

TALLINNA TEHNICAÜLIKOOL
Loodusteaduskond
Keemia ja biotehnoloogia instituut

SUHKRUTE MÄÄRAMINE TSELLULOOSSES BIOMASSIS JA PRODUKTIDES

Bakalaureusetöö

Violetta Umerenkova

Juhendaja: Maria Kulp, vanemteadur

Kaasjuhendaja: Tiit Lukk, vanemteadur

Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia LAAB

2022

Deklareerin, et käesolev lõputöö on minu iseseisva töö tulemus ning kinnitan, et esitatud materjalide põhjal ei ole varem akadeemilist kraadi taotletud.

Kinnitan, et antud töö koostamisel olen kõikide teiste autorite seisukohtadele, probleemipüstitustele, kogutud arvandmetele jmt viidanud.

Violetta Umerenkova

(allkiri ja kuupäev)

Juhendaja: Maria Kulp

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.

(allkiri ja kuupäev)

Kaitsmiskomisjoni esimees:

Lubatud kaitsmisele

.....

(nimi, allkiri, kuupäe)

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	4
SISSEJUHATUS	5
1 LIGNOTSELLULOOSNE BIOMASS.....	6
1.1 Lignotselluloossne biomass ja selle koostis	6
1.2 Lignotselluloosse biomassi eeltöötlusmeetodid.....	7
2 SUHKRUD.....	9
2.1 Suhkrute struktuur ja kasu	9
2.2 Suhkrute määramismeetodid.....	10
3 KAPILLAARELEKTROFOREES	12
3.1 Kapillaarelektroforeesi põhimõtted.....	12
3.2 Elektroosmootne voog ja elektroforeetiline liikuvus	13
4 ANALÜÜLISE MEETODI TULEMUSLIKKUSE NÄITAJAD	16
5 EKSPERIMENTAALNE OSA	17
5.1 Kasutatud reagendid, kemikaalid ja lahused	17
5.2 Aparatuur ja töövahendid	18
5.3 Katsete läbiviimise tingimused.....	18
5.4 Biomassi proovide ettevalmistamine	19
6 TULEMUSED	21
6.1 Suhkrute modifitseerimine CE analüüsiks.....	21
6.2 CZE optimeerimine	21
6.3 Meetoodika kalibreerimisgraafikud ning avastamis- ja määramispiirid	22
6.4 CE meetoodika korduvuse ja korratavuse hindamine	23
6.5 Biomassi ja ligniini proovide tulemused.....	24
6.6 Tulemuste analüüs	26
KOKKUVÕTE.....	28
SUMMARY	29
KASUTATUD KIRJANDUS.....	30
LISAD.....	33
Lisa 1 5-HMF kalibreerimisgraafik	33
Lisa 2 Galaktoosi, fukoosi ja tsellobioosi kalibreerimisgraafikud	33
Lisa 3 Glükoosi, mannoosi, arabinoosi ja ksüloosi kalibreerimisgraafik.....	34

KASUTATUD LÜHENDID

LB	lignotselluloossne biomass
NaOH	naatriumhüdroksiid
H	<i>p</i> -hüdroksüfenüül ühik
G	guaiatsüül ühik
S	süringüül ühik
H_2SO_4	väävelhape
C aatom	süsiniku aatom
C_4	tetroos
C_5	pentoos
C_6	heksoos
UV	ultraviolett
CaCO_3	kaltsiumkarbonaat
GC	gaasikromatograafia
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
RI	refraktiivse indeksi detektor
CE	kapillaarelektroforees
CZE	kapillaartsoonelektroforees
EOF	elektroosmoos
SiOH	silanol
LoD	avastamispiir
LoQ	määramispiir
Dest. vesi	destilleeritud vesi
CH_3COOH	äädikhape
5-HMF	5-hüdroksümetülfurfuraal
Na_2HPO_4	dinaatriumvesinikfosfaat
dw	kuivmass
Misc.	<i>miscanthus</i> × <i>giganteus</i>

SISSEJUHATUS

Lignotselluloosne biomass on üks levinumatest materjalidest maailmas. See taimset päritolu materjal on laialt kasutusel puidu- ja paberitööstuses. Hetkel arendatakse meetodeid, mille abil saaks lignotselluloosi kasutada bioetanooli, polümeeride, peenkemikaalide ja muude taastuvtoormel põhinevate materjalide tootmiseks.

Lignotselluloosi keemiline töötlemine on täis erinevaid väljakutseid selle keeruka struktuuri pärast, koosnedes tselluloosist, hemitselluloosist ja ligniinist, mis on omavahel tugevasti ristsidestatud. Iga biomassi komponendi eraldamiseks on välja töödatud erinevad meetodid, mida kasutatakse sõltuvalt eesmärgist.

Hemitselluloos ja tselluloos koosnevad omakorda suhkrutest, mida uuritakse lignotselluloosi lagundamise meetodite efektiivsuse hindamiseks. Hemitselluloosist ja tselluloosist saadud suhkruid on võimalik kasutada toiduainetööstuses magusainete tootmiseks, bakterite kasvusubstraadina ning peenkemikaalide, plasti ja sünteetiliste materjalide tootmiseks.

Suhkrud on olulised biomassi kirjeldavad indikaatorid. Suhkrute analüüs teostatakse biomassi iseloomustamiseks ja ligniini puhtuse hindamiseks. Kõige tuntum suhkrute määramismeetod on kõrgsurvevedelikkromatograafia, millel on aga rida puudusi. Alternatiivina saab suhkrute analüüsiks kasutada kiiresti arenevat kapillaarelektroforeesi meetodit, mis on efektiivne ja keskkonnasõbralik.

Käesoleva töö eesmärkideks oli:

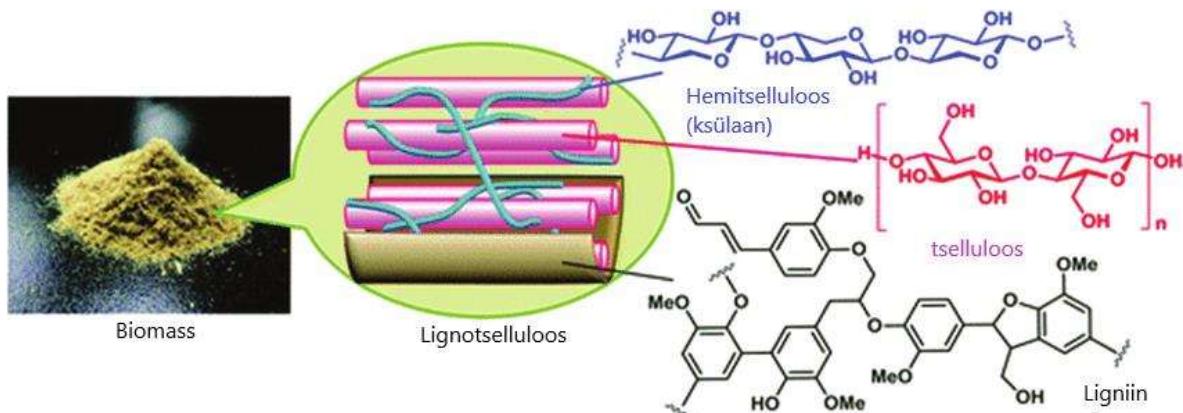
1. Optimeerida kapillaarelektroforeesi meetodika tingimusi monosahhariidide lahutamiseks ja määramiseks lignotselluloosses biomassis ja selle töötlemise produktides;
2. Koostada kalibreerimisköverad kasutades välisstandardeid monosahhariidide kvantitatiivseks ja kvalitatiivseks määramiseks;
3. Hinnata kapillaarelektroforeesi meetodika korratavust ja detekteerimispiire iga suhkru jaoks;
4. Rakendada optimeeritud kapillaarelektroforeesi meetodikat suhkrute kvantitatiivseks ja kvalitatiivseks määramiseks erinevates biomassides ja produktides.

1 LIGNOTSELLULOOSNE BIOMASS

1.1 Lignotselluloossne biomass ja selle koostis

Lignotselluloossne biomass (LB) on üks väärthuslikumatest materjalidest maailmas. LB all mõeldakse taimset päritolu biomassi, mis koosneb ligniinist, hemitselluloosist ja tselluloosist [1]. Antud komponentide täpne protsendiline sisaldus sõltub taime päritolust ja liigist. Üldiselt on okaspuudes 40-55% tselluloosi, 24-40% hemitselluloosi ja 18-25% ligniini, aga lehtpuudes 45-50% tselluloosi, 25-35% hemitselluloosi ja 25-35% ligniini [2]. Biomassi põhiline kasutusala on endiselt pigem puidu- ja paberitööstuses, aga aktiivselt arendatakse meetodeid ka biokütuste, polümeeride, taastuvtoormel põhinevate materjalide ja peenkemikaalide tootmiseks kuna biomass on rikas ja kätesaadav taastuva süsiniku allikas [1].

LB töötlemine on keeruline protsess, mille põhjuseks on selle komponentide koostis ja reaktiivsus. Tselluloos ja hemitselluloos on tugevas ühenduses ligniiniga, mis teeb nende eraldamist teineteisest suhteliselt raskeks [2].



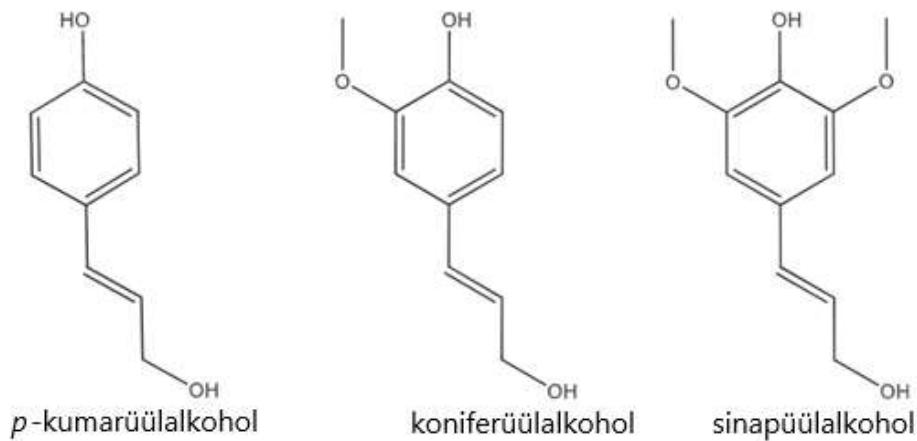
Joonis 1. Lignotselluloosse biomassi koostis [3].

Tselluloos on loodus esinev biopolümeer, mida leidub taimedes, bakterites, vetikates ja teistes biomassides. Tselluloos koosneb glükoosi monomeeridest, mis on ühendatud β -1,4-glükosiidsidemetega. Selle lahustumatus vees, nörkades hapetes ja alustes on tingitud tugevatest molekulivahelistest ja sisemolekulaarsetest vesiniksidemetest monomeeride vahel. Tselluloosi jaotatakse 17.5% naatriumhüdroksiidi lahuses (NaOH) lahustuvuse ja polümerisatsiooni astme järgi kolmeks: α - ja β -tselluloosiks. Nendest kolmest kasutatakse tselluloosi puhtuse hindamiseks α -tselluloosi, sest see omab kõrgemat polümerisatsiooni astet ja ei lahustu NaOH lahuses [2].

Teiseks LB komponendiks on hemitselluloos, mis omab biomassis sidumisrolli. See ühendab ligniini ja tselluloosi moodustades esimesega ester- ja eetersidemeid. Tselluloosiga aga moodustatakse mikrofibrillide vahel sidemeid taimse rakuseina tugevdamiseks. Hemitselluloosil on võrreldes

tselluloosiga madal polümerisatsiooni aste ning on seetõttu lahustuv nõrkades hapetes ja alustes [2].

Viimane LB komponent on ligniin. Ligniin on aromaatne biopolümeer, mille põhirolliks on rakuseina tugevdamine, taime kasvu kiirendamine, patogeenide vastu resistentsuse tagamine, vee transpordi parandamine ja puidu mikroorganismide poolt lagundamise aeglustumine. Ligniini kolmeks põhilisteks ehitusplokkideks on *p*-kumarüül-, koniferüül- ja sinapüülalkoholid [2].



Joonis 2. Ligniini põhilised ehitusplokid [4].

Ligniini biosüntees toimub antud alkoholide ensümaatilise dehydrogenatsiooni teel, mille tulemusena sünteesitakse *p*-hüdroksüfenüül (H), guaiatsüül (G) ja süringüül ühikud (S). Igal taimeliigil võib ligniini koostis erineda, näiteks esineb okaspuudes rohkem G ühikuid ja vähesel määral ka H ühikuid võrreldes lehtpuudega, kus esinevad pigem G ja S ühikud. Rohttaimedest on aga leitavad kõik kolm ühikut [5].

Ligniini alaühikud on ühendatud juhuslikke ja mitte lineaarsete estersidemetega ja süsinik-süsiniksidemetega ensüüm-katalüüsitud radikaal-vahéühendite kaudu, mille tulemusena moodustuvad keerulised kolmemõõtmelised polümeerid. Just sellel põhjusel on ligniini depolümeriseerimine nii keemiliselt kui ka mikrobioloogiliselt raskendatud [2, 5].

1.2 Lignotselluloosse biomassi eeltöötlusmeetodid

LB uurimiseks peab seda enne analüüsimist töötlema. Eeltöötluse all mõeldakse LB intramolekulaarsete sidemetega lõhkumist, mille tulemusena lahutatakse teineteisest ligniin, tselluloos ja hemitselluloos. Antud protsessi läbiviimiseks kasutatakse erinevaid meetodeid. Meetodi valimisel peab arvestama biomassi parameetritega, sest mõne meetodi kasutamisel võib väheneda näiteks suhkrute saagis. Kasutusel on füüsikalised, keemilised, bioloogilised ja mõned kombineeritud töötlemismeetodid [6, 7].

Füüsikaliste meetodide all mõeldakse protsesse, mille tulemusena biomassi osakeste suurus väheneb, toimub tselluloosi polümerisatsiooniastme vähenemine ja ligniini, hemitselluloosi ja tselluloosi kompleksi lõhkumine. Tihti kasutatakse füüsikalisi meetodeid koos teiste eeltöötuse meetoditega selleks, et optimeerida töötlemistingimus, kiirendada tselluloosi hüdrolüsi ja vähendada protsessi energiakulu. Tuntud füüsikalised meetodid on: mehaaniline ja hüdrotermiline eeltöötlemine [6, 7].

Keemilisi meetodeid rakendatakse kiirema biomassi lagundamise saavutamiseks kasutades happeid, aluseid, orgaanilisi solvente ja ionseid vedelikke. Keemiline eeltöötlemine on laialt kasutusel selle kiiruse ja efektiivsuse pärast, aga võrreldes füüsikalise meetodiga ei ole keemiline töötlemine alati kõige loodussõbralikum ning kasutatavad solvendid võivad olla suhteliselt kallid [6].

Üks efektiivsemaid keemilisi meetodeid on organosolv meetod. Antud meetodi saaduseks on kõrge kvaliteediga ligniin. Ligniini eraldamiseks biomassist kasutatakse kas puhtaid orgaanilisi solvente (nagu metanol, etanol, atsetoon) või nende segu veega orgaaniliste ja mineraalhapete juuresolekul [7].

Teine tundud meetod on sooda töötlemisprotsess. Sooda protsessis kasutatakse puidu töötlemiseks NaOH lahust. Mõnikord lisatakse ka antrakinooni suhkrute lagundamise peatamiseks. Võrreldes Kraft ja sulfiidiprotessiga on sooda meetodi produktiks väävlivaba ja kõrgema puhtusega ligniin [8, 9].

Kraft protsess on enimkasutatav keemiline meetod biomassi töötlemiseks. Biomass lisatakse NaOH ja sulfiidide segusse ning töödeldakse umbes kaks tundi 150-180 °C juures. Kõrgel pH-1 toimub ligniini fenoolsete hüdroksülrühmade ionisatsioon, mille tulemusena katkevad tselluloosi ja ligniini vahel olevad sidemed [10].

Sulfitide meetod kasutab võrreldes Kraft protsessiga väga happelisi lahuseid. Biomass töödeldakse kas väävlishappe või tema sooladega seitse tundi 125-175 °C juures. Tulemusena saadakse madala hemitselluloosi sisaldusega puitmass [8].

Kombineeritud füüsikokeemilised meetodid on enimkasutatavad LB töötlemiseks. Töötlemisprotsessi tulemuseks on efektiivne ligniini lagundamine lühema aja jooksul, aga võrreldes füüsikaliste ja keemiliste meetoditega on antud tehnoloogia keerulisem, mille tõttu võivad ka energiakulud olla suuremad. Tuntud füüsikokeemilised meetodid on aurlõhkamine ja märg oksüdeerimine [2, 6].

Bioloogilises meetodis kasutatakse biomassi töötlemiseks mikroorganisme (nt seeni, bakttereid) ja ensüüme. Antud meetod on potentsiaalselt kõige loodussõbralikum ja turvalisem kuna ei kasutata kemikaale ja energiakulud on madalad. Puudusteks on pikki töötusaeg ning mikroorganismide kasvu on vaja jälgida [2].

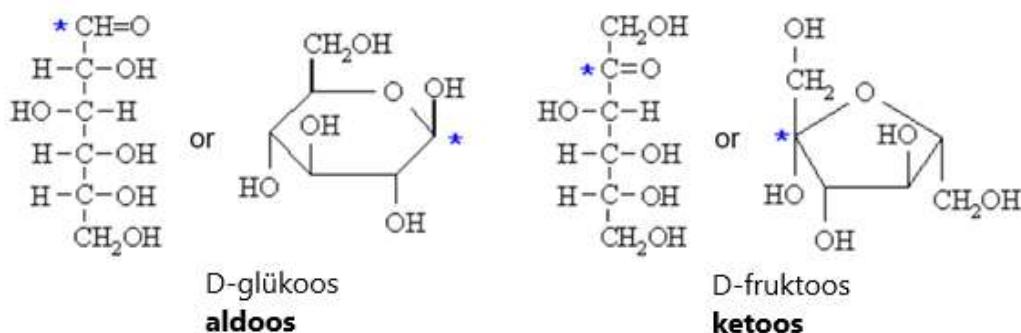
2 SUHKRUD

2.1 Suhkrute struktuur ja kasu

Suhkrud on väärthuslikud looduslikud ühendid ja omavad suurt rolli metabolismis energia ja süsiniku allikatena. Suhkruid leidub taime rakuseinas ning taime ja looma ekstratsellulaarses maatriksis, kus nad täidavad struktuurset funktsiooni [11].

Suhkruid liigitakse tihti struktuuri ja koostise järgi. Struktuurne jaotus toimub suhkru molekulide koguse alusel: monosahhariigid (üks suhku molekul), disahhariigid (kaks suhku molekuli), oligosahhariigid (kolm kuni kuus suhku molekuli) ja polüsahhariigid (rohkem kui kuus suhku molekuli). Disahhariigid, oligosahhariigid ja polüsahhariigid tekivad monosahhariidide vahel glükiisidemete moodustamisel [12, 13].

Suhkruid liigitakse koostise järgi aldoosideks ja ketoosideks. Aldoos on suhkur, kus on olemas aldehydüdrühm ja ketoos on vastavalt ketorühmaga suhkur. Suhkruid on võimalik liigitada ka süsiniku aatomite arvu (C aatomite) järgi: tetroosid (C_4), pentoosid (C_5) ja heksoosid (C_6) [13].



Joonis 3. Aldoosid ja ketoosid [13].

Üldiselt on loodusnes enamlevinumad kolm C_6 suhkrut ja kaks C_5 suhkrut. C_6 suhkrud on glükoos, mannoos ja galaktoos; C_5 suhkrud on ksüloos ja arabinoos. LB-s esinevad suhkrud tselluloosi ja hemitselluloosi koostisosadena. Tselluloos koosneb omavahel glükiisidemetega ühendatud glükoosi molekulidest, ehk nende sidemete lõhkumisel on võimalik saada glükoosi monomeere. Hemitselluloosi põhikomponentideks on polüksüloos, glükomannaan ja galaktoglükomannaan [2, 7].

Looduslikest materjalidest eraldatud suhkruid kasutatakse energiaallikatena ja maitseainetena. Suhkrutest sünteesitakse tihti olulisi kemikaale, nagu furaanid, furfuralid, happed ja alkoholid. Pärast toodetakse nendest ühenditest inimtegevuseks vajalikke materjale ja aineid: sorbitool, mannitool, ksülitool (kasutatakse magusainetena ja kosmeetikas), nailon, plast, etanol ja metanol [7].

Suhkrute eraldamine lignotselluloosist on majanduslikult kasulik protsess. Ühe tonni lignotselluloosi väärthus on algsest 50\$, aga kui sellest eraldada suhkrud, siis saadakse sellised väärthuslikud produktid nagu glükoos (450-650\$ tonni eest) või ksüloos (1000-2500\$ tonni eest). Lignotselluloos on oma kättesaadavuse ja odavuse tõttu väärthuslikuks alternatiiviks fossiilsetel toormetel põhinevatele sünteetilistele ainetele ja ka fossiilkütustele [7].

2.2 Suhkrute määramismeetodid

Biomassis on ligniin, tselluloos ja hemitselluloos tugevalt ühendatud. Suhkrute määramiseks biomassist peab proove esialgu analüüsiks ette valmistama ehk lagundama tselluloosi ja hemitselluloosi vees lahustuvateks monosuhkruteks ja seejärel neid kromatograafiliselt või elektroforeetiliselt lahutama [14]. Suhkruid on võimalik viia lahusesse kasutades näiteks Klason meetodit [15].

Klason meetod on gravimeetriline meetod ligniini kvantitatiivseks määramiseks. Pärast 72% väävelhappega (H_2SO_4) töötlemist toimub polüsahhariidide lagunemine ja lahustumatu ligniini eraldumine [16]. Protsessi tulemusena saadakse hemitselluloosi ja tselluloosi monomeeride lahus ning lahustumata ja lahustuv ligniin. Enne analüusi läbiviimist aga suhkrute lahused neutraliseeritakse, kuna pärast H_2SO_4 -ga töötlemist on lahuste pH väga madal, mis võib oluliselt mõjutada analüusi tulemust [17]. Lahuste neutraliseerimiseks kasutatakse kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$). Lahusesse lisatakse selline $CaCO_3$ kogus, mis ei tõstaks pH-d üle 9, kuna see võib põhjustada suhkrute lagunemise. Pärast neutraliseerimist segu tsentrifugitakse ja saadud supernatant eraldatakse järgnevate analüüside teostamiseks [14].

Suhkrute määramiseks LB-s ja selle töötlemise produktides on välja töötatud mitmed analüütilised meetodid. Biomassi proovide uurimine on ajamahukas protsess, kuna proovide ettevalmistamine võib vahepeal koosneda mitmest etapist. Suhkruid on ka raske detekteerida, kuna nad ei absorbeeri UV valgust muundamata kujul [11].

Tuntud suhkrute määramismeetodid on gaasikromatograafia (GC) ja kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC). Nii GC kui ka HPLC on analüütilised meetodid, mis võimaldavad määrata teatud analüüdi olemasolu proovis ja selle kontsentratsiooni. GC-s kasutatakse mobiilse faasina gaasi, aga HPLC-s on mobiilseks faasiks vedelik [18, 19].

GC analüüsi esimeseks etapiks on proovi sisestamine kolonni dosaatori kaudu. Kolonni sisepind on kaetud liikumatu faasiga, mis võib olla kas adsorbent (tseoliit või polümeerid) või vedelik. Kolonn on asetatud termostaati, kus toimub proovi lahutamine kuumutamisel. Kolonni lõppu on paigaldatud detektor, mis muundab signaali väljunud ainete kontsentratsiooni kohta elektriliseks signaaliks [18, 20].

HPLC on klassikaline suhkrute määramismeetod, kus mobiilseks faasiks või eluendiks on tavaliselt orgaaniliste lahustite segu või soolade vesilahused. Analüüsi käigus pumbatakse eluenti läbi peeneteralise silikageeli täidisega kolonni, mille lõpus olev detektor tõlgendab signaali elektriliseks signaaliks. Proovi komponentide interakteerumine täidisega sõltub sellistest parameetritest nagu ioonvahetus, adsorpsioon ja osakeste suurus, ehk neid parameetreid saab kasutada analüüsi optimeerimiseks [20, 21].

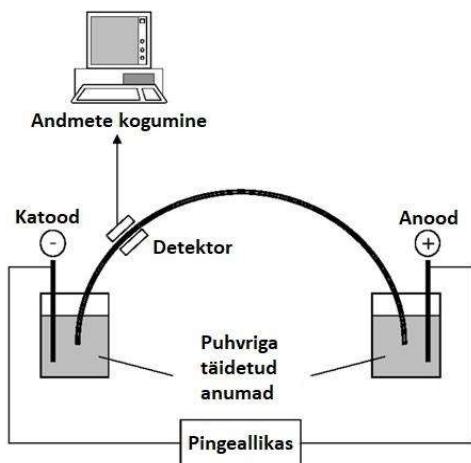
Suhkrute määramisel kasutatakse enamasti HPLC-d refraktiivse indeksi detektoriga (RI), mis mõõdab murdumisnäitaja erinevusi kahes kohas: esimeses voolab puhas eluent ja teises kolonnist väljunud eluent. Antud detektori kasutamisel on usaldusväärselt võimalik tõestaada glükoosi, fruktoosi ja sahharoosi olemasolu proovides [20, 21]. HPLC meetodi puuduseks on aga näiteks RI detektori madal tundlikkus, piikide laienemine ja halb lahutuvus [17, 20]. Kapillaarelektroforees on suhteliselt uus ja kiiresti arenev analüütiline meetod, mis võimaldab lahutada aineid väga efektiivselt, kiirelt ja sõltuvalt detektorist võib tagada ka madalamaid määramispiire.

3 KAPILLAARELEKTROFOREES

3.1 Kapillaarelektroforeesi põhimõtted

Kapillaarelektroforees (CE) on analüütiline meetod segu komponentideks lahutamiseks elektriväljas. Tänapäeval kasutatakse CE-d rohkem hea lahutuvuse, selektiivsuse ja efektiivsuse pärast. CE-s kasutatakse solvente ja proove väga väikestes koguses ning proovide ettevalmistuse etapp ei ole nii pikki vörreledes teiste meetoditega [22, 23]. CE võib omakorda jagada kuueks tüübiks: kapillaartsoonelektroforees, kapillaargeelektroforees, mitsellaarne elektrokineetiline kromatograafia, kapillaarne elektrokromatograafia, isotahforees ja isolelektriline fokuseerimine. Käesolevas töös kasutati kapillaartsoonelektroforeesi meetodit (CZE) UV detektsiooniga [23].

Tüüpiline CZE seade koosneb kõrgepingeallikast, UV- või fluorescentsdetektorist, kvarts-, klaas- või teflonkapillaarist ja arvutist. Mõnedel seadmetel on olemas termostaat temperatuuri stabiliseerimiseks, sest temperatuur mõjub tulemuste reproduktsioonile proovilahuse viskoossuse muutumise tõttu. Kõrgepingeallikas on ühendatud kahte elektroodiga, mis rakendab kõrgepingeet kapillaaris ümber vahemikus 10 kuni 30kV. Mõlemad kapillaari otsad on sisestatud elektrolüüdi lahusesse ja on ühenduses elektroodidega. Katoodi pool asuva kapillaari otsas on aken, millega läbi UV valgus analüüdi absorptsiooni määramiseks. Enne katse läbiviimist peab kapillaari täitma puhverlahusega kapillaari sisepinna aktiveerimiseks [20, 23].



Joonis 4. CZE seadme skeem [24].

Pinge rakendamisel hakkavad proovi komponendid elektriväljas liikuma katoodi poole. Ioonide liikumiskiirus sõltub elektroosmootsetest voost ja elektroforeetilisest liikuvusest [20, 23].

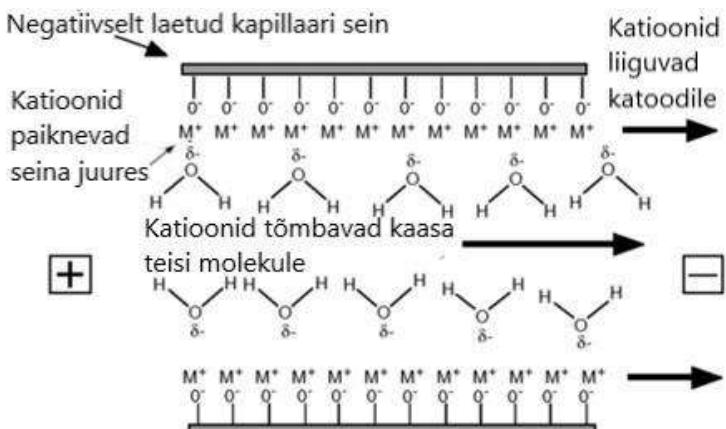
3.2 Elektroosmootne voog ja elektroforeetiline liikuvus

Elektroforeetiline liikuvus on laetud osakeste omadus, mis kirjeldab iooni liikumiskiirust spetsiifilises puhvris ja kindla elektrivälja tugevuse juures. Ioonile mõjuv jõud on võrdne tema raadiuse ja laengu suhtega. Liikumiskiirusele mõjuvad ka tömbe- ja takistusjõud. Takistusjõu tekitavad sellised parameetrid nagu puhvri viskoossus ja iooni raadius. Viskoossuse ja raadiuse suurenemine suurendavad takistusjõu mõju, mille töttu ioon liigub aeglaselt. Tömbjõu tugevust mõjutavad elektrivälja tugevus ja iooni summaarne laeng. Kui mõlemad jõud on võrdsed, siis kirjeldab elektroforeetilist liikuvust antud valem:

$$\mu_{EP} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

Kus η – puhvri viskoossus (Pa^* s), r – iooni raadius (m), q – iooni laeng [20, 23].

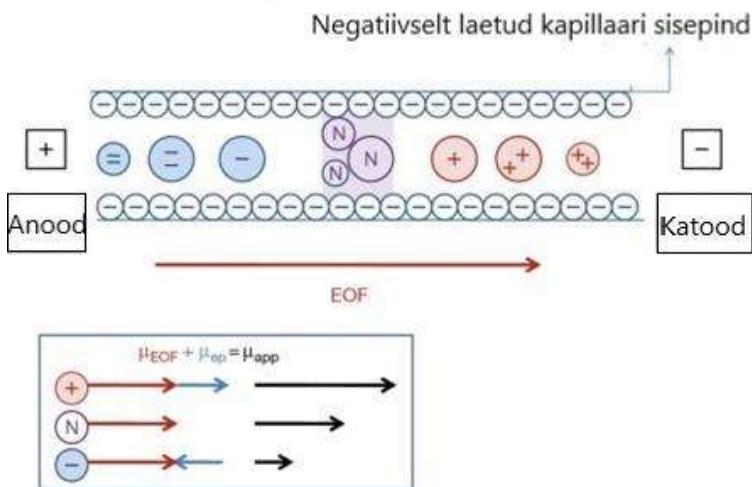
loonide liikuvusele mõjub mitte ainult elektroforeetiline liikuvus, aga ka elektroosmoos. Pinge rakendamisel kapillaarile liiguvad nii ioonid kui ka puhverlahus. Puhvri liikumine toimub sellepärast, et kapillaari sisepind on kaetud silanool rühmadega (SiOH), mis kindla pH juures deprotoneeruvad ning kapillaari pinnale tekivad negatiivselt laetud rühmad. Pinge rakendamisel liiguvad prootonid katoodi poole ja tömbavad puhvrit endaga kaasa. Antud nähtust nimetatakse elektroosmoosiks (EOF) [20, 23].



Joonis 5. EOF-i protsess [35].

EOF-i kiirus on võrreldes ainete elektroforeetilise mobiilsusega palju suurem. See mõjutab kõiki lahuses olevaid molekule. Kuna EOF on tavaselt suunatud katoodi poole siis katatoonide liikumiskiirus on summaarselt suurem, kui EOF-i oma, ja nad väljuvad kapillaarist esimestena. Neutraalseid osakesi tömmatakse EOF-iga kaasa. Anionid liiguvad tegelikult anoodi poole, kuid EOF-i toimel nende liikumine suunatakse siiski katoodi poole ainult väiksema kiirusega. Seepärast

on kapillaarelektroforeesis ioonide väljumisjärjekord järgmine: esimesena väljuvad katioonid, seejärel neutraalsed osakesed ja viimasena anioonid (Joonis 6) [20].



Joonis 6. EOF-i mõju analüüdi osakestele ning nende väljumise järjekord [37].

EOF-i tugevust määrab järgmine valem:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon}{4\pi\eta} E\zeta$$

Kus ϵ – lahuse dielektriline läbitavus, η – lahuse viskoossus (Pa^* s), E – elektrivälja tugevus, ζ – zeeta potentsiaal [23].

Kogu CZE protsessis mõjuv jõud on kirjeldatav all pool oleva valemiga, mis on põhimõtteliselt elektroforeetilise liikuvuse ja EOF-i summa:

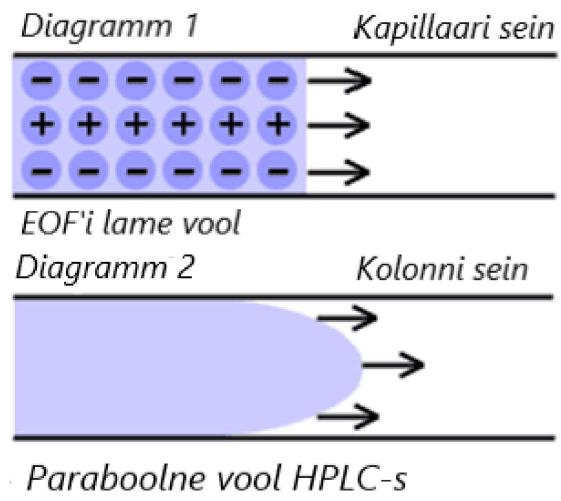
$$\mu_{kokku} = \mu_{EOF} + \mu_{EP}$$

Ioni tegelik kiirus on proporsionaalne elektrivälja tugevusega, mis tähendab, et mida tugevam on elektriväli, seda kiiremini liigub ion [25]. Antud suhe on kirjeldatav järgmisse valemiga:

$$v = \mu_{EOF} \times E$$

Kus E – elektrivälja tugevus (V/m) [23].

CZE-i on hea lahutavus ja ei toimu piikide laienemist nagu HPLC-s. Selle põhjuseks on CZE ja HPLC voolu profiili erinevused (Joonis 7). HPLC voolul on parabolne kuju kuna vedelikku pumbatakse kolonni sisse tugeva surve all. Vedeliku kokkupuutel kolonni seinaga toimub hõordumine ning sellepärast liigub seina ääres olev vedelik madalamata kiirusega kui kolonni keskel olev vedelik. CZE-i aga antud nähtust ei toimu, sest kapillaari sisepinnal olevate rühmade deprotoneerumisel tekivad katioonid, mis liiguavad koos puhvriga [26].



Joonis 7. CZE ja HPLC voolu võrdlus [27].

4 ANALÜÜTILINE MEETODI TULEMUSLIKKUSE NÄITAJAD

Analüüsitemuste kvaliteedi tagamiseks on analüüsimeetodikaarendamisel oluline hinnata ka metoodika nn. tulemuslikkuse näitajaid. Analüüsi protseduuri tulemuslikkuse näitajateks on spetsiifilus, selektiivsus, kalibreerimissirge lineaarsus, avastamis- ja määramispiirid, kordustäpsus, töesus, robustsus jne. Käesolevas töös uuriti meetodika täpsust ja hinnati avastamis- ja määramispiire. [28]

Avastamispiir (LoD) on väikseim analüüdi kontsentratsioon, mida saab uuritavas proovis kasutatava meetodikaga usaldusväärsest detekteerida. Määramispiir (LoQ) on väikseim analüüdi sisaldus proovis, mida metoodika võimaldab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata. Alates sellest piirist on kvantitatiivse analüüsi tulemuse esitamine numbriliselt õigustatud. Instrumentaalanalüüsi puhul on oluline hinnata ka instrumendi avastamis- ja määramispiire (IDL ja IQL). Selleks on olemas mitu erinevat lähenemisviisi. Käesolevas töös valitud meetod põhineb signaali ja müra suhtele (S/N). Avastamispiiri k väärtsuseks võeti 3 ja määramispiiri k väärtsuseks võeti 5 (Valemid 1-3).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (1)$$

$$IDL = 3s \quad (2)$$

$$IQL = 5s \quad (3)$$

Kus s – standardhälve, N – proovi mõõtmiste arv, x_i – proovi mõõtmiste tulemus, μM , \bar{x} – proovi mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmene [28].

Meetodika avastamis- ja määramispiirid, väljendatud massiprotsentides (%), sõltuvad uuritava proovi kaalutisest (m , g) ja lahjendusest (V , ml) vastavalt järgmisse valemile [28] (Valem 4):

$$LOD(LOQ)[\%] = \frac{IDL(IQL)[\frac{mg}{l}] * V[ml]}{m[g] * 10000} \quad (4)$$

Meetodika kordustäpsuse kirjeldamiseks kasutatakse parameetreid, mida määratakse eksperimentaalselt korduvate mõõtmiste teostamisel. Antud töös kasutati meetodika täpsuse kirjeldamiseks korduvust ja korratavust. Korduvus – mõõtmised tehakse mitu korda lühikese aja jooksul samas laboris, sama operaatori poolt, samadel tingimustel. Korratavus – mõõtmised tehakse mitu korda pikema aja jooksul samas laboris, aga erinevatel tingimustel [29].

5 EKSPERIMENTAALNE OSA

5.1 Kasutatud reagendid, kemikaalid ja lahused

Tabel 1. Kasutatud reagentide, kemikaalide ja lahuste nimekiri

Kemikaali või lahuse nimi	Kasutusala	Tootja
D-glükoos veevaba	Standardlahuste valmistamine	Fisher Chemical, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
D-(+)-ksüloos	Standardlahuste valmistamine	Sigma, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
D-(+)-galaktoos	Standardlahuste valmistamine	Fluka, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
D-(-)-arabinoos	Standardlahuste valmistamine	Sigma, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
D-rafinoos pentahüdraat	Standardlahuste valmistamine	Sigma, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
D-(+)-tsellobioos	Standardlahuste valmistamine	Fluka, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
L-fukoos	Standardlahuste valmistamine	Alfa Aesar, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
5-HMF	Standardlahuste valmistamine	Acros Organics, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
D-(+)-mannoos	Standardlahuste valmistamine	Acros Organics, USA
	Kalibratsioonilahuste valmistamine	
H ₂ SO ₄	Proovide valmistamine	Honeywell, USA
Dinaatriumvesinikfosfaat (Na ₂ HPO ₄)	Pesulahuste valmistamine	Fisher bioreagents, USA
	Puhverlahuse valmistamine	
NaOH	Pesulahuste valmistamine	Sigma-Aldrich, USA
	Puhverlahuse valmistamine	
CaCO ₃	Proovide valmistamine	Sigma-Aldrich, USA
CH ₃ COOH	Pesulahuste valmistamine	Fluka, USA
Eriti puhas dest. vesi	Proovide valmistamine	Millipore, USA
	Puhverlahuste valmistamine	
	Standardlahuste valmistamine	

5.2 Aparatuur ja töövahendid

Antud töös kasutati CZE seadet Agilent G1600AX UV detektoriga (Joonis 9). Andmete töötlemiseks kasutati tavalist lauaarvutit, kuhu oli paigaldatud Agilent ChemStation tarkvara. Analüüdid neelasid UV valgust laine pikkusel 270 nm.



Joonis 8. CZE seade

Katsete läbiviimisel kasutati kvartskapillaari (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), mille pikkus oli 80 cm, efektiivne pikkus oli 71 cm ja sisediamieter oli 50 μm . Kapillaarile rakendati pinget 19.42 kV ja voolutugevus oli umbes 150-160 μA .

Analüüdi lahuste doseerimiseks, lahjenduste tegemiseks ja puhvri- ning pesulahuste valmistamiseks kasutatud kasutati 10 μl , 200 μl , 1000 μl , 5 ml ja 10 ml automaatpipette. Lahuste valmistamiseks kasutati Eppendorf katsuteid ja 10 ml tuube.

Proovide valmistamiseks kasutati ka Hettich EBA 200 S tsentrifuugi ja Sanyo Labo Autoclave autoklaavi.

5.3 Katsete läbiviimise tingimused

Enne katsete läbiviimist uus kapillaar „aktiveeriti“. Aktiveerimise all mõeldakse kapillaari eeltöötlemist selleks, et toimuks kapillaari pinna deprotoneerimine. Kapillaari pestakse enne kasutamist ka selleks, et kõik toomisel sissejäänud mikroosakesed oleksid väljapestud [30]. Aktiveerimiseks teostati järgmised pesu sammud:

1. 30 minutit NaOH lahusega

2. 5 minutit eriti puhta destilleeritud veega (dest. vesi)
3. 5 minutit taustelektrolüüdiga

Igapäevaselt enne katsete läbiviimist pesti kapillaari järgmiste lahustega kindlas järjekorras:

1. 3 minutit 5% äädikhappega (CH_3COOH)
2. 5 minutit 1M NaOH lahusega
3. 3 minutit dest. veega
4. 10 minutit taustelektrolüüdiga

Proovi süstiti automaatsest rakendades röhku 50 mbar 10 sekundi jooksul. Enne ja pärast igat katset teostati pesu selleks, et lisada taustelektrolüüti kapillaari, pesta välja ühendid, mis võisid jäada kapillaari seina külge; eemaldada kõrgema kontsentratsiooniga analüüdi osakesi, mis võisid kapillaari sisse jäada [30].

Eelpesu etapid:

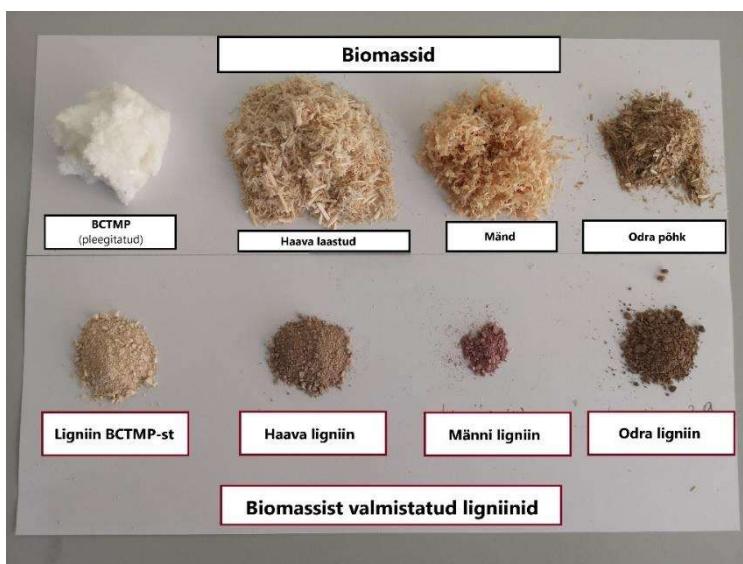
1. 5 minutit taustelektrolüüdiga

Pesu pärast katset:

1. 3 minutit 5% CH_3COOH lahusega
2. 3 minutit 1M NaOH lahusega
3. 3 minutit dest. veega

5.4 Biomassi proovide ettevalmistamine

Käesolevas töös kasutati järgmiste puitude ja taimede biomasse: haab, mänd, kask, tatrakestad, pilliroog, odrapõhk. Samuti määratigi suhkrute kogus ka kemotermiliselt töödeldud pleegititud puidumassis (BCTMP) ja eraldatud ligniinidest (Joonis 9).



Joonis 9. Erinevad biomassid ja nendest eraldatud ligniinid.

Biomassi lagundamiseks ja monosuhkrute lahuste saamiseks kasutati Klason meetodit, mida teostati järgmiselt:

1. Kaaluti 0,2 mg proovi ja lisati keeduklaasi.
2. Proovile lisati 3 ml 73% H_2SO_4 lahust ja segati spaatliga. Spaatel jäeti kadude vältimiseks keeduklaasi.
3. Keeduklaas kaeti fooliumiga ja soojendati eelsoojendatud vesivannis 30 °C juures ühe tunni jooksul.
4. Proovi segati soojendamise ajal hoolikalt.
5. Keeduklaas võeti vesivannist ühe tunni pärast välja ja lisati 72 ml vett, segati, kaeti fooliumiga ja asetati autoklaavi 121 °C juurde umbes üheks tunniks.
6. Pärast filtriti välja sadenenud ligniin ja filtraati kasutati suhkrute CE analüüsiks.

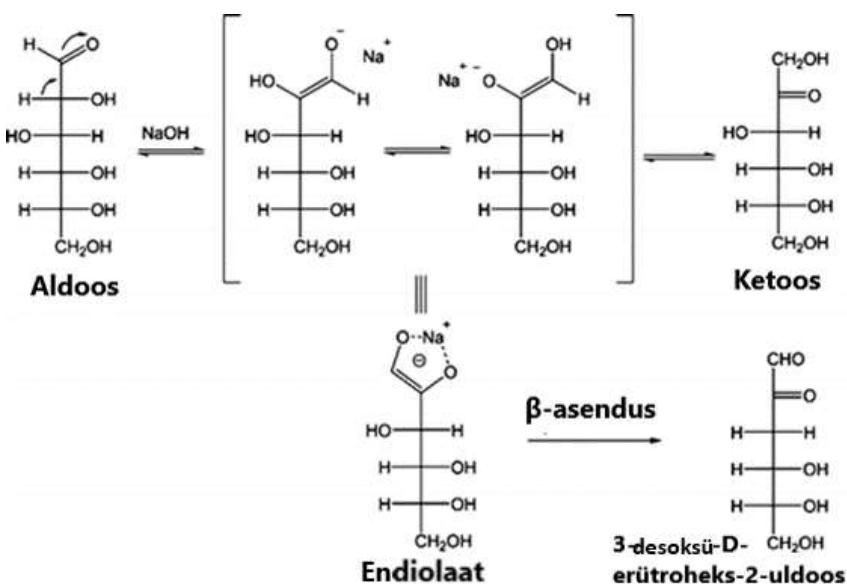
Kuna saadud suhkrute lahused olid happelised ja liiga happeline keskkond võib tekitada voolukadu CZE katse ajal, siis pidi lahuseid neutraliseerima. Neutraliseerimiseks kasutati $CaCO_3$ järgmiselt: 5 ml happenist proovi pipeteeriti 10 ml tuubi kuhu lisati umbes 0,5 g tahket $CaCO_3$ väikeste osade kaupa. Gaasi täielikul eraldamisel pandi tuub kinni ja tsentrifuugiti 5500 RPM juures viis minutit. Supernatant kallati uude 10 ml tuubi ja tsentrifuugiti veelkord 7000 RPM juures viis minutit.

Biomassi proovid sisaldasid enamasti väga palju suhkrid. Selleks, et tulemus jäääks kalibreerimisulatusse tehti saadud lahustest sobilikud lahjendused.

6 TULEMUSED

6.1 Suhkrute modifitseerimine CE analüüsiks

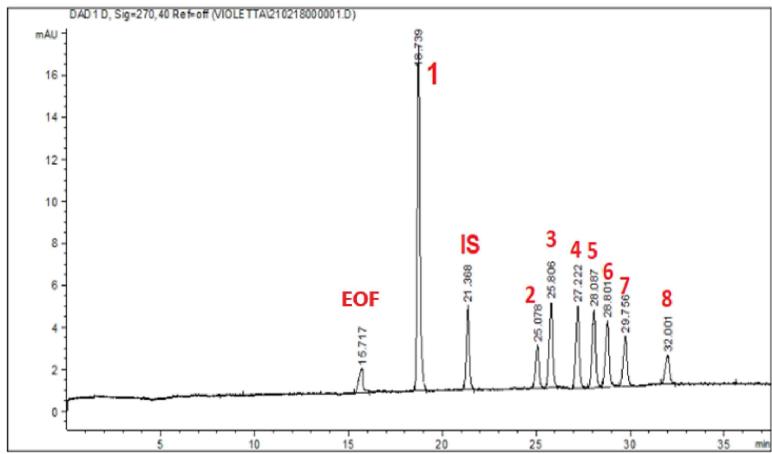
Kapillaarelektroforeesi meetodikat optimeeriti varem publitseeritud tööde alusel [11, 31]. Suhkrute kapillaarelektroforeetiline määramine on raskendatud kuna suhkrud on neutraalsed molekulid. Samuti ei neela nad UV-valgust ja selleks, et neid oleks võimalik UV detektoriga määrata, on vaja viia läbi suhkrute keemiline modifitseerimine. Suhkrute ioniseerimiseks on vaja tugevalt aluselist puhvrit, kuna nende pK_a väärus on 12-12,4. Kui aluselise elektrolüüdiga täidetud kapillaari sisestatakse suhkrulahus, siis toimub suhkuu ioniseerimine C_1 süsinikul, sest hemiatsetaalse hüdroksüülrühma hoppelus on suurem kui alkoholsel hüdroksüülrühmal, mille pK_a on 16. Iooniseerimise tulemusena saadakse suhkuu endiolaat-foon, mis neelab UV valgust ning omab negatiivset laengut [11].



Joonis 10. Kapillaarisene reaktsioon. Endiolaat-foonide teke [11].

6.2 CZE optimeerimine

Kapillaarelektroforeesi meetodika, mis sisaldas suhkrute laengu kapillaarisest muundamist optimeeriti kaheksa suhkuu lahutamiseks – 5-hüdroksümetülfurfuraal (5-HMF), fukoos, tsellobioos, galaktoos, glükoos, mannoos, arabinoos, ksüloos. Optimeerimise käigus uuriti pinget (17 kuni 19,42 kV) ja taustelektrolüüdi kontsentratsiooni (136 mM NaOH ja 46 mM Na_2HPO_4 ; 130 mM NaOH ja 36 mM Na_2HPO_4) mõju piikide lahutuvusele. Parim tulemus saavutati pingega 19,42 kV ja taustelektrolüüdiga, mis koosnes 136 mM NaOH ja 46 mM Na_2HPO_4 -st. Nimetatud analüüsitingimustel olid kõik suhkrud ioniseeritud ja katse jaoks sobilik voolutugevus oli stabiilne ning 35 minuti jooksul lahutusid kõik kaheksa suhkrut. Tulemused on esitatud Joonisel 11.



Joonis 11. 500 µM 8 suhkru segu standard koos lisatud sisestandardiga (IS). Pildil: 1 – 5-HMF, IS – rafinoos, 2 – fukoos, 3 – tsellobioos, 4 – galaktoos, 5 – glükoos, 6 – mannoos, 7 – arabinoos, 8 – ksüloos. Tingimused: kapillaari pikkus – 80 cm, kapillaari efektiivne pikkus – 71 cm, sisediameter – 50 µm, pinge – 19,42 kV, proovi sisestamise aeg – 10 s, rõhk – 50 mbar, puhvri kontsentratsioon – 136 mM NaOH ja 46 mM Na₂HPO₄.

Sisestandardiks valiti rafinoos. CE puhul on sisestandardi kasutamine eriti oluline, et kompenseerida võimalikke piikide migratsiooni aegade ebastabiilsusi ja null-joone fluktuatsioone.

Püsiva voolutugevuse säilitamiseks valmistati iga päev enne katsete tegemist uus puhver.

6.3 Meetoodika kalibreerimisgraafikud ning avastamis- ja määramispiirid

Kalibreerimisgraafikute koostamiseks kasutati erineva kontsentratsiooniga kalibreerimislahuseid: 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM ja 750 µM. Iga kontsentratsiooniga tehti kolm paralleelmõõtmist. Kalibreerimisgraafikute lineaarsust hinnati korrelatsiooni koefitsiendi R² alusel, mis näitab katseandmete ja lineaarse mudeli (kalibreerimissirge) lähenduse kvaliteeti. Tulemused esitatud Tabelis 2 ja Lisas 1-3.

Tabel 2. Kalibratsioon, avastamis- ja määramispiirid

Suhkur	Kalibreerimisulatus, µM	Kalibreerimisvõrrand	R ²	IDL, µM	IQL, µM
5-HMF	25-750uM	y = 0,4759x + 2,1237	0,9974	4,3	7,1
Fukoos	25-750uM	y = 0,0496x + 0,9901	0,9877	9,7	16,2
Tsellobioos	25-750uM	y = 0,1406x + 3,4741	0,9940	7,9	13,1
Galaktoos	25-750uM	y = 0,1213x - 0,5728	0,9891	9,1	15,1
Glükoos	25-750uM	y = 0,1198x - 1,0625	0,9917	9,1	15,2
Mannoos	25-750uM	y = 0,1063x - 0,3469	0,9893	10,9	18,2
Arabinoos	25-750uM	y = 0,0707x + 0,7557	0,9900	11,0	18,3
Ksüloos	25-750uM	y = 0,0426x + 1,5083	0,9903	10,6	17,7
5-HMF	25-750uM	y = 0,4759x + 2,1237	0,9974	4,3	7,1

Kõikidel graafikutel on korrelatsioonikoeffitsent (R^2) üle 0,98, mis tähendab, et valitud lineaarne mudel kirjeldab üle 98% katseandmete variatsioonist ja lineaarne kalibreerimismudeli valik on õigustatud.

Instrumendi avastamis- ja määramispiiride leidmiseks (IDL ja IQL) kasutati suhkrute segu standardlahust, mis sisaldas kaheksat suhkrut kontsentratsiooniga 25 μM (madalaim kalibreerimissirge kontsentratsioon) ja sisestandardit. Standardlahuse prooviga viidi läbi 10 paralleelkatset erinevatel päevadel 4 kuu jooksul. IDL ja IQL arvutati välja kasutades Valemeid (1-3) - tulemused on esitatud Tabelis 2. Arvestades proovi kaalutist 0,25 g ja lahjendust 75 ml-ni (Klason meetodi käigus) hinnati ka LOD ja LOQ iga suhkru jaoks Valemi 4 järgi (Tabel 3).

Tabel 3. LOD ja LOQ väärтused (massi %).

	5-HMF	Fukoos	Tsellobioos	Galaktoos	Glükoos	Mannoos	Arabinoos	Ksüloos
LOD, %	0,1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
LOQ, %	0,2	0,6	0,4	0,5	0,5	0,6	0,6	0,6

6.4 CE meetoodika korduvuse ja korratavuse hindamine

Meetoodika korduvuse hindamiseks kasutati samuti standardlahuseid, mis sisaldasid kaheksat suhkrut, aga lahuse kontsentratsioon oli 200 μM . Kokku tehti kuus paralleelkatset ühe päeva jooksul ning iga suhkru tulemuste varieeruvust hinnati kasutades suhtelise standardhälbe valemit (Valem 5).

$$SSH = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (5)$$

kus SSH – suhteline standardhälve, s – standardhälve, \bar{x} - proovi mõõtmistulemuste aritmeetiline keskmene [32].

Tabel 4. Korduvuse SSH (%)

Suhkur	SSH, %
5-HMF	2,2
fukoos	8,6
tsellobioos	7,7
galaktoos	4,3
glükoos	7,0
arabinoos	8,3
mannoos	8,5
ksüloos	3,8

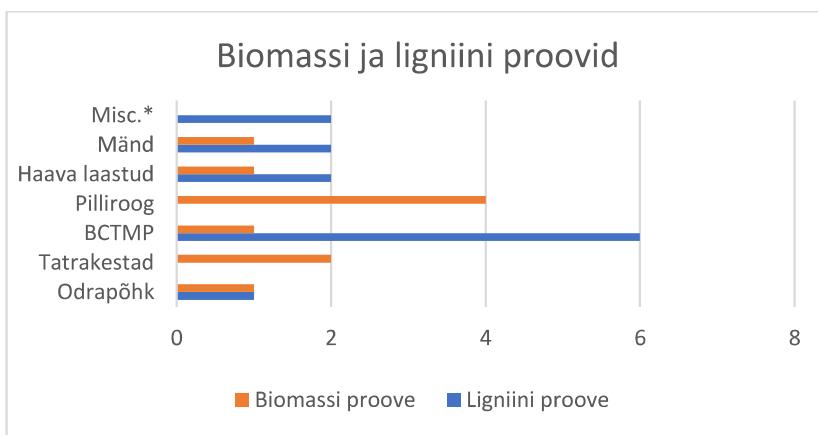
Korratavuse hindamiseks kasutati standardlahuseid kontsentratsiooniga 200 µM. Kokku tehti kaheksa katset ühe kuu jooksul. Korratavus oli samuti hinnatud paralleelmõõtmiste Valemi 5 kaudu (Tabel 5).

Tabel 5. Korratavuse SSH (%)

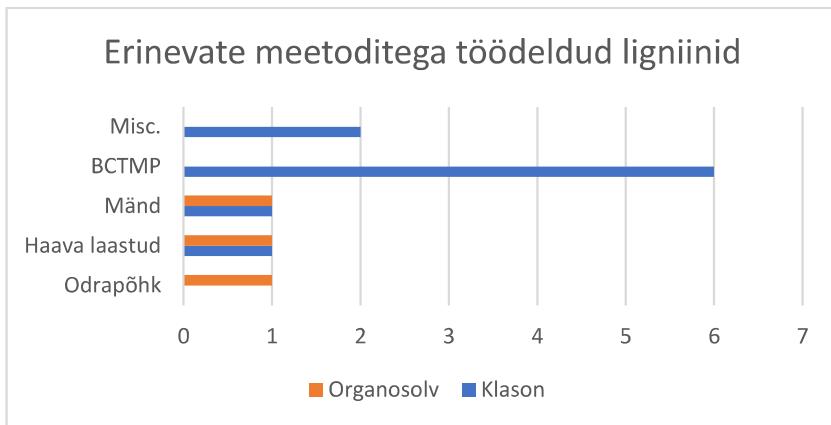
Suhkur	SSH, %
5-HMF	5,1
fukoos	10,3
tsellobioos	9,9
galaktoos	4,8
glükoos	5,9
arabinoos	7,8
mannoos	9,7
ksüloos	6,2

6.5 Biomassi ja ligniini proovide tulemused

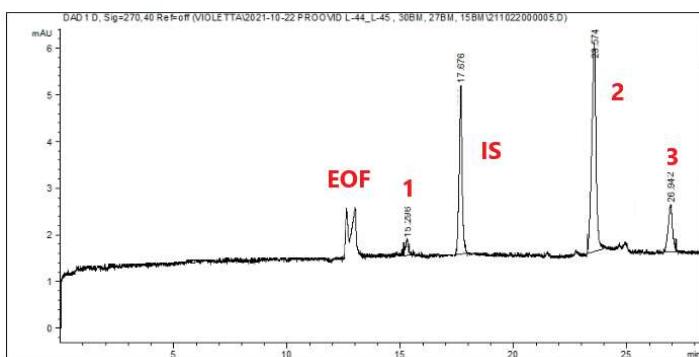
Töö käigus uuriti kokku kümme biomassi ja kolmteist ligniini proovi. Kakskümmend proovi valmistati Klason meetodi abil ja kolm proovi eeltöödeldi enne Klason-it kasutades organosolv meetodit (Joonised 12 ja 13). Joonistel 14 ja 15 on näitena esitatud uuritud proovide elektroferogrammid.



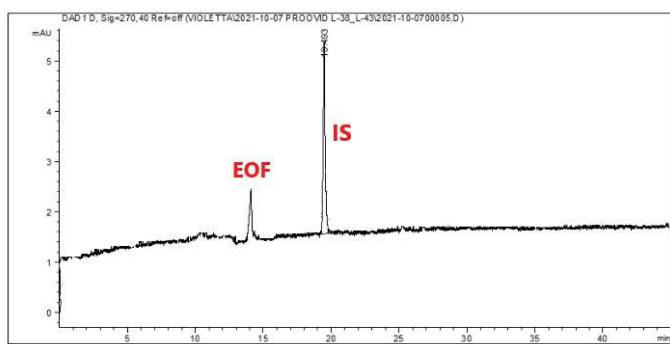
Joonis 12. Biomassi ja ligniini proovid. *Misc. on Miscanthus × giganteus



Joonis 13. Organosolv ja Klason metodiga töödeldud ligniinid



Joonis 14. Männi biomassi elektroferogramm. 1 – 5-HMF, IS – rafinoos, 2 – glükoos, 3 – ksüloos



Joonis 15. Männi ligniini elektroferogramm. IS - rafinoos

Biomassi proovide tulemused näitavad (Tabel 6), et proovides esineb põhiliselt fukoosi, galaktoosi, glükoosi, mannoosi, arabinoosi ja ksüloosi. Kõige rohkem on proovides glükoosi ja ksüloosi ning kõige vähem on proovies fukoosi ja tsellobioosi. Peaaegu kõikides ligniini proovides ei esinenud suhkruid. Ainult odrapõhu ja misc. proovides on vähesel määral arabinoosi ja ksüloosi, mille põhjuseks on eeldataval ebapiisav ligniini puastamine.

Tabel 6. Biomassis olevad suhkrud kuivmassi (dw) % kohta

Biomass	Kontsentratsioon, dw%							
	5-HMF	Fukoos	Tsellobioos	Galaktoos	Glükoos	Mannoos	Arabinoos	Ksüloos
Pilliroog	0,34	<0,6	0,61	0,88	55	<0,6	2,2	32
Haava laastud	0,23	<0,6	<0,4	<0,5 (0,26)*	30	6,4	<0,6	2,5
Mänd	0,25	<0,6	0,41	<0,5 (0,37)	52	10	<0,6	4,7
Tatrakest	<0,2 (0,13)	<0,6	<0,4	0,73	28	<0,6	1,2	22
Odrapõhk	0,22	<0,6	0,56	<0,5 (0,44)	43	<0,6	<0,6	18
BCTMP	0,20	<0,6	<0,4	<0,50	52	<0,6	<0,6	14

*Väärtus sulgudes näitab mõõdetud tulemuse, mida CE meetodiga oli võimalik kvantitatiivselt määrata, kuid mõõtetulemus jäi alla arvutusliku määramispiiri.

Tabel 7. Ligniinides olevad suhkrud dw% kohta

Ligniin	Kontsentratsioon, dw%							
	5-HMF	Fukoos	Tsellobioos	Galaktoos	Glükoos	Mannoos	Arabinoos	Ksüloos
Haava laastud	<0,2	<0,6	<0,4	<0,5	<0,5	<0,6	<0,6	<0,6
Mänd	<0,2	<0,6	<0,4	<0,5	<0,5	<0,6	<0,6	<0,6
Misc.	<0,2	<0,6	<0,4	<0,5	<0,5	<0,6	1,32	<0,6 (0,30)*
Odrapõhk	<0,2	<0,6	<0,4	<0,5	<0,5	<0,6	0,96	0,63
BCTMP	<0,2	<0,6	<0,4	<0,5	<0,5	<0,6	<0,6	<0,6

*Väärtus sulgudes näitab mõõdetud tulemuse, mida CE meetodiga oli võimalik kvantitatiivselt määrata, kuid mõõtetulemus jäi alla arvutusliku määramispiiri.

6.6 Tulemuste analüüs

Analüüsi tulemusena arendati efektiivne ja tundlik CE meetod. Parim lahutusvõime oli saadud 19,42 KV pingel rakendamisel. Kõik suhkrud esinesid elektroferogrammil lainepekkusel 270 nm kui kasutati puhvrit, mis koosnes 136 mM NaOH ja 46 mM Na₂HPO₄-st. Proovi süstiti rakendades röhku 50 mbar 10 s jooksul kapillaari, mille pikkus oli 80 cm, efektiivne pikkus oli 71 cm ja sisediameter oli 50 µm.

Meetodi valideerimiseks olid määratud instrumendi ja metoodika detekteerimispiirid. Suhkrute määramise IDL sõltuvalt suhkrust oli keskmiselt 9 µM ja LOD oli keskmiselt 0,3 %dw, mis töestab kapillaarelektroforeesi tundlikkust ja efektiivsust. Kapillaarelektroforeesi katsete päevadevaheline korratavus oli sõltuvalt suhkrust 4-11% ja päevasisene korduvus oli 2-9%.

Saadud tulemuste põhjal võib öelda, et biomassis esineb kõige rohkem glükoosi ja ksüloosi. Suur glükoosi sisaldus võib olla tingitud sellest, et tselluloos koosneb paljudest glükoosi molekulidest.

Ksüloosi kõrgema kontsentratsiooni põhjuseks võib olla suur ksüloosi kontsentratsioon hemitselluloosis.

Tuleb märkida, et 5-hüdroksümetülfurfuraali (5-HMF), mille piik tekib katse käigus, ei esine biomassis. Pärast LB happega töötlemist toimub glükoosi või fruktoosi dehüdratatsioon happeniste katalüsaatorite toimel, mille tulemusena tekib 5-HMF [33].

Biomassis on olemas ka tsellobioosi, aga hapetega eeltöödeldud proovides on seda ainet väga vähe sellepärist, et tugevalt happenises keskkonnas toimub tsellobioosi hüdrolüüs ja lagunemine glükoosi molekulideks [34].

Peaegu kõik ligniini proovid ei sisaldanud suhkruid. Arabinoosi ja ksüloosi olemasolu misc. ja odrapõhu proovides võib olla põhjendatud madalama töötlemise kvaliteediga kuna ligniini proovid ei tohiks suhkruid sisaldada.

KOKKUVÕTE

Tänapäeval arendatakse paljusid meetodeid biomassi uurimiseks ja töötlemiseks, et asendada turul fossiilkütust ja plasti. Selleks, et teostada analüüs keskkonnasõbralikult, on võimalik kasutada kapillaarelektroforeesi, kuna antud meetodis kasutatakse lahjendatud vesilahuseid ning proovide ja puhverlahuste kogused on väiksemad võrreldes kõrgefektivsevedelikkromatograafiaga, kus kasutatkse suuremas koguses orgaanilisi solvente. Kapillaarelektroforeesi teisteks eelisteks on hea lahutusvõime, kõrge tundlikkus ja hea selektiivsus. Antud meetodikaga on võimalik efektiivselt lahutada suhkruid ja saavutada madalaid määramispiire.

Käesoleva töö eesmärgiks oli optimeerida kapillaarelektroforeesi meetodikat suhkrute kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks lignotselluloosset biomassis ja selle produktides.

Katsete läbiviimisel leitud, et parim lahutusvõime saadi 19,42 kV pinge rakendamisel. Kõik suhkrud olid iooniseeritud ja esinesid elektroferogrammil laine pikkusel 270 nm kui kasutati puhvrit, mis koosnes 136 mM NaOH ja 46 mM Na₂HPO₄-st. Proovi süstiti rakendades röhku 50 mbar 10 s jooksul kapillaari, mille pikkus oli 80 cm, efektiivne pikkus oli 71 cm ja sisediameeter oli 50 µm.

Meetodika usaldusvääruse hindamiseks ja proovides olevate suhkrute kontsentratsioonide välja arvutamiseks koostati kalibreerimisgraafikud kahekso suhkru jaoks korrelatsiooni koeffitsiendiga üle 0,98, mis tõestas lineaarse mudeli sobilikkust katseandmetele.

Töö käigus määratigi instrumendi ja metoodika detekteerimispiire. Suhkrute määramise IDL oli sõltuvalt suhkrust keskmiselt 9 µM ja LOD oli keskmiselt 0,3 %dw, mis tõestab kapillaarelektroforeesi tundlikkust ja efektiivsust. Kapillaarelektroforeesi katsete päevadevaheline korrapasus oli sõltuvalt suhkrust 4-11% ja päevasisene korduvus oli 2-9%.

Optimeeritud kapillaarelektroforeesi meetodikat kasutati ettevalmistatud biomasside ja ligniinide analüüsiks. Ligniini proovide analüüs käigus leiti, et mõned proovid sisaldasid vähesel määral suhkruid. Põhjuseks on arvatavasti madalam töötlemise kvaliteet kuna ligniini proovid ei tohiks suhkruid sisaldada. Biomassi proovide analüüsil järeltuli, et kõige rohkem esinevad biomassis ksüloos ja glükoos. Vähesel määral esinevad ka teised suhkrud. Kõrge glükoosi sisaldus võib olla tingitud sellest, et tselulloos on suur polümeer, mis koosneb ainult glükoosi molekulidest ning hemitselluloosis esinev tsellobioos laguneb osaliselt glükoosiks biomassi töötlemise käigus. Ksüloosi kõrgema kontsentratsiooni põhjuseks võib olla suur ksüloosi kontsentratsioon hemitselluloosis.

Kapillaarelektroforees on kasulikuks alternatiiviks kõrgefektivsele vedelikkromatograafiale. Hea selektiivsuse, lahutuvuse ja reproduktiivsuse saavutamiseks peab meetodikat optimeerima seni kuni soovitud tulemused on saavutatud. Lignotselluloosse biomassi kasutamine eeldab keskkonnasõbraliku tootmise jälgimist. Kapillaarelektroforees on keskkonnasõbralik analüütiline meetod, mille abil saaks lignotselluloosse biomassi kasutamist ja analüüsni veelgi keskkonnasõbralikumaks teha.

SUMMARY

A lot of new methods of biomass research and treatment are developed nowadays in order to substitute fossil fuels and plastics. Capillary electrophoresis can be used as a form of ecologically friendly analysis because unlike in high-performance liquid chromatography, where organic solvents are used in large quantities, capillary electrophoresis uses diluted water-based solutions and the volume of those solutions is much smaller. Other advantages of capillary electrophoresis include good separation, high sensitivity and good selectivity. The following method allows sugars to be separated better unlike in other methods where sugars can exit together which makes them rather difficult to analyze.

The goal of the following research was to optimize the capillary electrophoresis method to measure sugars both quantitatively and qualitatively in lignocellulosic biomass and its products.

During the analysis it was concluded that the best separation was achieved when a voltage of 19,42 kV was applied to the capillary. All sugars were ionized and appeared on the electropherogram at the wavelength 270 nm when a buffer which consisted of 136mM NaOH and 46mM Na₂HPO₄ was used. Samples were injected into the capillary at 50 mbar during 10 s. The length of the capillary was 80 cm, the effective length was 71 cm and the inner diameter was 50 µm.

Calibration curves that described all eight sugars were built in order to assess the method and calculate the concentrations of sugars found in samples. All three calibration curves displayed a correlation coefficient equal to 0,98, which proved that the curves were linear.

Limits of detection and measurement were measured during the analysis. The average IDL was 9 µM and LOD was approximately 0,3 %dw, depending on the sugar. The following results prove the effectivity and sensitivity of capillary electrophoresis. The interday repeatability of capillary electrophoresis was 4-11% and intraday repeatability was 2-9%, depending on the sugar.

An optimized capillary electrophoresis method was used to analyze prepared biomass and lignin samples. Some lignin samples contained sugars, the reason of which is likely related to poor treatment because lignin samples should not contain sugars. It was proved that biomass samples contain more glucose and xylose. High glucose content may be related to cellulose being a large polymer which consists of many glucose monomers. Hemicellulose also contains cellobiose, which is degraded into glucose during pretreatment. The high content of xylose is likely related to hemicellulose being rich in xylose.

As a result of this research capillary electrophoresis could be a useful alternative to high-precision liquid chromatography. High selectivity, good separation and reproducibility can be achieved by optimizing the method until the desired results are acquired. The future use of lignocellulose implies that ecologically friendly production should be followed. Capillary electrophoresis is the ecologically friendly analytical method, which could help the production of lignocellulosic biomass become even more ecologically friendly.

KASUTATUD KIRJANDUS

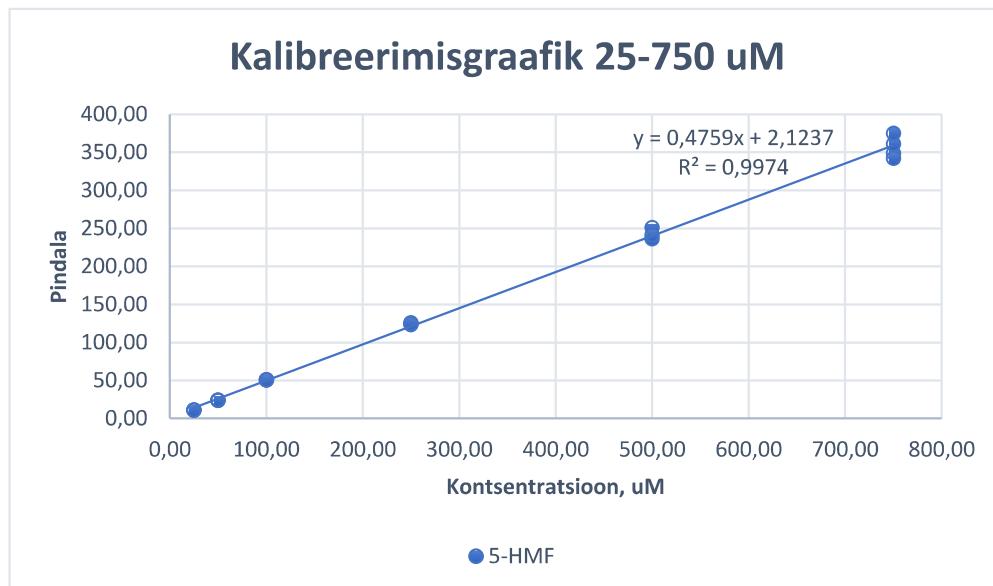
- [1] Biocore, „What is lignocellulosic biomass?,” [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.biocore-europe.org/pagee027.html?optim=what-is-lignocellulosic-biomass-->. [Kasutatud 30 03 2022].
- [2] H. Suryadi, J. J. Judono, M. R. Putri, A. D. Eclessia, J. M. Ulhaq, D. N. Agustina ja T. Sumiati, „Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi,” *Heliyon*, kd. 8, nr 2, pp. 1-3, 2022.
- [3] B. Abo, M. Gao, Y. Wang, C. Wu, H. Ma ja Q. Wang, „Lignocellulosic biomass for bioethanol: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes,” *Reviews on Environmental Health*, kd. 34, 2019.
- [4] T. Varila, H. Romar, T. Luukkonen, T. Hilli ja U. Lassi, „Characterization of lignin enforced tannin/furanic foams,” *Heliyon*, kd. 6, nr 1, p. 2, 2020.
- [5] R. Katahira, T. J. Elder ja G. T. Beckham, Lignin Valorization: Emerging Approaches, Royal Society of Chemistry, 2018, pp. 1-20.
- [6] X. Li, Y. Shi, W. Kong, J. Wei, W. Song ja S. Wang, „Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review,” *Energy Reports*, kd. 8, pp. 696-709, 2022.
- [7] P. Bhaumik ja P. L. Dhepe, Biomass Sugars for Non-Fuel Applications, 2015, pp. 1-53.
- [8] P. Bajpai, Biermann's Handbook of Pulp and Paper (Third Edition), kd. 1, Elsevier, 2018, pp. 295-351.
- [9] B. Liua ja M. M. Abu-Omar, Advances in Inorganic Chemistry, kd. 77, 2021, pp. 137-174.
- [10] A. Ejaz ja K. Kamal, Waste Biorefinery, Elsevier, 2018, pp. 409-444.
- [11] S. Rovio, J. Yli-Kauhaluoma ja H. Siren, „Determination of neutral carbohydrates by CZE with direct UV detection,” *Electrophoresis*, kd. 28, nr 17, pp. 3129-3135, 2007.
- [12] E. A. Davidson, „Carbohydrate,” Britannica, [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.britannica.com/science/carbohydrate>. [Kasutatud 13 04 2022].
- [13] R. Spinney ja I. Hunt, „Organic Chemistry etext,” McGraw-Hill, 10 2006. [Võrgumaterjal]. Available: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Carey.html>. [Kasutatud 4 04 2022].
- [14] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton ja D. Crocker, „Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass,” NREL, 2008.
- [15] E. Galiwango, N. S. Abdel Rahman, A. H. Al-Marzouqi, M. M. Abu-Omar ja A. A. Khaleel, „Klason Method: An Effective Method for Isolation of Lignin Fractions from Date Palm Biomass Waste,” *Chemical and Process Engineering Research*, kd. 57, pp. 46-58, 2018.

- [16] F. C. Moreira-Vilar, R. d. C. Siqueira-Soares, A. Finger-Teixeira, D. M. de Oliveira, A. P. Ferro, G. J. da Rocha, M. de Lourdes L. Ferrarese, W. D. dos Santos ja O. Ferrarese-Filho, „The Acetyl Bromide Method Is Faster, Simpler and Presents Best Recovery of Lignin in Different Herbaceous Tissues than Klason and Thioglycolic Acid Methods,” *Plos One*, 2014.
- [17] „Advantages and Disadvantages of Capillary Electrophoresis,” *Chromatography Today*, 08 11 2014.
- [18] D. D. Turner, „Gas Chromatography – How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC,” *Technology Networks*, 17 03 2021.
- [19] „Specialty Gases & Specialty Equipment,” Linde plc, [Võrgumaterjal]. Available: http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/index.html. [Kasutatud 8 04 2022].
- [20] M. Kaljurand ja R. Kuldvee, Instrumentaalanalüüs III, Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool, 1997, pp. 15-58.
- [21] W. Xu, L. Liang ja M. Zhu, „Determination of Sugars in Molasses by HPLC Following Solid-Phase Extraction,” *International Journal of Food Properties*, kd. 18, nr 3, pp. 547-557, 2015.
- [22] R. Maria Viviane, L. Tenfen, R. da Silveira, G. Luciano Valdemiro, O. C. Ana Carolina ja F. Roseane, „Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples,” *Talanta*, kd. 93, pp. 62-66, 2012.
- [23] „Capillary Electrophoresis,” Libretexts, 16 08 2020. [Võrgumaterjal]. Available: <https://chem.libretexts.org/@go/page/294>. [Kasutatud 9 04 2022].
- [24] „Introduction to Capillary Electrophoresis,” Prince Technologies, [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.princetechnologies.com/products/ce-systems/ce-technologies/ce-introduction/>. [Kasutatud 12 05 2022].
- [25] A. M. Stalcup, Chiral analysis, Elsevier Ltd, 2006, pp. 241-275.
- [26] F. M. Dunnivant, „Electroosmotic Flow,” 2008. [Võrgumaterjal]. Available: http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH4/4_2_1.html. [Kasutatud 13 04 2022].
- [27] „Basic Theory and Introduction to CE,” Microsolv Technology Corporation, [Võrgumaterjal]. Available: <https://www.mtc-usa.com/cebasic>. [Kasutatud 12 05 2022].
- [28] I. Leito ja A. Viitak, Kvaliteeditagamine analüütilises keemias, Tallinn: TTÜ Kirjastus, 2007.
- [29] M. Koel ja M. Kaljurand, Usaldusväärised Möötmised Keemias, Tallinn: Tallinna Tehnikaülikool, 2020, pp. 40-44.
- [30] „Capillary Conditioning — The Foundation of Precision in capillary electrophoresis (CE),” Separation Science, [Võrgumaterjal]. Available: <https://blog.sepscience.com/pharmascience/capillary-conditioning-the-foundation-of-precision-in-capillary-electrophoresis-ce>. [Kasutatud 12 05 2022].

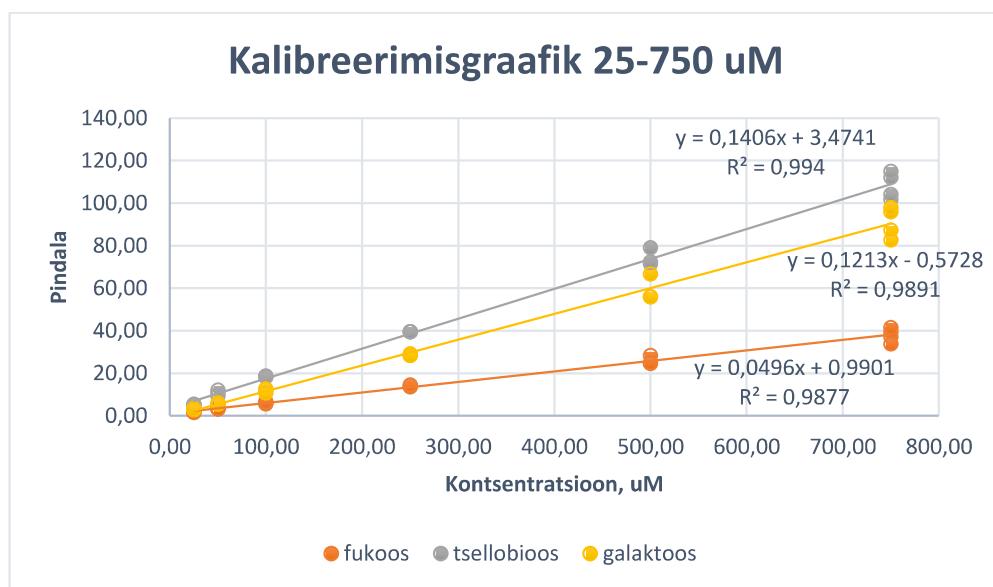
- [31] T. Aid, L. Paist, M. Lopp, M. Kaljurand ja M. Vaher, „An optimized capillary electrophoresis method for the simultaneous analysis of biomass degradation products in ionic liquid containing samples,” *Journal of Chromatography A*, nr 1447, pp. 141-147, 2016.
- [32] R. R. Sokal ja F. Rohlf, *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, New York: W.H. Freeman and Co., 1995.
- [33] E. Soszka ja A. M. Ruppert, „Separation procedures in the identification of the hydrogenation products of biomass-derived hydroxymethylfurfural,” *Reviews in Analytical Chemistry*, kd. 39, nr 1, pp. 88-105, 2020.
- [34] S. Carlier ja S. Hermans, „Highly Efficient and Recyclable Catalysts for Cellobiose Hydrolysis: Systematic Comparison of Carbon Nanomaterials Functionalized With Benzyl Sulfonic Acids,” *Frontiers in Chemistry*, 2020.
- [35] „Basicmedical Key,” 24 06 2016. [Võrgumaterjal]. Available: <https://basicmedicalkey.com/high-performance-capillary-electrophoresis/>. [Kasutatud 3 04 2022].
- [36] D. Harvey, „Electrophoresis,” Libretexts, 15 06 2020. [Võrgumaterjal]. Available: <https://chem.libretexts.org/@go/page/220769>. [Kasutatud 13 04 2022].
- [37] A. Shallan, R. Guijt ja M. Breadmore, *Encyclopedia of Forensic Sciences*, Elsevier Ltd, 2013, pp. 549-559.

LISAD

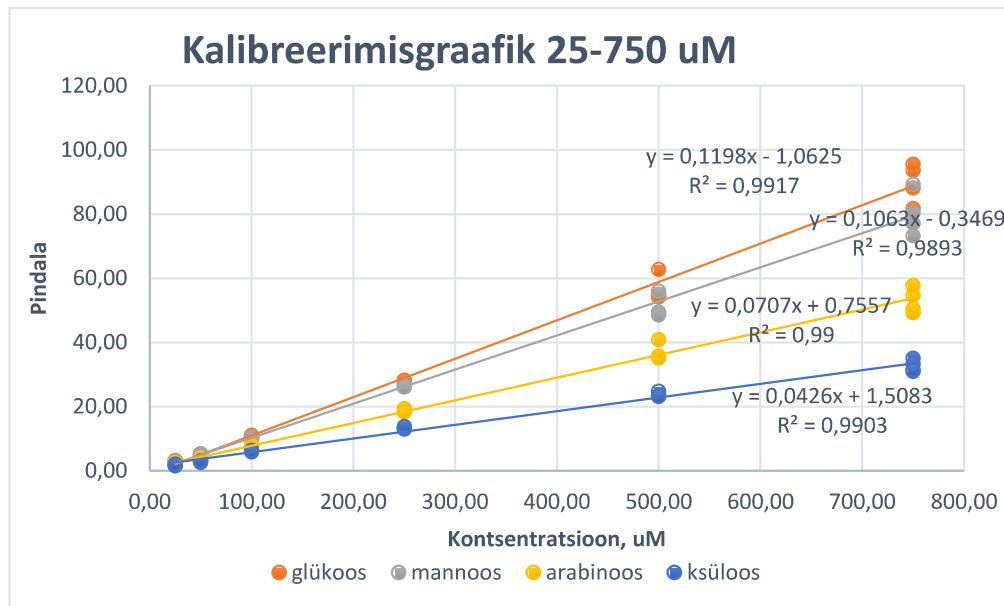
Lisa 1 5-HMF kalibreerimisgraafik



Lisa 2 Galaktoosi, fukoosi ja tsellobioosi kalibreerimisgraafikud



Lisa 3 Glükoosi, mannoosi, arabinoosi ja ksüloosi kalibreerimisgraafik



Lihltltsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusel kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina _____ Violetta Umerenkova _____ (autorin nimi)

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Suhkrute määramine lignotselluloosesse biomassis ja
produktides _____,
(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on _____ Maria Kulp, Tiit Lukk _____,
(juhendaja nimi)

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

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

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsenti punktis 1 nimetatud õigused jäevad alles ka autorile.

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

02.06.2022 (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 reproduutseerida 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 kindlaks määratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reproduutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1 ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaia looksal ei kehti.