josta neste otettiin talteen ja kiinteäaine hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 400 ml.

Tämän jälkeen rakennettiin tislauslaitteisto. Neste laitettiin tislauskolviin ja sekaan lisättiin muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta, punnittiin. Seuraavaksi aloitettiin kolvin lämmitys. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpötilaa pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvin lämmitys aloitettiin.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 8,5805 g.

Tisleestä otettiin kaksi 5 ml näytettä pipetillä ja näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tisleettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9878 g/ml ja toisen näytteen 0,9902 g/ml. Keskiarvoksi laskettiin 0,9890 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 5,0 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 0,4290 grammaa puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä oleva etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,31 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 0,74 %.



Kuva 24. Kokeesta 13 saatu tisleen määrä (Kuva: Jesse Seila).

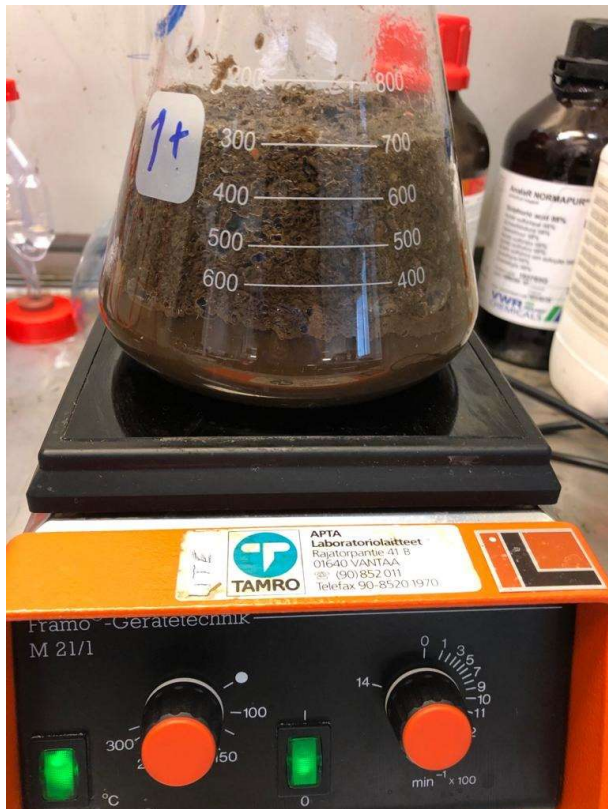
4.14 Koe 14: Varmistuskoe kokeesta 1

Tämä koe tehtiin mahdollisimman identtisesti kokeen 1 mukaisesti. Kokeesta 1 saatiin kokeen 12 ohella selvästi muita kokeita paremmat tulokset konversioasteen perusteella. Tarkoituksena oli toistaa koe ja varmistaa oliko sen tulos pelkkää sattumaa.

Koe aloitettiin 4.3.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti. Raaka-aineen kuiva-aineprosentti oli 38,77 %. Tämän jälkeen raaka-ainetta punnittiin keitinpulloon n. 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 151,94 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,91 g.

Seuraavaksi valmistettiin n. 20til.-% rikkihappoliuos, joka muodostui 100 ml:sta rikkihappoa (95.0–97.0) ja 400 ml:sta ionivaihdettua vettä.

Keitinpulloon lisättiin 500 ml 20 til.-% rikkihappoa sekä magneettisekoittajan sekoitussauva. Keitinpullo laitettiin vetokaapissa olevan lämmittävän magneettisekoittimen päälle (kuva 25). Keitinpullon päälle rakennettiin refluksointilaitteisto, johon laitettiin vesikierto. Seosta alettiin lämmittämään magneettisekoittajalla samalla sekoittaen. Infrapunalämpötilamittarilla mitattiin välillä pullon lämpötilaa eri kohdista. Lämpötila nostettiin noin 100 C°:seen hiljalleen ja pidettiin lämpötilaa halutussa lukemassa 15 min. Johtuen hitaasta lämpötilan nostosta seosta lämmitettiin yhteensä noin tunnin verran, kuten kokeessa 1.



Kuva 25. Raaka-aine kuumassa happokäsittelyssä magneettisekoittajan päällä (Kuva: Jesse Seila).

Kun seosta oli lämmitetty määrätty aika, keitinpullo nostettiin hetkeksi jäähtymään, jonka jälkeen aloitettiin imusuodattamaan nestettä pois seoksesta. Seuraavaksi materiaalin pH:n mitattiin, joka oli tässä vaiheessa pH 1:n luokkaa. Raaka-ainetta alettiin neutralisoimaan huuhtomalla sitä aiemmin valmistetulla 0,5 moolisella natriumhydroksidilla eli lipeällä sekä ionivaihdetulla vedellä. Lipeää ja vettä kaadettiin materiaalin päälle ja se imusuodatettiin pois useita kertoja, kunnes materiaalin pH oli pH-liuskalla mitaten 7.

Neutralisoitu materiaali laitettiin käymisastiaan ja lisättiin sekaan 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 0,25 g *Trichoderma* sp. entsyymiä. Entsyymi oli punnittu tarkkuusvaa'alla ja sekoitettuna pipetillä mitattuun määrään ionivaihdettua vettä. Entsyymi annosteltiin käymisastiaan FinnpiPETillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

Seuraavana päivänä 5.3.2021 glukoosin määrä mitattiin uudelleen. Mittaustulokseksi saatiin noin 25 tunnin jälkeen 3,2; 3,3; 4,4 ja 9,3 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin 2 g kuivahiivaa ja astia sekoitettiin ravistamalla. Astiaan laitettiin vesilukko ja jätettiin käymään noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 15.3.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 10 vuorokautta. Tämä oli pidempi aika kuin kokeessa 1, mutta koetta ei päästy jatkamaan aiemmin koulun talvilomasta johtuen. Käymisastiassa oleva materiaali imusuodatettiin, josta neste otettiin talteen ja kiinteä aine hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 550 ml.

Tämän jälkeen rakennettiin tislauslaitteisto. Neste laitettiin tislauskolviin ja sen sekaan lisättiin muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Astia, johon valmis tisle valuisi tislauslaitteistosta, punnittiin. Seuraavaksi aloitettiin kolvin lämmitys. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpötilaa pidettiin noin 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislaus lopetettiin noin tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvin lämmitys aloitettiin.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 17,8022 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tisleettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9845 g/ml ja toisen näytteen 0,9867 g/ml. Keskiarvoksi laskettiin 0,9856 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 7,5 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 1,3351 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä olevan etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,91 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 2,27 %.

4.15 Koe 15: Varmistuskoe kokeesta 12

Tämä koe tehtiin mahdollisimman identtisesti kokeen 12 mukaisesti. Kokeesta 12 saatiin kokeen 1 ohella selvästi muita kokeita paremmat tulokset konversioasteen perusteella. Tarkoituksena oli toistaa koe ja varmistaa oliko sen tulos pelkkää sattumaa.

Koe aloitettiin 4.3.2021 sulattamalla pakastettua raaka-ainetta sopiva määrä huoneen lämmössä. Raaka-aineesta otettiin pieni näyte, josta mitattiin kuiva-aineprosentti, joka oli 38,77 %. Tämän jälkeen raaka-ainetta punnittiin käymisastiaan noin 150 g. Raaka-aineen tarkaksi massaksi saatiin vaa'alla 150,93 g ja kuiva-ainetta tästä oli 58,52 g.

Tälle erälle ei tehty minkäänlaista esikäsitteilyä, joten raaka-aine laitettiin käymisastiaan sellaisenaan ja sekaan lisättiin 500 ml ionivaihdettua vettä sekä 40 ml Aspergillus sp. entsyymiä. Kyseinen entsyymi oli nestemäistä, joten se oli helppo annostella Finnpiipetillä.

Glukoosin määrä mitattiin noin puolen tunnin päästä verensokerimittarilla. Mittari näytti lukemaa "low", eli sokereita ei vielä ollut muodostunut.

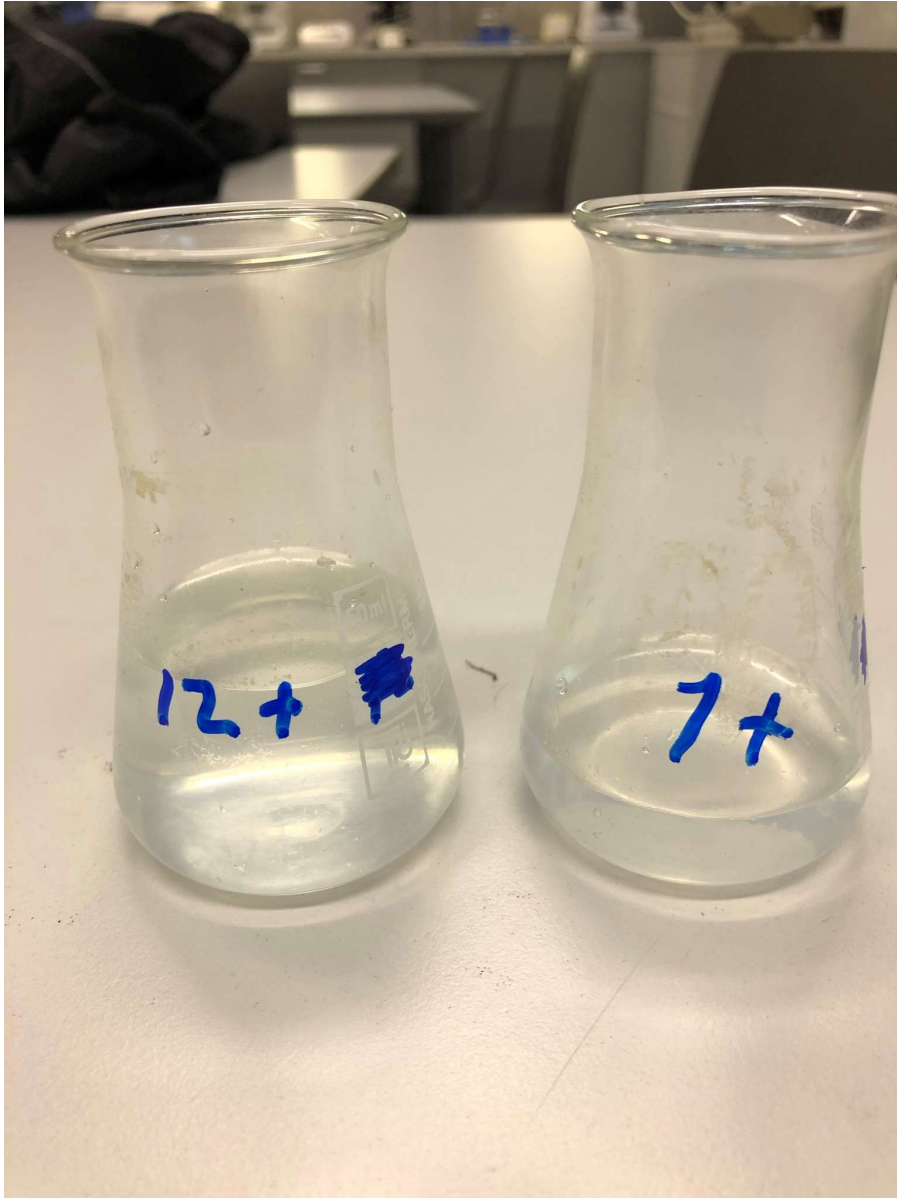
Seuraavana päivänä 5.3.2021 glukoosin määrä mitattiin uudelleen. Mittaustulokseksi noin 25 tunnin päästä saatiin 2,4; 3,9; 4,7 ja 5,6 mmol/l. Käymisastiaan lisättiin 2 g kuivahiivaa, ja astia sekoitettiin ravistamalla. Astiaan laitettiin vesilukko ja jätettiin käymään noin viikoksi 30 C°:seen vesihauteeseen.

Koetta jatkettiin 15.3.2021 eli materiaali oli saanut käydä noin 10 vuorokautta. Käymisastiassa oleva materiaali imusuodatettiin, josta neste otettiin talteen ja kiinteäaine hävitettiin. Nestettä saatiin tislattavaksi noin 450 ml.

Tämän jälkeen rakennettiin tisluslaitteisto. Neste laitettiin tisluskolviin ja sekaan lisättiin muutama kiehumakivi tasoittamaan kiehumista. Astia, johon valmis tisle valuisi tisluslaitteistosta, punnittiin. Seuraavaksi aloitettiin kolvin lämmitys. Nesteen lämpenemiseen halutulle tasolle kului aikaa reilu 15 min. Lämpötilaa pidettiin n. 95–99 C°:ssa, koska tislettä ei tahtonut muuten tulla tarpeeksi. Tislus lopetettiin n. tunnin kuluttua siitä hetkestä, kun kolvin lämmitys aloitettiin.

Saatu tisle punnittiin astioineen tarkkuusvaa'alla ja vähennettiin lukemasta tyhjän astian massa. Saadun tisleen massa kirjattiin ylös, joka oli 43,4362 g.

Tisleestä otettiin kaksi 10 ml näytettä pipetillä ja näytteet punnittiin tarkkuusvaa'alla, joka oli taarattu hetkeä aiemmin kyseiselle näytelasille. Punnituksen jälkeen tisle laitettiin takaisin alkuperäiseen tislelasiin, josta näyte oli otettu. Näin ollen tislettä riitti useaan punnitukseen. Näytteen massan ja tilavuuden avulla saatiin lasketuksi tisleen tiheys jakamalla massa tilavuudella. Ensimmäisen näytteen tiheydeksi saatiin 0,9850 g/ml, toisen näytteen 0,9824 g/ml ja kolmannen näytteen 0,9871 g/ml. Keskiarvoksi laskettiin 0,9848 g/ml. Tiheyden perusteella pystyttiin arvioimaan tisleessä olevan etanolin massaprosentti taulukosta (liite 2) katsomalla. Tämän testin tisleessä oli n. 8,0 % puhdasta etanolia. Näin ollen tisleessä oli 3,4749 g puhdasta etanolia. Jakamalla tisleessä olevan etanolin massa raaka-aineen kuiva-aineen massalla, joka oli 58,52 g, saatiin lasketuksi raaka-aineen konversioaste etanoliksi. Konversioasteeksi tuli 5,94 %.



Kuva 26. Varmistuskokeiden 1+ (14) ja 12+ (15) saadut tisleet (Kuva: Jesse Seila).

5 Opinnäytetyön tulokset

5.1 Yleistä

Kokeiden tulokset olivat melko odotettuja. Suuria etanolimääriä ei muodostunut, mutta kokeiden perusteella voidaan tehdä varovaisia johtopäätöksiä entsyymien ja esikäsitteilytekniikoiden toiminnasta.

5.2 Kokeiden tulokset

Taulukossa 1 on kerrottu eri kokeissa käytetyt esikäsitteilyteknikat sekä raaka-aineen lähtötietoja. Raaka-aineen kuiva-ainepitoisuus mitattiin kaksi kertaa, koska se ei pakastamisen aikana näyttänyt muuttuvan radikaalisti. Kuten taulukosta 1 voidaan nähdä, jokaisessa kokeessa pyrittiin käyttämään samansuuruisia panosta kuitusaven osalta.

Taulukko 1. Esikäsitteilyteknikat ja raaka-aineen lähtötiedot.

Koe numero	Esikäsitteily	Raaka-aineen massa (g)	Kuiva-ainepitoisuus (%)	Kuiva-aineen massa (g)
1	happo	151,85	38,95	59,145575
2	happo	150,47	38,95	58,608065
3	happo	153,38	38,95	59,74151
4	happo	154,81	38,95	60,298495
5	happo	150,68	38,95	58,68986
6	happo	151,90	38,77	58,89163
7	happo	151,41	38,95	58,974195
8	happo	148,18	38,77	57,449386
9	hapossa 25 h ilman lämmitystä	151,10	38,77	58,58147
10	hapossa 25 h ilman lämmitystä	151,81	38,77	58,856737
11	ei esikäsitteilyä	150,80	38,77	58,46516
12	ei esikäsitteilyä	150,18	38,77	58,224786
13	ei esikäsitteilyä	150,39	38,77	58,306203
14 (1)	happo	151,94	38,77	58,907138
15 (12)	ei esikäsitteilyä	150,93	38,77	58,515561

Taulukossa 2 on esitettyä esikäsitteilyyn käytetyn hapon vahvuudet ja määrät sekä seoksen lämmitykseen käytetty aika ja lämpötila. Hapon määrä pyrittiin pitämään vakiona, mutta kuten taulukosta 2 voi nähdä, kokeissa 9 ja 10 hapon määrä on hieman pienempi. Tämä johtuu siitä, että happo pääsi loppumaan kesken kokeiden. Tällä ei pitäisi kuitenkaan olla suurta merkitystä lopputuloksen kannalta.

Taulukko 2. Hapon vahvuus ja -määrä sekä reaktioaika ja -lämpötila.

Koe numero	Hapon vahvuus-% ja määrä (ml)	Reaktioaika (min) ja lämpötila (C°)
1	20 til-% rikkihappoa 500 ml	15min, 100 C°
2	20 til-% rikkihappoa 500 ml	15min, 100 C°
3	20 til-% rikkihappoa 500 ml	30min, 100 C°
4	20 til-% rikkihappoa 500 ml	30min, 100 C°
5	30 til-% rikkihappoa 500 ml	15min, 100 C°
6	30 til-% rikkihappoa 500 ml	15min, 100 C°
7	30 til-% rikkihappoa 500 ml	30min, 100 C°
8	30 til-% rikkihappoa 500 ml	30min, 100 C°
9	30til-% rikkihappoa 450 ml	25 h huoneen lämmössä
10	30til-% rikkihappoa 450 ml	25 h huoneen lämmössä
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14 (1)	20 til-% rikkihappoa 500 ml	n. 1 h 100 C°:een hiljalleen
15 (12)	-	-

Taulukossa 3 on esitettynä kokeissa käytetyt entsyymit ja niiden määrät, glukosimittauksen tulokset sekä käytetyn hiivan määrä. Glukosimittauksissa ensimmäinen arvo on mitattu puolen tunnin kuluttua entsyymin laitosta. Kuten taulukosta 3 voidaan nähdä, lukemat ovat kaikissa kokeissa "low", eli verensokerimittari ei pystynyt havaitsemaan liuoksessa glukosia. Vuorokauden kuluttua lähes kaikissa kokeissa on muodostunut hieman glukosia. Joistain kokeista on otettu jälkimmäisellä mittauskerralla useita mittauksia, jotka ovat nähtävissä kyseisessä taulukossa. Hiivan määrä oli kaikissa kokeissa sama 2 grammaa.

Taulukko 3. Entsyymit, glukosimittaukset ja käytetyn hiivan määrä.

Koe numero	Entsyymin määrä (g/ml)	Glukoosin määrä 0,5 h ja 24 h kuluttua (mmol/l)	Hiivan määrä (g)
1	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 5,8	2
2	Aspergillus sp. 20 ml	low ja low	2
3	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 9,9	2
4	Aspergillus sp. 20 ml	low ja low	2
5	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 7,4	2
6	Aspergillus sp. 40 ml	low ja low	2
7	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 8,3	2
8	Aspergillus sp. 40 ml	low ja low	2
9	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 13,1	2
10	Aspergillus sp. 40 ml	low ja 1,1	2
11	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 5,6; 4,8	2
12	Aspergillus sp. 40 ml	low ja 5,1; 4,0	2
13	-	low ja 3,9; 4,3; 3,6	2
14 (1)	Trichoderma sp. 0,25 g	low ja 3,2; 3,3; 4,4; 9,3	2
15 (12)	Aspergillus sp. 40 ml	low ja 2,4; 3,9; 4,7; 5,6	2

Taulukossa 4 nähdään tislattavan nesteen määrä, joka vaihteli 400 ja 600 millilitran välillä. Yksiselitteistä syytä nesteen määrän vaihteluun ei ole. Jokaiseen käymisastiaan lisättiin saman verran vettä. Nestettä on joko haihtunut joissain koeksissa enemmän käymisen aikana tai materiaali on ollut käymisastiaan laitettaessa eri kosteudessa. Tislattavan nesteen määrällä ja saadulla tisleellä ei näyttäisi kuitenkaan olevan yhteyttä. Saadut tislemäärät vaihtelivat melko paljon, eikä tislattavan nesteen määrä vaikuttanut saadun tisleen määrään.

Taulukko 4. Tislauksen alku- ja lopputilanne.

Koe numero	Tislattavan nesteen tilavuus (ml)	Tisleen massa (g)	Tisleen tiheys (g/ml)
1	600	48,4503	0,98297
2	550	6,9431	0,98099
3	600	24,789	0,982385
4	550	27,9801	0,98397
5	550	32,0821	0,99021
6	600	41,6098	0,988205
7	600	42,2686	0,98602
8	600	11,1219	0,987185
9	500	26,1496	0,98582
10	500	22,1997	0,98603
11	500	21,882	0,98526
12	500	28,5064	0,9746
13	400	8,5805	0,989
14 (1)	550	17,8022	0,9856
15 (12)	450	43,4362	0,98483

Taulukossa 5 on esitetty tisleistä määritellyt etanolin massaprosentit. Eri kokeista saadut vahvuudet vaihtelivat melko paljon. Huonoimmissa kokeissa saatiin vain noin 4 m-% vahvuista tislettä, kun taas parhaissa noin 15,5 m-%:sta tislettä. Tislemäärät olivat niin pieniä, että tietoisesti ei lähdetty hakemaan todella korkeita vahvuuksia, jotta tisleen etanolipitoisuus oli helpompi määrittellä tiheyden perusteella. Raaka-aineen konversioasteet olivat yleisesti ottaen melko vaatimattomia, mutta parhaimmissa kokeissa päästiin lähes 8 % konversioasteeseen. Konversioaste kertoo, kuinka monta prosenttia saadun etanolin massa on sen valmistamiseen käytetyn raaka-aineen kuiva-aineen massasta. Näin ollen 100 g:sta kuiva-ainetta saataisiin n. 8 g puhdasta etanolia.

Taulukko 5. Tisleen tiedot ja raaka-aineen konversioaste.

Koe numero	Tisleen etanoli määrä (m-%)	Etanolin massa (g)	Raaka-aineen konversioaste etanoliksi (%)
1	9,5	4,6027785	7,78
2	11	0,763741	1,30
3	9,5	2,354955	3,94
4	8,5	2,3783085	3,94
5	4,5	1,4436945	2,46
6	5,5	2,288539	3,89
7	7	2,958802	5,02
8	6,5	0,7229235	1,26
9	7,5	1,96122	3,35
10	7	1,553979	2,64
11	7,5	1,64115	2,81
12	15,5	4,418492	7,59
13	5	0,429025	0,74
14 (1)	7,5	1,335165	2,27
15 (12)	8	3,474896	5,94

6 Tulosten tarkastelu

6.1 Esikäsittelyn toimivuus

Tärkeimpänä huomiona opinnäytetyön tuloksissa mahtaa olla happokäsittelyn vaikutus etanolin saantoon. Tuloksien perusteella voidaan melko varmasti todeta, ettei happokäsittely paranna etanolin saantoa kyseisellä raaka-aineella. Joissain tapauksissa sillä näyttäisi olevan jopa negatiivinen vaikutus etanolin saantoon. Materiaali on käynyt tehtaalla läpi niin monet kemikaalikäsittelyt, joten esikäsittely näyttäisi olevan täysin turha vaihe kyseisen materiaalin kohdalla.

Vaikka esikäsittelyllä ei näyttäisi koetulosten perusteella olevan vaikutusta etanolin saantoon, niin raaka-aineen ulkonäkö muuttui huomattavasti. Esikäsittelemätön raaka-aine oli väriltään mustaa ja koostumukseltaan tiiviimpää kuin esikäsitelty raaka-aine, jonka väri myös muuttui esikäsittelyn seurauksesta ruskeaksi (kuva 27).



Kuva 27. Vasemmalla esikäsittelemätön ja oikealla esikäsitelty raaka-aine käymisreaktion jälkeen (Kuva: Jesse Seila).

6.2 Entsyymien toimivuus

Tarkasteltaessa eri entsyymien toimivuutta, ei voida yksiselitteisesti sanoa kumpi entsyymeistä on parempi. Kumpikin sellulaasi näyttäisi toimivan, jos katsotaan kahta parhaiten onnistunutta koetta, jotka olivat koe 1 ja koe 12, toisessa käytettiin *Trichoderma sp.* entsyymiä ja toisessa *Aspergillus sp.* entsyymiä. Koe 13 taas tehtiin ilman esikäsitteilyä ja entsyymiä ja tästä kokeesta saatiin selvästi huonoin tulos, konversioasteeksi saatiin vaivaiset 0,74 prosenttia. Näin ollen entsyymillä on selvästi prosessia tehostava vaikutus.

6.3 Sokereiden muodostus

Sokerimittausten perusteella voitaisiin todeta, että *Aspergillus sp.* entsyymi alkaa tuottamaan sokereita hieman hitaammin. Lähes kaikissa *Aspergillus sp.* entsyymillä tehdyissä kokeissa, pois lukien 10, 12 ja 15, glukoosia ei ollut muodostunut vielä 24 tunnin kuluttua entsyymien lisäämisestä käymisastiaan. Näissä kolmessa kokeessa esikäsitteily poikkesi muista kokeista tai puuttui kokonaan. Tällä voi olla merkitystä sokerien muodostumiseen.

6.4 Entsyymien määrän vaikutus

Entsyymien määrän lisäämisellä ei näyttäisi olevan kokeiden perusteella vaikutusta etanolin saantoon. Todennäköisesti kokeissa käytetyt minimi määrät, 0,25 g *Trichoderma sp.* entsyymiä ja 20 ml *Aspergillus sp.* entsyymiä n. 60 g kuiva-ainetta kohden oli jo reilu annostus. Näin ollen entsyymiannostuksen lisäämisellä kaksinkertaiseksi, kuten teimme *Aspergillus sp.* entsyymien kohdalla, ei saavutettu merkittävää parannusta etanolin saantoon. Se ei tosin näyttänyt haittaavaankaan prosessia.

6.5 Tulosten vertailua

Tiaisen (2020) kirjoittamassa vasun verkkojulkaisussa on esillä Uusiutuva energia liikenteessä –kurssilla vuonna 2020 tehdyt kokeiden tulokset. Kyseisestä materiaalista ei ole tehty muita kokeita liittyen bioetanoliin. Kokeita tehtiin kurssilla yhteensä neljä. Alla on esitettyinä tehtyjen kokeiden tulokset.

Taulukossa 6 on esitetty raaka-aineen lähtötiedot ja esikäsitteilytekniikat. Esikäsitteilyä käytettiin happoesikäsitteilyä ja kuumakäsitteilyä ilman happoa. Lisäksi kaikissa kokeissa raaka-ainetta hienonnettiin jauhamalla, jota ei omissa kokeissa tehty, sillä raaka-aines oli jo tarpeeksi hienojakoista.

Taulukko 6. Esikäsitteilytekniikat ja raaka-aineen lähtötiedot.

Koe numero	Esikäsitteily	Raaka-aineen massa (g)	Kuiva-ainepitoisuus (%)	Kuiva-aineen massa (g)
PR1 B	jauhanta + happo	158,4	38	59,9
PR1 C	kuumakäsitteily, jauhanta	158,3	38	60,2
PR2 B	jauhanta + happo	160	27	43,4
PR2 C	kuumakäsitteily, jauhanta	160,72	27	43,6

Taulukossa 7 on esitettyä esikäsittelyssä käytettyjen happojen vahvuudet sekä reaktioajat ja -lämpötilat. Kuumennusajat olivat tekemiimme kokeisiin verrattuna lyhyet, mutta lämpötilat jotakuinkin samat.

Taulukko 7. Hapon vahvuus ja -määrä sekä reaktioaika ja -lämpötila.

Koe numero	Hapon vahvuus-% ja määrä (ml)	Reaktioaika (min) ja lämpötila (C°)
PR1 B	10 til-% rikkihappoa 500 ml	-
PR1 C	-	3min, 100 C°
PR2 B	20 til-% rikkihappoa 500 ml	12min, 107 C°
PR2 C	-	-

Taulukossa 8 on esitettyä kokeissa käytetyt entsyymit ja niiden määrät sekä so-kerimittaukset ja hiivan määrät. Entsyymit olivat samoja, joita käytettiin omissa kokeissa, mutta entsyymiliuosten voimakkuudesta ei voida olla varmoja. Hiivan määrä oli suurempi kuin omissa kokeissa käyttämämme, mutta tällä tuskin oli vaikutusta lopputulokseen.

Taulukko 8. Entsyymit, glukoosimittaukset ja käytetyn hiivan määrä.

Koe numero	Entsyymin määrä (g/ml)	Glukoosin määrä 0,5 h	Hiivan määrä (g)
PR1 B	Trichoderma sp. 15 ml	low	5
PR1 C	Trichoderma sp. 15 ml	2,1	5
PR2 B	Aspergillus sp. 15 ml	low	5
PR2 C	Aspergillus sp. 15 ml	low	5

Taulukossa 9 on esitettyä tislauksen alku- ja lopputilanteen tiedot. Tislattavat määrät olivat osassa kokeita huomattavasti pienemmät verrattuna omiin kokeisiimme.

Taulukko 9. Tislauksen alku- ja lopputilanne.

Koe numero	Tislattavan nesteen tilavuus (ml)	Tisleen massa (g)	Tisleen tiheys (g/ml)
PR1 B	250	5,59	0,96505
PR1 C	400	14,95	0,9861
PR2 B	290	37,75	0,98596
PR2 C	500	14,28	0,98784

Taulukossa 10 on esitettyä tisleiden tiedot ja raaka-aineen konversioasteet. Kokeissa saadut etanolin määrät ja konversioasteet olivat hyvin samankaltaisia omiin kokeisiimme verrattuna.

Taulukko 10. Tisleen tiedot ja raaka-aineen konversioaste.

Koe numero	Tisleen etanoli määrä (m-%)	Etanolin massa (g)	Raaka-aineen konversioaste etanoliksi (%)
PR1 B	23	4,6027785	2,1
PR1 C	7	0,763741	1,7
PR2 B	7,5	2,354955	6,5
PR2 C	6	2,3783085	2

7 Pohdinta

7.1 Teoreettinen etanolin saanto

Tehtaasta tulee vuodessa 20 000 tonnia materiaalia, jonka kuiva-aineprosentti on noin 39 % (Pakarinen 2020). Näin ollen etanolin valmistukseen olisi käytettävissä 7 800 tonnia kuiva-ainetta. Etanolin saanto olisi 4 % konversioasteella 312 tonnia ja 8 % konversioasteella 624 tonnia etanolia. Etanolin tiheyden ollessa noin 0,79 kg/l, saataisiin vuodessa noin 394 937 ja 789 873 litraa puhdasta etanolia esimerkin konversioasteilla.

7.2 Taloudellista pohdintaa

Kokeessa 1 käytettiin 0,25 g *Trichoderma* sp. entsyymiä ja tällä määrällä saatiin noin 4,60 grammaa puhdasta etanolia. 1:n etanoligramman tuottamiseen kului näin ollen 0,054 grammaa *Trichoderma* sp. entsyymiä. 1 g pakkaus *Trichoderma* sp. entsyymiä maksoi Sigma Aldrichilla 166 €. Yhden etanoligramman tuottaminen kyseisessä kokeessa maksoi entsyymin osalta 8,96 €. Yksi litra etanolia painaa n. 790 g tiheyden ollessa 0,79 kg/l. Näin ollen etanolin litrahinnaksi tulisi entsyymin osalta n. 7078 €.

Kokeessa 12 käytettiin 40 ml *Aspergillus* sp. entsyymiä ja tällä määrällä saatiin noin 4,42 grammaa puhdasta etanolia. Näin ollen tuottaessa 1 g etanolia tarvitaan noin 9 ml entsyymiä. 250 ml pullo *Aspergillus* sp. entsyymiä maksoi 160 € Sigma Aldrichilla. Näin ollen 1 ml maksoi 0,64 €. Yhden etanoligramman tuottaminen kyseisessä kokeessa maksoi entsyymin osalta 5,76 €. Yksi litra etanolia painaa n. 790 g tiheyden ollessa 0,79 kg/l. Näin ollen etanolin litrahinnaksi tulisi entsyymin osalta n. 4 550 €.

Kokeessa 13, joka tehtiin ilman esikäsitteilyä ja entsyymiä, saavutettiin 0,74 % konversioaste. Jos ajatellaan, että ilman materiaalin esikäsitteilyä ja ilman entsyymiä, voitaisiin päästä keskimäärin 0,5 % konversioasteeseen, voitaisiin

7 800 tonnin kuiva-aine määrästä saada teoreettisesti 39 tonnia etanolia. Etanolin tiheyden ollessa 0,79 kg/l, vastaisi tämä 49 367 litraa puhdasta etanolia. Tämä edellyttäisi ainoastaan hiivan ja veden lisäämistä materiaalin joukkoon sekä asianmukaiset laitteistot materiaalin käsittelyyn ja tislaukseen. Saatu etanolin määrä ei ole merkittävä, mutta tämä olisi mahdollisesti kaikkein kustannustehokkain tapa tuottaa etanolia kyseisestä materiaalista. Lisäksi veden poiston jälkeen, kyseinen materiaali, on lähes saman kaltaista kuin ennen etanoliksi käyttämistä. Siihen ei sitoudu uusia kemikaaleja, eikä sivutuotteena synny ongelmallisia happovesiä kuten materiaalia happoesikäsiteltäessä.

Tehtyjen kokeiden raaka-aineen konversioasteet jäivät melko vaatimattomiksi, parhaimmillaan päästiin noin 8 %:iin ja suurimmassa osassa kokeita noin 4 % tuntumaan entsyymien käytöstä huolimatta. Vertailuna esim. biojätettä raaka-aineena käytettäessä voidaan päästä jopa 20,5 % konversioasteeseen (Rättö, Vikman & Siika-Aho 2009, 40).

Opinnäytetyöstä saadut tulokset kertovat melko yksiselitteisesti, ettei bioetanolin valmistaminen ole kovinkaan järkevää kyseisestä materiaalista. On syytä huomioida, että kokeissa käytetyt entsyymit erät olivat pieniä ja erittäin korkealaatuisia. Suuria eriä tilatessa entsyymien kustannukset voivat olla paljon matalammat. VTT:n tiedotteessa entsyymin hinnaksi arvioitiin 250 €/t etanolia (Weymarn, N. 2007).

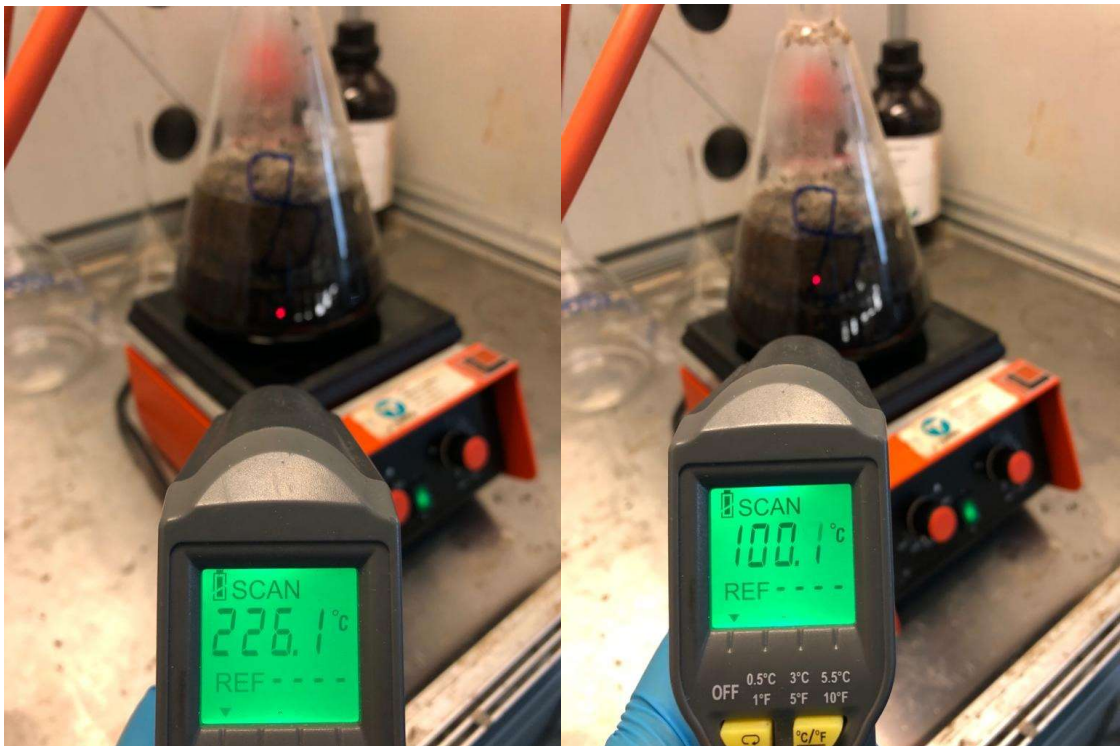
Yksi tonni etanolia vastaa 1265,8 litraa etanolia tiheyden ollessa 0,79 kg/l. Jos entsyymien kustannus olisi 250 €/t, tulisi yhden etanoli litran entsyymikustannukseksi näin ollen vain 19,8 snt. Tällöin entsyymien kustannukset olisivat kohdullisella tasolla, mutta edelleen ollen merkittävä kuluerä bioetanolin valmistuksessa. Kyseisessä tapauksessa raaka-aineen ollessa ilmaista, koituu suurimmat kulut todennäköisesti entsyymien hankinnasta.

7.3 Kokeiden epävarmuustekijöitä

Tekemiimme kokeisiin liittyy joitain epävarmuustekijöitä, jotka voivat vaikuttaa kokeiden lopputuloksiin.

Materiaaleja ja valmista tuotetta punnittiin lukemattomia kertoja kokeiden aikana. Punnituksissa on voinut tapahtua pieniä heittoja. Punnitukset tehtiin kuitenkin huolellisesti ja asianmukaisilla laitteilla.

Materiaalia lämmitettäessä happoseoksessa, oikean lämpötilan löytämisessä ja pitämisessä haluttuna on eroja eri kokeiden kohdalla. Happoa lämmitettäessä täytyi varmistua, ettei se pääse kuohumaan yli keitinastiasta. Myös lämpötilan mittaaminen oli suuntaa antavaa, koska happoseos oli luonnollisesti eri lämpöinen eri syvyyksiltä (kuva 28). Näin ollen kokeen täsmällinen toistaminen on haastavaa.



Kuva 28. Lämpötilan erot pohjalla ja pinnassa (Kuva: Jesse Seila).

Raaka-aine sisälsi runsaasti rikkiyhdisteitä, joiden vaikutuksesta käymisprosessiin ei ole varmuutta. Yleisesti ottaen rikkiyhdisteitä käytetään säilöntäaineina

esim. elintarvikkeissa (Ruokavirasto 2021). Näin ollen voisi olettaa, että rikki olisi käymisprosessia haittaava tekijä.

7.4 Valmistuksen ongelmat ja jatkotutkimus

Suurin ongelma etanolin valmistuksessa kuitusavesta on entsyymien korkea hinta. Nykyisillä entsyymien hinnoilla ja opinnäytetystä saatujen tulosten perusteella tuotanto ei näyttäisi olevan kannattavaa.

Opinnäytetyössä entsyymien määrät olivat jaettuna sopiviin annoksiin, niin että entsyymiä riitti kaikkiin testeihin, joita haluttiin tehdä. Mitään tarkempaa annostelumetodia ei käytetty. Jatkotutkimusten kannalta olisi tärkeä selvittää, mikä on optimaalisin annostus entsyymien kohdalla, koska niistä koostuvat prosessin suurimmat kulut. Entsyymien hintojen laskiessa voisi niiden käyttäminen olla järkevää taloudellisesta näkökulmasta.

Lisäksi jatkotutkimuksissa olisi hyvä selvittää raaka-aineessa olevan rikin roolia etanolin saantoon ja koko käymisprosessiin. Rikki voi olla merkittävä tekijä prosessin onnistumiseen sillä rikkiyhdisteitä käytetään säilöntäaineena mm. elintarvikkeissa ja se voi täten haitata esimerkiksi käymisreaktiota. Sen roolia olisi hyvä tutkia.

Lähteet

- Autoalan tiedotuskeskus. 2021. Nestemäiset biopolttoaineet. https://www.aut.fi/tieliikenne/polttoaineet_ja_kayttovoimat/biopolttoaineet. 14.4.2021.
- Etanolin kansainvälinen kemikaalikortti. 2020. http://www.ilo.org/dyn/icsc/show-card.display?p_lang=fi&p_card_id=0044&p_version=2. 14.4.2021.
- Etanolitaulukko. Karelia AMK. Uusiutuvat energiat liikenteessä. https://moodle.karelia.fi/pluginfile.php/225890/mod_resource/content/0/etanolitaulukko.pdf. 21.4.2021.
- Home, S. 2002. Tiede. Tiede-lehden verkkojulkaisu. 11.1.2021.
- Knowpulp. 2021. Sellunkeiton periaate. https://www.knowpulp.com/www_demo_version/suomi/pulping/general/2_cooking/frame.htm. 14.4.2021.
- Motiva. 2021. Nestemäiset biopolttoaineet. https://www.motiva.fi/ratkaisut/uusiutuva_energia/bioenergia/nestemaiset_biopolttoaineet. 14.4.2021.
- Nevalainen, T. 2012. Kartonkijätteestä bioetanolia - Hydrolysoitujen sokerien erotus ja väkevöinti fermentointia varten. Lappeenrannan teknillinen yliopisto. Teknillinen tiedekunta. Diplomityö. <https://lut-pub.lut.fi/bitstream/handle/10024/77388/Diplomity%C3%B6%20Tuomas%20Nevalainen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. 14.4.2021.
- Pakarinen, T. 2020. Henkilökohtainen tiedonanto. 19.3.2020.
- Peda.net 2021. Orgaaninen kemia. Hiilihydraatit. <https://peda.net/kannus/jvk/oppiaineet2/kemia/kemia32/oppikirja/III/15>. 14.4.2021.
- Ruokavirasto. 2021. Lisäaineet. <https://www.ruokavirasto.fi/henkiloasiakkaat/tietoa-elintarvikkeista/ruoka-allergeenit/yleisimmat-ruoka-allergian-aiheuttajat/lisaaineet/> 14.4.2021.
- Rättö, M., Vikman, M. & Siika-Aho, M. 2009. VTT tiedotteita. Yhdyskuntajätteen hyödyntäminen biojalostamossa. ISBN 978-951-38-7311-0. 14.4.2021.
- Sigma Aldrich. 2020. Cellulase from *Aspergillus* sp. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2605?lang=fi®ion=FI>. 18.12.2020.
- Sigma Aldrich. 2020. Cellulase from *Trichoderma* sp. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1794?lang=fi®ion=FI>. 18.12.2020.
- Sitra. 2021a. Tulevaisuussanasto. Ensimmäisen sukupolven biopolttoaine. <https://www.sitra.fi/tulevaisuussanasto/ensimmaisen-sukupolven-biopolttoaine/> 14.4.2021.
- Sitra. 2021b. Tulevaisuussanasto. Toisen sukupolven biopolttoaine. <https://www.sitra.fi/tulevaisuussanasto/toisen-sukupolven-biopolttoaine/> 14.4.2021.
- Stora Enso. 2021a. Stora Enson verkkosivut. <https://www.storaenso.com/> 18.12.2020.
- Stora Enso. 2021b. Varkauden tehdas. <https://www.storaenso.com/fi-fi/about-stora-enso/stora-enso-locations/varkaus-mill>. 18.12.2020.
- Suokko A. 2010. VTT tiedotteita 2533. Lignoselluloosaetanolin ja synteesikaausta fermentoitujen polttonesteiden teknologiataarkastelu. ISBN 978-951-38-7576-3. 14.4.2021.

- Taulukot. 2021. Taulukkokirja verkossa https://www.taulukot.com/fysiikka/mekaniikka_termodynamiikka/ 11.1.2021.
- Tiainen, E. 2020. Vasu. Karelia -ammattikorkeakoulun verkkojulkaisu. <https://vanha.karelia.fi/vasu/2020/04/03/bioetanolia-jatevedenpuhdistamon-kuitupuristeesta/> 5.1.2021.
- Turunen, S. 2021. Opetus.tv. Tislaus. <https://opetus.tv/ylakoulu/kemia/aineiden-erotusmenetelmat/tislaus/> 15.4.2021.
- Virtuaali.tkk. 2005a. Imusuodatus. <http://virtuaali.tkk.fi/fi/orgaaninenkemia/lab-raopas/menetelmat/erottelu/imusuodatus/imusuodatus.htm>. 15.4.2021
- Virtuaali.tkk. 2005b. Refluksointi. <http://virtuaali.tkk.fi/fi/orgaaninenkemia/lab-raopas/menetelmat/reaksuoritus/refluksointi/refluksointi.htm>. 15.4.2021.
- Weymarn, N. 2007. VTT tiedotteita 2412. Bioetanolia maatalouden selluloosavirroista. ISBN 978-951-38-6968-7. 14.4.2021.

Eurofins Ahma Oy
Teollisuustie 6
96100 Rovaniemi

Saaja:
Stora Enso Oyj / Varkaus Mill

SE-831 88 Östersund
78201 SWEDEN

Tilauksen tiedot:
Asiakastunnus: 131283
Tilaustunnus: O-18-02050
Tilauksen kuvaus: Kuitupuriste 1 kpl,

Näytetunnus:	Kuvaus:	Tulos	U	LOQ	Menetelmä / Laboratorio
O-18-02050-001	Kuitupuriste				
Näyte otettu: 27.9.2018	Vastaanottopvm: 1.10.2018				Tutkimus aloitettu: 3.10.2018 0:00:00
Näytetyyppi: Kiinteä näyte	Näytteenottaja:				
Analyytit	Yksikkö	Tulos	U	LOQ	Menetelmä / Laboratorio
Kompostin kypsäys (hiilidioksidin tuotto)	mg C/g VS	6,8		0,2	/ AEFV
Mikrobiologiset tutkimukset					
Salmonella *	pmy/g	Ei todettu			NMKL 71:1999 / ARAM
E. coli *	pmy/g	<10			NMKL 125: 2005 mod. / ARAM
Fysikaalis-kemialliset tutkimukset					
Hehkutushäviö (550 °C)	% ka	84,0			SFS-EN 12879:2000 / OUL
pH (1:5)		6,4			ISO 10390:2005 / OUL
Tilavuuspaino	g/l	370			
Orgaaninen hiili, TOC *	% ka	42 ± 28%	0,3		SFS-EN 13137, ISO 10694 / ARAM
Kosteuspitoisuus (105 °C)	%	65,7			ISO 11465:1993 / OUL
Kuiva-ainepitoisuus (105 °C)	%	34,3			ISO 11465:1993 / OUL
Vesiliukoinen fosfori, P	mg/kg ka	2,4			SFS-EN 13652 / OUL
Vesiliukoinen fosfori, P	mg / l	0,2			SFS-EN 13652 / OUL
	(tuore)				
Vesiliukoinen mineraalityppi, N	mg/kg ka	470			SFS-EN 13652 / OUL
Vesiliukoinen mineraalityppi, N	mg / l	59			SFS-EN 13652 / OUL
	(tuore)				
Alkuaineanalyytit					
Kokonaistyyppi, N	mg/kg ka	14900 ± 15%	100		SFS-EN 13654-1:en 2002 / OUL
Arseeni, As	mg/kg ka	<3 ± 25%	3		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Boori, B	mg/kg ka	8,0 ± 35%	4		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Kalsium, Ca	mg/kg ka	8430 ± 14%	50		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Kadmium, Cd	mg/kg ka	0,88 ± 26%	0,3		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Kromi, Cr	mg/kg ka	15 ± 20%	2		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Kupari, Cu	mg/kg ka	33 ± 20%	2		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Elohopea, Hg	mg/kg ka	0,060 ± 22%	0,04		EPA3051(HNO3/HCl),ISO 16772:2004 / OUL
Kalium, K	mg/kg ka	560 ± 25%	200		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Magnesium, Mg	mg/kg ka	1150 ± 15%	20		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Mangaani, Mn	mg/kg ka	170 ± 25%	5		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Nikkeli, Ni	mg/kg ka	13 ± 20%	1		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Fosfori, P	mg/kg ka	2470 ± 12%	20		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Lyijy, Pb	mg/kg ka	8,9 ± 25%	3		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Rikki, S	mg/kg ka	15000 ± 15%	50		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL
Sinkki, Zn	mg/kg ka	180 ± 15%	3		EPA3051(HNO3/HCl),SFS-EN ISO11885:09/OUL

* Menetelmä on akkreditoitu

U = Laajennettu mittausepävarmuus (k=2)
LOQ = Määritysraja

Kommentti

O-18-02050-001: Haitallisten metallien (As, Hg, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn) pitoisuudet alittavat MMMa 24/11 liitteen IV mukaiset enimmäispitoisuudet. Salmonella ja E Coli alittavat lannoitevalmisteissa sallitut ko. taudinaiheuttajien enimmäismäärät. Maanparannusaineena käytettävän tuotteen hajoamisasteen eli stabiiliisuuden arviointiin käytettävän hiilidioksidintuotetestin tulos 6,8 mg C/ vrk ylittää pakatuille tuotteille asetetun 3 mg/kg C/vrk.



Eurofins Ahma Oy
Teollisuustie 6
96100 Rovaniemi

Testausseleste

2 (2)
Raporttinumero: 085799
22.10.2018

22.10.2018

Tomi Nevanperä, Kemisti
044 588 5268, TomiNevanpera@eurofins.fi

Yhteyshenkilöt

Alkuaineanalytiikka: Ilkka Välimäki, 044 256 3322, IlkkaValimaki@eurofins.fi

Tulokset pätevät ainoastaan tässä seosteessa mainituille näytteille.
Tämän seosteen saa kopioida vain kokonaan. Muussa tapauksessa on
pyydyttävä lupa Eurofins Ahma Oy:ltä.

Menetelmäviittausten lopussa olevien laboratoriotunnusten selitteet:

AEFV = Eurofins Viljavuuspalvelu Oy

OUL = Eurofins Ahma Oy, Sammonkatu 8, 90570 Oulu, p. 044 588 5260

ARAM = Alihankinta, Eurofins Environment Testing Finland Oy

Laboratorio on FINAS-akkreditointipalvelun akkreditoima testauslaboratorio T131. Kuvaus akkreditoinnista on saatavissa
www.finas.fi tai laboratoriosta. Lausunto ei kuulu akkreditoinnin piiriin.



Pitoisuus (massa-%)	Tiheys (g/cm ³)	Taitekerroin	Pitoisuus (massa-%)	Tiheys (g/cm ³)	Taitekerroin	Pitoisuus (massa-%)	Tiheys (g/cm ³)	Taitekerroin
0,50	0,9973	1,3333	15,00	0,9752	1,3432	56,00	0,9004	1,3630
1,00	0,9963	1,3336	16,00	0,9739	1,3440	58,00	0,8958	1,3634
1,50	0,9954	1,3339	17,00	0,9726	1,3447	60,00	0,8911	1,3638
2,00	0,9945	1,3342	18,00	0,9713	1,3455	62,00	0,8865	1,3641
2,50	0,9936	1,3345	19,00	0,9700	1,3462	64,00	0,8818	1,3644
3,00	0,9927	1,3348	20,00	0,9687	1,3469	66,00	0,8771	1,3647
3,50	0,9918	1,3351	22,00	0,9660	1,3484	68,00	0,8724	1,3650
4,00	0,9910	1,3354	24,00	0,9632	1,3498	70,00	0,8676	1,3652
4,50	0,9902	1,3357	26,00	0,9602	1,3511	72,00	0,8629	1,3654
5,00	0,9893	1,3360	28,00	0,9571	1,3524	74,00	0,8581	1,3655
5,50	0,9885	1,3364	30,00	0,9539	1,3535	76,00	0,8533	1,3657
6,00	0,9878	1,3367	32,00	0,9504	1,3546	78,00	0,8485	1,3657
6,50	0,9870	1,3370	34,00	0,9468	1,3557	80,00	0,8436	1,3658
7,00	0,9862	1,3374	36,00	0,9431	1,3566	82,00	0,8387	1,3657
7,50	0,9855	1,3377	38,00	0,9392	1,3575	84,00	0,8335	1,3656
8,00	0,9847	1,3381	40,00	0,9352	1,3583	86,00	0,8284	1,3655
8,50	0,9840	1,3384	42,00	0,9311	1,3590	88,00	0,8232	1,3653
9,00	0,9833	1,3388	44,00	0,9269	1,3598	90,00	0,8180	1,3650
9,50	0,9826	1,3392	46,00	0,9227	1,3604	92,00	0,8125	1,3646
10,00	0,9819	1,3395	48,00	0,9183	1,3610	94,00	0,8070	1,3642
11,00	0,9805	1,3403	50,00	0,9139	1,3616	96,00	0,8013	1,3636
12,00	0,9792	1,3410	52,00	0,9095	1,3621	98,00	0,7954	1,3630
13,00	0,9778	1,3417	54,00	0,9049	1,3626	100,00	0,7893	1,3614
14,00	0,9765	1,3425						