

**Aurlõhkamise temperatuuri mõju ligniini ekstraheerimise
efektiivsusele**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Karl Romek Staškevitš

Üliõpilaskood: 213044LAAB

Juhendaja: Maria Kulp, Keemia ja biotehnoloogia instituut, vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja geenitehnoloogia



The effect of steam explosion on the extraction efficiency of lignin

Bachelor's thesis

Student: Karl Romek Staškevitš

Student code: 213044LAAB

Supervisor: Maria Kulp, department of Chemistry and Biotechnology, Senior Researcher

Study program: Applied Chemistry and Gene Technology

Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Karl Romek Staškevitš
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendaja: Maria Kulp
[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Lühendite loetelu	5
Sissejuhatus.....	6
1. Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Taimne biomass ning ligniin.....	7
1.2 Biomassi eeltötlusmeetodid	8
1.2.1 Aurlõhkamine	8
1.2.2 <i>Organosolv</i> meetod.....	8
1.3 Biomassi analüüsimeetodid	9
1.3.1 Klasoni meetod.....	9
1.3.2 Kõrgsurvevedelikkromatograafia	10
1.3.3 Fourier' teisendatud infrapunaspetskoopia	11
2. Töö eesmärgid.....	13
3. Eksperimentaalne osa	14
3.1 Kasutatud biomass.....	14
3.2 Ligniini kvantitatiivne analüüs Klasoni meetodil.....	14
3.3 Suhkrute analüüs kõrgsurvevedelikkromatograafia meetodil.....	15
3.4 Ligniini ekstraheerimine <i>organosolv</i> meetodil	16
3.5 FTIR spektrite mõõtmine	16
4. Tulemused ja arutelu.....	18
4.1 Odrapõhu proovide iseloomustus	18
4.2 <i>Organosolv</i> meetodil ligniini ekstraheerimise efektiivsus	19
4.3 Biomassi ja ligniini iseloomustamine FTIR meetodi abil	20
Kokkuvõte.....	22
Abstract	23
Tänuavaldused	24
Kasutatud kirjanduse loetelu	25
Lisad.....	30
Lisa 1 Odrapõhu FTIR spektri piikide selgitused	30
Lisa 2 <i>Organosolv</i> ligniinide FTIR sepktri piikide selgitused.....	31

Lühendite loetelu

AIR – *Acid Insoluble Residue* (happes lahustumatu fraktsioon)

ASL – *Acid Soluble Lignin* (happes lahustuv ligniin)

ATR – *Attenuated Total Reflectance* (nõrgendatud täielik sisepeegeldus)

FTIR – *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* (Fourier' teisendatud infrapunaspektroskoopia)

GC – *Gas Chromatography* (Gaasikromatograafia)

HPLC – *High Pressure Liquid Chromatography* (kõrgsurvevedelikkromatograafia)

MS – *Mass Spectrometry* (massispektromeetria)

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance* (tuumamagnetresonants)

RID – *Refractive Index Detector* (murdumisnäitaja detektor)

SEC – *Size Exclusion Chromatography* (eksklusioonikromatograafia)

Sissejuhatus

Naftapõhiste toodete kasutamisel eraldub atmosfääri olulisel hulgal kasvuhoonegaase, mille tulemusel suureneb maakera keskmine temperatuur. Selleks, et vähendada kliimasoojenemise negatiivset mõju maailma ökosüsteemile, otsitakse naftapõhiste toodetele alternatiive. Lignotselluloosne biomass on taastuv ressurss, millest saab samuti toota energiat, kütust ning kemikaale.

Biomassile suurema väärtuse andmiseks seda rafineeritakse. Biorafineerimine võimaldab põllumajanduse ja metsandustööstuse saadustest ja jääkidest eraldada kolme biopolümeeri: ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi.

Biomassi eeltöötlemiseks ja biopolümeeride eraldamiseks kasutatakse erinevaid protsesse, mis võivad olla nii keemilised, mehhaanilised, ensümaatilised kui ka kombinatsioon nendest. Aurlõhkamine on keskkonnasõbralik eeltöötlusmeetod, mis lõhub raskesti töödeldava biomassi struktuuri. Üldjuhul eelneb see bioetanooli toomises ensümaatilise hüdrolyüüsi etapile, sest aurlõhkamine parandab ensüümide ligipääsu tselluloosile. Vähe on uuritud seda, kuidas võiks aurlõhkamine omada efekti ligniini ekstraheerimise efektiivsusele.

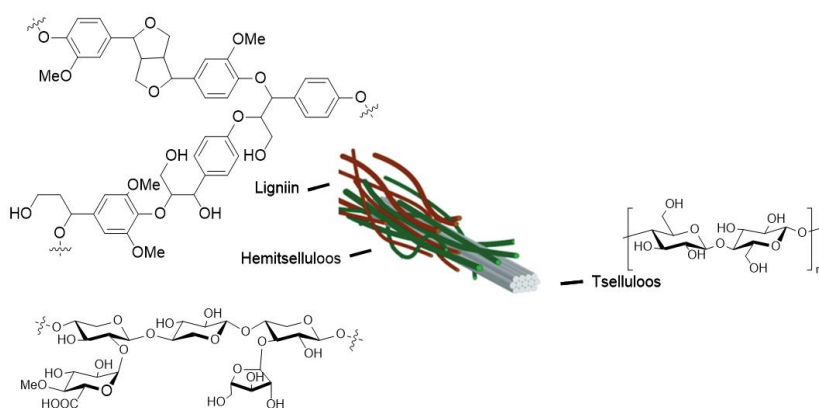
Lähtudes kirjanduses toodud andmetest püstitati hüpotees, et kõrgemal temperatuuril aurlõhatud odrapõhust on ligniini ekstraheerimine efektiivsem. Sellest lähtuvalt oli töö eesmärk iseloomustada alg- ja erineval temperatuuril aurlõhatud odrapõhu proove valitud analüüsimeetoditel, viia läbi ligniini ekstraheerimine odrapõhust *organosolv* meetodil ning hinnata, kuidas mõjutab aurlõhkamise protsess *organosolv* ligniini ekstraheerimist.

Töö esimeses osas anti ülevaade lignotselluloosest biomassist ning proovide iseloomustamiseks ja ligniini ekstraheerimiseks kasutatud meetoditest. Teises osas sõnastati töö peamine hüpotees ja sellest lähtuvad uurimiseesmärgid. Kolmandas osas kirjeldati eksperimentaalset protseduuri koos selle sooritamiseks vajalike vahenditega. Neljandas peatükis esitati *organosolv* ekstraktsiooni ja biomassi karakteriseerimise tulemused ja arutelu.

1. Kirjanduse ülevaade

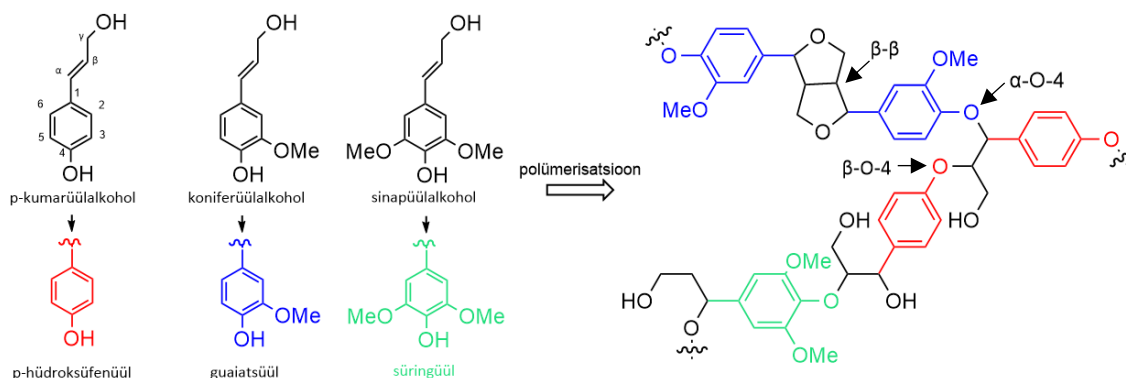
1.1 Taimne biomass ning ligniin

Lignotselluloosne biomass annab taimedele omase struktuuri, leidudes tavaliselt taimede vartes, lehtedes ja juurtes [1]. Lignotselluloosne biomass sisaldab peamiselt kolme biopolümeeri: tselluloos (9% - 80%), hemitselluloos (10% - 50%) ja ligniin (5% - 35%) [2]. Tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini proportsioon erineb taimeliigiti ning seda mõjutavad kasvutingimused ja geneetika [1]. Biopolümeerid on taimeraku kesta seotud omavahel tihedalt kovalentsete sidemete ja mitte kovalentsete vastastikmõjude kaudu (Joonis 1.) [3]. Ristsidestatus ja ligniini esinemine muudavad biomassi raskesti käideldavaks [2].



Joonis 1. Lignotselluloosse biomassi komponendid [4].

Ligniin on rohkelt hargnenud ja amorfne biopolümeer, selle molekulmass jääb 1000 ja 20 000 g/mol vahemikku. Ligniini struktuur, mis sisaldab erinevaid keemilisi ühendeid ja korduvaid monomeere, sõltub taimeliigist, kasvuperioodist ning ekstraheerimise meetodist. [5] Peamiseks aromaatsuse allikaks ligniinis on monomeerid p-hüdroksüfenüül (H), guaiatsüül (G) ja süringüül (S), mis tekivad p-kumarüülalkoholi, koniferüülalkoholi ja sinapüülalkoholi polümerisatsioonil (Joonis 2.) [6].



Joonis 2. Ligniini struktuuri näide, mis sisaldab omavahel C-O ja C-C sidemetega ühendatud G, H ja S monomeere [6, 7].

Iga-aastaselt kasvab maailmas juurde hinnanguliselt 181 miljardit tonni lignotsellulooset biomassi, millest põllumajanduses, metsanduses ja loomakasvatuses on kasutusel 7 miljardit tonni [8]. Põllumajandusest jääb üle 1,2 miljardit tonni lignotselluloosseid jäätmeid, millest üle poole moodustab teraviljade põhk [8, 9]. Enamikku arengumaades tekkivatest lignotselluloosetest jäätmetest ei väärindata ning põletatakse madala kütteväärtusega kütusena või ladestatakse kuhilates [9]. Põllumajanduses tekkivate lignotselluloosete jäätmete väärindamine võimaldab neid kasutada paberitööstuse ning biokütuste tootmise toorainena [10, 11]. Nende tootmisprotsesside jaoks on olulised tselluloos ja hemitselluloos, aga kõrvalsaadusena tekkinud ligniini väärindamine ei ole levinud [4]. Ligniini eraldamine ja väärindamine on huvipakkuv, sest sellest saab valmistada erinevaid materjale, peen kemikaale, plastikuid, liime ja ka näiteks multifunktsionaalseid hüdrogeele. Antibakteriaalsed ja adhesiivsed omadused koos elektrijuhtivusega võimaldavad ligniini sisaldavaid hüdrogeele kasutada potentsiaalselt meditsiinis, keemiatööstuses ning elektroonika tootmises. [5]

1.2 Biomassi eeltötlusmeetodid

Lignotselluloosest biomassist biokütuse, kemikaalide ja funktsionaalsete materjalide tootmine eeldab biopolümeeride efektiivset eraldamist ja karakteriseerimist [12]. Biopolümeeride eraldamiseks ja töötlemiseks on vaja lõhkuda lignotselluloosi kompaktne struktuur. Molekulide vaheliste sidemete katkemiseks ja biomassi fragmenteerimiseks kasutatakse erinevaid eeltötlusmeetodeid, mille toimemehhanismiks võib olla ensümaatilise hüdrolyüsi, keemilise hüdrolyüsi, mehhaanilise rebenemise või nende kombinatsiooni. [13]

1.2.1 Aurlõhkamine

Aurlõhkamine, tuntud ka kui autohüdrolyüs, on kuluefektiivne, keskkonnasõbralik ja tõhus biomassi eeltötlusmeetod [13]. See hüdrotermiline protsess, mis toimub kõrgel temperatuuril (140 – 220 °C) ning kõrgel rõhul (0,8 – 3,8 MPa), lõhub biomassi tihedalt seotud struktuuri. Esimesed muutused struktuuris põhjustab küllastatud veeaur, mis reaktoris kõrge temperatuuri juures biomassi kiudude vahele imendub ja põhjustab hemitselluloosi hüdrolyüsumise monomeerseteks ja oligomeerseteks suhkruteks. Tselluloosi molekulide sees ja vahel katkevad vesiniksidemed. [14] Ligniini molekulides hüdrolyüsuvad β -O-4 ja α -O-4 eeter sidemed ning depolümerisatsiooni käigus vabanevad fenoolsed ühendid. Kõrgema aurlõhkamise intensiivsuse juures toimub ka repolümerisatsioon, mille käigus suureneb C-C sidemete osakaal. [15] Protsessi käigus eraldub hemitselluloosi molekulidelt atsetüülrühm, sellest tekib äädikhape, mis suurendab hüdrolyüsi efektiivsust [16]. Hüdrolyüsile järgneb biomassi plahvatuslik dekompressioon, mille tulemusel vee molekulid biopolümeeride ümbrusest ja seest lahkuvad ning biomassi kiud lõhenevad [13, 14].

1.2.2 Organosolv meetod

Organosolv on biomassi eeltötlusmeetod, milles kasutatakse orgaanilisi lahusteid, et ekstraheerida ligniini ja hemitselluloosi [17]. Lahustina saab kasutada metanooli, etanooli, 2-propanooli, 2-butanooli, atsetooni, dioksaani ja orgaanilisi happeid. Lahusteid on võimalik peale ekstrahatsiooni eraldada ning taaskasutada. Eelistatud on madala keemistemperatuuri ja odava hinnaga metanool ja etanool. [18] Lisaks on polaarsemate primaarsete alkoholide kasutamisel

delignifikatsioon efektiivsem võrreldes sekundaarsete või tertsiaarsete alkoholidega. Selle põhjuseks võib olla rohkemate vesiniksidemete teke metanooli või etanooli ja ligniini vahel, mis soodustab eeter sidemete katkemist. [19]

Lisatakse ka katalüsaator, et suurendada hemitselluloosi hüdroolüüsi ning ligniini eeter sidemete lõhustamist. Samuti võimaldab katalüsaatori kasutamine protsessi läbi viia lühema ajaga ning madalamal temperatuuril, säästes sellega energiat. [17] Soolhappe katalüsaatori eelis on saadava ligniini kõrgem puhtus võrreldes väävelhappe, lämmastikhappe või fosforhappega. [19]

Peale ligniini ja hemitselluloosi lahustumist eraldatakse vedelik tahkest biomassist filtreerimise teel. Seejärel järgneb sadestamisetapp, milles tavaliselt lahjendatakse *organosolv* lahust veega, ligniini lahustuvus väheneb ja see sadeneb välja, jättes alles fraktsiooni, mis sisaldab hemitselluloosiühendeid. Väljasadestunud ligniini eraldatakse tsentrifuugimise teel. [17] Ligniini saagis massiprotsentides %LIG arvutatakse järgnevat valemit kasutades:

$$\%LIG = \frac{m_{lig}}{m_{bm}} \times 100\% \quad (1)$$

kus m_{lig} on ligniini kuivmass (g) ja m_{bm} on biomassi kuivmass (g) [17].

1.3 Biomassi analüüsimeetodid

Lignotselluloosi ja sellest valmistatud toodete keemiline analüüs on oluline, mõistmaks erinevaid keemilisi muutusi, mis toimuvad biomassi raskesti töödeldavas struktuuris eeltötlusprotsessi erinevates etappides. Aastate jooksul on välja töötatud palju erinevaid analüütilisi meetodeid biopolümeeride kontsentratsiooni kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks biomassis. [20] Lignotselluloosi koostise määramiseks ning ligniini, puiduekstraktiivide ja monolignoolide identifitseerimiseks ja kvantifitseerimiseks kasutatakse traditsioonilisi märgkeemia ja gravimeetrilisi meetodeid kui ka uudsemaid meetodeid. Klasoni meetodile ja Soxhleti ekstraktsioonile lisaks saab kasutada meetodeid nagu GC ehk gaasikromatograafia ning MS ehk massispektromeetria. [20, 21, 22] Polümeeride molekulmassi jaotust mõõdetakse eksklusioonkromatograafiaga (SEC) ja vedelikromatograafiat kasutatakse puidusuhkrute analüüsiks [23, 24]. Erinevad spektroskoopilised meetodid nagu Fourier' teisendatud infrapunaspektroskoopia (FTIR) ja NMR ehk tuumamagnetresonants-spektroskoopiaga erinevate tuumade (^{13}C , ^1H , ^{31}P) mõõtmine koos uute andmetötlustehnikatega annavad võimaluse analüüsida puidupolümeeride struktuuri ja funktsionaalrühmi [20].

1.3.1 Klasoni meetod

Klasoni meetod on ligniini kvantitatiivse analüüsi meetod, mida on täiustatud üle sajandi. Meetodile eelneb tavapäraselt Soxhleti ekstraktsioon, et eemaldada valke, vahasid ja muid komponente, mis ei ole biopolümeeridega seotud ning võiksid segada edasist analüüsi. [21] Meetodis kasutatakse 72% väävelhapet, et hüdroolüüsida tselluloos ja hemitselluloos [25]. Hüdroolüüsi käigus tekkivad monomeersed suhkrud on hüdroolüüsi vedelikus lahustuvad ja nende sisaldust saab määrata kõrgsurvevedelikromatograafia meetodit kasutades. Enamik ligniini ei lahustu ning eraldatakse filtreerimise teel, selle fraktsiooni kogus määratakse gravimeetriliselt. Happes lahustunud ligniini sisaldus määratakse UV-Vis spektrofotomeetrit kasutades. [26] Spektroskoopilised mõõtmised

teostatakse 205 nanomeetri või 280 nanomeetri juures, mis vastavad ligniini absorptsiooni maksimumidele [27]. Happes lahustumatu fraktsiooni, millest enamiku moodustab ligniin, massiprotsendi %AIR arvutamiseks kasutatakse valemit:

$$\%AIR = \frac{m_{fj} - m_f}{m_{bm}} \times 100\% \quad (2)$$

kus m_{fi} on kuiva filtri mass koos happes lahustumatu fraktsiooniga (g), m_f on kuiva filtri mass (g) ning m_{bm} on biomassi kuivmass (g). Happes lahustuva ligniini %ASL massiprotsendi arvutamiseks kasutatakse valemit:

$$\%ASL = \frac{A * V * L}{\epsilon * m_{bm} * l} \times 100\% \quad (3)$$

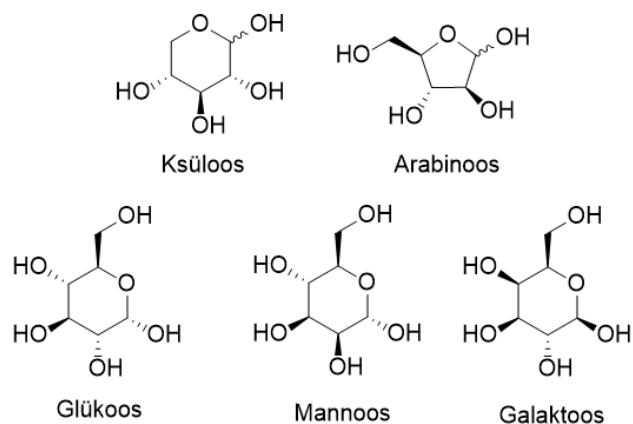
kus A on absorptsiooni väärtus, V on filtraadi ruumala (l), L on lahjendusfaktor, ϵ on molaarne neelduvustegur (g/l), m_{bm} on biomassi kuivmass (g) ja l on optiline teepikkus (cm) [26]. Klasoni meetodiga määratud ligniini sisalduse saamiseks tuleb kokku liita happes lahustumatu fraktsiooni ja happes lahustuva ligniini massiprotsendid.

1.3.2 Kõrgsurvevedelikkromatograafia

HPLC ehk kõrgsurvevedelikkromatograafia on meetod orgaaniliste, anorgaaniliste või bioloogiliste ainete komponentide lahutamiseks ja kvantitatiivseks analüüsiks. Meetodi eeliseks on mitmekülgsus, efektiivne komponentide lahutuvus ja madal avastamispiir. Eraldamine põhineb komponentide erineval jaotumisel mobiilse ja statsionaarse faasi vahel. Vedelikkromatograafia korral on mobiilne faas ehk eluent polaarne või mittepolaarne vedelik. [28]

HPLC süsteem koosneb eluentide anumatest, degasaatorist, pumpadest, proovi injektorist, kolonnist ja detektorist. Sõltuvalt jaotusmehhanismist saab eristada adsorptsioonikromatograafiat, jaotuskromatograafiat, eksklusioonkromatograafiat, ioonkromatograafiat ja afiinsuskromatograafiat. [28]

HPLC meetodit kasutatakse levinult hemitselluloosi ja tselluloosi hüdrolüüsil tekkivate monosahhariidide kontsentratsioonide määramiseks [24]. Tselluloos hüdrolüüsub glükoosiks ja hemitselluloos ksüloosiks, galaktoosiks, arabiiniks ning mannoosiks (Joonis 3.) [29].



Joonis 3. Lignotselluloosse biomassi koostises sisalduvad monosahhariidid [30].

Monosahhariidide kontsentratsioonide põhjal on võimalik arvutada biomassis tselluloosi %CEL ja hemitselluloosi %HEM sisaldused massiprotsentides kasutades valemeid:

$$\%CEL = \%GLY \times 0,9 \quad (4)$$

kus %GLY on glükoosi kontsentratsioon Klasoni meetodi filtraadis (%) ning

$$\%HEM = \%XYL \times 0,88 \quad (5)$$

kus %XYL on ksüloosi ja teiste hemitselluloosi monomeeride kontsentratsioon Klasoni meetodi filtraadis (%) [26]. Polüsahhariidide sisaldusi arvutades tuleb kasutada dehüdrokonstante, mis võtavad arvesse vee molekulide vabanemist glükosiidsidemete tekkel monosahhariidide polümerisatsioonil [31].

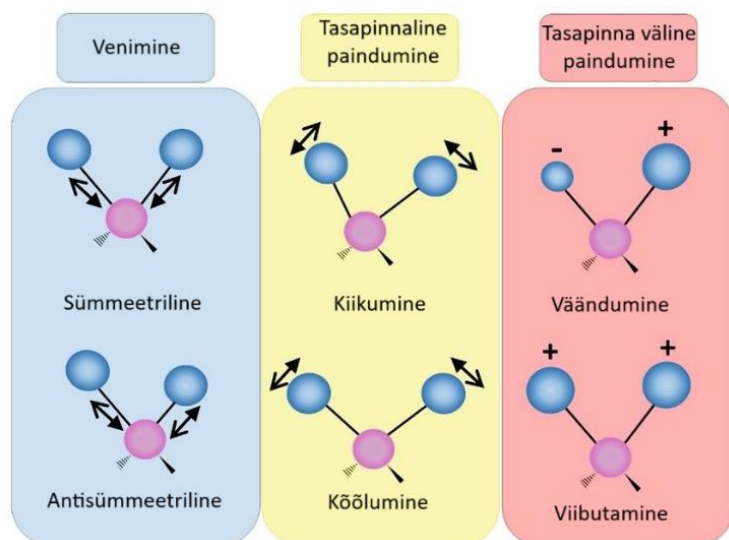
Kolonni lahutamismehhanism, mida suhkrute analüüsiks HPLC süsteemis kasutatakse, on tavaliselt ioonvahetus, eksklusiooni või nende kombinatsioon [24]. SEC ehk eksklusioonkromatograafia jaotusmehhanism põhineb komponentide molekulaarse suuruse erinevusel. SEC kolonn on täidetud geeliga, mille osakeste suurused on tavaliselt vahemikus 3 – 10 µm. Suuremad molekulid ei difundeeru geeli pooridesse ja väljuvad kolonnist esimesena koos eluendiga, väiksemad molekulid difundeeruvad täielikult ja väljuvad viimasena. Keskmise suurusega molekulid difundeeruvad osaliselt. [32]

Suhkrute analüüsil on hea sobivusega RID ehk murdumisnäitaja detektor. Valgusallikast eralduv kiirgus läbib kaks kambrit, ühes kambri on puhas eluent ja teises kolonni läbiv eluent, milles võivad sisalduda ka proovi komponendid. Kui eluendis sisaldub proovi molekule, siis kiirguse teekond muutub ühest kambrist teise liikudes ja detektor tuvastab murdumisnäitaja muutuse. [33]

1.3.3 Fourier' teisendatud infrapunaspetskoopia

FTIR on meetod, mille abil saab analüüsida biomassi koostises toimuvaid muutusi enne ja pärast eeltötlusprotsesse. [34]

Infrapunaspetskoopia põhineb molekuli aatomite võnkumisel, analüüsida saab molekule, mille elektriline dipoolmoment muutub võnkumise käigus. Molekul absorbeerib infrapunakiirgust, mille sagedus ühtib molekuli võnkesagedusega. Molekuli erinevad võnkesagedused on seotud sideme pikkuse (venimine) või sideme nurga (paindumine) muutusega (Joonis 4.). Venimine võib olla nii asümmeetriline kui ka sümmeetriline. Paindumisel eristatakse nelja erinevat muutust: twisting (väändumine), rocking (kiikumine), scissoring (kõõlumine) ja wagging (viibutamine). [35]



Joonis 4. Sidemete pikkuse ja nurga muutusest tulenevad vibratsioonirežiimid molekulis [36].

FTIR spektromeeter koosneb kiirusallikast, interferomeetrist ning detektorist ja signaalivõimendist. Levinuim Michelsoni interferomeeter koosneb kahest risti paiknevast peeglist ja kiirejagajast, mis jaotab kiirusallikast leviva kiirguse kaheks, osa kiirgusest läbib jagaja ja peegeldub peeglit, mis on paigal ja teine osa kiirgusest läbib jagaja ning peegeldub peeglit, mis liigub. Tagasi peegeldunud kiirte liitudes need interfeeruvad ja osa sellest kiirgusest läbib proovi. Liikuva peegli kaugust muutes saadakse graafikud, mis iseloomustavad kiirguse intensiivsuse muutust erinevatel kaugustel peeglist. Iga lainepikkuse intensiivsuse muutusi kirjeldavate graafikute ühendamine annab interferogrammi. Interferogramm saadakse nii prooviga kui ka ilma proovita ning nende võrdlemine annab absorptsiooni interferogrammi. Arvuti teostab interferogrammiga matemaatilise Fourier' teisenduse ning väljastab infrapunakiirguse absorptsiooni spektri. FTIR meetodi eeliseks on mõõtmiste kiirus ja mürataseme vähenemine mitme mõõtmise interferogrammide kombineerimisel. [35]

Tahkete proovide analüüsimisel kasutatakse levinult ATR ehk nõrgendatud täieliku sisepeegeldusega lisaseadet. ATR seade sisaldab kristalli, millele asetatakse tahke proov. Infrapunakiirgus peegeldub kristallilt ning seejärel mõõdetakse peegeldunud kiirguse intensiivsuse muutust enne ja pärast proovi kristallile asetamist. Kasutades ATR seadet ei ole vajalik KBr tablettide valmistamine tahkest proovist. [37]

Biomassi analüüsides teostatakse mõõtmised peamiselt keskmises infrapuna regioonis $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Biomassi FTIR spektrites saab eristada kahte analüüsitavaid piikidega piirkonda $3800 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ ja $1800 - 850 \text{ cm}^{-1}$. Biomassi proovides annavad infrapuna signaale peamiselt fenoolsed ühendid ning hüdroksüül-, metüül- ja metüleenrühmad. [34]

2. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö hüpotees oli, et *organosolv* meetodil ligniini ekstraheerimise efektiivsus (ligniini saagis) kasvab aurlõhkamise temperatuuri suurenemisel. Selle hüpoteesi kinnitamiseks või ümberlukkamiseks sõnastati järgmised eesmärgid:

1. Iseloomustada alg- ja erineval temperatuuril aurlõhatud odrapõhu proove määrates Klasoni ja kõrgsurvevedelikkromatograafia analüüsimeetodeid kasutades ligniini ja suhkrute kogused;
2. Viia läbi ligniini ekstraheerimine odrapõhu proovidest *organosolv* meetodil ning hinnata ekstraktsiooni saagist;
3. Uurida ja teha järeldused aurlõhkamise temperatuuri mõjust *organosolv* ligniini saagisele;
4. Iseloomustada alg- ja erineval temperatuuril aurlõhatud biomassi ning *organosolv* ligniini FTIR meetodi abil.

3. Eksperimentaalne osa

3.1 Kasutatud biomass

Ligniini ekstraheeriti *organosolv* meetodit kasutades seitsmest odrapõhu proovist (Joonis 5.). Kuus proovi, mis saadi Eesti Maaülikoolilt, olid aurlõhatud Ülem-Austria ülikoolis temperatuuridel 150 – 200 °C. Aurlõhkamisele eelnes proovide immutamine võrdses koguses destilleeritud vees. Proovid viibisid aurlõhkamise reaktoris 30 minutit. [38] Seitsmes proov oli aurlõhkamata odrapõhk. Samade proovidega teostati Klasoni meetodil ligniini kvantitatiivne määramine ja saadud filtraadist määrati lisaks happes lahustuva ligniini kogusele ka tselluloosi ning hemitselluloosi monomeerseid suhkruid kasutades HPLC meetodit. FTIR spektromeetriga uuriti biomassi ja ligniini struktuurseid omadusi. Katsete tegemise käigus varieerusid proovide niiskussisaldused 3,2 ja 6,2 % vahel.



Joonis 5. Töös kasutatud aurlõhatud ja aurlõhkamata odrapõhu proovid.

3.2 Ligniini kvantitatiivne analüüs Klasoni meetodil

Kasutatud ained ja töövahendid

Klasoni meetodiga ligniini sisalduse määramiseks kasutati järgnevaid töövahendeid: 100 ml mahuga keeduklaasid, Bunseni kolb, portselanist lehter, mõõtesilinder mahuga 100 ml, 15 ml mahuga tuubid, *Pasteur* pipett (VWR), automaatpipett 100 – 1000 µl (VWR), analüütiline kaal AP-07 (Mettler Toledo), veevann TW8 (Julabo), autoklaav MLS-3020U (Sanyo), kuivatuskapp MOV 112S (Panasonic), niiskusemõõdja MB120 (Ohaus), UV-vis spektromeeter Cary 50 bio (Varian).

Ligniini sisalduse määramise lahustes kasutati loetelus toodud aineid: 72% väävelhape (Chem-Lab NV), ülipuhas deioniseeritud vesi (Millipore, USA).

Katse protseduur

Mõõdeti biomassi proovide niiskusesisaldused. Märjastati kaheksa keeduklaasi, millesse kaaluti analüütilist kaalu kasutades 0,2 g odrapõhku. Igasse keeduklaasi lisati 3 ml väävelhapet ja segati. Keeduklaasid kaeti fooliumiga ning asetati tunniks ajaks veevanni, mis oli eelnevalt kuumutatud 30 kraadini. Proove segati veevannis iga 20 minuti järel. Analüütilise kaaluga kaaluti filterpaberid, mis olid eelnevalt kuivanud 8 tundi 105 °C juures kuivatuskapis. Keeduklaasidesse lisati mõõtesilindriga proovile 72 ml ülipuhast vett. Keeduklaasid kaeti uuesti fooliumiga ning asetati autoklaavi, milles neid kuumutati 121 °C juures 15 minutit. Proovide filtramiseks kasutati klaaspulka ja Bunseni kolbi koos portselanist filtriga, millesse asetati eelnevalt kaalutud filterpaber. Pärast proovi filtrimist mõõdeti mõõtesilindriga filtraadi ruumala. Happes lahustunud ligniini sisalduse ja suhkrute analüüsi teostamiseks valati 15 ml filtraati tuubi. Keeduklaasi pesti ülipuhta veega, et saada kogu proov filterpaberile. Filterpaber pesti ülipuhta veega, et see ei söestuks kuivatamise käigus. Filterpaber asetati Petri tassile, mis märjastati. Filterpaberil proove kuivatati kuivatuskapis 105 °C juures 8 tundi. Analüütilise kaaluga kaaluti filterpaber koos prooviga.

Spektrofotomeetria nulllahuse valmistamiseks võeti 3 ml väävelhapet ja 72 ml ülipuhast vett. Nulllahus valati kvartsküvetti ning spektromeeter teostas nullmõõtmise. Proovides ligniini sisalduse mõõtmiseks tehti Klasoni filtraadist 15 ml tuubi 10- või 20-kordne lahjendus. Mõõtmised teostati 205 nm juures ja molaarse neelduvuskoefitsiendi väärtuseks võeti 110 g/l [39].

3.3 Suhkrute analüüs kõrgsurvevedelikkromatograafia meetodil

Kasutatud ained ja töövahendid

Hemitselluloosi ja tselluloosi hüdrolüüsil tekkinud monomeersete suhkrute analüüsiks olid kasutusel töövahendid HPLC seade (Agilent Technologies) RID detektorgia ja Shodex SP 0810 kolonniga, 15 ml mahuga tuubid, automaatpippet 100 –1000 µl (VWR), HPLC proovi viaalid, analüütiline kaal AP-07 (Mettler Toledo), tsentrifuug EBA 200 S (Hettich), lakmuspaber.

Ained, mida kasutati olid glükoosi, ksüloosi, galaktoosi, arabinoosi, tsellobioosi ja 5-hüdroksümetüülfurfuraali standardlahused kontsentratsioonidega 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 ja 6,4 g/l, Na₂CO₃, ülipuhast deioniseeritud vesi (Millipore, USA).

Katse protseduur

Klasoni meetodit kasutades saadud filtraati pipeteeriti 3 ml 15 ml mahuga tuubi. Kaaluti 0,5 grammi Na₂CO₃ ja lisati tuubi happelisele filtraadile. Lakmuspaberit kasutades kontrolliti, et lahuse pH oleks neutraalne. Tuube tsentrifuugiti 4000 pöörde juures 10 minutit. Lahus pipeteeriti HPLC proovi viaali. Iga prooviga teostati 3 mõõtmist. Mõõtmise tingimused HPLC seadmes olid järgnevad: RID detektori temperatuur 55 °C, kolonni termostaadi temperatuur 80°C, süstitud proovi kogus 5 µL, eluent ülipuhast deioniseeritud vesi, isokraatne elueerimisrežiim, voolu kiirus 0,6 g/l. Kalibratsioonigraafikute põhjal arvutati proovides glükoosi ja ksüloosi kontsentratsioonid ühikutes g/l, seejärel arvutati protsentuaalsed sisaldused proovis %GLY ning %XYL, kasutades valemeid:

$$\%GLY = \frac{c_{gly} \times V \times L}{m_{bm} \times 10} \quad (6)$$

ja

$$\%XYL = \frac{c_{xyl} \times V \times L}{m_{bm} \times 10} \quad (7)$$

kus c_{gly} on glükoosi kontsentratsioon (g/l), c_{xyl} on ksüloosi ja teiste hemitselluloosi monomeeride kontsentratsioon (g/l), V on Klasoni filtraadi ruumala (l), L on lahjendusfaktor ja m_{bm} on biomassi kuivmass (g).

3.4 Ligniini ekstraheerimine *organosolv* meetodil

Kasutatud ained ja töövahendid

Organosolv protsessis kasutati järgnevaid töövahendeid: 250 ml mahuga mõõtekolb ja ümarkolb, Bunseni kolb, portselanist lehter, filterpaberid, keeduklaas mahugs 500 ml, tsentrifuugi tuubid, *Pasteur* pipett (VWR), automaattippett 100 – 1000 μ l (VWR), tehniline kaal PB1502-S/FACT (Mettler Toledo), analüütiline kaal H_125SM (Precisa), rotaatoraurusti R-210 (BÜCHI Labortechnik), magnetsegaja (IKA RCT), jahuti, tsentrifuug Universal 32 R (Hettich), kuumutuspesa EM1000/CE (Electrothermal), kuivatuskapp MOV 112S (Panasonic), niiskusemõõtja MB120 (Ohaus).

Organosolv meetodi käigus kasutati järgnevaid aineid: 37% soolhape (Fluka), ülipuhas deioniseeritud vesi (Millipore, USA), 96,6% etanool (Merck).

Katse protseduur

Mõõdeti biomassi proovide niiskusesisaldused. Mõõtekolbi mahuga 250 ml kaaluti 6,25 grammi odrapõhu proovi ja lisati 125 ml etanooli, mis sisaldas 284 mM soolhapet. Seati üles *organosolv* aparaat, mis koosnes kuumutuspesast, jahutist ja segistist. Segu kuumutati tagasivoolu režiimis kuus tundi. Kaaluti filterpaber ja segu filtriti kasutades vaakumfiltratsiooni. Rotatsiooniaurustiga aurustati filtraati 30 °C juures kuni enamik lahustit oli aurustunud. Segu kolvist keeduklaasi pesemiseks lisati atsetooni ning keeduklaasis lisati umbkaudu pool liitrit vett, et ligniin põhja sadestada. Peale poolt tundi magnetsegajal segunemist, valati ligniini sadet sisaldav lahus tsentrifuugi tuubidesse. Tuube tsentrifuugiti 10 minutit 4000 pöörde juures 3 korda. Ligniini pandi tuubides 40 °C juures kaheks ööpäevaks kuivama. Kuivanud ligniin kaaluti.

3.5 FTIR spektrite mõõtmine

Kasutatud ained ja töövahendid

IRTracer-100 Fourier' teisendusega infrapunaspektromeeter (Shimadzu) koos QATR-10 teemant nõrgendatud täieliku sisepeegelduse seadmega (Shimadzu)

Katse protseduur

FTIR spektrid registreeriti IRTracer-100 Fourier' teisendusega infrapunaspektrofotomeetril, mis oli varustatud DLaTGS-detektoriga. Spektrid registreeriti vahemikus 4000-400 cm^{-1} lahutusvõimega 4

cm^{-1} . Proovi kohta keskmistati 30 spektrit ja analüüsiti tarkvara Lab Solutions (Shimadzu) abil (Joonis 7., Joonis 8.).

4. Tulemused ja arutelu

4.1 Odrapõhu proovide iseloomustus

Enne *organosolv* ekstraheerimist oli kõikide odrapõhu proovide iseloomustamiseks määratud ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi sisaldused. Tulemused on esitatud tabelis 1.

Määratud ligniini sisaldused erinesid aurlõhkamata ja aurlõhatud odrapõhu proovide vahel. Temperatuuridel 180 – 200 °C aurlõhatud proovide ligniinisaldus oli 9 – 11 % dw kõrgem võrreldes aurlõhkamata odrapõhuga. Ligniini sisalduse suurenemine biomassis aurlõhkamise temperatuuri tõustes on põhjendatav hemitselluloosi sisalduse vähenemisega tahkes biomassis, sest aurlõhkamise käigus hemitselluloos laguneb monomeerseteks suhkruteks, mis lahustuvad vees [38, 40]. Seda kinnitab ka odrapõhu proovide värvuste erinevus, kõrgemal temperatuuril aurlõhatud biomassi proovid olid pruunikamad. Vastavalt kirjanduse andmetele on proovide tumenemine aurlõhkamise puhul seotud hemitselluloosi lagunemisega temperatuuri kasvades ning sellest tulenevalt ligniini sisalduse suurenemisega [41]. Madalamatel temperatuuridel aurlõhatud proovide ligniini sisaldused, mis erinesid 1 % dw ulatuses, olid ligilähedased aurlõhkamata odrapõhuga. Tõenäoliselt ei olnud madalamatel aurlõhkamise temperatuuridel tingimused piisavalt karmid, et kutsuda esile lignotselluloosse maatriksi lagunemist.

Tabel 1. Odrapõhu proovide koostis.

Odrapõhu aurlõhkamise temperatuur (°C)	Klason ligniin ± SH**, % dw*	Tselluloos ± SH**, % dw*	Hemitselluloos ± SH**, % dw*
Aurlõhkamata	23,0 ± 2,4	38,2 ± 0,5	19,2 ± 0,0
150	23,6 ± 2,1	39,5 ± 0,7	17,6 ± 0,4
160	22,5 ± 2,9	41,1 ± 0,1	18,8 ± 0,1
170	23,9 ± 2,4	41,5 ± 0,2	17,4 ± 0,2
180	32,7 ± 2,5	42,3 ± 0,3	7,3 ± 0,1
190	33,0 ± 1,3	41,3 ± 0,1	6,8 ± 0,2
200	34,5 ± 2,1	40,2 ± 0,4	6,3 ± 0,3

(* massiprotsent kuivmassi kohta, ** kolme paralleelmõõtmise standardhälve)

Hemitselluloosi ja tselluloosi hulga määramiseks mõõdetud monosahhariidide kontsentratsioonide põhjal tehtud arvutustest, selgus, et hemitselluloosi sisaldus väheneb pidevalt aurlõhkamise temperatuuri tõustes. Aurlõhatud proovides, milles ligniini sisaldus oli ligi 10 % dw kõrgem kui aurlõhkamata odrapõhus oli ka hemitselluloosi sisaldus üle 10 % dw väiksem kui aurlõhkamata odrapõhus.

Vahemikus 180 – 200 °C lõhatud proovides oli hemitselluloosi sisaldus ligi 11 % dw võrra väiksem kui madalamatel temperatuuridel lõhatud proovides. Tselluloosi sisaldus aga varieerus vähe, 3 % dw ulatuses. Sarnased tulemused olid saavutatud ka teistes ülikoolides. Näiteks Florida ülikoolis läbiviidud katses, kus suhkruroo proove töödeldi fosforhappega ja aurlõhati 180 kraadi juures

väheneb ksüloosi ja arabinoosi summaarne sisaldus 22-lt protsendilt 10-le protsendile [40]. Eesti Maaülikoolis läbi viidud katsete käigus ei tuvastanud ANKOM 2000 analüsaator 190 ja 200 kraadi juures analüüsitud proovides hemitselluloosi ning 180 kraadi juures lõhatud proovis oli sisaldus alla ühe protsendi. Sama töö käigus määratud ligniini sisaldused suurenesid paari protsendi võrra ning tselluloosi sisaldused, mis vähenesid temperatuurini 180 kraadi ja seejärel tõusid, jäid 33 ja 42 % vahemikku [38]. Floridas tehtud uuringus tõusis tselluloosi sisaldus peale eeltöötlust 10 protsenti võrreldes eeltöötlemata biomassiga [40].

4.2 *Organosolv* meetodil ligniini ekstraheerimise efektiivsus

Organosolv meetodit saab viia läbi leebematel tingimustel ehk atmosfäärirõhul ja madalamatel temperatuuridel, sellest tulenevalt võivad ligniini saagised olla väiksemad kui 50 % kogu biomassis sisalduvast ligniinist [42]. *Organosolv* meetodiga ekstraheeritud ligniini saagised ja ekstraheerimise efektiivsuse tulemused on esitatud tabelis 2 ja joonisel 6. Uuritava materjali vähese koguse tõttu teostati *Organosolv* ekstraheerimist ainult ühe korra, seega polnud võimalik hinnata tulemuste varieeruvust. Ligniini ekstraheerimise efektiivsuse arvutamiseks kasutati valemit:

$$\%Efektiivsus = \frac{\%LIG}{\%Klason} * 100\% \quad (8)$$

kus %LIG on *organosolv* meetodiga saadud ligniini saagis (%) ja %Klason on Klasoni meetodiga määratud ligniini sisaldus antud proovis (%).

Joonisel 6 on näha, et ligniini saagis sõltub võrdeliselt aurlõhkamise temperatuurist. Alates temperatuurist 180 °C *organosolv* ligniini saagis suurenes peaaegu kaks korda võrreldes aurlõhkamata prooviga. Temperatuuridel 180 – 200 °C aurlõhatud proovidest õnnestus ekstraheerida ligikaudu 42 – 44 % biomassis sisalduvast ligniinist, mis oli kuni 9 % kõrgem kui aurlõhkamata proovi korral.

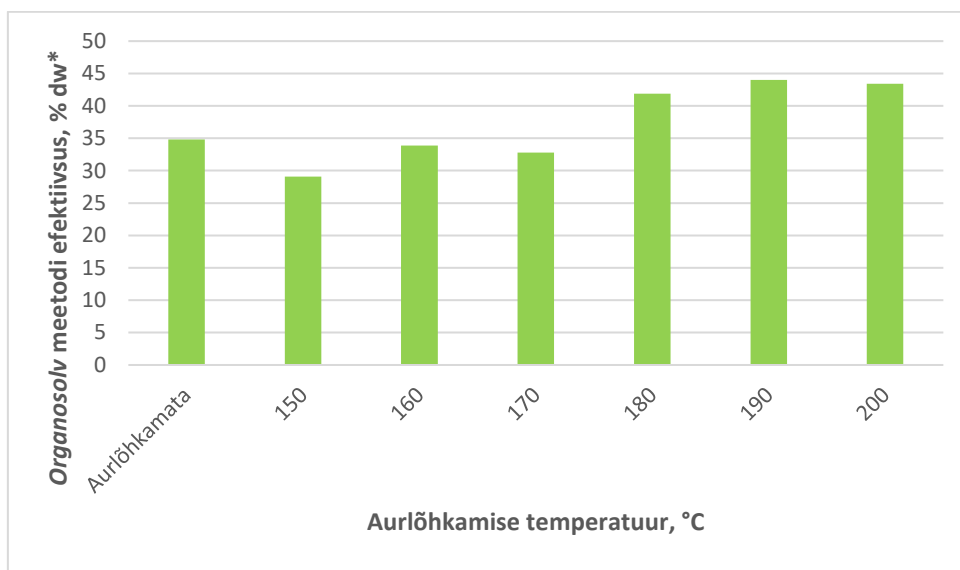
Tabel 2. *Organosolv* meetodiga ekstraheeritud ligniini saagised ja meetodi efektiivsus.

Odrapõhu aurlõhkamise temperatuur (°C)	<i>Organosolv</i> ligniini saagis, % dw*	<i>Organosolv</i> meetodi efektiivsus, % dw*
Aurlõhkamata	8,0	34,8
150	6,9	29,1
160	7,6	33,9
170	7,8	32,8
180	13,7	41,9
190	14,5	44,0
200	15,0	43,4

(* massiprotsent kuivmassi kohta)

Tulemused näitavad, et aurlõhkamise eeltöötlus aitab suurendada ekstraheerimise efektiivsust läbi biomassi tihedalt seotud struktuuri lõhkumise, millega kaasneb parem vastuvõtlikkus edasisele töötlemisele. Protsessi käigus suureneb biomassi maatriksi lagunemise tulemusel osakeste pindala ja ekstraheeritava ligniini määr, selle tulemusel annab *organosolv* meetod suurema ligniini saagise

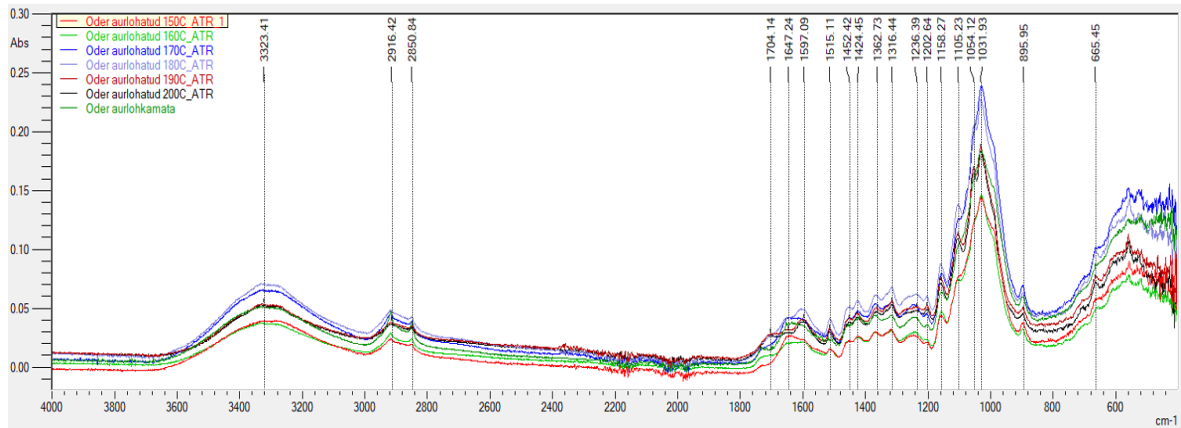
kui aurlõhkamata proovi korral [43]. Madalamatel temperatuuridel aurlõhatud proovidest ligniini ekstraheerimine võis olla vähem efektiivne, sest lõhkamise tingimused ei olnud piisavad, et katkestada ligniini ja polüsahhariidide vahelisi sidemeid.



Joonis 6. Ligniini ekstraheerimise efektiivsus *organosolv* meetodiga.

4.3 Biomassi ja ligniini iseloomustamine FTIR meetodi abil

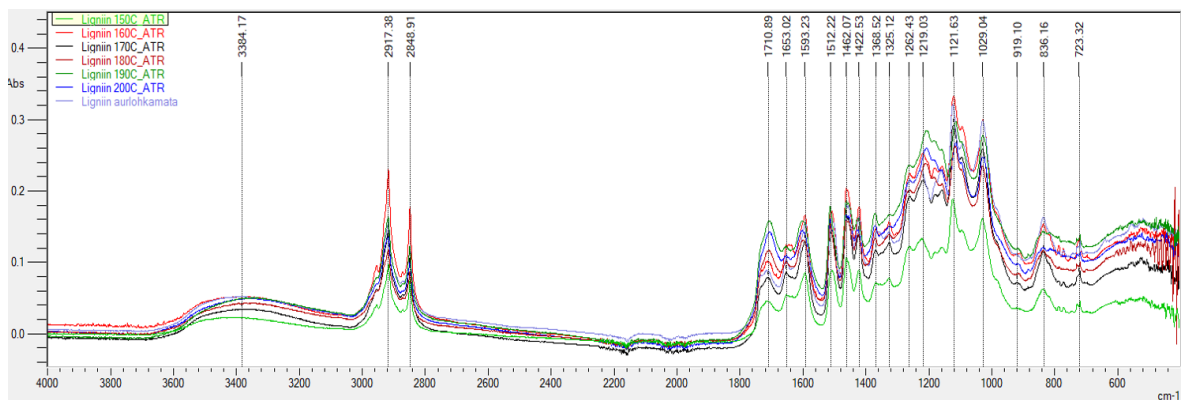
Odrapõhu ja *organosolv* ligniini proovide ATR-FTIR spektrid on esitatud joonistel 7 ja 8. Odrapõhu ja *organosolv* ligniinide spektreid iseloomustati kirjanduse andmete põhjal (Lisa 1, Lisa 2). Piirkonnas $3800 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ eristusid kolm piiki, mis on omased kõigile kolmele biopolümeerile: alifaatse ja aromaatse hüdroksüülrühma venimise spektraaljoon (3323 cm^{-1}) on intensiivsem biomassi puhul (Joonis 7), kuid sümmeetrilise metüül- ja metüleenrühma venimise (2916 cm^{-1}) ning antisümmeetrilise metüül- ja metüleenrühma venimise (2851 cm^{-1}) piigid on suurema intensiivsusega ligniinis (Joonis 8) [34]. Regioonis $1800 - 850 \text{ cm}^{-1}$ on kaks spektraalset joont, mis on iseloomulikud ligniinis sisalduvate aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete võnkumisele (1597 cm^{-1} ja 1515 cm^{-1}) [34]. Piigid lainearvuga 1704 cm^{-1} ja 1647 cm^{-1} on iseloomulikud süsinik-hapnik kaksiksideme venimisele karbonüülrühmas, mis on hemitselluloosi ja ligniini koostises [29, 44]. Piigid lainearvuga 1452 cm^{-1} ja 1424 cm^{-1} on karakteristlikud süsinik-vesinik sideme paindumisele ligniinis ja piigid lainearvuga 1362 cm^{-1} ning 1316 cm^{-1} on iseloomulikud süsinik-vesinik sideme signaalile tselluloosis ja hemitselluloosis [29, 34, 45]. Piik lainearvuga 1236 cm^{-1} on põhjustatud süsinik-hapnik sideme venimisest ja hapnik-vesinik sideme paindumisest polüsahhariidides, sellest järgmine piik (1158 cm^{-1}) on seotud tselluloosis süsinik-hapnik-süsinik sidemete asümmeetrilise venimisega [34, 44]. Süsinik-hapnik-süsinik sidemete venimine hemitselluloosis ja tselluloosis põhjustab piigi lainearvuga 1105 cm^{-1} , see piik võib olla põhjustatud ka ligniini aromaatsete ühendite süsinik-vesinik sidemete paindumisest [34]. Piigid lainearvuga 1054 cm^{-1} ja 1032 cm^{-1} on omased süsinik-hapnik sidemete võnkumisele tselluloosis, hemitselluloosis ja ligniinis [44]. Piik lainearvuga 896 cm^{-1} on karakteristlik tselluloosis esimese süsiniku ja vesiniku vahelise sideme paindumisele [34]. Piik lainearvuga 665 cm^{-1} on tõenäoliselt põhjustatud süsinik-vesinik sideme paindumisest ligniinis.



Joonis 7. Odrapõhu proovide FTIR spektrid.

Ligniini spektrite spektraalsed jooned lainearvudega 1325 cm^{-1} ja 1262 cm^{-1} iseloomulikud süringüüli ning guaiatsüüli monomeeridele [29, 46]. Piik lainearvuga 1122 cm^{-1} vastab aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete paindumisele ligniini struktuuris [47]. Piik lainearvuga 1029 cm^{-1} on karakteristlik süsinik-hapnik sideme venimisele ja spektraalne joon lainearvuga 836 cm^{-1} on seotud süringüüli monomeeriga [45, 46]. Aurlõhkamata ja aurlõhatud *organosolv* ligniini proovide spektrites olulisi erinevuseid ei olnud, seega saab eeldada, et aurlõhkamine ei mõjutanud oluliselt ligniini struktuuri.

Sarnased FTIR spektrid aurlõhkamata ja aurlõhatud proovide *organosolv* ligniinidele saadi ka Brasiilias läbi viidud uuringus õlipalmi ja suhkrurooga [43].



Joonis 8. *Organosolv* ligniinide FTIR spektrid.

Kokkuvõte

Kliimasoojenemise negatiivse mõju leevendamiseks tuleb fossiilkütuste nagu nafta kasutamisele leida keskkonnasõbralike alternatiive. Lignotselluloosse biomassi kasutamine kütuste, energia ja kemikaalide tootmises omab suurt potentsiaali. Seni on biorafineerimine keskendunud peamiselt tselluloosi ja hemitselluloosi biopolümeeride väärindamisele, kuid ligniin on jäänud suurema tähelepanuta.

Põllumajanduse ja metsandustööstuse jääkidele, mis muidu põletatakse madala kütteväärtusega kütusena või ladestatakse kuhilates, saab anda väärindamisega uue kasutusotstarbe. Väärindamiseks kasutatakse erinevaid eeltötlusmeetodeid, et eraldada lignotselluloosse biomassi raskesti töödeldavast kompaktselt struktuurist biopolümeere. Aurlõhkamine on meetod, mis muudab biomassi paremini töödeldavaks ja hõlbustab ekstraktsiooni protsesse.

Käesoleva töö peaesmärk oli uurida, kuidas mõjutab biomassi termiline eeltötlus ja selle temperatuur ligniini ekstraheerimise efektiivsust *organosolv* meetodil. Selleks kasutati kuut temperatuurivahemikus 150 – 200 °C aurlõhatud proovi ja ühte töötlemata odrapõhu proovi. Töö esimeses etapis määrati odrapõhu proovide koostis (ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi sisaldused). Tulemused näitasid, et aurlõhkamise temperatuuri tõustes suurenes vahemikus 180 – 200 °C lõhatud proovides ligniini sisaldus ning vähenes hemitselluloosi sisaldus võrreldes aurlõhkamata prooviga. Tselluloosi sisaldus suurel määral ei muutunud.

Seejärel viidi läbi proovide *organosolv* ekstraheerimine ja hinnati protsessi efektiivsust. Tulemused kinnitasid, et proovide termiline eeltötlus kõrgematel temperatuuridel suurendas ligniini ekstraheerimise efektiivsust. Madalamatel temperatuuridel ei täheldatud ekstraheerimise efektiivsuse tõusu.

Seatud hüpotees, mille kohaselt kõrgemal temperatuuril aurlõhatud proovidest on ligniini ekstraheerimine efektiivsem leidis kinnitust. Temperatuuridel 180 – 200 °C aurlõhatud proovidest ekstraheeriti kuni 9 % rohkem biomassis sisalduvast ligniinist kui aurlõhkamata odrapõhu proovist. Samas oli temperatuuridel 150 – 170 °C lõhatud proovidest ligniini ekstraheerimine 2 – 6 % vähem efektiivsem.

Töö viimases etapis iseloomustati biomassi ja ligniini proove kasutades FTIR meetodit. FTIR *organosolv* ligniini spektrites ei olnud näha suuri muutusi, seega tehti järeldus, et aurlõhkamine ei mõjutanud ligniini struktuuri määral, mida oleks võimalik ATR-FTIR seadmega detekteerida.

Abstract

In order to reduce the negative effect of climate change an environmentally friendly alternative to fossil fuels such as petroleum needs to be found. The use of lignocellulosic biomass to produce chemicals, energy and fuels has great potential. Until now the primary focus of biorefining industries has been the valorization of cellulose and hemicellulose polymers leaving lignin without attention.

The residues of timber and agricultural sector can be valorized into valuable products instead of being burned as low value fuels or being landfilled. In order to do that there are many different pretreatment methods used for extracting biopolymers from the recalcitrant structure of lignocellulosic biomass. Steam explosion is a promising method which breaks down the recalcitrant structure of biomass and improves other extraction processes.

The main aim of this thesis was to examine how thermal pretreatment carried out at different temperatures affects the organosolv extraction efficiency of lignin. In order to determine that six samples that had been steam exploded in the temperature range of 150 – 200 °C and one regular barley straw sample were used. Firstly, the composition of the barley straw samples was determined (lignin, cellulose and hemicellulose contents). The results showed that the rise in thermal pretreatment temperature had an effect on the lignin content. When compared to the regular barley straw sample the lignin content had increased in the samples that were exploded within 180 – 200 °C and the hemicellulose content had decreased. The cellulose content remained similar to that of the regular sample.

Secondly, the organosolv extraction was carried out and the efficiency of the process was assessed. The results confirmed that the thermal pretreatment of samples at higher temperatures increased the efficiency of lignin extraction. At lower temperatures a rise in extraction efficiency was not noted.

The hypothesis according to which the lignin extraction would be more efficient from samples that had been steam exploded at higher temperatures was thus confirmed. The samples that had been exploded in the temperature range of 180 – 200 °C had up to 9 % increased total lignin extraction yield compared to the regular barley straw sample. Despite that the samples that had been exploded in the temperature range of 150 – 170 °C had a decreased total lignin extraction yield of 2 – 6 % when compared to the regular barley straw sample.

In the last part of the experiment the biomass and lignin samples were characterized using FTIR. There were no changes in the FTIR organosolv lignin spectra, therefore the conclusion was made that steam explosion did not affect the structure of the lignin to an extent that was detectable by an ATR-FTIR instrument.

Tänuavaldused

Autor soovib tänada juhendajat Maria Kulpi, tänu kelle nõuannetele koostati käesolev töö. Lisaks soovib autor tänada Violetta Umerenkovat, kes aitas analüüsida HPLC tulemusi ja Olivia-Stella Salmi, kes demonstreeris, kuidas viia läbi Klason meetodil ligniini kvantitatiivset määramist ning Evelin Solominat, kes näitas, kuidas viia läbi *organosolv* meetodil ligniini ekstraheerimist.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- [1] Kumar, A., Gautam, A., & Dutt, D. (2016). Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(3), 149–168. <https://doi.org/10.4236/abb.2016.73014>
- [2] Xu, F., & Li, Y. (2017). Biomass Digestion. In Martin A. Abraham (Eds.), *Encyclopedia of Sustainable Technologies*, (pp. 197–204). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10108-3>
- [3] Zhang, Y., & Cheng, G. (2023). Lignin-containing hydrogels: Transforming a low-value byproduct to absorbents, wound dressings and strain sensors. *Chemical Engineering Journal*, 475. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146460>
- [4] Li, T., & Takkellapati, S. (2018). The current and emerging sources of technical lignins and their applications. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(5), 756–787. <https://doi.org/10.1002/bbb.1913>
- [5] Mondal, A. K., Uddin, M. T., Sujan, S. M. A., Tang, Z., Alemu, D., Begum, H. A., Li, J., Huang, F., & Ni, Y. (2023). Preparation of lignin-based hydrogels, their properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125580>
- [6] Li, K., Zhong, W., Li, P., Ren, J., Jiang, K., & Wu, W. (2023). Antibacterial mechanism of lignin and lignin-based antimicrobial materials in different fields. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126281>
- [7] Karunarathna, M. S., & Smith, R. C. (2020). Valorization of lignin as a sustainable component of structural materials and composites: Advances from 2011 to 2019. *Sustainability (Switzerland)*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/su12020734>
- [8] Chen, Z., Chen, L., Khoo, K. S., Gupta, V. K., Sharma, M., Show, P. L., & Yap, P. S. (2023). Exploitation of lignocellulosic-based biomass biorefinery: A critical review of renewable bioresource, sustainability and economic views. *Biotechnology Advances*, 69. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108265>
- [9] Tripathi, N., Hills, C. D., Singh, R. S., & Atkinson, C. J. (2019). Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *Npj Climate and Atmospheric Science*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/s41612-019-0093-5>
- [10] Bhatia, S. K., Gurav, R., Choi, T. R., Han, Y. H., Park, Y. L., Park, J. Y., Jung, H. R., Yang, S. Y., Song, H. S., Kim, S. H., Choi, K. Y., & Yang, Y. H. (2019). Bioconversion of barley straw lignin into biodiesel using *Rhodococcus* sp. YHY01. *Bioresource Technology*, 289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121704>

- [11] Worku, L. A., Bachheti, A., Bachheti, R. K., Rodrigues Reis, C. E., & Chandel, A. K. (2023). Agricultural Residues as Raw Materials for Pulp and Paper Production: Overview and Applications on Membrane Fabrication. *Membranes*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/membranes13020228>
- [12] Singh, N., Singhania, R. R., Nigam, P. S., Dong, C. Di, Patel, A. K., & Puri, M. (2022). Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126415>
- [13] Hoang, A. T., Nguyen, X. P., Duong, X. Q., Ağbulut, Ü., Len, C., Nguyen, P. Q. P., Kchaou, M., & Chen, W. H. (2023). Steam explosion as sustainable biomass pretreatment technique for biofuel production: Characteristics and challenges. *Bioresource Technology*, 385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129398>
- [14] Chen, H., & Sui, W. (2017). Steam explosion as a hydrothermal pretreatment in the biorefinery concept. In Hector A. Ruiz, Mette H. Thomson & Heather L. Trajano (Eds.), *Hydrothermal Processing in Biorefineries: Production of Bioethanol and High Added-Value Compounds of Second and Third Generation Biomass*, (pp. 317–332). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56457-9_12
- [15] Martin-Sampedro, R., Capanema, E. A., Hoeger, I., Villar, J. C., & Rojas, O. J. (2011). Lignin changes after steam explosion and laccase-mediator treatment of eucalyptus wood chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8761–8769. <https://doi.org/10.1021/jf201605f>
- [16] Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., & Stroeve, P. (2009). Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713–3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
- [17] Ferreira, J. A., & Taherzadeh, M. J. (2020). Improving the economy of lignocellulose-based biorefineries with organosolv pretreatment. *Bioresource Technology*, 299. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122695>
- [18] Zhang, J., Zhou, H., Liu, D., & Zhao, X. (2019). Pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient enzymatic saccharification of cellulose. In Abu Yousuf, Domenico Pirozzi & Filomena Sannino (Eds.), *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*, (pp. 17–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00002-2>
- [19] Farid, M. A. A., Ibrahim, I., Lease, J., Tsubota, T., & Andou, Y. (2023). Effect of solvent and acid catalyst selection on lignin recovery and purity in autoclave-assisted organosolv extraction. *Bioresource Technology Reports*, 24. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101622>
- [20] Krasznai, D. J., Champagne Hartley, R., Roy, H. M., Champagne, P., & Cunningham, M. F. (2018). Compositional analysis of lignocellulosic biomass: conventional methodologies and

future outlook. *Critical Reviews in Biotechnology* 38,(2), 199–217.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1331336>

- [21] Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2008). Determination of Extractives in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); Issue Date 7/17/2005. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
- [22] Akalin, M. K., & Karagöz, S. (2014). Analytical pyrolysis of biomass using gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 61, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.006>
- [23] Zhang, H., & Row, K. H. (2015). Extraction and separation of polysaccharides from laminaria japonica by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 53(4), 498–502. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu073>
- [24] Llano, T., Quijorna, N., Andrés, A., & Coz, A. (2017). Sugar, acid and furfural quantification in a sulphite pulp mill: Feedstock, product and hydrolysate analysis by HPLC/RID. *Biotechnology Reports*, 15, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.06.006>
- [25] Ibáñez, A. B., & Bauer, S. (2014). Downscaled method using glass microfiber filters for the determination of Klason lignin and structural carbohydrates. *Biomass and Bioenergy*, 68, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.013>
- [26] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011). http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
- [27] Lee, R. A., Bédard, C., Berberi, V., Beauchet, R., & Lavoie, J. M. (2013). UV-Vis as quantification tool for solubilized lignin following a single-shot steam process. *Bioresource Technology*, 144, 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.045>
- [28] Skoog, Douglas Arvid, Holle, F. James, & Crouch, Stanley R. (2016). *Principles of instrumental analysis: Seventh edition*. Cengage Learning.
- [29] Latif, N. H. A., Brosse, N., Ziegler-Devin, I., Chrusiel, L., Hashim, R., & Hussin, M. H. (2023). Structural characterization of modified coconut husk lignin via steam explosion pretreatment as a renewable phenol substitutes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127210>
- [30] Falco, G. (2016). Huiles végétales époxydées et alcool furfurylique : deux types de monomères pour l'élaboration de thermodurcissables et de composites biosourcés. *Hyper Articles en Ligne*. <https://theses.hal.science/tel-01671166>

- [31] König-Mattern, L., Komarova, A. O., Ghosh, A., Linke, S., Rihko-Struckmann, L. K., Luterbacher, J., & Sundmacher, K. (2023). High-throughput computational solvent screening for lignocellulosic biomass processing. *Chemical Engineering Journal*, 452. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.139476>
- [32] Wehr, T., Scandella, C., Schoenmakers, P., Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009). *Introduction to modern liquid chromatography*. Wiley.
- [33] Shimadzu. (2024). *Refractive Index Detection*. https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/refractive_index_detection.html. (Vaadatud 20.02.2024)
- [34] Javier-Astete, R., Jimenez-Davalos, J., & Zolla, G. (2021). Determination of hemicellulose, cellulose, holocellulose and lignin content using FTIR in *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) K. Schum. and *Guazuma crinita* Lam. *PLOS ONE*, 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256559>
- [35] Stuart, Barbara. (2004). *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Wiley.
- [36] Jafari, M. J. (2017). *Application of Vibrational Spectroscopy in Organic Electronics* [Doctoral dissertation, Linköping University]. Researchgate. <https://www.researchgate.net/publication/320780724>
- [37] Specac. (2021). *The Basics of ATR-FTIR spectroscopy*. <https://specac.com/theory-articles/introduction-to-atr-ftir-spectroscopy-part-1-the-basics/>. (Vaadatud 04.04.2024)
- [38] Raud, M., Krennhuber, K., Jäger, A., & Kikas, T. (2019). Nitrogen explosive decompression pre-treatment: An alternative to steam explosion. *Energy*, 177, 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2019.04.071>
- [39] Jõul, P., Ho, T. T., Kallavus, U., Konist, A., Leiman, K., Salm, O.-S., Kulp, M., Koel, M., & Lukk, T. (2022). Characterization of Organosolv Lignins and Their Application in the Preparation of Aerogels. *Materials* 15(8), 2861. <https://doi.org/10.3390/ma15082861>
- [40] Zeng, J., Tong, Z., Wang, L., Zhu, J. Y., & Ingram, L. (2014). Isolation and structural characterization of sugarcane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 154, 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.072>
- [41] Auxenfans, T., Crônier, D., Chabbert, B., & Paës, G. (2017). Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0718-z>
- [42] Kim, Y.-R., & Chung, B. (n.d.). Lignin Removal from Barley Straw by Ethanosolv Pretreatment. *KSBB*, 24(6). <https://www.researchgate.net/publication/263361129>

- [43] Pereira Marques, F., Lima Soares, A. K., Lomonaco, D., Alexandre e Silva, L. M., Tédde Santaella, S., de Freitas Rosa, M., & Carrhá Leitão, R. (2021). Steam explosion pretreatment improves acetic acid organosolv delignification of oil palm mesocarp fibers and sugarcane bagasse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 175, 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.174>
- [44] Shi, L., Shi, J., & Li, J. (2012). Metabolites changes in inclined stem. *BioResources*, 7(3). <https://www.researchgate.net/publication/324055021>
- [45] Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., & Wang, D. (2013). Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, 104, 801–809. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.019>
- [46] Kaur, V., Prasad Dash, B., Vermani, S., & Devi, A. (2022). Extraction, quantification and characterization of lignin extracted from bamboo biomass. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.116>
- [47] Wittner, N., Slezsák, J., Broos, W., Geerts, J., Gergely, S., Vlaeminck, S. E., & Cornet, I. (2023). Rapid lignin quantification for fungal wood pretreatment by ATR-FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 285. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121912>

Lisad

Lisa 1 Odrapõhu FTIR spektri piikide selgitused

cm ⁻¹	Piigi selgitus	Biomassi komponent
3323,41	Hüdroksüülrühma venimine	Ligniin, tselluloos, hemitselluloos
2916,42	Sümmeetriline metüül- ja metüleenrühma venimine	Ligniin, tselluloos, hemitselluloos
2850,84	Antisümmeetriline metüül- ja metüleenrühma venimine	Ligniin, tselluloos, hemitselluloos
1704,14	Süsinik-hapnik kaksiksideme venimine karbonüülrühmas	Ligniin, hemitselluloos
1647,24	Süsinik-hapnik kaksiksideme venimine karbonüülrühmas	Ligniin, hemitselluloos
1597,09	Aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete võnkumine	Ligniin
1515,11	Aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete võnkumine	Ligniin
1452,42	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Ligniin
1424,45	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Ligniin
1362,73	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Tselluloos, hemitselluloos
1316,44	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Tselluloos
1236,39	Süsinik-hapnik sideme venimine ja hapnik-vesinik sideme paindumine	Tselluloos, hemitselluloos
1158,27	Süsinik-hapnik-süsinik sideme asümmeetriline venimine	Tselluloos
1105,23	Süsinik-hapnik-süsinik sidemete venimine ja ligniini aromaatsete ühendite süsinik-vesinik sidemete paindumine	Tselluloos, hemitselluloos ja ligniin
1054,12	Süsinik-hapnik sideme võnkumine	Tselluloos, hemitselluloos
1031,93	Süsinik-hapnik sideme võnkumine	Ligniin
895,95	Esimese süsiniku ja vesiniku vahelise sideme paindumine	Tselluloos
665,45	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Ligniin

[29, 34, 44, 45]

Lisa 2 *Organosolv* ligniinide FTIR spektri piikide selgitused

cm ⁻¹	Piigi selgitus	Biomassi komponent
3384,17	Hüdroksüülrühma venimine	Ligniin, tselluloos, hemitselluloos
2917,38	Sümmeetriline metüül- ja metüleenrühma venimine	Ligniin, tselluloos, hemitselluloos
2848,91	Antisümmeetriline metüül- ja metüleenrühma venimine	Ligniin, tselluloos, hemitselluloos
1710,89	Süsinik-hapnik kaksiksideme venimine karbonüülrühmas	Ligniin, hemitselluloos
1653,02	Süsinik-hapnik kaksiksideme venimine karbonüülrühmas	Ligniin, hemitselluloos
1593,23	Aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete võnkumine	Ligniin
1512,22	Aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete võnkumine	Ligniin
1462,07	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Ligniin
1422,53	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Ligniin
1368,52	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Tselluloos, hemitselluloos
1325,12	Süringüüli monomeer	Ligniin
1262,43	Guaiatsüüli monomeer	Ligniin
1219,03	Süsini-hapnik, süsinik-süsinik ja süsinik-hapnik kaksiksidemete venimine	Ligniin
1121,63	Aromaatsete ühendite süsinik-süsinik sidemete paindumine	Ligniin
1029,04	Süsinik-hapnik sideme venimine	Tselluloos, hemitselluloos, ligniin
919,10	Glükosiidsideme võnkumine	Tselluloos, hemitselluloos
836,16	Süringüüli monomeer	Ligniin
723,32	Süsinik-vesinik sideme paindumine	Tselluloos, hemitselluloos

[29, 34, 44, 45, 46, 47]

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Karl Romek Staškevitš

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Aurlõhkamise temperatuuri mõju ligniini ekstraheerimise efektiivsusele“

mille juhendaja on Maria Kulp

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

_____ (kuupäev)

¹ Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingulise tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.