

**KIIRE SPEKTROSKOOPILINE MEETOD LIGNIINI MÄÄRAMISEKS
LIGNOTSELLULOOSIS**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Alisia Teras

Juhendaja: Maria Kulp, KBI, vanemteadur

Kaasjuhendaja: Olivia-Stella Salm, nooremteadur

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



RAPID SPECTROSCOPIC METHOD FOR MEASURING LIGNIN CONTENT IN LIGNOCELLULOSIC BIOMASS

Bachelor thesis

Student: Alisia Teras

Supervisor: Maria Kulp, KBI, senior researcher

Co-supervisor: Olivia-Stella Salm, early-stage researcher

Study program: Applied Chemistry, Food and Gene Technology

Tallinn 2023

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: Alisia Teras
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.
Juhendajad: Maria Kulp, Olivia-Stella Salm
[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.
Kaitsmiskomisjoni esimees: Maksim Ošeka
[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Autorideklaratsioon.....	3
Lühendite loetelu	5
Sissejuhatus.....	6
1 Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Lignotselluloosne biomass	7
1.2 Analüütilised meetodid	8
1.2.1 Tselluloosi ja hemitselluloosi määramine.....	8
1.2.2 Klason meetod ligniini määramiseks	9
1.2.3 CASA meetodi põhimõte	10
1.2.4 Spektrofotomeetiline ligniini määramine CASA meetodil	11
2 Töö eesmärk	14
3 Eksperimentaalne osa	15
3.1 Aparatuur ja kemikaalid	15
3.2 Analüüsitud biomassi iseloomustus	15
3.3 CASA analüüsi käik.....	15
3.4 Andmete statistiline töötlus	16
4 Tulemused ja arutelu.....	18
4.1 Erinevate ligniinide neeldumistegurite määramine	18
4.2 CASA meetodi tõepärasuse kinnitamine	20
Kokkuvõte.....	22
Abstract	23
Tänuavaldused.....	24
Kasutatud kirjanduse loetelu.....	25

Lühendite loetelu

AIL	(i.k. <i>acid insoluble lignin</i>) happes lahustumatu ligniin
ASL	(i.k. <i>acid soluble lignin</i>) happes lahustuv ligniin
BTX	(i.k. <i>benzene, toluene, xylene mixture</i>) benseeni, tolueni ja ksüleeni segu
CASA	(i.k. <i>cysteine-assisted sulfuric acid method</i>) tsüsteiin väävelhape meetod
CRM	(i.k. <i>certified reference material</i>) sertifitseeritud referentsmaterjal
DHP	(i.k. <i>dehydrogenation polymer</i>) dehüdroneeritud polümeer
HPLC	(i.k. <i>high-performance liquid chromatography</i>) kõrgsurvedelikkromatograafia
HPLC-RID	(i.k. <i>high-performance liquid chromatography with refractive index detector</i>) kõrgsurvedelikkromatograafia murdumisnäitaja detektoriga
SH	standardhälve
SSH	suhteline standardhälve
UV	(i.k. <i>ultraviolet</i>) ultraviolettkiirgus
UV-Vis	(i.k. <i>ultraviolet-visible</i>) ultraviolettkiirgus ja nähtav valgus

Sissejuhatus

Biomass on tänapäeval väga oluline teema. Seda kasutatakse arengumaades toiduvalmistamiseks ja kütmiseks. Arenenud riikides suureneb selle kasutamine transpordi ja elektritootmise valdkondades. See pakub huvi süsinikdioksiidi heitkoguse vähendamise ja naftapõhise keemia asendamise mõttes. Biomassis nähakse taastuvat energiaressurssi paljutõotava tulevikuga.

Biomassi efektiivseks kasutamiseks, töötlemiseks ja väärimiseks on oluline teada selle keemilist koostist. Üheks oluliseks biomassi komponendiks on ligniin. Ligniini väärimine on laialdaselt uuritav teema, kuna sellel polümeeril on suur potentsiaal aromaatsete ühendite ehitusplokkide allikana. Ligniini täielik (jäätmevaba) kasutamine võib suurendada tööstuste kasumlikkust ja võimaldab toota biopõhiseid tooteid, mis võivad aidata kaasa kasvuhooonegaaside heitkoguse vähendamisele. Ligniini võimalike kasutusvõimaluste paremaks uurimiseks biokütuste ja biotoodete tööstuses peab kvantifitseerima ligniini kogust. Biomassi analüüsimiseks siamaani kasutatavad meetodid on ajakulukad, mitmeastmelised, töömahukad ja nõuavad kuumutamist ning toksiliste ainete kasutamist suurtes kogustes.

Antud töös uuritakse uudset meetodit, mida saab kasutada ligniini sisalduse määramiseks lignotselluloossest biomassist keskkonna sõbralikumal ja lihtsamal viisil. Meetodi läbiviimiseks on vaja vähem energiat, aega ja märkimisväärselt väiksemat happe kogust. Oma eeliste tõttu, uuritav meetod pakub suurt huvi selle kasutusele võtmiseks.

1 Kirjanduse ülevaade

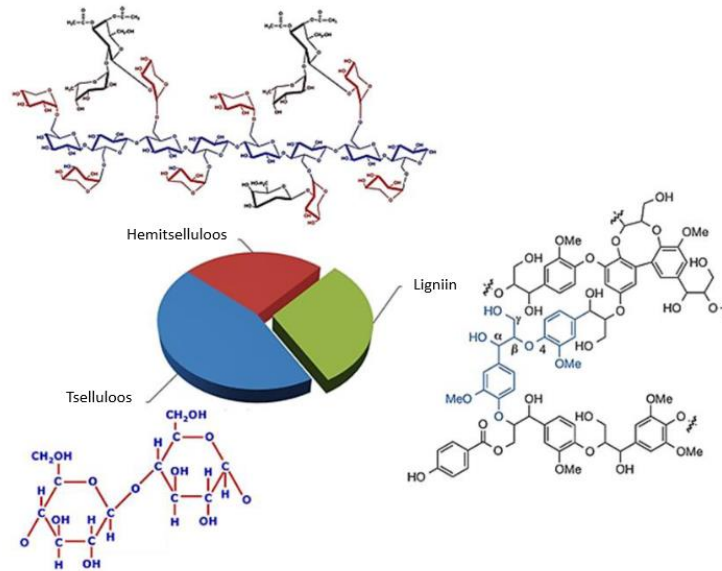
1.1 Lignotselluloosne biomass

Peamiseks lignotselluloosse biomassi allikaks on puud ja puittaimed (1), mis koosnevad kolmest põhikomponendist: ligniinist, tselluloosist ja hemitselluloosist (Joonis 1). Nende polümeeride põhielemendiks on süsinik, mis kujutab endast energiarvaru. (2)

Tselluloos on looduses kõige tihedamini esinev polümeer. Taimede rakuseinte peamine struktuuri komponent koosneb β -1,4-glükosiidsidemete kaudu ühendunud β -D-glükopüranoosi monomeeridest. Tselluloos omab korrapärast lineaarset struktuuri ja hüdroksüülrühmade hulga tõttu on tselluloos hüdrofiilne, kuid ei lahustu vees. (3)

Hemitselluloos on taimerakkude oluline komponent, mis koosneb mitmesugustest monosahhariididest, nagu glükoos, mannoos, galaktoos, ksüloos ja arabinoos, mis on vahetevahel atsetüülitud ja/või kombineeritud uroonhapete, pektiinide ja tärklisega. Hemitselluloos toimib tselluloosi mikrofibrillide maatriksina, polümeeride sidumine toimub Van der Waalsi jõudude ja vesiniksidemete kaudu. (4,5)

Kolmas puidu põhikomponent, ligniin, on keerukas kolmemõõtmeline polümeer, mis sisaldab arvukalt aromaatsid tsükleid ja eetersidemeid. Ligniin annab taimedele struktuurse tugevuse, tagab rakuseina veekindlust, hõlbustades vee liikumist ksüleemis ülespoole. Samuti kaitseb see taime seente ensüümide ja toksiinide difusiooni eest, kiiresti ladestudes vastusena seente tekitatud vigastustele. (6)



Joonis 1. Biomassi peamiste komponentide lihtsustatud struktuurid: tselluloos, hemitselluloos, ligniin (5)

Polümeeride sisaldus varieerub sõltuvalt puuliigist, eriti leht- ja okaspuidu vahel. (5) Kirjanduse andmetel on okaspuukoore koostises tselluloosi 18 – 38%, hemitselluloosi 15 – 33% ja ligniini 30 – 60% ja lehtpuidus vastavalt 43 – 47%, 25 – 35% ja 16 – 24%. (7) Okaspuu vartes 45 – 50% tselluloosi, 25 – 35% hemitselluloosi ja 25-35% ligniini ja lehtpuude vartes vastavalt 40 – 55%, 24 – 40%, 18 – 25%. (8)

Ligniini on tselluloosi järel teine kõige levinum orgaaniline materjal Maal, kuid tööstuslikke rakendusi peale kütust on leitud suhteliselt vähe. Ligniini eemaldatakse puidumassist paberi valmistamisel, tavaliselt töötlemisel selliste ainetega nagu vääveldioksiid (SO_2), naatriumsulfiid (Na_2S) või naatriumhüdroksiid (NaOH). Ligniini kasutatakse puitlaastplaatide ja sarnaste lamineeritud või komposiitpuittoodete sideainena, pinnase parandajana, täiteainena või fenoolvaikude toimeainena ning linoleumi liimina. Ka vanilliini (sünteesiline vaniljeekstrakt) ja dimetüülsulfoksiidi (DMSO) valmistatakse ligniinist. (6)

Puidutööstuses esinevad jäägid (varred, oksad, lehestik, koored, juured, puiduplokid, harvendusraie puiduhake jne), mis tavaliselt moodustavad 25 – 40% raiutud puidust. (9) See fakt paneb mõtlema sellele, kuidas saaks efektiivsemalt kasutada ressursse ning minimeerida jääke. Näiteks, saab metsa harvendusraie ja paberitootmise puidijääke kasutada bioetanooli tootmise lähteaineks. (10) Ligniini on looduses suurim taastuv aromaatsete ehitusplokkide allikas ja sellel on märkimisväärne potentsiaal olla lähteaineks lahtiste või funktsionaliseeritud aromaatsete ühendite tootmisel, et pakkuda sobivaid alternatiive universaalselt kasutatavale naftast saadud BTX-le (benseen, toluen ja ksüleen). (11)

Seepärast on ligniini väärimine hetkel väga aktuaalne teema. Ligniinitooted (segud ja komposiidid) võimaldavad asendada naftast saadud tooteid ning aitavad kaasa ringmajanduse loomisele ja jätkusuutlikule materjalitehnoloogia arengule. (12)

1.2 Analüütilised meetodid

Selleks, et puidu biomassi saaks edukalt väärimada ja uusi kasutusvõimalusi arendada, on vajalik teada selle koostist täpsemalt. Biomassi biokoostise ehk tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini sisalduse määramiseks on olemas mitmeid analüütilisi meetodeid.

1.2.1 Tselluloosi ja hemitselluloosi määramine

Tselluloos ja hemitselluloos on struktuursed süsivesikud ehk pika ahelaga molekulid, mida kasutatakse biomassi struktuurseks ehitamiseks. Tselluloos on väga stabiilne tänu vesiniksidemetele ning vastupidav keemilisele rünnakule. Hemitselluloosil on lühemad ja hargnenud ahelad, mille tõttu on seda kergem lagundada, võrreldes tselluloosiga.

Üks võimalikest meetoditest struktuursete süsivesikute määramiseks on vedelikkromatograafia refraktiivindeksi detektoriga (HPLC-RID). Enne HPLC analüüsi hüdrolyüsatakse biomassi proov happega. Hüdrolyüsi protsess on kaheastmeline, esimesel etapil kasutatakse 72% väävelhappet ja teisel 4% väävelhappet. Hüdrolyüsi käigus lagundatakse polümeersed süsivesikud monomeerideks, mis lahustuvad happes. Seejärel monomeersete suhkrute sisaldusi määratakse HPLC abil, kasutades kalibreerimist suhkrute standarditega. (13)

Vedelikkromatograafia on ajakulukas protsess ning suhkrute puhul saadavad piigid pole hästi eristatavad ja tulemuste interpreteerimine võib olla keeruline, sellepärast võib kasutada suhkrute analüüsimiseks kapillaarelektroforeesi.

Kapillaarelektroforees on lihtne ja efektiivne meetod, mis nõuab väikest proovi ja elektrolüüdi kogust ning võimaldab saada head ionide lahustuvust ja kiiret analüüsi tulemust.

Ainete lahutamiseks kasutatakse kvartskapillaari ja liikumapanevaks jõuks on kõrgepinge alalisvoolu elektriväli. Lahuse komponentide lahutamine toimub tänu osakeste erinevale liikumiskiirusele, mis sõltub osakeste laengu ja massi suhtest (väiksemad osakesed suurema laenguga liiguvad kiiremini). Osakeste tsoonide liikumist läbi kapillaari fikseerib detektor. Kapillaarelektroforeesi saab kasutada komponentide analüüsimiseks alates orgaanilistest ionidest kuni bioloogiliste makromolekulideni. (14)

1.2.2 Klason meetod ligniini määramiseks

Klason meetod on klassikaline ligniini sisalduse otsese kvantifitseerimise meetod, mis on kasutusel juba üle sajandi. (15)

Meetodi printsiibiks (Joonis 2) on lignotselluloosse biomassi töötlemine tugevate hapetega, mille käigus süsivesikud hüdrolüüsitakse, jättes järele lahustumatu jäägi, mida identifitseeritakse kui happes lahustumatu ligniini (AIL). AIL filtritakse, pestakse, kuivatatakse ja selle kogus määratakse gravimeetriliselt. Kuna osa puidu ekstraktiivaineid (õlid, vaigud, rasvad, vahad ja tärklis) jäävad koos ligniiniga lahustumatuks, mille tulemusena võib saadav ligniini kogus olla ülehinnatud, eemaldatakse need eelnevalt sobivate lahustitega (etanol, etanooli-tolueeni lahus ja kuum vesi) ekstraheerimise teel. (16)

Väike kogus ligniinist, mis lahustub väävelhappes (happes lahustuv ligniin – ASL), mõõdetakse UV- spektromeetri abil lainepikkusel 205 nm. ASL kogus arvutatakse vastavalt valemile (17,18):

$$ASL \% = \frac{(A \cdot V \cdot D) \cdot 100}{\epsilon \cdot \left(\frac{W_s \cdot \text{tahke aine } \%}{100} \right) \cdot L} \quad (1)$$

Kus

A – absorptsioon lainepikkusel 205 nm

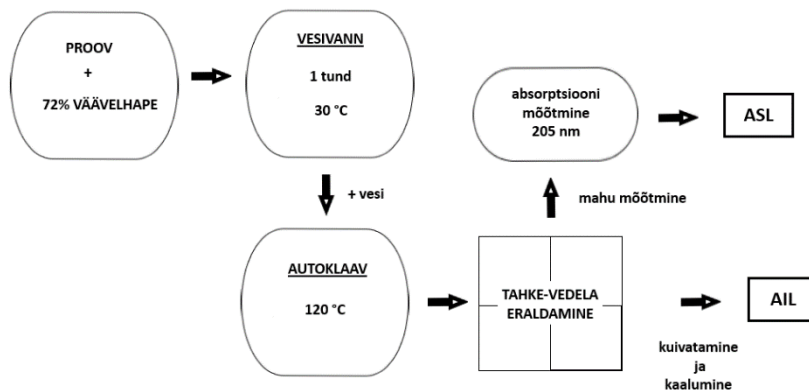
V – maht [ml]

D – lahjendusmäär

ϵ – neeldumistegur [$L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$]

L – optiline teepikkus [cm]

W_s – proovi kaal [g]



Joonis 2. Klason meetodi skeem

Happes mittelahustunud ligniini (AIL) analüüsiks proov kaalutatakse ja lisatakse sellele 72% väävelhape. Lahus jäetakse vesivanni 30°C juurde üheks tunniks. Seejärel võetakse proovid vesivannist välja, lisatakse vett ning asetatakse autoklaavi. Pärast seda võetakse proovid autoklaavist välja ja sellele järgneb vaakumfiltratsioon. Filtraat kogutakse (mõõdetakse spektrofotomeetriselt ASL sisaldust); filter koos happes mittelahustuva ligniiniga pestakse ja kuivatatakse kuivatuskapis konstantse kaaluni. Jääk kaalutatakse ning tulemus võetakse puhta ligniini massiks. (15)

1.2.3 CASA meetodi põhimõte

Kuna olemasolevad ligniini määramise meetodid on mitmeetapilised, ajakulukad ja nõuavad suurtes kogustes happete kasutamist, on vaja otsida kiiremaid ja keskkonnasõbralikumaid alternatiive.

Ligniini on oma keerulise ja heterogeense struktuuri tõttu lahustumatu paljudes tavalistes lahustites, sealhulgas vees ja orgaanilistes lahustites. Kuid ligniini võib teatud tingimustes lahustuda, näiteks väävelhappe-tsüsteiini lahuses.

Uus CASA (i.k. Cysteine-Assisted Sulfuric Acid) meetod lignitselluloosse biomassi ligniinisalduse määramiseks (Joonis 3) põhineb kogu biomassi täielikul lahustumisel 72% väävelhappe ja tsüsteiini lahuses ning saadud lahuse absorptsiooni mõõtmisel spektroskoopiliselt.



Joonis 3. CASA meetodi skeem (19)

Arvatakse, et ligniini lahustumine väävelhappe-tsüsteiini lahuses toimub protsessi kaudu, mida nimetatakse solvolüüsiks. Solvolüüs on keemiline reaktsioon, mille käigus tahke või vedel ühend reageerib lahustiga, moodustades lahuse. Sel juhul annab väävelhappe happelise keskkonna, mis on vajalik ligniini solvolüüsiks ja tsüsteiin toimib redutseeriva ainenä.

Väävelhappe on tugev hape, mis võib protoneerida ligniini hüdroksüülrühmi, mille tulemuseks on ligniini katioonide moodustumine. Tsüsteiin, aminohape, võib seejärel reageerida nende ligniini katioonidega, moodustades lahustuvad ligniini-tsüsteiini kompleksid. Tsüsteiini redutseerivad omadused aitavad lagundada ligniini keerulist ja heterogeenset struktuuri, võimaldades sellel lahustuda väävelhappe-tsüsteiini lahuses. (20)

Oluline on märkida, et ligniini lahustumine väävelhappe-tsüsteiini lahuses võib sõltuda erinevatest teguritest, nagu väävelhappe ja tsüsteiini kontsentratsioon, temperatuur ja reaktsiooniaeg. Väävelhappe-tsüsteiini lahuses ligniini lahustumise spetsiifilised mehhanismid ja tingimused on endiselt aktiivne uurimisvaldkond ning selle protsessi paremaks mõistmiseks viiakse läbi täiendavaid uuringuid.

Lu et al. uuringus biomassi täielikuks lahustamiseks kasutati 0,1 g ml⁻¹ tsüsteiini 72% väävelhappes. Analüüsimiseks kasutati väikest proovi kogust (5 – 10 mg), mis lahustati 1 ml põhilahuses. Proov lahustus täielikult toatemperatuuril, konstantsel segamisel, 60 minuti jooksul. Lahustumise käigus lahus värvub ja moodustub homogeenne lillakas lahus. Pärast lahustumist proov lahjendatakse deioniseeritud veega ning lahus mõõdetakse UV- spektrofotomeetriga lainepikkusel 283 nm nullproovi suhtes. Lahjendatud lahus on kollakat värvi või värvitu. (19)

Võrreldes praegu kasutatavate ligniini määramise meetoditega, on CASA ligniini meetodil järgmised eelised:

- Kasutatavad reagentid on kergesti kättesaadavad ja keskkonnasõbralikud
- Protseduur on kiire ja selles ei kasutata kuumutamist
- Analüüsiks on vaja väike proovikogus
- Meetod annab tulemuse, mis on korrelatsioonis Klasoni meetodil saadud ligniini üldsisaldusega

Oma innovatiivsuse ja lihtsuse poolest pakub uus meetod huvi selle kasutamisele võtmiseks.

1.2.4 Spektrofotomeetriline ligniini määramine CASA meetodil

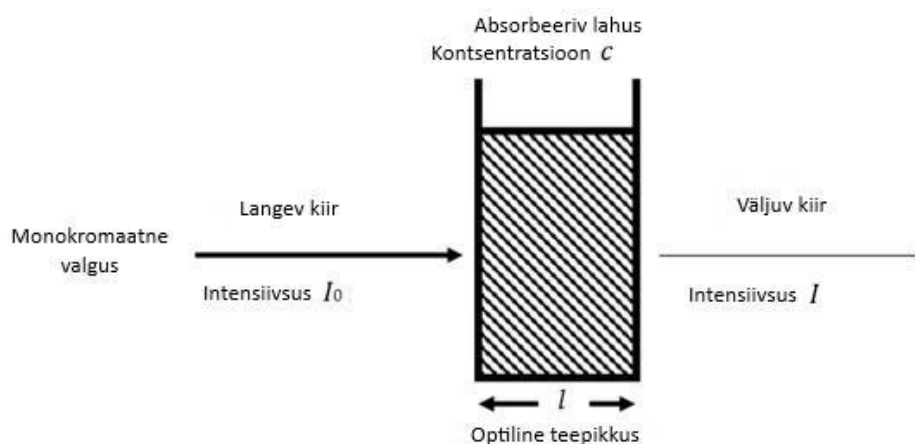
Spektrofotomeetria on meetod, mille puhul mõõdetakse molekulide interaktsioone elektromagnetkiirgusega. Valguse energiat kasutatakse elektronide viimiseks põhiolekust ergastatud olekusse. Spekter saadakse siis, kui valguse neeldumist mõõdetakse selle sageduse või lainepikkuse funktsioonina. Delokaliseeritud elektronidega aromaatsed süsteemid neelavad valgust UV (150 – 400 nm) või nähtavas (400 – 800 nm) piirkonnas.

Absorptsiooni spektroskoopiat kasutatakse tavaliselt läbipaistvas lahustis lahustatud ainete määramisel. Lahustunud aine neeldumine sõltub lineaarselt selle kontsentratsioonist ja seetõttu absorptsiooni spektroskoopia sobib hästi kvantitatiivseteks mõõtmisteks. Spektroskoopilised mõõtmised on väga tundlikud ja mittedestruktiivsed ning nõuavad analüüsiks väikeseid aine koguseid. (21)

UV-spektroskoopias on põhiline Lambert-Beeri seadus, mis kirjeldab monokromaatilise valguse neelduvuse määra absorbeerivas aines sõltuvalt aine omadustest. Ainete kontsentratsiooni saab lihtsalt ja täpselt määrata mõõtes neeldumist.

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) \quad (2)$$

Absorptsioon (A) on seotud valguse intensiivsusega enne (I_0) ja pärast (I) lahuse läbimist (Joonis 4).



Joonis 4. Valguse ülekanne läbi küvetis oleva lahuse (22)

Lambert-Beeri seaduse järgi valguse absorptsioon sõltub lineaarselt aine kontsentratsioonist.

$$A = \epsilon cl \quad (3)$$

Kus:

ϵ – molaarne neeldumistegur [$L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

c – molaarne kontsentratsioon [mol L^{-1}]

l – optiline teepikkus (lahusekihi paksus) [cm]

Ultraviolettspektrofotomeetria on üks mugavamaid meetodeid lahuses sisalduva ligniini kvantitatiivseks ja kvalitatiivseks analüüsiks. Suure aromaatsete tsüklite sisalduse tõttu neelab ligniin tugevalt ultraviolettkiirgust ja annab UV-kiirguse piirkonnas iseloomulike maksimume. Maksimumide asukoht ja intensiivsus sõltuvad ligniini tüübist, selle keemilistest modifikatsioonidest ja fotomeetriliseks mõõtmiseks kasutatud lahustist.

Ligniini määramiseks sobiv elektromagnetine spekter jääb 200 – 380 nm vahemikku. Selles piirkonnas neeldunud energia põhjustab muutusi ligniini molekuli elektronenergiast, mis tuleneb valentselektronide üleminekust ergastatud olekusse. (23)

Lignotselluloosse biomassi ligniinisisaldust ($CASA_L(\%)$) arvutatakse Lambert-Beeri seaduse järgi vastavalt:

$$CASA_L(\%) = \frac{A \cdot V}{\epsilon \cdot m_s \cdot L} \cdot 100 \quad (4)$$

Kus

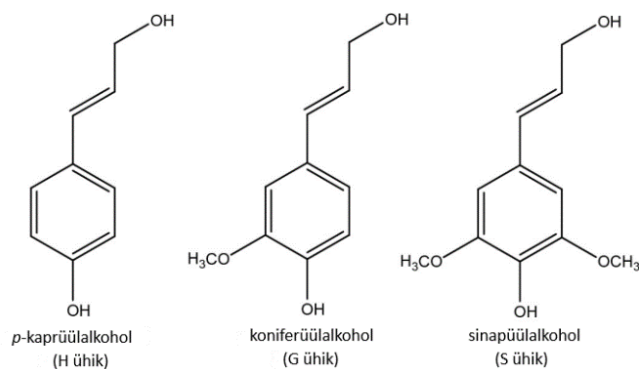
A – lahjendatud lahuse UV-neelduvus lainepikkusel $\lambda = 283 \text{ nm}$

V – lahjendatud lahuse maht [L]

m_s – proovi mass [g]

L – valguse teepikkus [cm]

ϵ – ligniini UV-kiirguse neeldumistegur lainepikkusel $\lambda = 283 \text{ nm}$ [$\text{g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$]



Joonis 5. Ligniini monolignoolid (H, G ja S ühikud) (24)

Ligniini koosneb põhiliselt kolmest algühikust (Joonis 5): G, S ja H. Kuna ligniini struktuur sõltub ligniini päritolust, okaspuudes koosneb ligniin põhiliselt G ühikutest ja lehtpuudes on G ja S ühikuid peaaegu samas koguses, siis ligniini neeldumistegur ϵ ka varieerub sõltuvalt puiduliigist. Seega CASA meetodi rakendamisel on oluline määrata ϵ erinevate puitude ligniinil, milleks kasutatakse erinevaid lähenemisi, näiteks Lu et al. artiklis seda tehti kasutades sünteetilisi monolignoolide erinevates suhetes. Monolignoolidest sünteesitud DHP-d (dehüdroneeritud polümeerid) kasutati ligniini standarditena kalibreerimiskõverate tegemiseks, kuna sünteesitud DHP-d saab hõlpsasti valmistada piisavas koguses, need on puhtad ning erinevate ühikute molaarsuhetega DHP-side kasutamisel saab uurida, kuidas G:S suhted mõjutavad ligniini neelduvust. Kasutades sünteetilisi ligniine, määrati järgmised neeldumistegurid: $17,25 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ okaspuu ja $11,23 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ lehtpuu ligniini jaoks. (19,25)

Käesolevas töös kalibreerimiskõverate väljatöötamiseks ja neeldumisteguri hindamiseks kasutati teadaoleva ligniinisisaldusega erinevat liiki puiduproove. Kasutatud proovides ligniini üldsisaldus oli määratud klassikalisel Klason meetodil.

2 Töö eesmärk

Käesoleva töö põhiliseks eesmärgiks oli uudse ligniini määramise meetodi arendamine ja selle tõepärasuse kinnitamine enne kasutusele võttu KBI Keemilise analüüsi laboratooriumis.

Sellest tulenevalt olid püstitatud järgmised alameesmärgid:

1. Kasutades kirjanduses avaldatud andmeid, viia läbi ligniini määramine biomassis CASA meetodi tingimustel
2. Koostada kalibreerimissirged ligniini kontsentratsioonide määramiseks ja hinnata nende lineaarsust
3. Hinnata CASA meetodi mõõteulatust ja kordustäpsust
4. Määrata ligniini neeldumistegurid nelja erineva puiduliigi jaoks ja nende varieeruvus
5. Kontrollida CASA meetodi usaldusväärsust, kasutades erinevate puitude sõltumatuid proove eelnevalt määratud ligniini sisaldusega

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Aparatuur ja kemikaalid

Ligniini määramiseks lignotsellulooses biomassis CASA meetodil kasutati järmisi vahendeid ja seadmeid: kooniline kolb, klaasist viaalid, Pasteur pipetid (VWR International), automaatpipett (BRAND GMBH + CO KG), analüütiline kaal (Precisa), ultrahelivann (Bandelin), UV-Vis spektrofotomeeter (Varian).

Ligniini lahuste valmistamiseks kasutati: väävelhape (72%, Chem-Lab NV), L-tsüsteiin (97%, Sigma-Aldrich), MilliQ ülipuhas vesi (Millipore, USA).

Referentsmaterjalina oli kasutatud sertifitseeritud, kindla ligniini sisaldusega, kallaspappeli biomass (National Institute of Standards and Technology, Reference Material 8492, Eastern Cottonwood Whole Biomass Feedstock (NREL, NIST)).

3.2 Analüüsitud biomassi iseloomustus

Töös analüüsiti Eestist pärit kase, kuuse ja männi puidu proovid. Eelneva RESTA11 projekti raames iseloomustati kokku ligi 90 puiduproovi, milleks teostati ka Klasoni (üld)ligniini määramist. Kuna ekstraktiivainete olemasolu puidus võib mõjutada ligniini sisalduse lõpptulemust, kõik kasutatud proovid olid eelnevalt ekstraheeritud orgaanilise solvendiga ekstraktiivainete eemaldamiseks ASTM D1107-96 meetodil (16).

Kalibreerimissirgete koostamiseks ja ligniini neeldumisteguri määramiseks kasutati järgmiseid puiduproove: E1312 (kask), E2425 (kuusk), E2435 (mänd). Saadud neeldumistegurite ja CASA meetodi üldtoimimise kontrolliks kasutati proove: E2413 (kask), E2423 (kuusk) ja E2434 (mänd). Varem määratud Klason ligniini sisaldused biomassides on toodud Tabelites 1 ja 2.

3.3 CASA analüüsi käik

Tsüsteiini-väävelhappe lahuse valmistamiseks kaaluti 10 g L-tsüsteiini ja lahustati 100 ml-s 72% väävelhappes.

Kalibreerimiskõverate tegemiseks võeti igat proovi viis kaalutist (2, 4, 6, 8 ja 10 mg). Proovid lahustati 1 ml-s tsüsteiini-väävelhappe lahuses viaalides. Viaalid asetati 30 – 60 minutiks 30°C juurde ultrahelivanni biomassi täieliku lahustumiseni (Joonis 6). Seejärel lahjendati saadud ligniini lahused 50 ml-ni veega.

Lahjendatud proovide absorptsiooni intensiivsust mõõdeti spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 283 nm, millest oli maha lahutatud null-proovi (tsüsteiini-väävelhappe lahuse) signaal. Saadud tulemuste alusel koostati MS Excelis kalibreerimissirged ja arvutati kalibreerimissirge tõusu ehk ligniini neelduvuse koefitsiendid (ϵ) erinevate puitude jaoks. Ligniini sisaldus tundmatutes proovides arvutati CASA meetodi valemi (4) järgi.



A



B



C



D

Joonis 6. Ligniini lahused proovist: A - kuusk; B - mänd; C - kask; D – kallaspappel

3.4 Andmete statistiline töötlus

Igat mõõtmist teostati vähemalt kolm korda ja paralleelmõõtmiste varieeruvust hinnati arvutades standardhälbe (s) valemi (5) järgi (26):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n - 1}} \quad (5)$$

x_i – üksikmõõtmise tulemus

x_m – paralleelmõõtmiste keskväärtus

n – paralleelkatsete arv

CASA meetodi kordustäpsust hinnati kasutades kogutud standardhälbe valemit (26):

$$s_{kogutud} = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_k^2}{k}} \quad (6)$$

CASA meetodi suhtelist kordustäpsust (SSH – suhteline standardhälve) arvutati järgmiselt (26):

$$SSH(\%) = \frac{s}{x_m} \times 100\% \quad (7)$$

Absorbtsiooni intensiivsuse ja ligniini sisalduse omavahelise korrelatsiooni lineaarsust hinnati jääkliikmete graafilise (visuaalse) analüüsi abil. Jääkliikmed on mõõdetud ja lineaarregressiooni sirge järgi ennustatud y-väärtuste (signaalide) vahed.

Saadud neelduvuskoeffitsiendi (kalibreerimisirge tõusu) standardhälvet (SH_{b1}) hinnati valemite (8) ja (9) järgi (26):

$$SH_{b1} = s_y \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{c_m^2}{\sum (c_i - c_m)^2}} \quad (8)$$

s_y – jääkliikmete standardhälve

N – kalibreerimisirge koostamiseks kasutatud katsete arv

c_m – keskmine kontsentratsioon

$$s_y = \sqrt{\frac{1}{N-2} \sum (y_i - (b_0 + b_1 c_i))^2} \quad (9)$$

SH_{b1} arvutati MS Excelis kasutades LINEST funktsiooni.

Meetodi tõepärasust hinnati kasutades z-arvu - statistilist parameetrit, mis määrab ära 95% usaldusnivool erinevuse olulisuse kahe mõõtmise vahel. (26)

$$z = \frac{x_i - x_{ref}}{\sqrt{s_i^2 + s_{ref}^2}} \quad (10)$$

x_i – CASA meetodil mõõdetud ligniini sisaldus

x_{ref} – klassikalisel meetodil määratud ligniini sisaldus

95% usaldusnivool z – arv absoluutväärtus peab olema väiksem kui 1,96 juhul, kui mõõtmiste keskvaartused statistiliselt oluliselt ei erine.

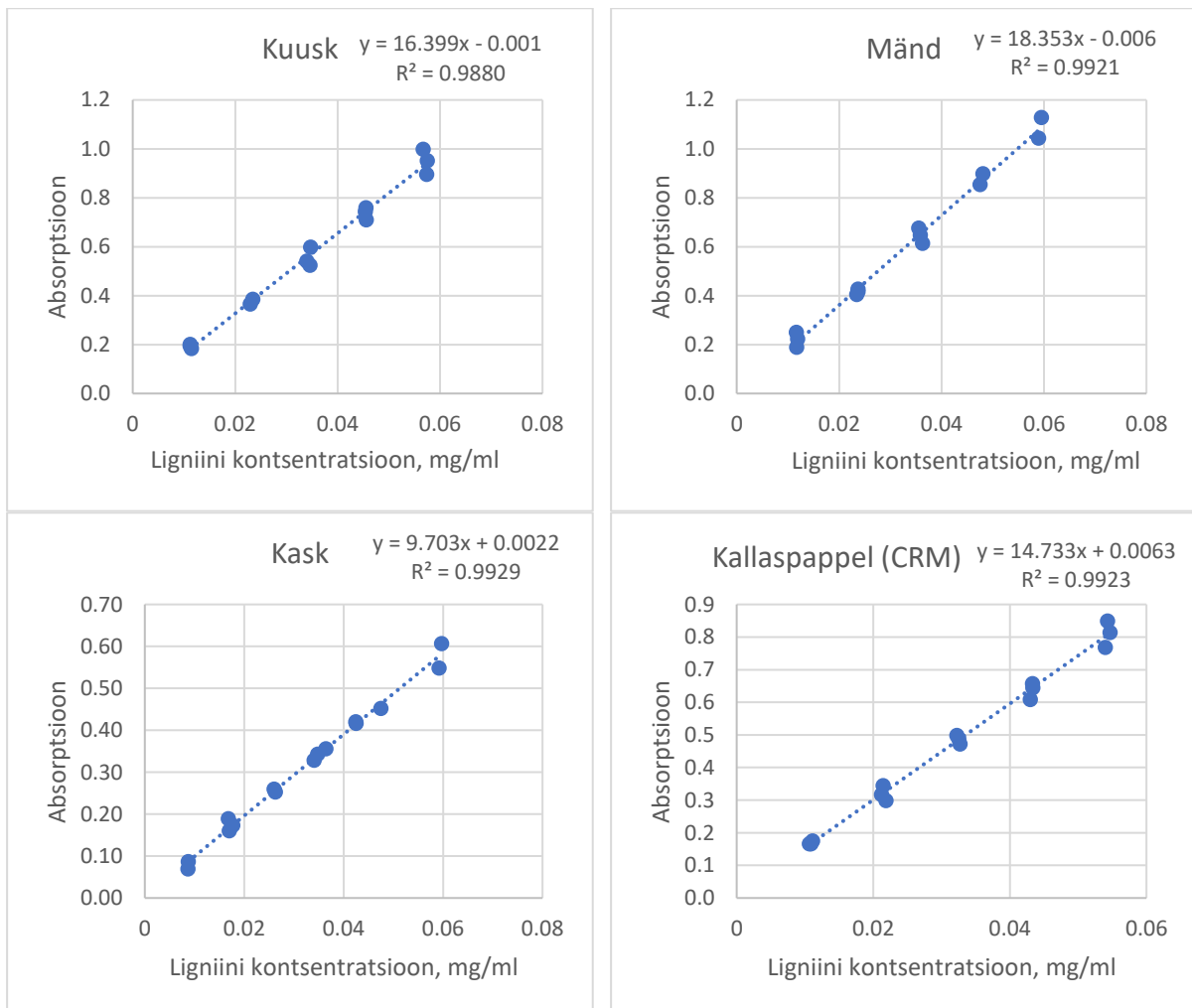
4 Tulemused ja arutelu

4.1 Erinevate ligniinide neeldumistegurite määramine

Erinevate biomasside ligniini neelduvuskoeffitsientide määramiseks koostati kalibreerimissirged, milleks kasutati nelja erinevat puidumassi eelnevalt määratud ligniini kogusega (Tabel 1). Pärast lignotselluloosse biomassi lahustamist tsüsteiin-vävelhappe segus, jäid ligniini kontsentratsioonid kalibreerimislahustes vahemikku 10 – 60 mg/l, mis andis absorptsiooni signaali intensiivsuse vahemikus 0,2 kuni 1,1 AU.

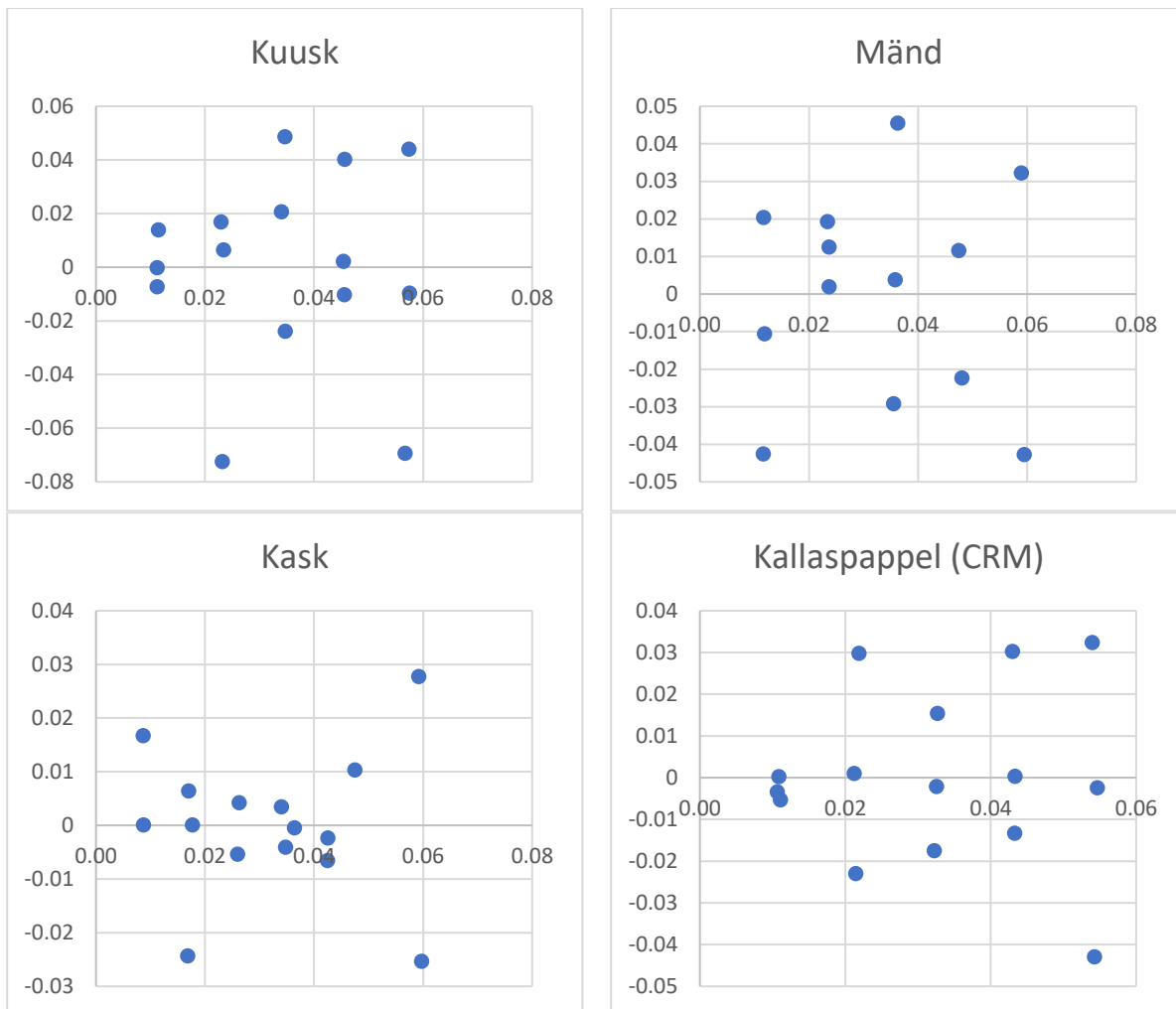
Ligniini lahuste tegemisel oli näha erinevused lehtpuu ja okaspuu ligniinide värvuses (Joonis 6). Lehtpuude proovidest lahused olid eredamat värvi ning okaspuude proovidest lahused olid tumedamat värvi. Arvatavasti, erinevus tuleneb ligniini G ja S ühikute sisalduse erinevusest biomassis.

Lignotselluloosse biomassi spektromeetrilisel mõõtmisel saadud absorptsioonide järgi koostatud kalibreerimissirged koos võrrandi ja korrelatsiooni koeffitsiendiga R^2 on esitatud Joonisel 7.



Joonis 7. Lineaarne korrelatsioon tsüsteiin-happes lahustatud lignotselluloosse biomassi proovide UV-neeldumise (283 nm juures) ja nende ligniini kontsentratsioonide vahel

Saadud kalibreerimissirgete lineaarsust hinnati, jälgides jääkliikmete jaotust (Joonis 8). Joonisel 8 on näha, et jääkliikmetel puudub seaduspärasus ja nad on juhuslikult jaotatud x-telje suunas. Seega, võib teha järelduse, et vahemikus 10 – 60 mg/l on kõigi nelja kalibreerimisgraafiku signaali sõltuvus kontsentratsioonist lineaarne.



Joonis 8. Jääkliikmete jaotus kalibreerimissirgete lineaarsuse hindamiseks

Metoodika mõõteulatuse vahemik, alates kõige madalama kontsentratsiooniga standardlahusest ning lõpetades kõige kõrgema kontsentratsiooniga standardlahusega. Käesoleva CASA meetodi puhul võib mõõteulatuseks pidada ligniini kontsentratsiooni vahemikus 10 – 60 mg/l, mis ümberarvutatuna biomassile on 2 kuni 10 mg lignotselluloosi (ligniini sisaldusega 20 – 30%).

Erinevate ligniinide saadud neeldumistegurid (ϵ) koos standardhällbega on esitatud Tabelis 1.

Uuritavate okaspuude ligniini neeldumistegurid olid lähedased Lu et. al artiklis esitatud neeldumistegurile okaspuu ligniini jaoks, kuid lehtpuidu ligniini neeldumistegurid erinesid märkimisväärselt.

Tabel 1. Kalibreerimissirgete järgi saadud neeldumistegurid

Biomass	Proovi ID	Puit	Ligniin, %dw**	Neeldumistegur ϵ (283 nm) ($\text{g}^{-1} \text{L cm}^{-1}$)
Kuusk	E2425	Okaspuit	28,6	16,2 \pm 0,6
Mänd	E2435	Okaspuit	29,7	18,4 \pm 0,5
Kask	E1312	Lehtpuit	21,3	9,7 \pm 0,2
Kallaspappel	CRM	Lehtpuit	27,2*	14,7 \pm 0,4

*Sertifikaadilt

**massiprotsent kuiva kaalu kohta

4.2 CASA meetodi tõepärasuse kinnitamine

Arendatud CASA meetodi tulemuste kordustäpsuse ja tõepärasuse hindamiseks kasutati sõltumatuid kontrollproove samadest puiduliikidest. Igat proovi analüüsiti CASA meetodil kolmes paralleelis ja saadud absorptsioonide järgi leiti ligniini sisaldused (Valem 4), kasutades määratud neelduvuskoeffitsiente.

Meetodi kordustäpsust hinnati paralleelmõõtmiste kogutud standardhälbe kaudu. Tulemused on esitatud Tabelis 2. Üksikproovide paralleelmõõtmiste suhteline standardhälve varieerus vahemikus 2 – 8%, kogutud SSH ehk meetodi kordustäpsuse väärtuseks saadi 6%, mis on piisavalt väike spektroskoopilise meetodi jaoks.

Tabel 2. Sõltumatute proovide mõõtetulemuste suhtelised standardhälbed

Biomass	Proovi ID	SSH, %
Kuusk	E2423	7,5
Mänd	E2434	2,4
Kask	E2413	5,8
Kallaspappel	CRM	6,7

CASA meetodiga saadud tulemused võrreldi Klasoni meetodi järgi määratud üldligniini sisaldusega (Tabel 3). Statistiliseks kriteeriumiks kasutati z-arvu (Valem 10).

z – arv annab teavet kahe keskväärtuse statistilise erinevuse kohta. 95% usaldusnivool peaks z – arv absoluutväärtus olema väiksem kui 1,96 juhul, kui keskväärtused ei oma statistilist erinevust.

Tabel 3. Biomasside üldligniini ja CASA ligniini võrdlus

Biomass	Proovi ID	Puit	Üldligniin \pm s*, %dw	CASA ligniin \pm s*, %dw	Z – arv
Kuusk	E2423	Okaspuit	27,9 \pm 1,6	29,1 \pm 2,2	-0,47
Mänd	E2434	Okaspuit	29,6 \pm 1,7	29,0 \pm 0,8	0,32
Kask	E2413	Lehtpuit	24,9 \pm 1,5	23,4 \pm 1,6	0,63
Kallaspappel	CRM	Lehtpuit	27,2 \pm 1,9	25,5 \pm 1,8	0,71

*s – paralleelmõõtmiste standardhälve (n = 3)

Statistiline analüüs näitas, et erinevate meetoditega saadud tulemuste z-arv on alla 1, mis tähendab seda, et tulemused ei erine omavahel statistiliselt oluliselt. Järelikult, saab pidada CASA meetodit usaldusväärseks ja edaspidi kasutada KBI Keemilise analüüsi laboris lignotselluloosse biomassi ligniini sisalduse määramiseks.

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uudse ligniini määramismeetodi arendamine ja selle tõepärasuse kinnitamine selleks, et seda saaks võtta kasutusele KBI Keemilise analüüsi laboratooriumis.

CASA meetodi tingimustel viidi läbi ligniini määramine biomassis ning valmistati kalibreerimissirged kase, kuuse, männi ning kallaspappeli ligniini määramiseks. Jääkliikmete jaotuse järgi tehti järeldus, et saadud kalibreerimissirged on lineaarsed.

Kalibreerimissirgete abil määrati ligniini neeldumistegurid nelja erineva puiduliigi jaoks ning hinnati nende varieeruvust, arvutades kalibreerimissirgete tõusu standardhälbed. CASA meetodi mõõteulatuse hindamisel lähtuti UV-absorptsiooni signaali intensiivsusest. Mõõteulatuseks saadi 10 – 60 mg/l ligniini tsüsteiin-vävelhappe lahuses. Meetodi kordustäpsust hinnati läbi erinevate proovide paralleelmõõtmiste kogutud suhtelisi standardhälbeid ning saadi tulemuseks 6%.

Arendatud CASA meetodi usaldusväärsust hinnati, analüüsides samade puuliikide sõltumatuid proove (mille ligniini sisaldus oli eelnevalt määratud Klason meetodiga). Sõltumatute proovide ligniini sisaldused määrati, kasutades leitud neelduvustegureid. Saadud tulemusi võrreldi klassikalise Klason meetodi tulemustega, kasutades statistilist parameetrit – z–arvu.

Statistilist erinevust Klasoni ja CASA meetodite vahel ei esinenud ning sellest tehti järeldus, et töös arendatud CASA meetod on usaldusväärne ja seda saab võtta kasutusele KBI Keemilise analüüsi laboratooriumis ligniini sisalduse määramiseks lignotsellulooses biomassis.

Abstract

Nowadays biomass is an important topic mainly because of the opportunity to use it as a renewable resource. One of biomasses relevant compounds is lignin. It is known for a large quantity of aromatic subunits in its structure; therefore, it may be used as an alternative to petroleum-based fuels and chemicals. As a result, by using lignin it is possible to contribute to the reduction of greenhouse gas emissions and change biomass processing to be more effective and profitable. For that reason, many researchers have been focusing on lignin valorization.

In order to explore the possible uses of lignin in the biofuels and bioproducts industry, the amount of lignin must be quantified. The methods currently used to analyze biomass are time-consuming, multi-step, labor-intensive and require heating and the use of large amounts of toxic substances.

This work investigates a novel method (CASA method) that can be used to determine the lignin content of lignocellulosic biomass in a more environmentally friendly and simple way. The method requires less energy, time and significantly less acid.

The aim of this study was to develop a new method for determining lignin and confirm its veracity so that it could be used in the KBI Chemical Analysis Laboratory. Under the conditions of the CASA method, the determination of lignin in biomass had been carried out, and calibration lines had been prepared for the determination of lignin in birch, spruce, pine and cottonwood reference material. According to the distribution of the residual terms, it was concluded that the obtained calibration lines are linear.

The lignin absorption coefficients for four different wood species were determined using the calibration curves and their variability was evaluated by calculating the standard deviations of the increase in the calibration curves in Excel.

The measurement range of the CASA method was evaluated based on the intensity of the UV absorption signal and a range of 10 – 60 mg/l lignin in the cysteine-sulfuric acid solution was obtained.

The repeatability of the method was evaluated through the relative standard deviations collected through parallel measurements of different samples, and the result was 6%.

The reliability of the developed CASA method was evaluated by analyzing independent samples of the same tree species (whose lignin content was previously determined by the Klason method). Lignin contents of independent samples were determined using the absorption coefficients found. The obtained results were compared with the results of the classic Klason method.

There was no statistical difference between the Klason and CASA methods, and it was concluded that the CASA method developed in the work is reliable and can be used in the KBI Chemical Analysis Laboratory to determine the lignin content in lignocellulosic biomass.

Tänuavaldused

Töö autor soovib tänada oma juhendajaid Maria Kulpi ja Olivia-Stella Salmi, kelle abiga ja toetusega käesolev töö valmis sai.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- (1) Yang C., Li R., Zhang B. (2016). 5 – Biomass harvesting and collection. Holm-Nielsen J. B., Ehimen E. A., Biomass Supply Chains for Bioenergy and Biorefining (103–125). Woodhead Publishing.
- (2) Anani, N. (2020). Renewable Energy Technologies and Resources. Artech House, 220.
- (3) Yam, K. L. (2009). The Wiley Encyclopedia of Packaging Technology (3. tr). John Wiley & Sons, Inc., 1368.
- (4) Onyeaka H. N., Nwabor O. F. (2022). Food Preservation and Safety of Natural Products. Academic Press, 272.
- (5) Akash B. (2015). Thermochemical Depolymerization of Biomass. Procedia Computer Science (827–834). Elsevier.
- (6) Petruzzello M. (2022). Lignin. T. E. of E. Britannica, Encyclopedia Britannica.
- (7) Díez D., Urueña A., Piñero R., Barrio A., Tamminen T. (2020). Determination of Hemicellulose, Cellulose, and Lignin Content in Different Types of Biomasses by Thermogravimetric Analysis and Pseudocomponent Kinetic Model (TGA-PKM Method). Processes, 8(9), 1048.
- (8) Haq I., Mazumder P., Kalamdhad A. S. (2020). Recent advances in removal of lignin from paper industry wastewater and its industrial applications – A review. Bioresource Technology, 312, 123636.
- (9) Luque R., Ki Lin C. S., Wilson K., Clark J. (2016). Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies (2. tr). Woodhead Publishing, 612.
- (10) Sluiter J. B., Ruiz R. O., Scarlata C. J., Sluiter A. D., Templeton D. W. (2010). Compositional Analysis of Lignocellulosic Feedstocks. 1. Review and Description of Methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(16), 9043 – 9053.
- (11) Sun Z., Fridrich B., de Santi A., Elangovan S., Barta K. (2018). Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform Chemicals. Chemical Reviews, 118(2), 614–678.
- (12) John M. J., Lefatle M. C., Sithole B. (2022). Lignin fractionation and conversion to bio-based functional products. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 25, 100594.
- (13) Sluiter A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D. (2008). Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, in: Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory.
- (14) Butler J. M. (2012). Chapter 6 – Capillary Electrophoresis: Principles and Instrumentation. Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology. Academic Press (141 – 165).
- (15) Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood, ASTM standard D1106 – 96
- (16) Standard Test Method for Ethanol-Toluene Solubility of Wood, ASTM standard D1107-96
- (17) Graglia, M. (2017). Lignin Valorization: Extraction, Characterization and Applications. Institutional Repository of the University of Potsdam.
- (18) TAPPI UM 250 (2000) Acid-soluble lignin in wood and pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI)
- (19) Lu F., Wang C., Chen M., Yue F., Ralph J. (2021). A facile spectroscopic method for measuring lignin content in lignocellulosic biomass. Green Chemistry, 23(14), 5106 – 5112.

- (20) Li S., Li X., Li X., Wang Y., Li B., Liu C. (2018). Dissolution of lignin in sulfuric acid/cysteine: insights from chemical structures and molecular dynamics simulations. *RSC Advances*, 8(33), 18567 – 18574.
- (21) Schmid F. (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. Wiley Online Library.
- (22) Pintavirooj C., Ni B., Chatkobkool C., Piniikij K. (2021). Noninvasive Portable Hemoglobin Concentration Monitoring System Using Optical Sensor for Anemia Disease. *Healthcare*, 9(6), 647.
- (23) Lin S. Y. (1992). Ultraviolet Spectrophotometry. Dence C. W., *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Series in Wood Science (217 – 232). Springer, Berlin, Heidelberg.
- (24) Lu Y.-C., Lu Y., Fan X. (2020). Structure and Characteristics of Lignin. Kumar A., *Lignin*. Springer Series on Polymer and Composite Materials (17 – 75). Springer, Cham.
- (25) Abu Ghali M., Dahman Y. (2017). Synthesis and utilization of natural fiber-reinforced poly (lactic acid) bionanocomposites. Jawaid M., Tahir P. M., Saba N., In *Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering, Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials: Processing, Properties and Applications*, 313 – 345. Woodhead Publishing.
- (26) Leito I., Viitak A. (2007). *Kvaliteeditagamine Analüütilises Keemias*. TTÜ kirjastus.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks¹

Mina Alisia Teras

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose Kiire spektroskoopiline meetod ligniini määramiseks lignotselluloosis, mille juhendajad on Maria Kulp ja Olivia-Stella Salm,

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.