



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

**SOKEREIDEN JA SOKERIOLIGOMEERIEN
NESTEKROMATOGRAFINEN ANALYSOINTI**

HALONEN LAURA

PROSESSITEKNIikka

Kandidaatintyö

Toukokuu 2020

TIIVISTELMÄ

Sokereiden ja sokerioligomeerien nestekromatografinen analysointi

Laura Halonen

Oulun yliopisto, Prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö 2020, 25 s.

Työn ohjaaja yliopistolla: Marja Mikola

Hemiselluloosa on raaka-aine, jota ei tällä hetkellä hyödynnetä laajalti teollisuudessa. Hemiselluloosaa on saatavilla lähes alueesta riippumatta, sillä puut ja peltokasvit sisältävät sitä runsaasti. Sen käyttömahdollisuuksista ja ominaisuuksista ei vielä tällä hetkellä tiedetä runsaasti. Tässä työssä keskitytään tutkimaan hemiselluloosarakenteen sokereiden ja sokerioligomeerien uuttamista ja analysointia.

Työn tarkoituksena oli selvittää mahdollisuuksia saada selville tiettyjen puulajien hemiselluloosarakenteesta uuttuvien erilaisten sokereiden ja sokerioligomeerien määrät sekä mahdollisuuksia niiden erottamiseen toisistaan. Valitut puulajit olivat Suomessa runsaasti esiintyvät mänty, kuusi ja koivu. Tavoitteena työssä oli saada kyseisten puulajien uutetuista liuoksista selkeät kromatogrammit nestekromatografilla. Näistä kromatogrammeista tarkoituksena oli saada selville puulajien sokeri- ja sokerioligomeerikoostumukset ja nähdä, kuinka hyvin komponentit pystytään erottamaan toisistaan.

Valittujen puulajien puuainesta uutettiin kuumavesiuutolla kahdessa eri lämpötilassa. Kokeissa havaittiin, että jokaisen puulajin kohdalla yksittäiset sokerit ovat näkyvissä kromatogrammeissa selvinä toisistaan erottuvina piikkeinä uuttaessa puuainesta pienemmässä lämpötilassa. Lämpötilaa nosttaessa sokereiden pitoisuudet nousevat ja piikit eivät enää erotu toisistaan yhtä hyvin. Pienemmässä lämpötilassa uutettujen puuainesten kromatogrammeista huomataan, että erikokoiset sokerit ja sokerioligomeerit on mahdollista tunnistaa ja erottaa toisistaan suhteellisen hyvin. Tämän pohjalta on hyvä lähteä tutkimaan ja kehittämään sokereiden ja sokerioligomeerien erottamista puuaineksesta lisää, sillä se on tässä työssä todettu mahdolliseksi.

Asiasanat: nestekromatografia, hemiselluloosa, uutto

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	4
2 KIRJALLISUUSKATSAUS	5
2.1 Nestekromatografian perusteet.....	5
2.2 Biomassan koostumus	5
2.3 Eri biomassalajien hemiselluloosan sokerikoostumus	6
2.3.1 Havupuiden hemiselluloosat.....	6
2.3.2 Lehtipuiden hemiselluloosat	7
2.3.3 Peltokasvien hemiselluloosat.....	8
2.4 Hemiselluloosan erottaminen biomassasta uuttamalla.....	9
3 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN	11
3.1 Komponenttien retentioaikojen määrittäminen	11
3.1.1 Sokereiden retentioajat	11
3.1.2 Happojen retentioajat.....	13
3.2 HPLC-kalibrointi.....	13
3.3 Sahanpuru-uutot	14
4 TULOSTEN TARKASTELU	15
4.1 Komponenttien retentioajat	15
4.1.1 Sokereiden retentioajat	16
4.1.2 Happojen retentioajat.....	17
4.2 HPLC-kalibrointi.....	18
4.3 Sahanpuru-uutot	19
5 YHTEENVETO	22
LÄHDELUETTELO	24

1 JOHDANTO

Puut ja peltokasvit sisältävät runsaasti hemiselluloosaa, jota tällä hetkellä ei hyödynnetä laajasti teollisuudessa. Puun massasta noin kolmasosa on hemiselluloosaa. Hemiselluloosaa on saatavilla laajalti sekä lähes alueesta riippumatta. Se on sopiva tulevaisuuden raaka-aine sen uusiutuvuuden ja ympäristöystävällisyyden vuoksi. Hemiselluloosalla voi olla hyvä tulevaisuus elintarvike- ja pakkausteollisuudessa sekä esimerkiksi biojalostomoilla. Hemiselluloosan käyttömahdollisuuksia sekä ominaisuuksia tutkitaan nykypäivänä runsaasti.

Työn tarkoituksena oli selvittää mahdollisuuksia saada selville kolmen tutkittavan puulajin hemiselluloosarakenteesta uutettavien erilaisten sokereiden määrät ja mahdollisuuksia niiden erottamiseen toisistaan. Tavoitteena työssä on saada haluttujen puulajien uutetuista liuoksisista tarpeeksi selkeät kromatogrammit, joista saadaan tarkasti selville kyseisten puulajien sokeri- ja sokerioligomeerikoostumukset. Kromatogrammien avulla on tavoitteena nähdä, kuinka hyvin komponentit pystytään erottamaan toisistaan. Toiveena on, että tutkimuksessa saatua tietoa voidaan käyttää ja soveltaa tulevaisuuden tutkimuksissa sekä mahdollisesti myös tulevaisuuden teollisuudessa.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Nestekromatografian perusteet

Kromatografialla on suuri merkitys kemiallisessa analyysissä. Kromatografia on erotusmenetelmä, joka koostuu paikallaan pysyvistä faasista ja liikkuvasta faasista. Näiden kahden faasin vuorovaikutus muodostaa lähtökohdan kromatografiselle erotukselle. Kromatografisessa analyysissä keskeistä on siis analysoitavien komponenttien erottaminen toisistaan. Kromatografiset tekniikat erotellaan liikkuvan faasin olomuodon mukaan. Näin ollen nestekromatografia koskee kaikkia niitä sovellutuksia, joissa liikkuva faasi on nestemuodossa. Erotus perustuu komponenttien erilaisiin vuorovaikutuksiin paikallaan pysyvän faasin ja liikkuvan faasin välillä, jotka saavat aikaan sen, että komponentit erottuvat toisistaan. (Ramos, 2013, s.1)

Nestekromatografiassa (HPLC) erotus tapahtuu kolonnin sisällä. Kolonni on ratkaiseva osa HPLC:tä, sillä kaksifaasisen järjestelmän rajoittaminen putkeen mahdollistaa liikkuvan faasin virtauksen täydellisen hallinnan, joka on yksi tarvittava perusparametri HPLC:n käytössä. (Ramos, 2013, s.2)

2.2 Biomassan koostumus

Biomassa on yleinen termi ei-fossiilisille ja komposiittisille biogeenisille kiinteille orgaanisille aineille, jotka ovat muodostuneet luonnon tai ihmisen toiminnasta johtuvissa prosesseissa. (Zhang & Wang, 2013, s.5) Biomassan muodostuminen liittyy joko suoraan tai epäsuoraan fotosynteesiin, ja se sisältää niin eläimet, kasvit, mikrobit kuin orgaaniset aineet, jotka ovat peräisin näistä prosesseista. Biomassa muodostuu pääasiassa kolmesta alkuaineesta, jotka ovat hiili, happi ja vety, mutta sisältää myös esimerkiksi rikkiä ja typpeä. Tämän lisäksi biomassa sisältää myös vapaita yhdisteitä, niin sanottuja uutteen, jotka voidaan uuttaa joko polaarilla tai poolittomilla orgaanisilla liuottimilla. (Wang & Luo, 2017, s.1-2)

Lignoselluloosapitoinen biomassa on monimutkainen heterogeeninen seos orgaanista ainetta, joka sisältää erilaisia kiinteitä ja nestemäisiä läheisesti toisiinsa liittyviä faaseja. Niin sanotun perusbiomassan orgaaniset komponentit sisältävät kolmea keskeistä biopolymeeriä, jotka muodostavat kasvien soluseinämän. Nämä kolme komponenttia

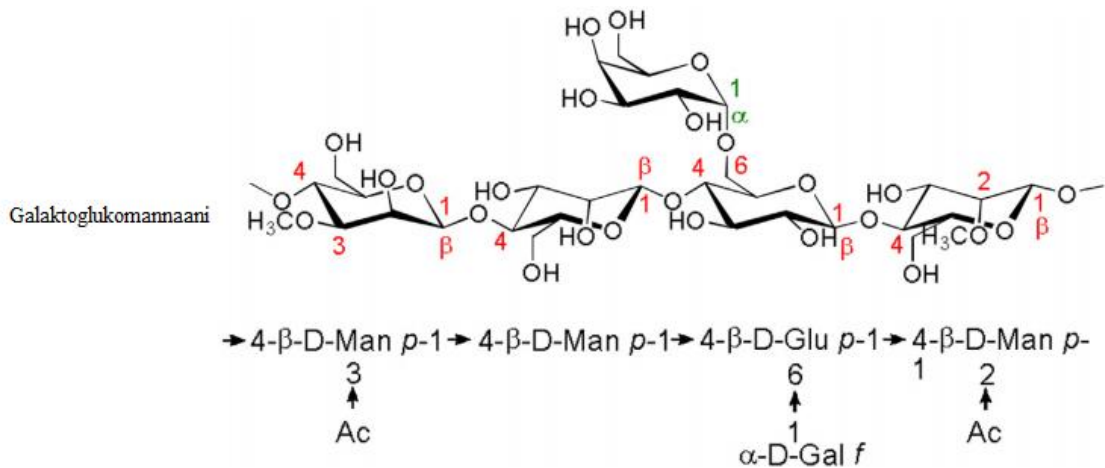
ovat selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini. Selluloosa ja hemiselluloosa sisältävät erilaisia sokerimonomeerejä ja ne ovat tiukasti sidottu yhteen ligniinin avulla. (Zhang & Wang, 2013, s.9) Selluloosan ja hemiselluloosan tai ligniinin välillä on yleensä vetysidoksia, kun taas hemiselluloosan ja ligniinin välillä on niiden lisäksi myös kovalenttisia sidoksia. (Wang & Luo, 2017, s.2)

Jotta biomassan rakenteen ymmärtäisi, on tärkeää tunnistaa kyseisen biomassan tyyppi, sillä rakenteet vaihtelevat erityyppisillä biomassoilla. Myös kasvin ikä biomassan keräämisen aikana vaikuttaa sen kemialliseen koostumukseen. Kasvin ikä korreloi sen aineenvaihduntaan ja fysiologiaan, kuten kykyyn imeä metaboliitteja maaperästä, ilmasta ja vedestä juurten ja ilmarakojen läpi sekä niiden kuljettamiseen ja keräämiseen kudoksiinsa. Myös kasvin maantieteellinen sijainti voi vaikuttaa sen metaboliseen rakenteeseen merkittävästi, ja aiheuttaa näin ollen vaihtelua biomassan rakenteeseen. (Zhang & Wang, 2013, s.10)

2.3 Eri biomassalajien hemiselluloosan sokerikoostumus

2.3.1 Havupuiden hemiselluloosat

Havupuiden tärkeimmät hemiselluloosat ovat galaktoglukomannaani (kuva 1), glukomannaani ja arabinoglukuronoksyylaani. Muita havupuiden hemiselluloosia ovat arabinogalaktaani, ksyloglukaani sekä muut glukaanit. Pääasialliset hemiselluloosat havupuissa eli (galakto)glukomannaanit koostuvat lineaarisesta tai hieman haarauneesta ketjusta sisältäen (1→4)-sidoksin yhteen muodostuneita β-D-mannopyranoosiyksiköitä ja β-D-glukopyranoosiyksiköitä, sekä sivuryhminä mannoosiin (1→6)-sidoksin linkittyneitä galaktoosiyksiköitä. Galaktoglukomannaaneja on kuitenkin kahdenlaisia: sellaisia, jotka sisältävät galaktoosiyksiköitä ja sellaisia, jotka eivät. Noin 10-15% havupuusta koostuu arabinoglukuronoksyylaanista, joka koostuu β-(1→4)-sidoksin yhteen muodostuneista ksylopyranoosiyksiköistä. Kyseisessä ksylaanissa on keskimäärin yksi 4-O-metyyliglukuronihapporyhmä noin 5-6 ksyloosiryhmää kohden ja yksi L-arabinoosiyksikkö noin 5-12 ksyloosiryhmää kohden. (Azhar, 2015, s. 3-4; Gelerstedt et al., 2009, s.107-108; Laine, 2005, s.15-16)



Kuva 1. Galaktoglukomannaanin rakennekaavio. (Mukaiillen Negahdar et al., 2016)

Metsäkuusi (*Picea abies*) on Pohjois-Euroopan teollisuuden tärkein havupuulaji. Metsäkuusen pääasialliset hemiselluloosat ovat asetyloidut galaktoglukomannaanit ja arabinoglukuronoksytaanit, jotka sisältävät pieniä hemiselluloosia kuten arabinogalaktaaneja. Metsäkuusen hemiselluloosapitoisuus puun kuivapainosta on noin 25%, ja noin 15% metsäkuusen kuivapainosta on galaktoglukomannaaneja. Kuusen sekä muiden yleisimpien havupuiden hemiselluloosapitoisuuksia on koottu taulukkoon 1 massaprosentteina. (Leppänen et al., 2011)

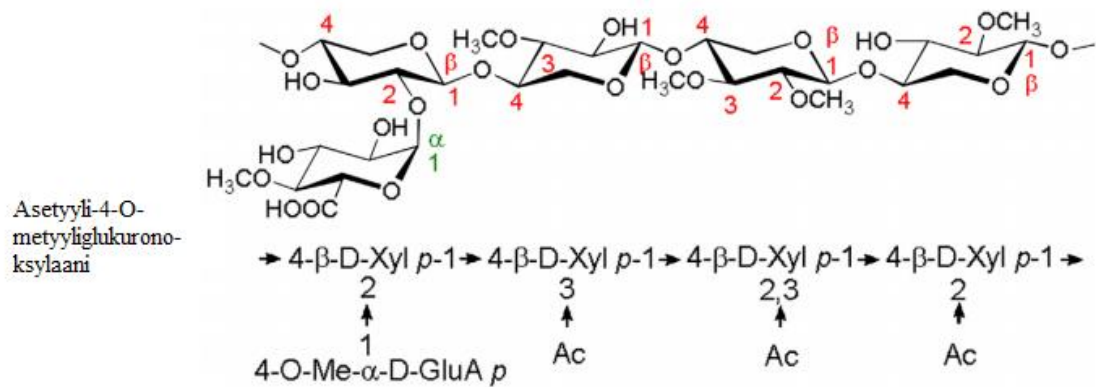
Taulukko 1. Havupuiden hemiselluloosapitoisuuksia massaprosentteina. (Mukaiillen Cirio et al., 2010; Otieno & Ahring, 2012)

Puulaji	Xylaani	Arabinaani	Mannaani	Galaktaani
Mänty	8,8	2,4	11,7	
Montereymänty	5,9	1,6	11,3	2,5
Kuusi	5,3-10,2	1,0-1,2	9,4-15,0	1,9-4,3
Douglaskuusi	6	3		3,7

2.3.2 Lehtipuiden hemiselluloosat

Lehtipuiden pääasiallinen hemiselluloosa on ksylaani, tarkemmin O-asetyyli-4-O-metyylliglukurono-β-D-ksylaani (kuva 2). Kuten myös havupuissa, lehtipuut sisältävät β-(1→4)-sidoksin yhteen muodostuneita ksylopyranoosiyksiköitä. Lehtipuut sisältävät myös glukomannaaniketjun, joka sisältää (1→4)-sidoksin yhteen muodostuneita β-D-

mannopyranoosiyksiköitä ja β -D-glukopyranoosiyksiköitä. Lehtipuissa glukomannaania on noin 3-5% puun kuivapainosta. Lehtipuiden O-asetyyli-4-O-metyyyliglukurono- β -D-ksylaaneissa on keskimäärin yksi glukuronoksylaasin sivuryhmä noin 8-20 ksylopyranoosiyksikköä kohden. Taulukkoon 2 on koottu yleisimpien lehtipuiden hemiselluloosapitoisuuksia massaprosentteina. (Laine, 2005, s. 18-19; Gelerstedt et al., 2009, s.109)



Kuva 2. Asetyyli-4-O-metyyyliglukuronoksylaanin rakennekaavio. (Mukaiillen Negahdar et al., 2016)

Taulukko 2. Lehtipuiden hemiselluloosapitoisuuksia massaprosentteina. (Mukaiillen Cirio et al., 2010; Otieno & Ahring, 2012)

Puulaji	Xylaani	Arabinaani	Mannaani	Galaktaani
Koivu	18,5-24,9	0,3-0,5	1,8-3,2	0,7-1,3
Haapa	18,0-27,3	0,7-4,0	0,9-2,4	0,6-1,5
Vaahtera	18,1-19,4	0,8-1,0	1,3-3,3	1
Valkotammi	18	2,4	2,9	0,4
Punatammi	18,9	1,9	2,7	
Eukalyptus	14,0-19,1	0,6-1,0	1,0-2,0	1,0-1,9

2.3.3 Peltokasvien hemiselluloosat

Olki koostuu yleensä arabinoksylaanista eli ksylaaniketjusta, johon on liittynyt arabinoosia β -(1 \rightarrow 4)-sidoksin. Oljen hemiselluloosasta noin 80% on ksylaania. Se voi sisältää ksylaanin ja arabinoosin lisäksi myös esimerkiksi galaktoosia tai mannoosia

pieninä määrinä. Taulukkoon 3 on koottu yleisimpien peltokasvien hemiselluloosapitoisuuksia massaprosentteina. (Lawther et al., 1996)

Taulukko 3. Peltokasvien hemiselluloosapitoisuuksia massaprosentteina. (Mukaiillen Cirio et al., 2010)

Kasvi	Xylaani	Arabinaani	Mannaani	Galaktaani
Vehnän olki	19,2-21,0	2,4-3,8	0-0,8	1,7-2,4
Ohran olki	15	4		
Riisin olki	14,8-23,0	2,7-4,5	1,8	0,4
Maissin varret	14,8-25,2	2,0-3,6	0,3-0,4	0,8-2,2

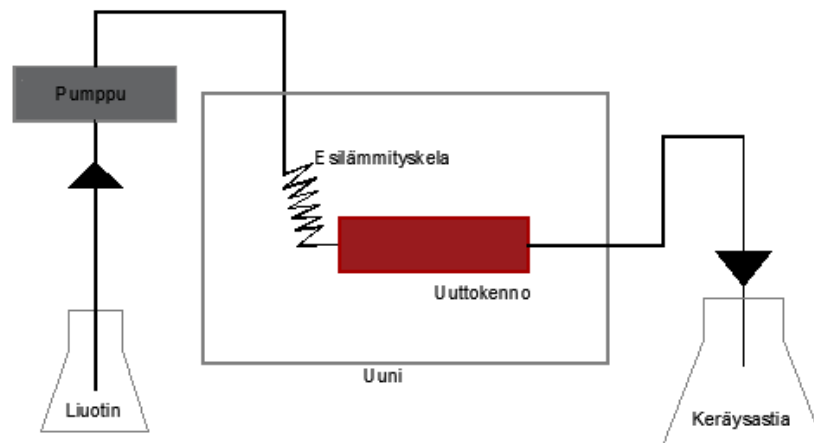
2.4 Hemiselluloosan erottaminen biomassasta uuttamalla

Paineistettu kuumavesiuutto (PHWE) on nykypäivänä yleisin uuttomenetelmä hemiselluloosan sokereiden erottamiseen puusta. Kyseisessä uuttomenetelmässä uuttoliuottimena toimii vesi, joka verrattuna muihin teollisesti käytettyihin liuottimiin on halpa, helppo käsitellä ja myrkytön. Paineistetussa kuumavesiuutossa käytettävä nestemäisessä olomuodossa oleva vesi on lämpötilaltaan veden kiehumispisteen yläpuolella (100°C/273 K, 0.1 MPa) ja sen kriittisen pisteen alapuolella (374°C/647 K, 22.1 MPa). Vesi pidetään nestemäisessä muodossa paineen avulla. (Krogell et al., 2013; Plaza & Turner, 2015) Tärkeimmät parametrit, jotka vaikuttavat kuumavesiuuton uuttotehokkuuteen ovat lämpötila, paine, uuttoaika, virtausnopeus sekä lisäaineiden läsnäolo. Lämpötila on näistä tärkein tekijä, joka voi vaikuttaa uuton tehokkuuteen sekä selektiivisyyteen. Se voi vaikuttaa veden fysikaalisiin ominaisuuksiin ja aiheuttaa helposti hajoavien yhdisteiden hajoamisen. Paineen säätäminen voi puolestaan vaikuttaa veden olomuotoon ja täten myös uuttotehokkuuteen. Joidenkin orgaanisten tai epäorgaanisten lisäaineiden lisääminen voi parantaa yhdisteiden liukoisuutta veteen ja lisätä kohdeyhdisteiden vuorovaikutusta veden kanssa. Ne voivat myös joissain tapauksissa muuttaa veden fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia korotetussa lämpötilassa. (Teo et al., 2010)

Päätarkoituksena hemiselluloosan kuumavesiuutossa on poistaa mahdollisimman paljon hemiselluloosaa puuaineksesta. Toimintaperiaate perustuu hemiselluloosan

liukenemiseen ja uuttamiseen puuaineksesta. Tämä saavutetaan polysakkaridien hydrolyysillä. Siinä polysakkaridit hydrolysoidaan pienemmiksi oligomeereiksi ja monosakkarideiksi. Joissain tapauksissa kuumavesiuuttoa tehostetaan katalyytillä. Katalyytin lisääminen voi aikaansaada tehokkaamman hydrolyysin. (Goldmann et al., 2017)

Tyypillisesti PHWE-uuttolaitteiston osia ovat vedenjakelu, liuottimen kuljettamiseen tarkoitettu pumppu, liuottimen lämmittämiseen tarkoitettu uuni, paineastia, jossa uutto tapahtuu, paineenhallintajärjestelmä ja uutteen keräysastia. Uuttojärjestelmä on havainnollistettu kuvaan 3. Kokoonpano koostuu ruostumattoman teräksen esilämmityskelasta, joka varmistaa, että vesi on käyttölämpötilassaan ennen ruostumattomaan uuttokennoon siirtymistä. Pumppu pumppaa nesteen uuttokennoon, ja uutto suoritetaan halutussa korotetussa lämpötilassa, jota ylläpitää kaasukromatografiauuni. Uuttamisprosessit toimivat paineissa, jotka ovat 10-60 barin välillä. Nesteen poistovirtausta säätelee vastapaineensäädin vastapaineen tuottamiseksi. Joissain tapauksissa kokoonpanoon lisätään toinen pumppu estämään saostumista veden jäähtyessä. (Teo et al., 2010)



Kuva 3. Tyypillisen PHWE-uuttolaitteiston kokoonpano. (Mukaillen Teo et al., 2010)

3 TUTKIMUKSEN SUORITTAMINEN

Työn tarkoituksena oli selvittää, onko mahdollista saada selville jonkin tietyn puulajin hemiselluloosarakenteen erilaisten sokereiden määrät ja erottaa ne kromatografissa toisistaan. Työ aloitettiin sokerikomponenttien retentioaikojen määrittämisellä, jotta saataisiin selville, että onko kyseiset sokerit ja sokerioligomeerit ylipäättään mahdollista erottaa toisistaan. Sahanpuru-uutoissa saattaa muodostua kahta erilaista happoa riippuen puulajista, joten seuraavaksi määritettiin näiden happojen retentioajat selvittääksemme niiden mahdolliset vaikutukset kromatografajoihin. Tämän jälkeen suoritettiin HPLC-kalibrointi. Lopuksi haluttujen puulajien sahanpurut uutettiin paineistettua kuumavesiuuttoa hyödyntävällä uuttolaitteistolla ja uutosta saadut liuokset ajettiin nestekromatografilla.

Työssä käytettiin Agilent 1200-sarjan nestekromatografiaa. Kolonnina käytettiin Phenomenex Rezex RSO-Oligosaccharide Ag+ 4%. Työssä oli käytössä myös esikolonne. Jokaisessa ajossa kolonnin lämpötilana käytettiin 85 astetta ja virtausnopeutena 0,3 ml/min. Työssä detektorina oli käytössä taitekerroindetektorin ja eluenttina vesi.

3.1 Komponenttien retentioaikojen määrittäminen

Ensimmäisenä ajoimme laitevalmistajan Phenomenex oligosakkaridi-standardin, jotta näkisimme, toimiiko käytetty kolonne meidän kromatografi-laitteistossa niin kuin sen kuuluisi. Kyseinen standardi sisältää maissisiirappia. Maissisiirappi koostuu tärkkelyksestä, ja näin ollen sisältää eri kokoisia glukoosiyksiköistä koostuvia oligomeerejä. Ajaminen jälkeen vertasimme sitä laitevalmistajan toimittamaan mallikromatogrammiin.

3.1.1 Sokereiden retentioajat

Työ aloitettiin tekemällä useista yleisistä sokereista niiden vesiliuokset noin 10 g/l pitoisuudella. Näitä sokereita oli arabinoosi, mannoosi, galaktoosi, ksyloosi, glukoosi, laktoosi, maltoosi, sakkaroosi, sellobioosi ja maltotriooosi. Liuokset tehtiin 10 ml:n lasiastioihin ja jokaista sokeria mitattiin noin 0,1 g. Taulukossa 4 on listattu jokaisen sokerin todellinen määrä 10 ml:ssa. Tämän jälkeen liuoksista pipetoitiin osa pieniin

viaaleihin kromatografia-ajoa varten. Kyseiset liuokset ajettiin kromatografian läpi, josta saatiin näiden sokereiden kromatogrammit OpenLab Chemstation -järjestelmään, joista pystyttiin lukemaan näiden retentioajat. Kaikkien työn liuoksien ajoaika kromatografissa oli tunti.

Taulukko 4. Ajettujen sokereiden todelliset määrät liuoksissa.

Sokeri	Todellinen määrä (g)
Arabinoosi	0,1022
Mannoosi	0,1018
Galaktoosi	0,1004
Ksyloosi	0,1016
Glukoosi	0,1003
Laktoosi	0,1004
Maltoosi	0,1008
Sakkaroosi	0,1015
Sellobioosi	0,1004
Maltotriooosi	n. 0,1
Raffinoosi	0,1252

Sokereiden vesiliuosten ajamisen jälkeen tehtiin kolme yhteisliuosta, jotka ajettiin kromatografian läpi. Jokaisen kolmen vesiliuoksen pitoisuudeksi päätettiin noin 10 g/l. Jokaiseen liuokseen pipetoitiin siis 10 ml deionisoitua vettä. Ensimmäisessä liuoksessa tämä saavutettaisiin sillä, että ksyloosia, mannoosia ja galaktoosia olisi kaikkia liuoksessa noin 0,033 g. Ajettu liuos sisälsi ksyloosia 0,0332 g, mannoosia 0,0335 g ja galaktoosia 0,0350 g. Toinen liuos sisälsi kaikki ajettut monosakkaridit eli arabinoosia, mannoosia, galaktoosia, ksyloosia ja glukoosia. Näiden teoreettiset ja todelliset määrät ovat taulukoitu taulukkoon 5. Kolmas liuos sisälsi kolme yleistä disakkaridia. Jotta haluttuun pitoisuuteen päästäisiin, olisi kaikkia kolmea oltava noin 0,33 g liuoksessa. Ajettu liuos sisälsi laktoosia 0,0335 g, maltoosia 0,0342 g ja sellobioosia 0,0336 g.

Taulukko 5. Toisen yhteisliuoksen sokereiden teoreettiset ja todelliset määrät.

Sokeri	Teoreettinen määrä (g)	Todellinen määrä (g)
Arabinoosi	0,02	0,0235
Mannoosi	0,12	0,124
Galaktoosi	0,04	0,041
Ksyloosi	0,04	0,04

Glukoosi	0,04	0,0399
----------	------	--------

3.1.2 Happojen retentioajat

Seuraavaksi tehtiin muurahaishapon ja etikkahapon laimennetut liuokset. Molempien happojen pitoisuuksiksi haluttiin noin 1 g/l. Tämän vaiheen tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako näiden happojen mahdollinen läsnäolo laitteistossa muihin tuloksiin, sillä todelliset uutot voivat sisältää näitä happoja. Muurahaishappoa pipetoitiin mittapulloon 0,041 ml, jonka jälkeen lisättiin 50 ml deionisoitua vettä. Seuraavaksi etikkahappoa pipetoitiin 0,048 ml mittapulloon ja lisättiin 50 ml deionisoitua vettä. Mittapulloista kaadettiin osa pienempiin lasiastioihin talteen, jonka jälkeen molemmista liuoksista pipetoitiin osa pieniin viaaleihin kromatografia varten ja suoritettiin ajo.

3.2 HPLC-kalibrointi

Seuraavaksi suoritettiin HPLC-kalibrointi. Tämä suoritettiin tekemällä kaikista käytetyistä monosakkarideista eli glukoosista, ksyloosista, mannoosista, galaktoosista ja arabinoosista kaksi työliuosta: standardi työliuos ja CVS-työliuos. Molempiin liuoksiin pipetoitiin 50 ml deionisoitua vettä. Taulukko 6 sisältää sekä standardin työliuoksen että CVS työliuoksen sokereiden teoreettiset ja todelliset massat.

Taulukko 6. Työliuoksien sokereiden teoreettiset ja todelliset määrät.

	Standardi työliuos		CVS työliuos	
	m(teor) (g)	m(tod) (g)	m (teor) (g)	m(tod) (g)
Arabinoosi	0,15	0,1513	0,13	0,1308
Mannoosi	0,15	0,1508	0,13	0,1299
Galaktoosi	0,15	0,1508	0,13	0,1306
Ksyloosi	0,15	0,1506	0,13	0,1309
Glukoosi	0,15	0,1511	0,13	0,1309

Standardista työliuoksesta tehtiin yhdeksän laimennettua liuosta. Työliuosta pipetoitiin tietty määrä riippuen laimeudesta lasiastioihin ja loput täydennettiin deionisoitulla vedellä niin, että liuos oli tilavuudeltaan 10 ml. Taulukosta 7 löytyy jokaisen

laimennetun liuoksen työliuoksen ja deionisoidun veden määrä. CVS-työliuokselle tehtiin kaksi laimennusta. CVS1 sisälsi 0,20 ml työliuosta ja 9,80 ml deionisoitua vettä. CVS2 sisälsi 3,00 ml työliuosta ja 7,00 ml deionisoitua vettä. CVS3 oli siis 10 ml itse työliuosta. Jokainen näistä pipetoitiin pieneen viaaliin ajoa varten, jonka jälkeen suoritettiin ajo kromatografilla.

Taulukko 7. Standardin työliuoksen laimennokset.

	Vtyöliuos (ml)	Vvesi (ml)
st1	0,1	9,9
st2	0,2	9,8
st3	0,4	9,6
st4	0,8	9,2
st5	1,4	8,6
st6	2,2	7,8
st7	3,4	6,6
st8	4,8	5,2
st9	7,2	2,8
st10 = työliuos	10	0

3.3 Sahanpuru-uutot

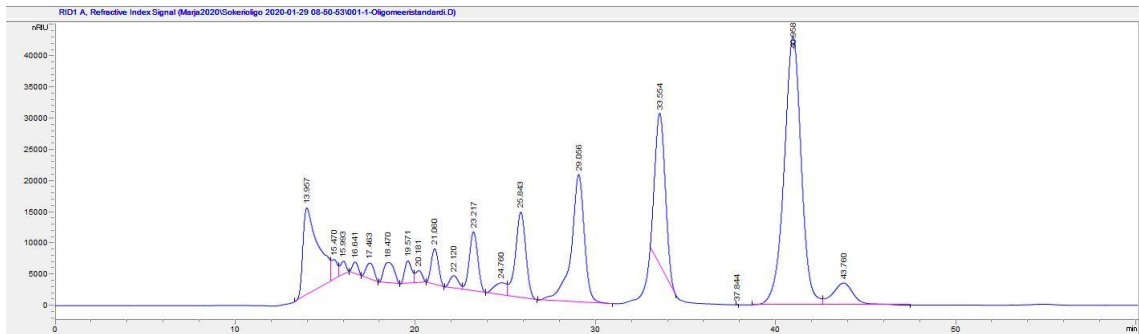
Tutkimuksessa käytettiin kolmen eri puulajin sahanpuruja. Näitä puulajeja oli mänty, kuusi ja koivu. Jokaista puulajia punnittiin tasan 11,3 g kahteen eri uuttokennoon. Työssä käytettiin Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extractor -uuttolaitteistoa. Uuttolaitteisto ensin pumppasi uuttoliuosta sahanpuruilla täytettyyn kennoon ja tämän jälkeen lämmitti kennon haluttuun lämpötilaan laitteiston uunissa. Kun määritelty aika oli kulunut, puhalsi se nesteen kennosta keräilypulloon. Ajoajaksi valitsimme 60 minuuttia ja uuttoliuoksena käytettiin vettä. Jokaisesta puulajista saatiin kaksi uutettua liuosta, ensimmäinen ajettiin 160 asteessa ja toinen 170 asteessa.

Ajosta saadut liukset kaadettiin pienempiin lasiastioihin, jonka jälkeen liuksista suodatettiin osa viaaleihin HPLC:a varten. Männystä ja kuusesta tulleet liukset suodattuivat hyvin, mutta koska koivusta tulleet liukset sisälsivät liian paljon sakkaa, täytyi ne käyttää ensin sentrifugissa. Tämän käsittelyn jälkeen suodatus onnistui hyvin.

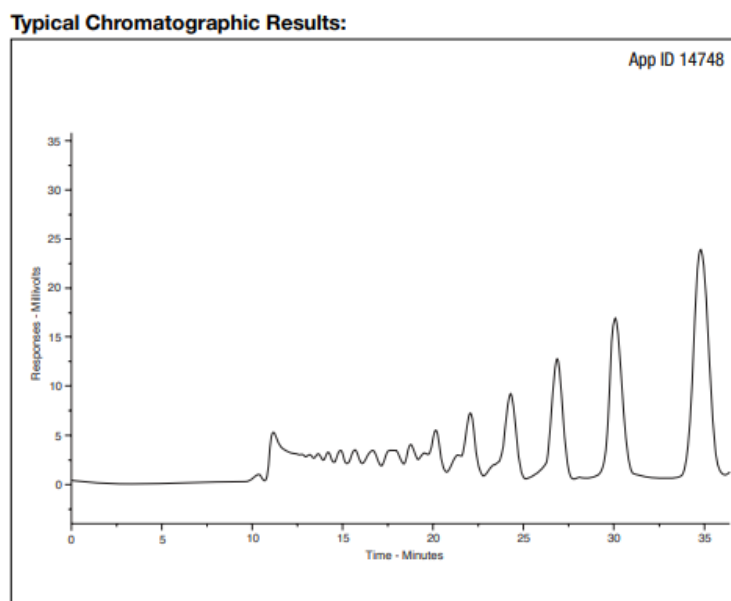
4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Komponenttien retentioajat

Ensimmäisenä ajettiin laitevalmistajan Phenomenex oligosakkarooosi-standardi. Tästä kromatogrammi löytyy kuvasta 4. Tätä verrattiin laitevalmistajan toimittamaan mallikromatogrammiin, joka löytyy kuvasta 5. Näitä kahta verrattiin, jotta saataisiin tietää, toimiiko kyseinen kolonni meidän kromatogrammi-laitteistossa kuten sen kuuluisi. Kuvia verratessa huomataan, että kromatogrammit ovat hyvinkin samanlaisia, josta voidaan päätellä kolonnin toimivan oikealla tavalla. Meidän ajossa saadun oligomeeristandardin piikki on hieman hitaampi, joka selittyy sillä, että käytössämme oli esikolonni, toisin kuin laitevalmistajan oligosakkarooosi-standardissa.



Kuva 4. Oligomeeristandardi.



Kuva 5. Kolonnin valmistajan oligosakkaridistandardi

4.1.1 Sokereiden retentioajat

Yleisimpien sokereiden vesiliuokset pitoisuudella 10 g/l ajettiin laitteiston läpi. Tästä saatiin kyseisten sokereiden retentioajat. Retentioaika tarkoittaa sitä aikaa, joka kuluu yhdisteen kulkeutumiseen kromatografisen systeemin läpi. Nämä löytyvät taulukosta 8.

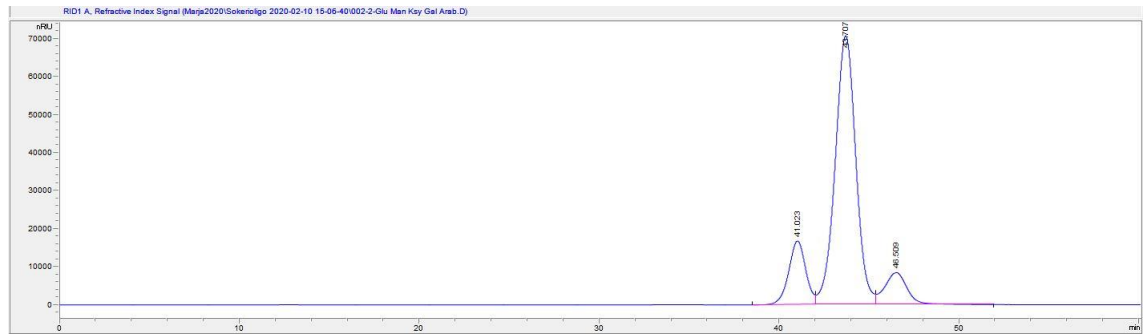
Taulukko 8. Testattujen sokereiden saadut retentioajat.

Sokeri	Retentioaika
Arabinoosi	46,3
Mannoosi	43,6
Galaktoosi	43,6
Ksyloosi	43,4
Glukoosi	41
Laktoosi	34,3
Maltoosi	33,8
Sakkaroosi	33
Sellobioosi	32,5
Maltotrioosi	29,1
Raffinoosi	28,1

Retentioaikojen tuloksista voidaan huomata, että esimerkiksi mannoosilla, galaktoosilla ja ksyloosilla, jotka kuuluvat monosakkarideihin, on lähes sama retentioaika. Tästä syystä näiden yhteisliuoksen yhteiskuvaajassa kaikki ovat piirtyneet samaan kohtaan, eikä kuvaajasta näin ollen voi tunnistaa yksittäistä sokeria. Tämä näkyy kuvassa 6. Myös monosakkarideihin kuuluvilla glukoosilla ja arabinoosilla sen sijaan on kuitenkin hieman eri retentioaika, jotka erottuvat näistä kolmesta muusta monosakkaridista myös yhteisliuoksessa. Tästä kertoo kuva 7.

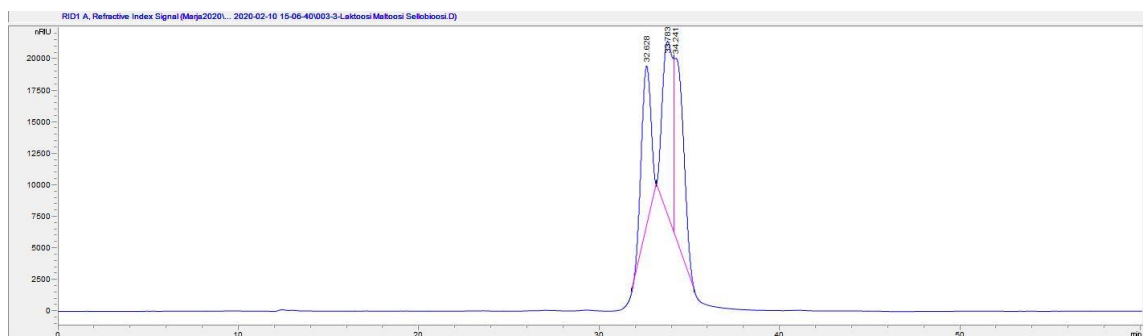


Kuva 6. Mannoosin, ksyloosin ja galaktoosin yhteiskuvaaja.



Kuva 7. Glukoosin, mannoosin, ksyloosin, galaktoosin ja arabinoosin yhteiskuvaaja.

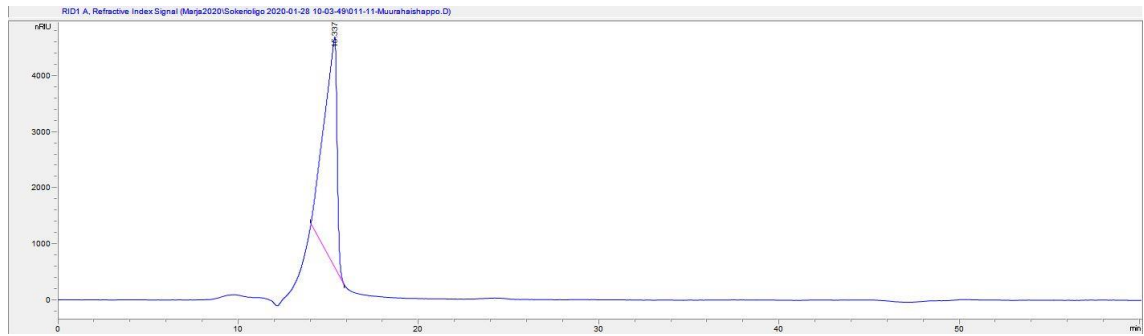
Laitteiston läpi ajettiin myös yhteisliuos sisältäen kolmea yleistä disakkaridia: laktoosia, maltoosia ja sellobioosia. Taulukon 1 mukaan näillä kolmella on aika läheiset retentioajat, mutta kuvan 8 mukaan sakkaroosi kuitenkin erottuu kahdesta muusta hieman, piirtyen kuitenkin samaan huippuun muiden kanssa.



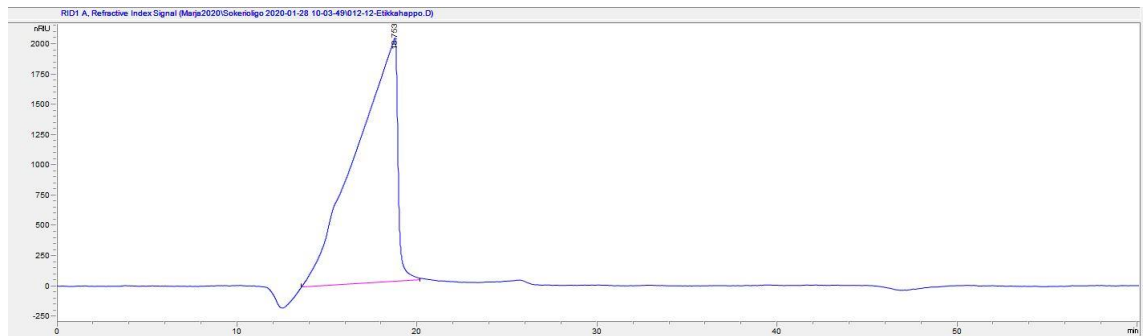
Kuva 8. Laktoosin, maltoosin ja sellobioosin yhteiskuvaaja.

4.1.2 Happojen retentioajat

Kromatografian läpi ajettiin myös kaksi happoa: muurahaishappo ja etikkahappo. Laitteiston läpi ajettavat happojen laimennetut vesiliuokset olivat pitoisuudeltaan noin 1 g/l. Näiden ajojien tarkoituksena oli selvittää, vaikuttaako näiden happojen läsnäolo edellä saatuihin tuloksiin. Kuten kuvasta 9 ja 10 huomataan, on näiden happojen retentioajat paljon pienemmät kuin käsiteltyjen sokereiden. Tästä syystä voidaan päätellä, että happojen mahdollisella läsnäololla ei olisi ollut suurta merkitystä aiempien kokeiden tuloksiin. Mikäli hapot kuitenkin häiritsevät joitakin kokeita, häiritsevät ne suurimpia oligomeerejä, jotka tulevat kolonnista aivan alussa. Kuitenkin happojen vaste on hyvin pieni verrattuna sokerioligomeerien vasteeseen.



Kuva 9. Muurahaishapon vesiliuoksen retentioaika.



Kuva 10. Etikkahapon vesiliuoksen retentioaika.

4.2 HPLC-kalibrointi

HPLC-kalibrointi toteutettiin tekemällä kaikista käytetyistä monosakkarideista kaksi työliuosta: standardi työliuos ja CVS-työliuos. Käytetyt monosakkaridit olivat glukoosi, ksyloosi, mannoosi, galaktoosi ja arabinoosi. Taulukosta 9 löytyy jokaisen CVS-työliuoksen monosakkaridien lasketut ja todelliset määrät liuoksessa. Taulukosta löytyy myös laskettu prosentuaalinen virhe todellisen ja lasketun määrän välillä. Kalibrointipisteet muodostivat hyvin lineaariset suorat koko kalibrointialueella.

Lukuun ottamatta CVS1-työliuoksen arabinoosia, jokaisen sokerin prosentuaalinen virhe on hyvin pieni (< 2 %), joten kalibrointi on hyvin onnistunut ja käytettävissä uutteen monomeerimääritykseen. CVS1-työliuoksessa arabinoosin prosentuaalinen virhe ylittää 5 %, joka selittyy sillä, että kyseessä on hyvin pieni pitoisuus, joten pieni ero integroinnissa, eli kromatogrammin pohjaviivan paikassa, aiheuttaa suhteessa suuren virheen. Kuitenkin kun kyseessä on hyvin pieni pitoisuus, käytännössä sen vaikutus tuloksiin on hyvin pieni.

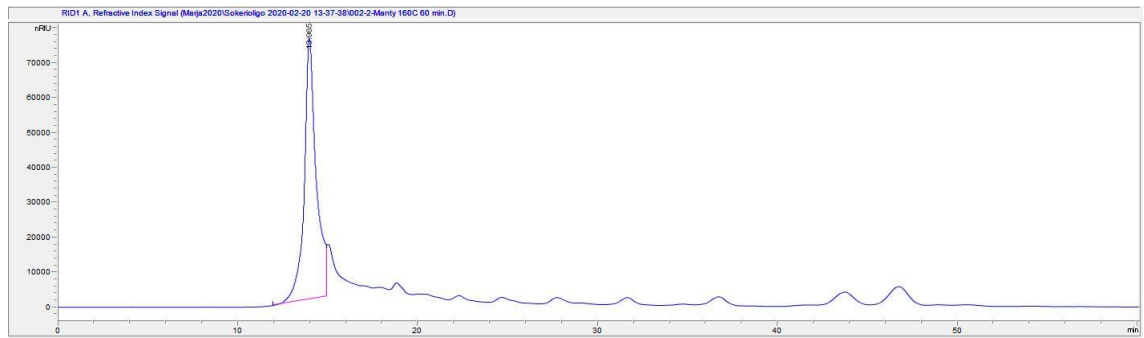
Taulukko 9. CVS-työliuoksien sokereiden lasketut ja todelliset määrät liuoksessa sekä laskettu prosentuaalinen virhe.

	Laskettu määrä	Todellinen määrä	Prosentuaalinen virhe (%)
CVS1:			
Glukoosi	0,0523	0,0526	0,57
KsyManGalakt	0,1566	0,1541	1,6
Arabinoosi	0,05236	0,05575	6,47
CVS2:			
Glukoosi	0,7848	0,7838	0,13
KsyManGalakt	2,348	2,359	0,47
Arabinoosi	0,7854	0,775	1,32
CVS3:			
Glukoosi	2,616	2,641	0,96
KsyManGalakt	7,828	7,941	1,44
Arabinoosi	2,618	2,642	0,92

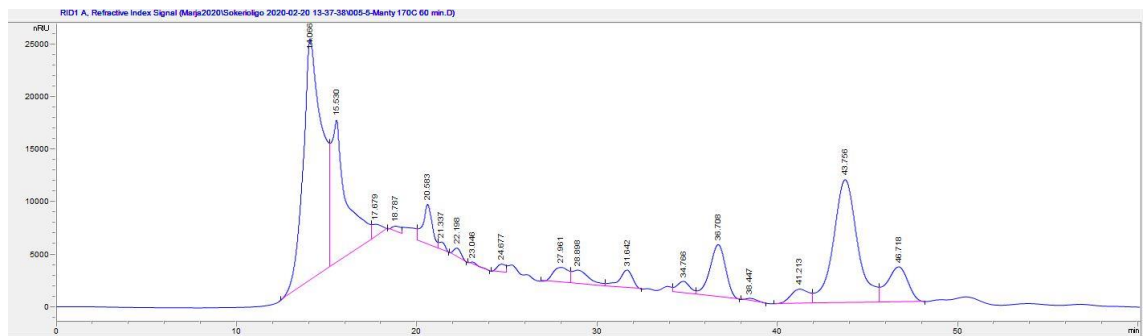
4.3 Sahanpuru-uutot

Kuumavesiuutoissa käytössä oli kolme eri puulajia: mänty, kuusi ja koivu. Näistä jokaisesta puulajista saatiin uutossa kaksi eri liuosta. Ensimmäiset näytteet uutettiin lämpötilassa 160 astetta. Näistä kromatogrammit löytyvät kuvista 11, 13 ja 15. Toiset näytteet uutettiin lämpötilassa 170 astetta. Näistä kromatogrammit löytyvät kuvista 12, 14 ja 16.

Verrataan kuvia 11 ja 12 toisiinsa. Nämä ovat männystä uutettuja liuosnäytteitä. Kuvasta 11 huomataan, että yksittäiset sokerit ovat näkyvissä selvinä toisistaan erottuvina piikkeinä, kun puuainesta uutetaan 160 asteessa. Kun lämpötilaa nostetaan 170 asteeseen (kuva 12), sokereiden pitoisuudet nousevat ja piikit eivät enää erotu toisistaan kunnolla vaan näkyvät kaikki samassa huipussa. Tästä voisi siis päätellä, että erikokoiset oligomeerit ovat nähtävissä selvinä piikkeinä vain silloin, kun niitä on määrällisesti vähän. Suurempienkin oligomeerimäärien tapauksissa saadaan kuitenkin suuntaa antavaa tietoa oligomeerien kokojakaumasta.

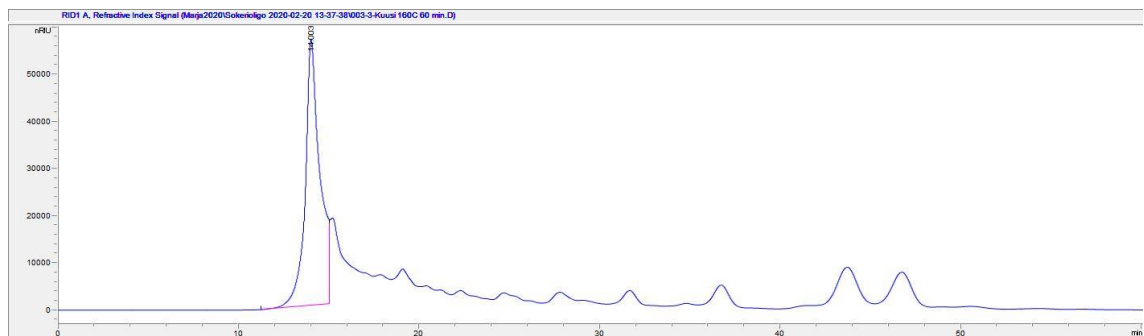


Kuva 11. 160 asteessa uutetun männyn kromatogrammi.

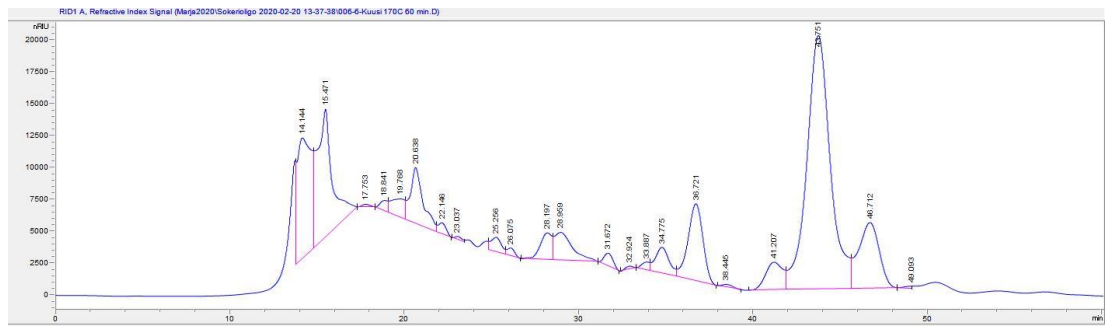


Kuva 12. 170 asteessa uutetun männyn kromatogrammi.

Verrataan kuvia 13 ja 14 toisiinsa. Nämä ovat kuusesta uutettuja liuosnäytteitä. Kuten männyn tapauksessa, niin myös kuusesta saaduista kromatogrammeista nähdään, että yksittäiset sokerit ovat näkyvissä selvempinä toisistaan erottuvina piikkeinä uutettuna 160 asteessa verrattuna 170 asteessa uutettuun liuosnäytteeseen. Tässäkin tapauksessa sokereiden pitoisuudet ovat pienempiä pienemmässä lämpötilassa.

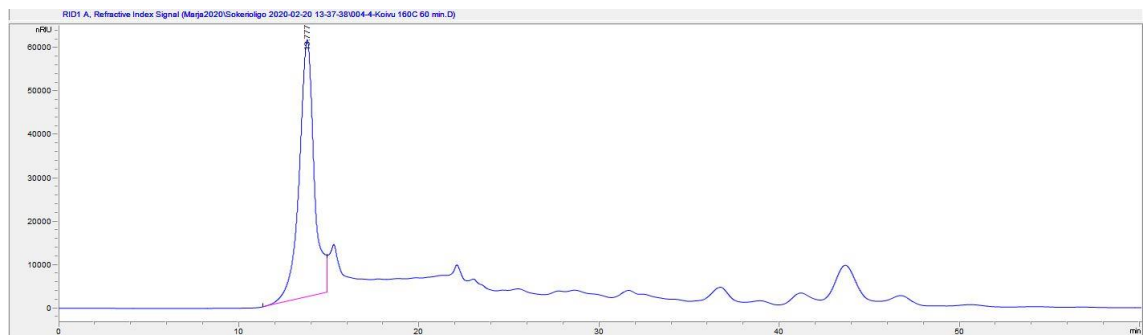


Kuva 13. 160 asteessa uutetun kuusen kromatogrammi.

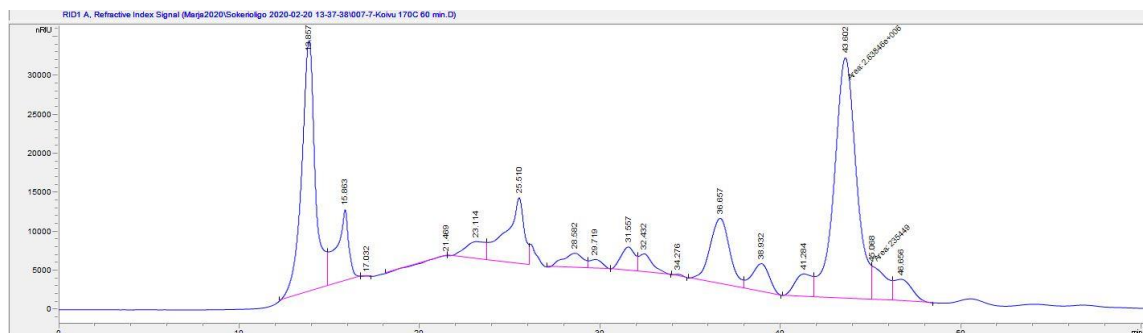


Kuva 14. 170 asteessa uutetun kuusen kromatogrammi.

Verrataan kuvia 15 ja 16 toisiinsa. Nämä ovat koivusta uutettuja liuosnäytteitä. Näidenkin kohdalla huomaa selkeän eron siinä, että yksittäiset sokerit näkyvät selvempinä piikkeinä 160 asteessa uutetuissa liuosnäytteissä verraten 170 asteessa uutettuun näytteeseen.



Kuva 15. 160 asteessa uutetun koivun kromatogrammi.



Kuva 16. 170 asteessa uutetun koivun kromatogrammi.

5 YHTEENVETO

Työn tarkoituksena oli selvittää mahdollisuuksia saada selville jonkin tietyn puulajin hemiselluloosarakenteesta uutuvien erilaisten sokereiden määrät ja mahdollisuuksia niiden erottamiseen toisistaan. Työ aloitettiin testattavien sokerikomponenttien retentioaikojen määrittämisellä, jotta saatiin selville, onko kyseiset sokerit ja sokerioligomeerit mahdollista erottaa toisistaan. Yhteensä yhdentoista erilaisen sokerin ja sokerioligomeerin retentioajat testattiin. Retentioaikojen määrittämisestä selvisi, että suurimmalla osalla testatuista sokereista ja sokerioligomeereista on tarpeeksi erilaiset retentioajat niiden erottamiseen toisistaan. Poikkeuksena kuitenkin monosakkarideihin kuuluvilla mannoosilla, galaktoosilla ja ksyloosilla oli lähes sama retentioaika, ja ne piirtyivät samaan huippuun näiden kolmen yhteisliuoksen kromatogrammissa. Toisena poikkeuksena kolmen yleisen disakkarideihin kuuluvilla laktoosilla, maltoosilla ja sellobioosilla oli myös hyvin samalaiset retentioajat, ja nekin piirtyivät samaan huippuun näiden kolmen sokerin yhteisliuoksen kromatogrammissa. Totesimme kuitenkin, että nämä poikkeustapaukset huomioiden, on mahdollista erottaa testatut sokerit ja sokerioligomeerit toisistaan.

Koska uuttaessa tietynlaista sahanpurua, on mahdollisuus, että muodostuu joko muurahaishappoa tai etikkahappoa, oli testattava näiden happojen retentioajat saadaksemme selville näiden mahdollisen vaikutuksen sokereiden kromatogrammeihin. Kokeesta huomattiin, että näiden happojen retentioajat ovat paljon pienemmät kuin käsiteltyjen sokereiden, joten happojen mahdollisella läsnäololla ei olisi suurta merkitystä kokeiden tuloksiin.

Tämän jälkeen suoritettiin HPLC-kalibrointi. Kalibrointipisteet muodostivat hyvin lineaariset suorat koko kalibrointialueella. Jokaisen sokerin laskettu prosentuaalinen virhe oli hyvin pieni. Tästä voimme päätellä, että kalibrointi oli hyvin onnistunut ja käytettävissä uutteen monomeerimäärittämiseen.

Kuumavesiuutoissa käytössä oli kolme erilaista puulajia: mänty, kuusi ja koivu. Nämä kaikki puulajit uutettiin kahdessa eri lämpötilassa: 160 astetta ja 170 astetta. Uutossa saatujen liuoksien kromatogrammeja verratessa huomataan, että jokaisen puulajin kohdalla yksittäiset sokerit ovat näkyvissä selvinä toisistaan erottuvina piikkeinä, kun puuainesta uutetaan 160 asteessa. Silloin erikokoisten oligomeerien määrät ovat

pienemmät kuin 170 asteessa uuttaessa. Lämpimämmässä lämpötilassa uutettuna sokereiden pitoisuudet nousevat ja piikit eivät enää erotu toisistaan yhtä hyvin ja näkyvät kaikki samassa huipussa. Kromatogrammeista kuitenkin huomataan, että erikokoiset sokerit ja sokerioligomeerit on mahdollista tunnistaa ja erottaa toisistaan. Tämä tosin vaatii lisää tutkimusta ja sovellutuksia, mutta voidaan todeta sen olevan kuitenkin mahdollista ja toteutettavissa.

LÄHDELUETTELO

Azhar, S. 2015. Extraction of Polymeric Hemicelluloses from Spruce Wood. Stockholm: KTH Royal Institute of Technology, 50 s. ISBN: 978-91-7595-415-8

Girio F.M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L.C., Marques S., Bogel-Lukasik R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Teoksessa: Bioresource Technology*, 101 4775–4800. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088

Goldmann W.M., Ahola J., Mikola M. & Tanskanen J. 2017. Formic acid aided hot water extraction of hemicellulose from European silver birch (*Betula pendula*) sawdust. *Teoksessa: Bioresource Technology*, 232: 176-182. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.032

Gelerstedt G., Henriksson G. & Ek M. 2009. Pulp and paper chemistry and technology, Volume 1, Wood chemistry and wood biotechnology. Berlin: De Gruyter, 310 s. ISBN: 3-11-021339-7

Krogell, J., Korotkova, E., Eränen, K., Pranovich, A., Salmi, T., Murzin, D., Willför, S. 2013. Intensification of hemicellulose hot-water extraction from spruce wood in a batch extractor – Effects of wood particle size, *Teoksessa: Bioresource Technology*, 143: 212-220. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.110

Laine, C. 2005. Structures of hemicelluloses and pectins in wood and pulp. Ph. D. dissertation. Helsingin teknillinen yliopisto. 63s. ISSN: 1457-6252

Lawther J.M., Sun R. & Banks W.B. 1996. Effects of Extraction Conditions and Alkali Type on Yield and Composition of Wheat Straw Hemicellulose. *Teoksessa: Journal of Applied Polymer Science*, Vol 60: 1827-1837. CCC: 0021-8995/96/111827-11

Leppänen K., Spetz P., Pranovich A., Hartonen K., Kitunen V. & Ilvesniemi H. 2011. Pressurized hot water extraction of Norway spruce hemicelluloses using a flow-through system. *Teoksessa: Wood Science and Technology*, 452: 223-236. DOI: 10.1007/s00226-010-0320-z

Negahdar L., Delidovich I. & Palkovits R. 2016. Aqueous-phase hydrolysis of cellulose and hemicelluloses over molecular acidic catalysts: Insights into the kinetics and

reaction mechanism. Teoksessa: Applied Catalysis B: Environmental, 184: 285-298. DOI: 10.1016/j.apcatb.2015.11.039

Otieno D.O. & Ahring B.K. 2012. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). Teoksessa: Carbohydrate Research, 360: 84-92. DOI: 10.1016/j.carres.2012.07.017

Plaza M. & Turner C. 2015. Pressurized hot water extraction of bioactives. Teoksessa: Trends in Analytical Chemistry. Teoksessa: Trends in Analytical Chemistry, 71: 39-54. DOI: 10.1016/j.trac.2015.02.022

Ramos, F. 2013. Liquid chromatography: Principles, technology and applications. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, 322 s. ISBN: 9781626187399

Teo C.C., Tana S.N., Yonga J.W.H., Hewb C.S. & Ongc E.S. 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). Teoksessa: Journal of Chromatography A, 1217: 2484-2494. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.12.050

Wang S. & Luo Z. 2017. Pyrolysis of biomass. Berlin, Beijing: De Gruyter, 256 s. ISBN: 9783110374575

Zhang B. & Wang Y. 2013. Biomass processing, conversion and biorefinery. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, 457 s. ISBN: 9781628081268