EESTI PUIDU ISELOOMUSTAMINE ERINEVATE KEEMILISTE JA MITMEMÕÕTMELISTE STATISTILISTE MEETODITEGA

Magistritöö

Üliõpilane: Olivia-Stella Salm

Juhendaja: Maria Kulp, Keemia ja biotehnoloogia instituut, Vanemteadur

Kaasjuhendaja: Tiit Lukk, Keemia ja biotehnoloogia instituut, Vanemteadur

Õppekava: Rakenduskeemia ja biotehnoloogia

Tallinn 2022

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: Olivia-Stella Salm

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Maria Kulp

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: [nimi]

[allkiri ja kuupäev]

Sisukord

Kasutatud lühendite loetelu 5
Sissejuhatus 6
1 Teoreetiline osa 8
1.1 Lignotselluloosne biomass 8
1.1.1 Tselluloos 9
1.1.2 Hemitselluloos 10
1.1.3 Ligniin 12
1.1.4 Ekstraktiivained 13
1.2 Lignotselluloossete biopolümeeride väärindamisvõimalused 14
1.3 Keemilised meetodid lignotselluloosse biomassi iseloomustamiseks 16
1.3.1 Klason meetod 16
1.3.2 Spektrofotomeetria 17
1.3.3 Soxhlet ekstraktsioon 18
1.3.4 Infrapunaspektroskoopia 19
1.4 Kemomeetrilised meetodid 21
1.4.1 Peakomponentide meetod 22
1.4.2 Osaliste vähimruutude regressioon (PLSR) 23
2 Töö eesmärk 24
3 Eksperimentaalne osa 25
3.1 Aparatuur ja töövahendid 25
3.2 Kemikaalid, reagendid ja lahused 26
3.3 Puitmassi päritolu ja ettevalmistus 26
3.4 Klason ligniini määramine biomassis 26
3.5 Ekstraktiivainete määramine biomassis 27
3.6 Infrapunaspektrite mõõtmine 28
3.7 Andmete kemomeetriline analüüs 28
3.7.1 Andmetöötlus 28
3.7.2 Mudelite arendamine 28
4 Tulemused ja arutelu 29
4.1 Klason meetodi korratavus ja täpsus 29
4.2 Klason meetodil ligniini koguse määramine 29

4.3 Soxhlet ekstraktsioonil ekstraktiivainete koguse määramine 31
4.4 Infrapunaspektroskoopia 33
4.5 Andmete analüüs peakomponentide meetodil 34
4.6 Osaliste vähimruutude meetodil loodud mudeli hindamine 35
4.7 Arutelu 37
Kokkuvõte 38
Summary 39
Tänuavaldused 40
Kasutatud kirjanduse loetelu 41

Kasutatud lühendite loetelu

DP – polümeriseerituse aste (*Degree of polymerisation*)

AIR – happes mitte lahustuv ligniin/jääk (*Acid insoluble residue*)

ASL – happes lahustuv ligniin (*Acid soluble lignin*)

KL – Klason ligniin

EA – ekstraktiivained

FTIR – Fourier' teisendusega infrapunaspektroskoopia (*Fourier-Transform infrared spectroscopy*)

ATR - Nõrgendatud täielik sisepeegeldus (*Attenuated total reflectance*)

PCA – peakomponentide meetod (*Principal component analysis*)

PC1 – esimene peakomponent

PC2 – teine peakomponent

PLS – olsaline vähimruutude meetod (*Partial least squares regression*)

%dw – protsent kuivmassist (% dry weight)

Sissejuhatus

Kliimamuutuste ja rohepöörde teemade elavnedes otsitakse üha enam viise, kuidas vähendada fossiilkütuste kasutamist ja selle ökoloogilist jalajälge. Puit kui tööstuslikult enimkasutatav lignotselluloosse biomassi vorm on jätkusuutlik alternatiiv fossiilsetele toormaterjalidele, olles rikkalikuks allikaks kolmele looduses levinumaile biopolümeerile – tselluloosile, hemitselluloosile ja ligniinile. Lignotselluloosse biomassi väärindamisel saadavad produktid (kemikaalid, biokütused, nutikad materjalid) võivad potentsiaalselt asendada peaaegu kõiki fossiilsetel toormetel baseeruvaid keemilatööstuse tooteid.

Lignotseluloosse biomassi väärindamise protsesside arendamisel mängib analüütiline keemia võtmerolli, varustades puidurafineerimise uuringuid vajaliku infoga. Seepärast on väga oluline biomassi iseloomustamine ja usaldusväärne keemiline analüüs keemilise töötlemise igal etapil ja ka saadud produktide kvaliteedi hindamisel.

Aastakümnete jooksul on arendatud mitmeid analüütilisi meetodieid lignotselluloosse biomassi koostise, spetsiifiliste puidupolümeeride ja ekstraktiivaine kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks. Nende hulgas on nii klassikalised „märgkeemilised“ (gravimeetria, tiitrimeetria) kui ka kaasaegsemad instrumentaalanalüüsi meetodid (NMR, FTIR, GC, HPLC, MS). Klassikalised standardiseeritud meetodid nagu näiteks ligniini (Klasoni meetod) ja ekstraktiivainete koguste määramine biomassis on siiani väga laialt kasutatud, kuid eeldavad pika analüüsiaega, keerulist ja aeganõudvat proovi ettevalmistust ning suurtes kogustes ohtlike kemikaalide (tugevate hapete ja toksiliste solventide) kasutamist.

Viimastel aastatel on FTIR ehk infrapunaspektroskoopia leidnud laia kasutuse lihtsa, kiire, odava ja mittedestruktiivse meetodina kvalitatiivse ja kvantitatiivse analüüsi jaoks. FTIR spektrite analüüs ja kombineerimine eelnevalt saadud kvantitatiivse infoga kemomeetrilisi ja statistilisi meetodeid kasutades, annab võimaluse mitmedimensionaalseid andmeid interpreteerida, klassifitseerida ja ennustada ühe või teise koostisosa kogust katseobjektis väga kiiresti ja ilma kemikaalide kasutamiseta. Käesoleva töö eesmärgiks oli kasutada peakomponentide (PCA) meetodit andmete interpreteerimiseks ja luua osaliste vähimruutude meetodil (PLS) kalibreerimismudel FTIR spektrite ja kvantitatiivsete andmete alusel ligniini ja ekstraktiivainete kvantitatiivseks määramiseks lignotselluloosses biomassis.

Töö koosneb kolmest põhiosast: teoreetiline osa, eksperimentaalne osa ja tulemuste analüüs. Teoreetilises osas antakse ülevaade lignotselluloosse biomassi olemusest, väärindamisvõimalustest, märgkeemilistest ja spektroskoopilistest meetoditest ning kemomeetria kasutamisest. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse kasutatud aparatuuri, kemikaale ja kasutatud meetodeid. Tulemuste osas kirjeldatakse märgkeemiliselt saadud parameetrite tulemusi ning antakse hinnang osaliste vähimruutude meetodil saadud mudelile kolme puuliigi andmete põhjal.

Töö käigus määrati ligniini ja ekstraktiivainete sisaldust ligi 90 puiduproovis, kasutades klassikalisi gravimeetrilisi meetodeid ning mõõdeti kõikide proovide FTIR spektrid. FTIR spektrite andmekogumit analüüsiti kasutades PCA meetodit ja leiti, et puiduproovid jaotuvad selgelt kaheks

klastriks sõltuvalt puutüübist (lehtpuu, okaspuu), kuid puidu koostise ja kasvukoha vahel korrelatsioon puudub. Loodud kemomeetrilise PLS kalibreerimismudeli tulemuslikkus oli hea ja seda kasutati edukalt ekstaktiivainete ja ligniini koguse ennustamiseks puiduproovides. PLS mudeli rakendamine edaspidistes uuringutes annab võimaluse teha kvantitatiivseid järeldusi spektraalse info alusel märgkeemilisi analüüsimeetodeid kasutamata.

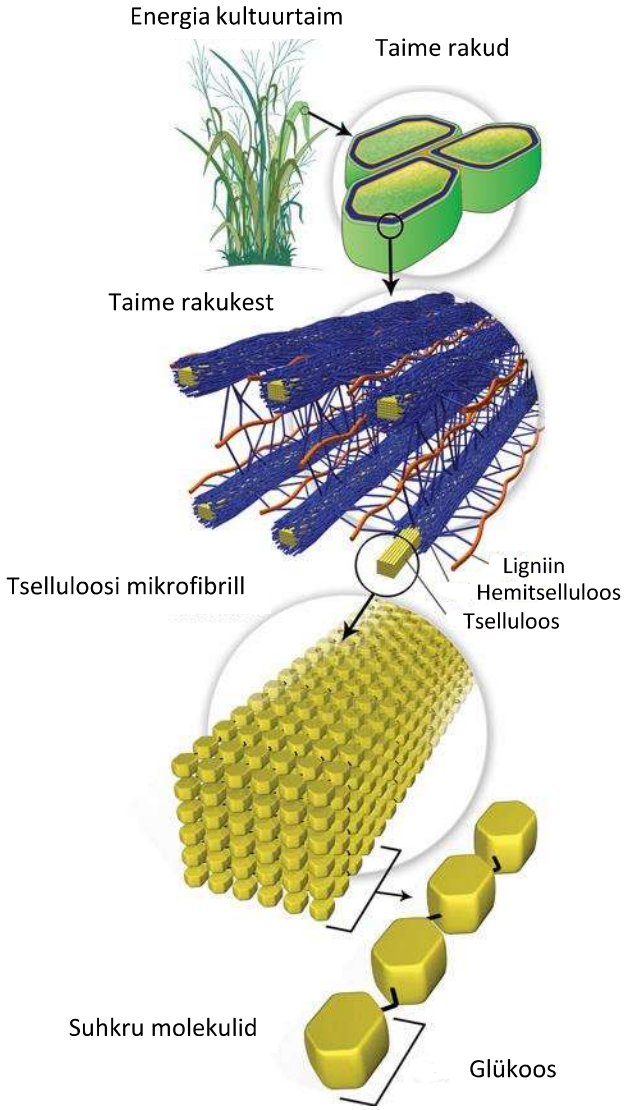
1 Teoreetiline osa

1.1 Lignotselluloosne biomass

Lignotselluloosne biomass sisaldab kolme biopolümeeri, milleks on tselluloos, hemitselluloos ja ligniin. Lignotselluloosses biomassis on tselluloosi 35-50%, hemitselluloosi 20-35% ja ligniini 5-30%. Nende biopolümeeride osakaal varieerub vastavalt taimeliigile.[1] Lisaks nendele polümeeridele on taimses biomassis ekstraktiivained, mis on väiksemad mittestruktuursed ained. Ligniin on oma olemuselt polüfenoolne, tselluloos ja hemitselluloos aga süsivesikud. Tänu oma keerukale ja raskesti hüdrolüüsitavale struktuurile on ligniin kui kaitsev kate polüsahhariidide kimpude ümber, mis takistab süsivesikute hüdrolüüsi.[2] Lignotselluloosse biomassi alla kuuluvad okaspuud, lehtpuud ja rohttaimed. Taimede rakuseinas on primaarne rakusein, sekundaarne rakusein ja vahelamell, millel on erinevad rollid. Primaarses rakuseinas on tselluloos ning sellel on oluline osa rakujagunemises ja kasvamises. Kui taimerakus olevad vakuoolid on täidetud veega ja rõhuvad primaarsele rakuseinale, on primaarsed rakuseinad võimelised ka struktuurset tugevust andma taimele, kuid peamiselt on nad õhemad ning mitte kuigi jäigad. Peale kasvu lõppu võivad muutuda need paksemaks. Sekundaarne rakusein on jäik, toestab taime ning puudub osadel taimedel.[3]

Lignotselluloosse biomassi jäägid, nagu põllumajandusjäägid, metsamajandamisel järgi jäänud oksad või saepuru, puidutööstuses järgi jäänud puukoor ja muud sarnased jäägid võivad olla midagi enamat, kui lihtsalt kütus sooja tootmiseks. Takistuseks võib olla biomassi niiskus, mis teeb transpordi ja hoiustamise kulukaks, kuid ka varieeruv biokompositsioon, mis teeb väärindamise keeruliseks .[4]

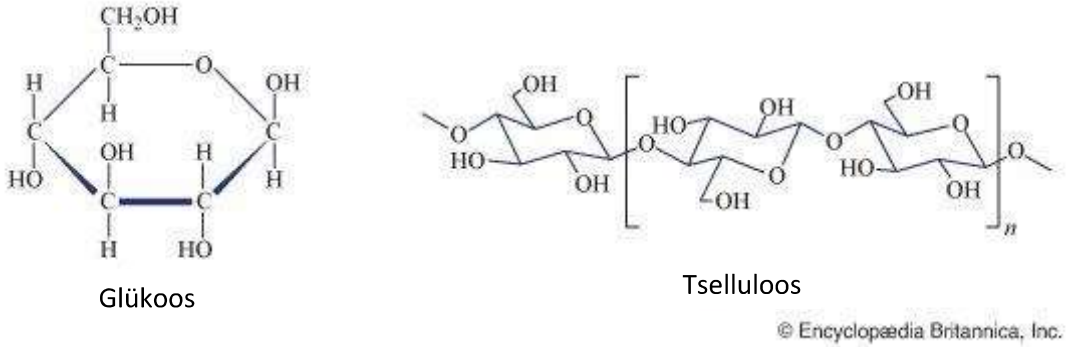
Joonisel 1 on kujutatud eelmainitud biopolümeeridest moodustuv struktuur, kus tselluloosikimpude ümber on hemitselluloos ning kimpe ühendab ligniin.[5] Lisaks struktuursetele polümeeridele on taimekudedes ka mittestruktuursed väiksemad ekstraktiivained, mille sisaldus ei ületa enamasti 10%.[6]



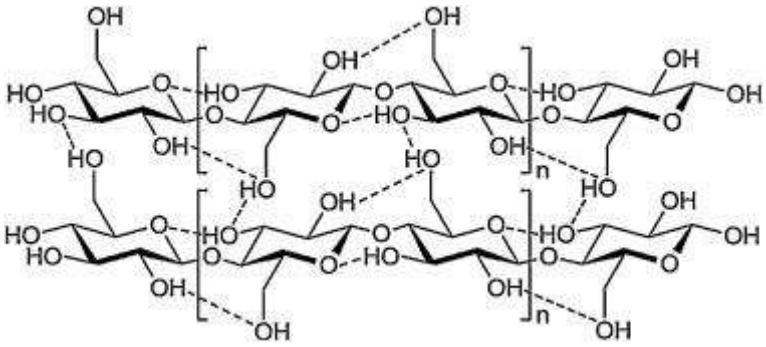
Joonis 1. Taime rakukestas olevate biopolümeeride paigutus [5]

1.1.1 Tselluloos

Tselluloos on polüsahhariid, mis koosneb β-1,4-glükosiidsidemetega ühendatud glükoosi monomeeridest. Tselluloosil on kõrge polümeriseerituse aste (kuni 10 000) ning kristalliline struktuur.[1] Polümeriseerituse aste (*Degree of polymerisation*, DP) on suhe polümeeri molekulmassi ja monomeeri molekulmassi vahel. Kõrge DP viitab sellele, et polümeeris on suurem arv monomeere.[7] Taime rakuseinas moodustuvad tselluloosikimbud, kus on nii intra- kui intermolekulaarsed vesiniksidemed, mis annavad rakukestale tugevuse.[1] Kuna tselluloosi molekulis on enamasti mitu tuhat monomeeri, siis on tekkivate tselluloosi mikrofibrillide pikkused vahemikus 2-7 µm. Joonisel 2 on toodud tselluloosi monomeer glükoos ja polümeeri lõik β-1,4-glükosiidsidemega[3] ning Joonisel 3 on toodud tselluloosi vesiniksidemete võimalikud asetused.[8]



Joonis 2. Glükoos ja tselluloosi fragment β-1,4-glükosiidsidemega [3]



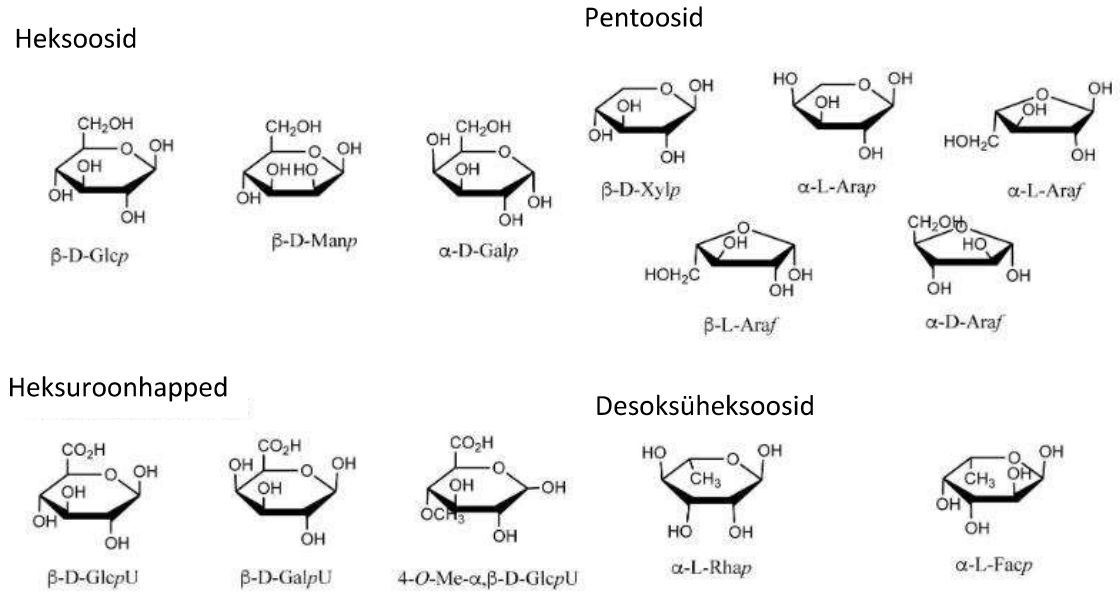
Joonis 3. Tselluloosi intra- ja intermolekulaarsed vesiniksidemed [8]

Tselluloosil on neli peamist vormi, mida tähistatakse rooma numbrite ja kreeka tähtede kombinatsiooniga – Iα , Iβ , II ja III ja nende eripära seisneb nii intra- kui intermolekulaarsete vesiniksidemete paigutuses. Lisaks kristallilisele struktuurile on fibrillides ka amorfsed alad, mis on ensümaatilise degradatsiooni potentsiaalseks asukohaks. Tselluloosi biosüntees toimub plasmamembraanil tselluloossüntaasi kompleksis.[4]

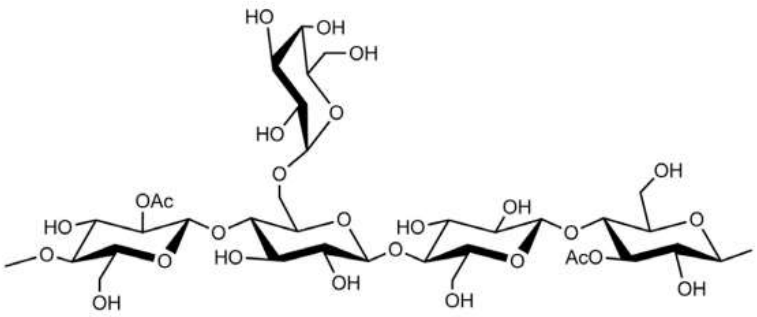
1.1.2 Hemitselluloos

Hemitselluloos on paljude hargnemistega heteropolüsahhariid, mille monomeerideks on glükosiidsidemetega ühendatud heksoosid ja pentoosid. Nii tselluloosi kui hemitselluloosi monomeerideks on taandavad suhkrud.[1] Hargnenud hemitselluloos katab tselluloosi kimbu kõrvalahelate abil ja hoiab kimpude ebakorrapärast „kleepumist“. Sellel on leitud raku kasvu reguleeriv toime primaarses rakukestas.[3] Hemitselluloosi monomeerideks (Joonis 4)[9] on ksüloos, glükoos, mannoos, galaktoos ja arabinoos, kuid vahetevahel ka uroonhapped. Vastavalt sellele klassifitseeritakse hemitselluloosid kas ksüloglükaanideks, ksülaanideks, mannanideks või galaktaanideks. Lehtpuudes on peamiseks hemitselluloosiks ksülaan, kuid okaspuudes glükomannaanid. Hemitselluloosi toodetakse rakus Golgi kompleksis glükosüültransferaaside abil.[4] Joonistel 5 ja 6 on toodud okaspuude ja lehtpuude hemitselluloosi fragmendid.[9] Hemitselluloosi DP

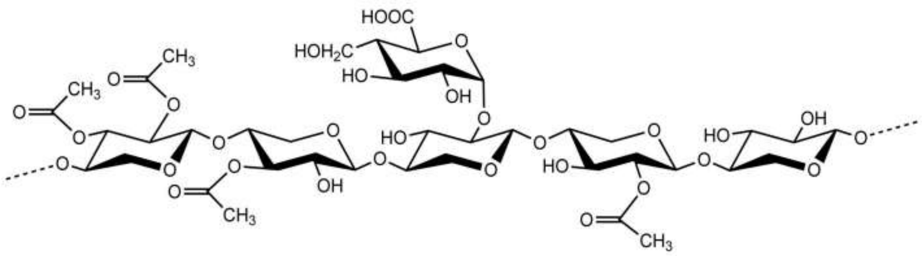
on keskmiselt vahemikus 100-200 ning lisaks D-suhkrutele võib selles olla ka L-suhkrujääke, näiteks L-arabinofuranoos. Polümeeri „selgroo“ moodustavad β-1,4-glükosiidsidemetega ühendatud monomeerid, millele lisaks on hargnemiskohad, mille võivad moodustuda süsinikud 2, 3 või 6. Esineda võivad ka metüül- või atsetüülrühmad.[10]



Joonis 4. Monomeerid, millest moodustub hemitselluloos [9]



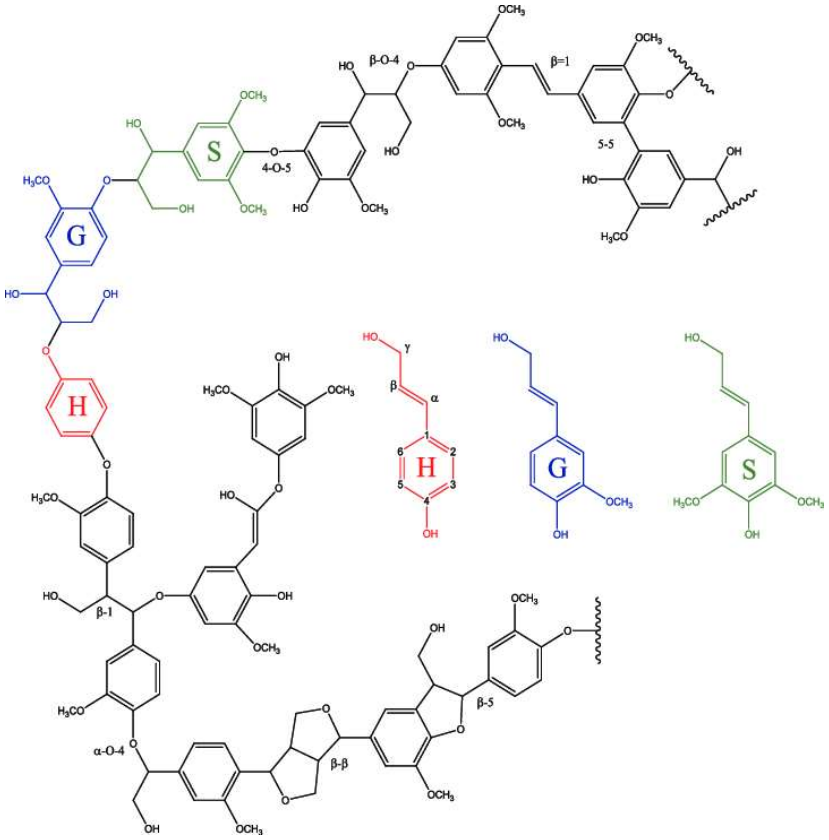
Joonis 5. Okaspuude hemitselluloosi fragment [9]



Joonis 6 Lehtpuude hemitselluloosi fragment [9]

1.1.3 Ligniin

Ligniin koosneb metoksüleeritud fenüülpropanoidsetest ühikutest, milleks on sinapüülalkohol ja koniferüülalkohol ning p-kumarüülalkohol. Neid monomeere nimetatakse ligniinis S, G ja H ühikuteks. Tegemist on raskesti degradeeritava polümeeriga, milles esineb erinevaid süsinik-süsinik sidemeid ning eetersidemeid.[1] Ligniini monomeerid on toodud Joonisel 7 koos ligniinis enimlevinud sidemetega.[11] Okaspuudes on levinud suurema G-ühiku osakaaluga ligniin, lehtpuude ligniinis on peamiselt S ja G ühikud.[10] Oma keeruka struktuuri tõttu on sellel tselluloosi kaitsev omadus ning kuna tegemist on suuresti hüdrofoobse molekuliga, parandab see taime veejuhtivust. Taimede ligniini kirjeldamiseks kasutatakse omadusi nagu ligniini sisaldus, ligniini aromaatsete alaühikute sisaldus, hüdroksükaneelhapete sisaldus, ühikutevaheliste sidemete vahekord, hüdroksüülrühmade sisaldus, pseudoligniini sisaldus ja ligniini molekulmass. Neid omadusi kasutatakse ka eeltöödeldud biomasside kirjeldamise puhul, et leida parim eeltöötlus biomassi väärindamiseks.[12]



Joonis 7. Ligniini monomeerid p-kumarüülalkohol (H), koniferüülalkoholi (G) ja sinapüülalkohol (S) ning ligniinis esinevad süsinik-süsinik ja eetersidemed [11]

Ligniin ja ekstraktiivained on lignotselluloosses biomassis insektitsiidse mõjuga ja kaitsevad patogeenide eest.[4] Enamasti on ligniin vaja biomassist eraldada, et tselluloosi ja hemitselluloosi väärindada, misjuhul nähakse ligniinis jääkprodukti. Uurimisjärgus on eeltöötlused orgaaniliste solventidega (organosolv protsess) ja ioonsete vedelikega ning bioloogiline eeltöötlus ensüümide ja valgemädanikseenega. Edasiminekud geenitehnoloogias võivad samuti olla abiks biomassi väärindamisele, kuna geneetiliselt muundatud taimed oleksid väärindamiseks sobivamate omadustega.[12]

1.1.4 Ekstraktiivained

Ekstraktiivained (EA) on väiksemad mittestruktuursed ained, mida saab solventidega biomassist eraldada. Kõikide ekstraktiivainete rolli puidus ei teata, kuid mitmed neist leiavad laialdast kasutust. Neid kasutatakse veekindluse tagamiseks, meditsiinis, kosmeetikas jne. Ekstraktiivained on enamasti sekundaarsed metaboliidid ja metabolismiproduktide prekursorid. Need tekivad vigastuse tagajärjel või kaitsemehhanismina. Ekstraktiivaineteks võivad olla rasvad, rasvhapped ja -alkoholid, fenoolsed ühendid, terpeenid, steroidid, vaikhapped, vaigud, vahad, tanniinid jne. Tanniine võib jagada gallotanniinideks, ellagitanninideks ja kondenseerunud tanniinideks. Enamasti on

ekstraktiivainete kogus okaspuudes kõrgem kui lehtpuudes ning need annavad puidule värvi, lõhna ja vastupidavuse.[10]

Ekstraktiivainete kogus puidu lõikes ning liigi lõikes varieerub vastavalt puu vanusele, aastaajale, asukohale ja hoiustamise ajale. Üldjuhul on vanemates puudes rohkem ekstraktiivaineid kui nooremates puudes. Ka oksas, tüves ja koores on erinev kogus ekstraktiivaineid, kuid enamasti on oksakohtades rohkem ekstraktiivaineid. Nende kogus hakkab langema kohe peale puu langetamist ja jätkub ka hoiustamise käigus ning oleneb sellest, mis kujul puit lattu seisma jääb.[6]

1.2 Lignotselluloossete biopolümeeride väärindamisvõimalused

Tõusva rahvaarvu ning majanduskasvu tõttu vajatakse järjest enam energiat. Sellest energiast 86% pärineb fossiilsetest allikatest, 6% tuumaenergiast ning 8% taastuvenergiast. Fossiilkütuste kasutamine on suurenenud viimaste kümnendite jooksul, kuid tänapäeval kasutatakse järjest enam asendusena ka taastuvenergiat. Sellegipoolest on fossiilkütuste kasutamine tõusnud riikides nagu Hiina, India ja Tai. Naftavarude vähenemise tõttu ning fossiilkütuste tootmisel ja kasutamisel tekkivate kasvuhoonegaaside, reostuse ja kliimasoojenemise tõttu on tekkinud soov liikuda loodust säästvamate energiaallikate suunas. Seda huvi toetab ka tõusev naftahind ning vajadus energeetiliselt iseseisvam olla. Alternatiivina kasutatakse tuule-, päikese-, maapõue- ja tuumaenergiat, kuid nende abil saab ainult kütta hooneid või neid elektriga varustada.[2]

Viimastel aastatel on järjest enam hakatud tähelepanu pöörama biomassi iseloomustamisele, eeltöötlusele ning väärindamisele, et toota biokütuseid. Aja möödudes langeb ka biokütuste tootmise hind, mis alandab hinna lõpptarbijale. Kuna ligi 40% kogu energiavajadusest tarbitakse hetkel vedela kütuse kujul, siis keskendutakse biodiislile ja bioetanoolile. Alternatiiviks on biobutanool, mille kasutamine on alles testimisjärgus. Biobutanooli omadused teevad selle kasutuse võimalikuks praegu käibel olevates sisepõlemismootorites. Biobutanool on kõrgema energiatihedusega kui bioetanool ning seda saab potentsiaalselt toota paljudest erinevatest toormetest. Bioetanool on juba praegu kasutusel bensiinilisandina.[2]

Kvaliteedinõuetele vastavast puidust toodetakse paberit Kraft protsessi abil ja selle käigus tekkivate jääkide kasutamine on olnud probleemiks. Selliste jäätmete kasutamine ringmajanduse põhimõtete alusel on oluline.[13] Tööstuslike taimset päritolu jääkide kasutamisele peaks senisest kuluma vähem vett, kurnama vähem põldusid (esimese generatsiooni bioetanooli tootmine) ja ökosüsteeme ning vältima edasist monokultuuride kasvatamist.[2] Lisaks bioetanoolile ja -butanoolile toodetakse taimsest biomassist pärit polüsahhariididest furaane ja orgaanilisi happeid ka termokeemiliselt.[12]

Aastaks 2040 ennustatakse energiavajaduse kasvu umbes 28% võrra, seega ringmajanduse põhimõtete kasutuselevõtt on vajalik.[1] Tööstusjääkide ja muu biomassi eeltöötlusel muutub eelmainitud biopolümeeride struktuur märgatavalt. Seega on vaja leida eeltöötlusi, mis ei takistaks biomassi edasist väärindamist. Eeltöötluse efektiivsuse tagamisel tuleb jälgida, et ligniini eemaldamisel biomassist ei muutu ligniini struktuur suurel määral, töötlusele kuluks vähe energiat ning oleks kuluefetkiivne, kasutataks loodussõbralikke kemikaale ja välditaks ensüümi-inhibiitorite teket. Eeltöötlused jagatakse füüsikalisteks, keemilisteks ja füsikokeemilisteks. Selleks, et biomass

väiksemateks osakesteks lõhkuda, saab kasutada jahvatamist, mis suurendab biomassi edaspidise ensümaatilise lagundamise efektiivsust tänu proovi suurenenud pindalale. Kasutusel on ka mikrolaine eeltöötlus, mille abil lagundatakse mingil määral Joonisel 1 toodud struktuur. Lisaks neile meetoditele on kasutusel veel ultraheli töötlus. Keemilistest eeltöötlustest on kasutusel näiteks happeline eeltöötlus, mille abil eemaldatakse hemitselluloos ning aluseline töötlus ja organosolv töötlus, millega eemaldatakse ligniini. Ammoniaagi aurlõhkamine aitab ensümaatilisele töötlusele kaasa, kuna suurendab proovi pindala. Keemilise eeltöötlusena kasutatakse veel superkriitilisi vedelikke ja süvaeutektilisi solvente (deep eutectic solvents, DES).[1]

Biomassi väärindamist raskenadab selle keemiline koostis, ligniini kõrge molaarmass, ligniini S ja G ühikute suhe, tselluloosi kristallilisus ja tselluloosi polümeriseerituse aste. Seni on kasutatud biomassi eeltöötluseks meetodeid, kus peamiseks eesmärgiks on tselluloosi kasutamine, millisel juhul ligniini eemaldamine toimub karmidel tingimustel. See toob endaga kaasa ligniini lagunemise ja kondenseerumise või repolümeriseerumise. Happelistes tingimustes tekivad kondenseerumise puhul stabiilsed C-C sidemed, kus nukleofiil atakeerib elektrofiilset karbokatiooni. Uued sidemed võivad tekkida ka läbi radikaal-vahendatud reaktsioonide, tänu formaldehüüdile või vabadele hüdroksüülrühmadele ligniini struktuuris. Sellise ligniini puhul on täheldatud, et väärindamine on keerukam ning seetõttu kasutatakse sellist jääkprodukti pigem soojuse tootmiseks küttena. [12]

Tselluloosist saab toota erinevaid kilesid, fiibreid, aerogeele ja komposiitmaterjale.[14] Hemitselluloosi kasutatakse algainena furaani derivaatide, etanooli, ksülitooli, levuliinhappe, 2,3-butaadiooli ja piimhappe sünteesiks.[15] Ligniinist on võimalik toota antioksüdante, komposiitmaterjale,[4] vanillhapet, vanilliini, dihüdroferuulhapet, benseeni, tolueeni, ksüleeni, naftaleeni, süsinikfiibrit ja mitmeid süsivesikuid, millest saab omakorda toota biomaterjale ja vedelkütust. Anaeroobse bakteriaalse fermentatsiooni produktina on võimalik toota ka metaani.[16] Tabelis 1 on välja toodud ligniini omadused lignotselluloosses biomassis ja nende omaduste mõju biomassi väärindamisele.[12] Ka ekstraktiivainetel on väärindamisvõimalusi. Paberitööstuse jääkidest toodetakse tallõli ja tärpentini. Rasvu saab kasutada biokütuste tootmiseks, vaiku saab asutada liimide tootmiseks jne. Probleemiks on suurt potentsiaali omavate ainete kergestilenduvus või keemiline ebastabiilsus.[6]

Tabel 1. Ligniini omaduste mõju biomassi väärindamisele [12]

Omadus	Kirjeldus	Mõju biomassi väärindamisele
Ligniini sisaldus	Ligniini massiprotsent kuivast biomassist	Negatiivne
Ligniini koostis	S, G ja H ühikute osakaal ligniinis	Muutuv
Hüdroksükaneelhapete sisaldus	Ferüülhappe ja p-kumarüülhappe suhteline sisaldus ligniinis	Negatiivne
Ühikutevahelised sidemed	Süsinik-süsinik ja eetersidemete suhe ligniini ühikute vahel	Positiivne (β-O-4) Negatiivne (β-5)
Hüdroksüülrühmade sisaldus	Alifaatsed ja fenoolsed hüdroksüülrühmad	Positiivne (alifaatsed -OH) Negatiivne (fenoolsed -OH)
Pseudoligniin	Süsivesikute laguproduktide happeline kondensatsioon	Negatiivne
Molekulaarmass	*massi keskmine molaarmass (Mw), arvu keskmine molaarmass (Mn), polüdisperssuse indeks (PDI)*	Muutuv

Kuna igal väärindamise etapil kasutatakse analüütilist keemiat väärtusliku info saamiseks, siis on analüütilise keemia tähtsus suur. Saadud teadmiste abil tehakse edasisi otsuseid ning järeldusi ja arendatakse protsessi, parandatakse saagist või puhtust.

1.3 Keemilised meetodid lignotselluloosse biomassi iseloomustamiseks

Väärindamisprotsessi käiku võivad negatiivselt mõjutada näiteks madal produkti puhtus, heterogeensus, lõhn, ligniini baasil tehtud toodete varieeruv värv ning väike valik usaldusväärseid ja töökindlaid analüütilisi meetodeid. Analüütilisi meetodeid rakendades on võimalik protsessi paremaks muuta ning ligniinile paremat kasutust leida ja sellest loodud toodangut paremini iseloomustada. Peamised ligniini kirjeldavad analüütilised meetodid on seotud funktsionaalsete rühmadega, nt hüdroksüül-, metoksü-, karbonüül- ja karboksüülrühmad. Läbi on võimalik viia ka elementanalüüsi, infrapunaspektroskoopiat, ja tuumamagnetresonantsspektroskoopiat.[17] Kasutusel on ka kromatograafilised meetodid kvalitatiivseteks ja kvantitatiivseks analüüsideks.[18]

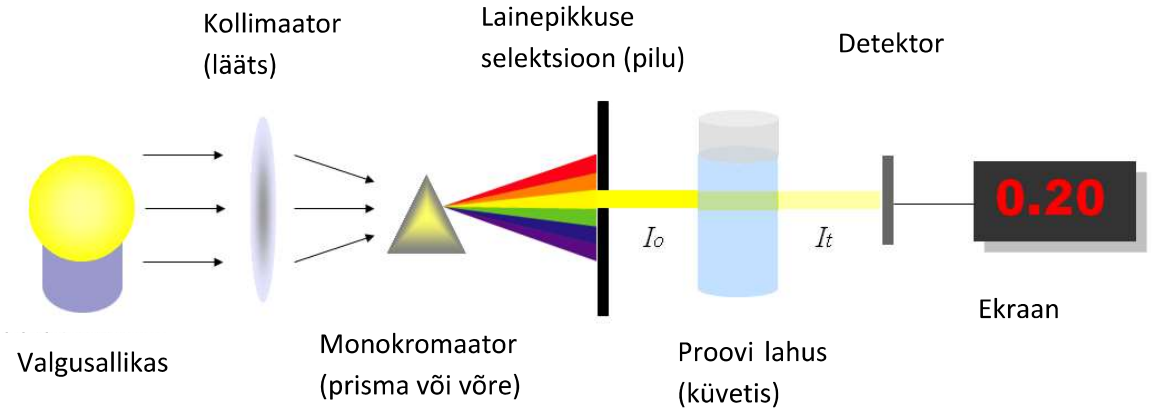
1.3.1 Klason meetod

Klason meetod on lihtne viis ligniini koguse määramiseks lignotselluloosses biomassis. Antud meetodi standardprotseduur[19–21] hõlmab endas puidu töötlust 72% väävelhappega. Selle mõjul hüdrolüüsuvad puidu süsivesinikud ning järgi jääb peamiselt lahustumatu ligniin. Kuna biomassis on väikestes kogustes ka ekstraktiivaineid, mis võivad jääda lahustumata happelises hüdrolüüsis, siis on

soovitav need biomassist solvendi mõjul eemaldada. Alkohole kasutatakse tanniinide eemaldamiseks, alkoholi ja benseeni või tolueeni segu kasutatakse vaikude, õlide jms eraldamiseks ning vesi sobib veeslahustuvate ainete eraldamiseks. Peale ekstraheerimist ja biomassi kuivatamist määratakse proovi ligniini sisaldus. Esmane polüsahhariidide hüdrolüüs viiakse läbi vesivannis madalal temperatuuril, kuid võrdlemisi kontsentreeritud väävelhappe juuresolekul. Sellele järgneb sekundaarne hüdrolüüs, misjuhul hape lahjendatakse veega ning protsess käib kõrgemal temperatuurlil pikemat aega.[20] Selle etapi võib läbi viia autoklaavis. Proovid filtritakse, et määrata happes mittelahustunud jäägi ehk ligniini (Acid insolube residue, AIR) kogus gravimeetriliselt ning happes lahustuva ligniini (Acid soluble lignin, ASL) kogus spektrofotomeetriliselt. Selleks, et leida kogu Klason ligniini kogus (KL), tuleb määrata happes lahustuva ja mittelahustuva ligniini koguste summa.[21]

1.3.2 Spektrofotomeetria

Spektrofotomeetria on meetod, mille puhul mõõdetakse aine võimet neelata seda läbivat valgust, võrreldes proovi siseneva valguse intensiivsust proovi läbinud valguse intensiivsusega. Kuna iga ühend neelab valgust mingitel kindlatel lainepikkustel, siis on võimalik aineid kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt määrata spektrofotomeetriliselt. Selliseid instrumente saab jagada vastavalt sellele, kas mõõtmine käib nähtava valguse ja UV regioonis (UV-Vis 185-700 nm) või infrapunaregioonis (IR 700-15000 nm). Nähtava valguse regioonis on märgatav, et absorptsioon sõltub proovi värvist, näiteks roheline proov neelab punast valgust, sest roheline ja punane on vastandvärvid. Spektrofotomeetris on valgusallikas, kollimaator footonite koondamiseks, monokromaator, lainepikkuse määramiseks ava, proovi pesa ja sobiv detektor (Joonis 8).[22]



Joonis 8. Spektrofotomeetri skeem [22]

Spektrofotomeeter mõõdab proovi läbivate footonite hulka. Proovi läbinud footonite hulk sõltub küveti mõõtmetest ja proovi kontsentratsioonist. Teades valguse intensiivsust enne proovi läbimist

(I_0) ning peale proovi läbimist (I_t) on võimalik arvutada proovi läbilaskvuse T ning edasi juba proovi absorbtsiooni A:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \quad (1)$$

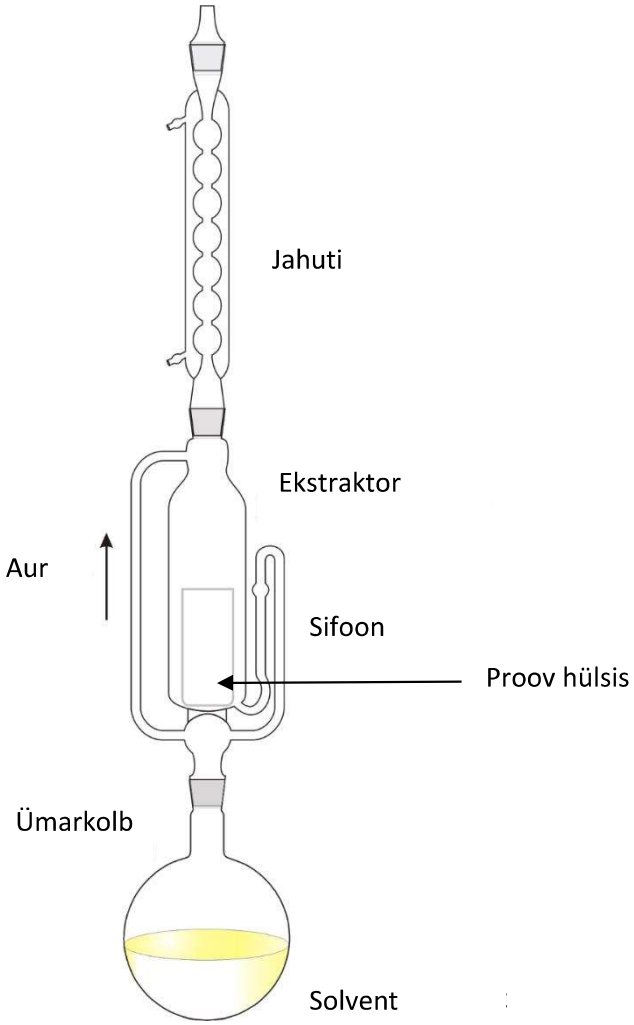
$$A = -\log(T) = -\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) \quad (2)$$

Beer-Lambert'i seaduse järgi on proovi absorptsiooni ja kontsentratsiooni vahel lineaarne side. Teades analüüdi molaarset ekstinktsioonikoefitsenti (ε) ja küveti sisemõõtmeid (l) ning mõõtes proovi absorptsiooni arvutatakse proovi kontsentratsioon (C). Lambert-Beer'i valem on:[22]

$$A = \varepsilon * l * C \quad (3)$$

1.3.3 Soxhlet ekstraktsioon

Soxhlet ekstraktsioon on tahke-vedel ekstraktsioonimeetod, mille puhul solvent läbib ekstraktorit mitmeid kordi. See muudab ekstraktsiooni tõhusamaks kui tagasivoolu režiimis ekstraheerimine. Huvipakkuvad ekstraktid peavad olema valitud solvendis kõrgel temperatuuril lahustuvad, kuna ekstraktsiooni toimimiseks on vaja ühtlast aurustumist ja kondenseerumist.[23] Joonisel 9 on kujutatud Soxhlet ekstraktsioonisüsteemi koos selle osade nimetustega.[24] Joonisel puudub kuumutuspesa.



Joonis 9. Soxhlet ekstraktsiooni aparatuur [24]

All olevas kolvis keeb solvent, mille aurud tõusevad jahutisse läbi vasakpoolse toru. Jahutis aurud kondenseeruvad ning langevad ekstraktorisse, kus on biomass. Ekstraktor täitub värske solvendiga kuni vedelikunivoo jõuab sifooni ülemise servani, misjärel ekstraktor tühjeneb läbi sifoonimistoru taas kolbi. Peale ekstraktsiooniprotsessi lõppu on võimalik ekstraktidega solvent kasutusele võtta või gravimeetriliselt määrata nende sisaldus biomassis peale solvendi eemaldamist rotatsiooniaurustiga. Antud aparatuuri kasutamise eeliseks on tõhus ja pidev ekstraktsioon, kus võrdlemisi väikse solvendi kogusega saab kontsentreeritud ekstrakt ja biomassist saab täielikult eraldada kõik valitud solvendis lahustuvad ained. Meetodi puudusena võib tuua selle, et võimalik on ainult ekstraktsioon kõrgetel temperatuuridel ja ühe prooviga korraga.[23]

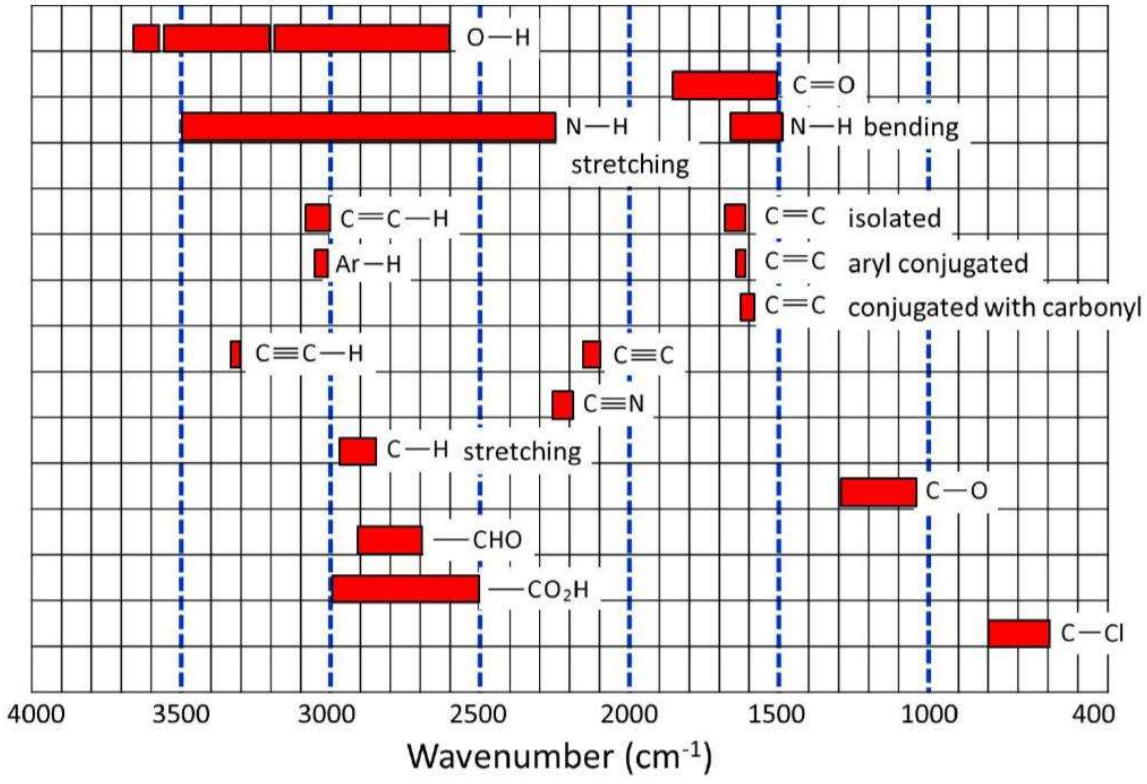
1.3.4 Infrapunaspektroskoopia

Infrapunaspektroskoopia on laialt kasutatav meetod, millel on biomassi analüüsil mitmeid eeliseid teiste analüütiliste meetodite ees. Tegemist on võrdlemisi odava kuid kiire analüüsiga, mis on ühtlasi

ka mittedestruktiivne. Eelnevalt mainitud keemilised meetodid on aga aeganõudvad ning kasutavad ohtlikke kemikaale, nt kontsentreeritud happed ja orgaanilised solvendid. Samuti on võimalik infrapunaspektroskoopias analüüsida nii tahkeid kui vedelaid proove.[25] Lisaks mainitud eelistele on FTIR spektroskoopia abil võimalik keerukate proovide analüüsimine ilma eelneva puhastamiseta ning sobib hästi kemomeetriliste meetodite (PCA, PLSR) rakendamiseks.[26]

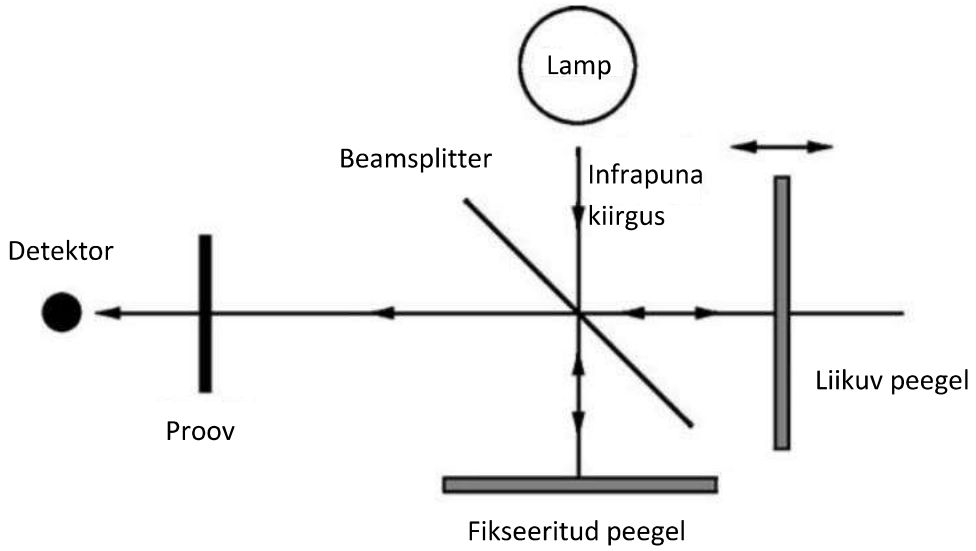
Infrapunaspektroskoopia põhineb ainete valgustabsorbeerivatel funktsionaalsetel rühmadel ning on võrdlemisi tundlik. Molekulid neelavad energiat teatud lainepikkustel ning see annab infot molekuli struktuuris olevate funktsionaalrühmade kohta, kuid kuna infrapunakiirgusel on madal energia, siis see ei põhjusta elektronide ergastust. Selleks, et tekiks infrapunaspekter, peab molekulide dipoolmoment kiirguse tõttu muutuma ning toimuma liikumised molekulis. Vibratsioonilised liikumised molekulis on näiteks venitus (*streching*) ja painutus (*bending*). Painutuse puhul muutub sidemetevaheline nurk ning eristatakse nelja painutusvibratsiooni – *wagging, twisting, rocking* ja *scissoring*.[27]

Infrapunakiirguseks loetakse valgust, mille lainearv on vahemikus 12800-10 cm^{-1}, lisaks jagatakse see vahemik lähiinfrapunaks (12800-4000), keskinfrapunaks (4000-200) ja kauginfrapunaks (200-10). Infrapuna spektrite abil on võimalik identifitseerida funktsionaalrühmi ja aatomitevahelisi sidemeid.[27] Valik määratavatest funktsionaalrühmadest on toodud Joonisel 10.[28] Ka infrapunaspektroskoopias kehtib Beer-Lambert'i seadus, ehk võimalik on ka kvantitatiivne analüüs.[27]



Joonis 10. Infrapunaspektroskoopias määratavate funktsionaalrühmade lainearvude vahemikud[28]

Infrapunaspektromeetris oleva lambi abil kiiritatakse kiirgusejagajat *(beam splitter)* infrapunavalgusega, kus pool kiirgusest läheb fikseeritud peeglisse ning pool liikuvasse peeglisse, mis liigub ühtlasel kiirusel. Tagasi peegeldunud kiired erinevad läbitud teepikkuse poolest ning tekitavad interferentsi. See kiirgus liigub läbi proovi (näiteks proov KBr tableti kujul) ning detektor mõõdab vastavalt kas absorbtsiooni või läbilaskvuse režiimis. Selleks, et saada spekter, teostab tarkvara Fourier' teisenduse. Joonisel 11 on infrapunaspektromeetri skeem.[29]



Joonis 11. Infrapunaspektromeetri skeem [29]

Nõrgendatud täielik sisepeegeldus (*attenuated total reflectance*, ATR) on proovi mõõtmise meetod, kus proovi siseneb instrumendi valguskiirgus läbi kristalli ning proov on tihedas kontaktis kristalliga. Kuna kristalli ja proovi murdumisnäitajad on erinevad, siis toimub peegeldumine. Osa valgust läbib ka proovi (*evanescent wave*), mil juhul osa kiirgusest absorbeerub. Kuna peegeldudes osa kiirgusest absorbeerub, siis peegeldunud kiir on „nõrgendatud", millest tuleb ka ATR nimi.[30]

1.4 Kemomeetrilised meetodid

Kemomeetria defineeritakse kui „analüütilise keemia haru, mis kasutab matemaatilise statistika meetodeid, et kavandada optimaalseid eksperimendi protseduure ja ekstraheerida mõõtmistulemustest maksimaalset võimalikku infot proovi koostise kohta."[31] Selle arengu mõjuriks võivad olla tänapäevaste analüütiliste instrumentide võime suures koguses andmeid toota ning nendest järelduste tegemine võib olla inimesele keeruline. Samuti aitab kaasa võimekate arvutite laialdane kasutus ning nende hindade taskupärasus.[31] Käesolevas töös on kasutatud erinevate puiduliikide FTIR spektrite ja kvantitatiivsete andmete interpreteerimisel ning analüüsil peakomponentide analüüsi (Principal component analysis, PCA) ja osaliste vähimruutude meetodit (Partial least squares, PLS).

1.4.1 Peakomponentide meetod

Kemomeetria tüüpiline keskne objekt on tabel, kus ridades on erinevad objektid (nt. erinevad puuliigid) ja veergudes nendel objektidel mõõdetud erinevad omadused (nt. absorbtsioonid teatud lainearvu juures või kontsentratsioonid). Sellise tabeli interpreteerimine võiks tähendada järelduste tegemist objektide omaduste kohta ja objektide omavaheliste suhete kohta, mis on tuntud ka kui klassifitseerimine ja taksonoomia. [32]

Peakomponentide meetod on üks laiemalt kasutatavaid mitmemõõtmelise statistika vahendeid keemiliste andmete analüüsil. Selle põhiline idee seisneb mitmest korreleeruvast muutujast (omadusest) koosneva andmekogumi (tabeli) mõõtmelisuse vähendamises niiviisi, et andmekogumis olemasolev variatsioon säiliks. Objektide omadused (muutujad) transformeeritakse uueks omaduste kogumiks ehk peakomponentideks, mis on üksteisega ortogonaalsed. Sel juhul esimese peakomponendi hajuvus peaks olema nii suur kui võimalik, et ta kirjeldaks võimalikult suure osa kõigi omaduste variatsioonist. Peakomponendi hajuvuste dispersiooni nimetatakse omaväärtuseks (*eigenvalue*). Põhiline kirjeldusvõime on esimestel peakomponentidel ning PCA mudeli koostamisel kasutatakse tavaliselt kaks kuni kolm peakomponenti. Heaks peetakse tavaliselt mudelit, mis kirjeldab üle 60% omaduste variatsioonist.[32]

Kui n objektil on mõõdetud m parameetrit, siis üritab peakomponentide meetod seda maatriksit lahutada lihtsamate komponentide korrutiseks ehk faktoriseerida. Lineaaralgebrast on teada üks maatriksite eriti kasulik faktorisatsioon – tema lahutamine singulaarväärtusteks, mida väljendatakse järgnevalt:[32]

$$D = u\Lambda v^T = u\begin{bmatrix}\lambda_{11} & \cdots & 0\\ \vdots & \ddots & \vdots\\ 0 & \cdots & \lambda_{nm}\end{bmatrix}v^T = (u\Lambda)v^T = tp^T. \quad (4)$$

Siin on u ja v ortogonaalsed ja normeeritud maatriksid ja Λ on diagonaalmaatriks, mille peadiagonaalil asuvad maatriksi D singulaarväärtused $\lambda 11, \lambda 22, \cdots, \lambda nm$. Kui tähistada $u\Lambda = t$ ja $v = p$, siis saame, et $D = tp^T$. Ülemine indeks T viitab sellele, et maatriks on transponeeritud. Selline maatriksi D faktorisatsioon on tuntud kui esitus tema peakomponentide kaudu. Maatriksit t nimetatakse faktorskooride (*factor scores*) maatriksiks ja maatriksit p faktorkaalude või peakomponentide (*factor loads, principal components*) maatriksiks. See protseduur on tuntud ka kui abstraktne faktoranalüüs.[32]

PCA geomeetriliseks tõlgenduseks kujutatakse andmed niiviisi, et nende keskpunkt on koordinaatteljestiku nullpunktis, mille järel koordinaatteljed pööratakse nii, et esimene koordinaat läheks suurima muutuse suunas (x-telg kirjeldab suurimat variatsiooni). Teine y-telg on ortogonaalne x-teljele ja kirjeldab suuruselt järgmist (väiksemat) variatsiooni. Need on vastavalt peakomponendid 1 ja 2 (PC1 ja PC2). Kui andmete hulgas on palju omaduste omavahelisi korrelatsioone, siis andmemaatriksi saab esitada palju väiksema dimensiooniga skooride ja kaalude maatriksite korrutisena. Kui andmetes on erineva mõõteskaalaga andmeid, siis võib olla vajalik

tunnuste autoskaleerimine, ehk andmemaatriksi iga veeru igast elemendist lahutatakse maha veeru keskmine ning saadud tulemus jagatakse veeru standardhälbega.[31]

1.4.2 Osaliste vähimruutude regressioon (PLSR)

PLSR algoritm ühendab PCA analüüsis ja mitmekordses lineaarregressioonis (*multiple linear regression*) kasutatud tehnikaid ning üritab kvantifitseerida vastuse tunnuse (*response variable*) ja ennustuse tunnuste kogumi (*predictor variables*) suhet (nt. proovile vastav kontsentratsioon ja FTIR spektrite kogum). See otsib lineaarset regressiooni mudelis projekteerides vastuse ja ennustuse tunnuseid uude ruumi. PLSR kasutatakse selleks, et leida fundamentaalsed seosed kahe maatriksi vahel (X ja Y), teiste sõnadega see otsib peakomponente, mis on üksteisega ortogonaalsed ja püüab seostada neid vastuse tunnusega. PLS mudel katsub leida mitmedimensionaalset suunda ruumis X, mis seletaks maksimaalset variatsiooni ruumis Y. Variatsioon, mis sisaldub vastuse tunnuses summeeritakse esimestes PLS peakomponentides (*latent variables*), mida edasi kasutatakse PLS regressiooni mudeli loomiseks.[33] Üldine mudel PLSi jaoks:

$$X = TP^{\mathrm{T}} + E$$
$$Y = UQ^{\mathrm{T}} + F \qquad (5)$$

kus X on *n* x *m* ennustuse tunnuste maatriks, Y on *n* x *p* vastuse tunnuste maatriks; T ja U on *n* x *l* maatriksid, mis on vastavalt X (X *score*, *component or factor matrix*) ja Y (Y *scores*) projektsioonid; P ja Q on vastavalt *m* x *l* and *p* x *l* ortogonaalsed kaalude maatriksid (*loading matrices*); E ja F on vead (normaaljaotusega). X ja Y transformeerimine tehakse nii, et maksimiseerida kovariatsiooni T ja U vahel.

Kui näiteks iga objekti kohta (*observations*) on kogutud spektroskoopilised andmed (vastuse tunnused ehk andmemaatriks X) (*response variables*) ning kontsentratsioonid (ennustuse tunnused ehk andmemaatriks Y) (*predictor variables*), siis on võimalik taas andmete keskpunktid võtta teljestiku uueks keskpunktiks ning leida sirge, mis läbib kõige suurema variatsiooniga ning mis korreleerub ühtlasi ka kõige paremini Y väätustega. Sellest saab esimene PLS komponent. Teine PLS komponent on taas ortogonaalne esimese komponendiga ning korreleerub Y väärtustega. Loodud mudelit on võimalik kasutada edaspidi objektide tundmatu kontsentratsiooni (Y väärtuste) ennustamiseks ilma keemilise analüüsi teostamiseta.[34]

2 Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö eesmärgiks on rakendada keemilisi ja spektroskoopilisi meetodeid Eesti puidu iseloomustamisel ning saadud andmete põhjal luua PLS kemomeetriline mudel, mis ennustaks Klason ligniini ja ekstraktiivainete koguseid tundmatutes puiduproovides. See hõlmab järgmisi alameesmärke:

1. Märgkeemiliste meetodite abil Klason ligniini ja ekstraktiivainete sisalduse määramine 88-s puiduproovis;
2. Proovide infrapunaspektrite mõõtmine;
3. Saadud andmekogumi PCA analüüs ja hüpoteesi kontroll, et puidu keemiline koostis (spektri kujul) sõltub puuliigist (mänd, kask, kuusk), puutüübist (okaspuu, lehtpuu) ja/või kasvamise asukohast;
4. Spektraalse info ja märgkeemilistel meetoditel saadud kvantitatiivsete andmete põhjal PLSR mudeli loomine;
5. Saadud PSLR mudeli kvaliteedi hindamine ja selle rakendamine Klason ligniini ja ekstraktiivainete sisalduste ennustamiseks tundmatu puidu proovides.

3 Eksperimentaalne osa

3.1 Aparatuur ja töövahendid

Kõik töös läbi viidud kaalumisprotseduurid teostati kaalul Mettler Toledo ME204 (kalibreeritud 01.09.2020) ja proove kuivatati kuivatuskapis Sanyo Sterilizer MOV-112S. Proovi niiskusesisaldus määrati OHAUS MB120 analüsaatoriga. Klason meetodil ligniini koguse määramiseks kasutati vesivanni Julabo TW8 ja autoklaavi Sanyo MLS-3020U. Happes lahustuva ligniini määramiseks kasutati spektrofotomeetrit Varian Cary 50 UV-Vis (kalibreeritud 30.08.2017). Ekstraktiivainete määramisel kasutati solvendi aurustamiseks rotatsiooniaurutit Heidolph Laborota 4000 efficient. Infrapunaspektrite mõõtmiseks keskinfrapuna alas kasutati Shimadzu IRTracer 100 koos ATR vahendiga. Ekstraktsiooni aparatuuri moodustasid kuumutuspesa, 250ml ümarkolb, Soxhlet ekstraktor, proovi hülss ja jahuti (Joonis 12). Vaakumfiltratsiooniks kasutati Büchneri lehtrit ja Bunseni pudelit. Kasutati filtreid Whatman, Qualitative poorsusega 11µm ja diameetriga 70 mm.

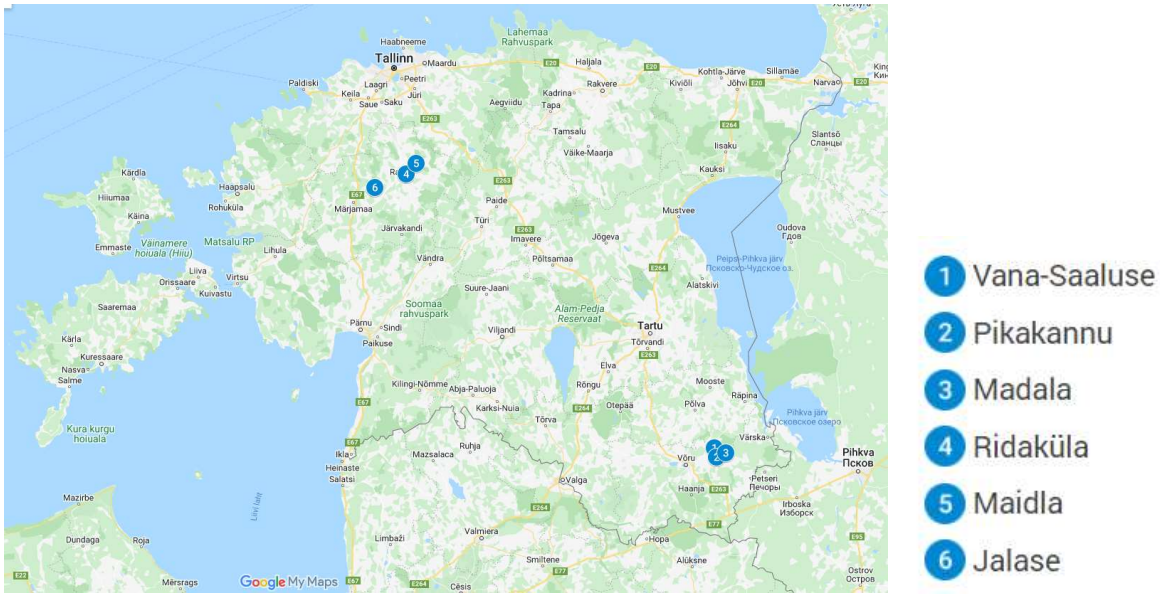
Joonis 12. Soxhlet ekstraktsiooni aparatuur. Autor: Olivia-Stella Salm

3.2 Kemikaalid, reagendid ja lahused

Klason meetodis kasutati Sigma-Aldrich väävelhapet (97%) ning ülipuhast vett (Millipore MilliQ) (18,2 MΩ), millest valmistati 72% väävelhappe lahus. Soxhlet ekstraktsioonis kasutati Sigma-Aldrich tolueeni ning Magnum Veterinaaria AS etanooli (96%).

3.3 Puitmassi päritolu ja ettevalmistus

Puiduproovid (92 tk) võeti kahest maakonnast, kokku kuuelt raiealalt (Joonis 13) ning esindatud oli kolm puuliiki – arukask (*Betula bendula*)(32 tk), harilik kuusk (*Picea abies*)(30tk) ja harilik mänd (*Pinus sylvestris*)(30 tk). Proovide nimetamisel kasutati neljakohalisi numbreid, mis näitavad vastavalt: maakond, raieala, puuliik, proovi number. Proovide kogumine ja jahvatamine on teostatud TalTech Puidutehnoloogia labori poolt (Prof. Jaan Kers). Niiskusesisaldus määrati enne infrapunaspektrite mõõtmist.



Joonis 13. Puiduproovide päritolu Võru- ja Raplamaal

3.4 Klason ligniini määramine biomassis

Ligniinisisalduse määramiseks puitmassis kasutati kombinatsiooni Klason standardprotokollist ASTM D1106-96 (2013)[20] ja ligniini võrdlusmõõtmiste protokollist (COST FP0901)[21]. Analüütilisel kaalul kaaluti 0,2 ± 0,05 g proovi keeduklaasi, lisati 3 ml 72% H_2SO_4 ning segati. Keeduklaas kaeti fooliumiga, märgistati ja asetati 30°C juurde üheks tunniks ning segati keeduklaasi sisu vastavalt vajadusele. Seejärel võeti proovid vesivannist välja, lisati 72 ml MilliQ vett. Proovid pandi autoklaavi ja käivitati programm A1 (121°C 15 min, märg kuumus). Programmi lõppedes võeti proovid

autoklaavist välja ning järgnes vaakumfiltratsioon. Filtraat koguti ning mõõdeti selle maht edasisteks arvutusteks, filter koos happes mittelahustuva ligniiniga pesti MilliQ veega ja kuivatati 70°C juures kuivatuskapis konstantse kaaluni. Lahustuva ligniini osa filtraadis mõõdeti spektrofotomeetriliselt 205 nm juures. Selleks kasutati sobivat lahjendust (kuni absorptsioon oli vahemikus 0,2-0,8). Nende andmete põhjal arvutati ASL protsentuaalne sisaldus, mille valem on:

$$ASL(\%) = \frac{A*D*V}{a*b*M} * 100\% \quad (6)$$

kus A on filtraadi absorbtsioon 205 nm juures, D on lahjendus, mis tehti filtraadi mõõtmisel spektrofotomeetris, V on filtraadi maht, a on ligniini neeldumistegur (vastavalt kasutatavale standardmeetodile 110 g/l), b on optiline teepikkus ja M on proovi algmass. Kuna kuiv filter on kaalutud enne filtrimist ja pärast filtrimist, siis arvutati AIR protsentuaalse sisalduse proovis valemiga:

$$AIR(\%) = \frac{(filtri\ mass\ pärast - filtri\ mass\ enne)}{M} * 100 \quad (7)$$

kus murru ülemisel poolel on leitud ligniini mass filtril ja M on proovi mass. Klason ligniini sisaldus on:

$$KL(\%) = ASL(\%) + AIR\ (\%) \quad (8)$$

Käesolevas töös hinnati ka Klason meetodi päevadevahelist korratavust ja meetodi toimimise kinnitamseks teostati sertifitseeritud referentsmaterjali „Eastern Cottonwood Whole Biomass Feedstock“ 8492 (National Institute of Standards and Technology, NIST) analüüsi.

Korratavust hinnati analüüsides kolme juhuslikult valitud erineva puidu proovi kahes paralleelis kaks korda nädalas ja seda kolmel järjestikusel nädalal. Andmed koguti proovide kaupa tabelitesse ning arvutati nendele väärtustele standardhälve (SD). SRM referentsväärtuse ja laboris saadud mõõtetulemuse omavahelist kokkulangevust hinnati kasutades kriteeriumiks *En* arvu:

$$E_n = \frac{X_{lab} - X_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (9)$$

kus X_{lab} on labori tulemus, X_{ref} on referentsmaterjali tugiväärtus, U_{lab} on labori tulemuse laiendmääramatus, U_{ref} on tugiväärtuse laiendmääramatus. Kui $|En| \leq 1$, siis mõõtetulemused statistiliselt ei erine (95% usaldusnivool).

3.5 Ekstraktiivainete määramine biomassis

Puiduproovides ekstraktiivainete määramiseks kasutati standardmeetodit puidu etanool-tolueen lahustuvuseks ASTM D1107-96 (2013).[35] Selleks kaaluti 2 ± 0,1 g proovi hülssi, valmistati etanooli-tolueeni segu vahekorras 200 ml etanooli ja 85 ml tolueeni, ning kallati sellest 200 ml kolbi. Solventi keedeti Soxhlet aparatuuris 6 tundi, misjärel sellel lasti jahtuda, eemaldati hülss biomassiga ning eemaldati solvent täielikult rotatsiooniauruti abil. Kolvi põhja jäid katma ekstraktiivained. Kolb kuivatati konstantse kaaluni 70°C juures kuivatuskapis ning teades kolvi kuivmassi ja kolvi massi koos ekstraktiivainetega arvutati ekstraktiivainete protsentuaalse kogus biomassis valemiga:

$$Ekstraktiivained(\%) = \frac{M(ekstraktiivained)}{M} * 100 \quad (10)$$

3.6 Infrapunaspektrite mõõtmine

Proovid kuivatati eelnevalt 105°C juures konstantse kaaluni, et vältida suuremat veepiiki spektris. Seejärel asetati proov ATR kristallile ning kasutatavad parameetriteks olid: mõõtmisvahemik 400-4000 cm^{-1}, resolutsioon 2 cm^{-1}, skaneerimiste arv 5. Kokku mõõdeti 92 puidu FTIR spektrid.

3.7 Andmete kemomeetriline analüüs

3.7.1 Andmetöötlus

Puidu FTIR algspektrite töötlus enne PCA analüüsi sisaldas silumist Savitzky-Golay algoritmi järgi (Solo tarkvara, Eigenvector Research Inc.) signaali müra vähendamiseks ja normaliseerimist. Normaliseerimine on standardne matemaatiline protseduur spektraalsete andmete muundamiseks, mis on mõeldud korduva vea eemaldamiseks ja lineaarse sõltuvuse säilitamiseks spektraalse signaali ja kontsentratsiooni vahel. PLSR mudeli loomisel teisendati spektreid kasutades Savitzky-Golay teist derivaati. Derivaatide hindamist on kasutatud ebaolulise baasjoone signaali eemaldamiseks proovidest, võttes mõõdetud vastustest (absorbtsiooni spekter) derivaadi muutuja indeksi (lainearvu) suhtes.

3.7.2 Mudelite arendamine

PCA ja PLS analüüse teostati kasutades Solo litsentseeritud tarkvara (Eigenvector Research Inc.). Selleks kasutati kogu spektraalset vahemikku (4000-400 cm^{-1}). PCA analüüsi rakendati erinevate puidu liikide ja asukohtade järgi grupeerimise visualiseerimiseks peakomponentide alusel. Selleks, et kvantitatiivselt ennustada Klason ligniini ja ekstraktiivainete koguseid erinevates puidu liikides loodi ennustav mudel osaliste vähimruutude meetodit kasutades. Andmekogum oli jagatud kaheks osaks – mudeli väljaõppeks (training) ja selle testimiseks. PLS kalibreerimismudel on välja arvutatud kasutades proove väljaõppe kogumist ja edaspidi on rakendatud testimise kogumit proovide kontsentratsioonide ennustamiseks. PLS mudeli tulemuslikkuse hindamiseks teostati ka rist-valideerimisprotseduuri (Venetian Blinds). Rist-valideerimine on standartne statistiline protseduur mida kasutatakse tihti mudeli stabiilsuse ja ennustamise võime hindamiseks.

4 Tulemused ja arutelu

4.1 Klason meetodi korratavus ja täpsus

Korratavuse hindamiseks valiti kolm (mänd, kuusk, kask) puiduproovi, millega teostati Klason meetodil analüüsi kahel korral nädalas kahes paralleelis proovi kohta. Saadud korratavus oli kase ja männi puhul 1,3%, kuuse puhul 1,4% (absoluutne standardhälve). Meetodi täpsuse kinnitamiseks määrati Klason ligniini sisaldust ka sertifitseeritud referentsmaterjalis „Eastern Cottonwood Whole Biomass Feedstock“ 8492 (NIST) referentsväärtusega KL (27,2 ± 1,3) %, k=2, norm. Laboris analüüsiti materjali viis korda kahel erineval päeval (kahe kuuse vahega) ja saadi keskmiseks tulemuseks KL 26,7% standardhälbega 1,7%. Meetodi süstemaatilist viga hinnati Nordtest meetodil[36] ja saadi 1,6% (absoluutsed ühikud). Standardmääramatust hinnati määramatuse edasikandumise seaduse järgi juhusliku ja süstemaatilise vea summana: *u*=2,3%. Laiendmääramatust leiti kasutades katteteguri k=2, *U*=4,6%. *En* arvuks saadi:

$$E_n = \frac{26{,}7-27{,}2}{\sqrt{4{,}6^2+1{,}3^2}} = -0{,}14 \qquad (11)$$

mis kinnitas, et laboris saadud tulemus statistiliselt ei erine CRM referentsväärtusest $|En|\leq 1$.

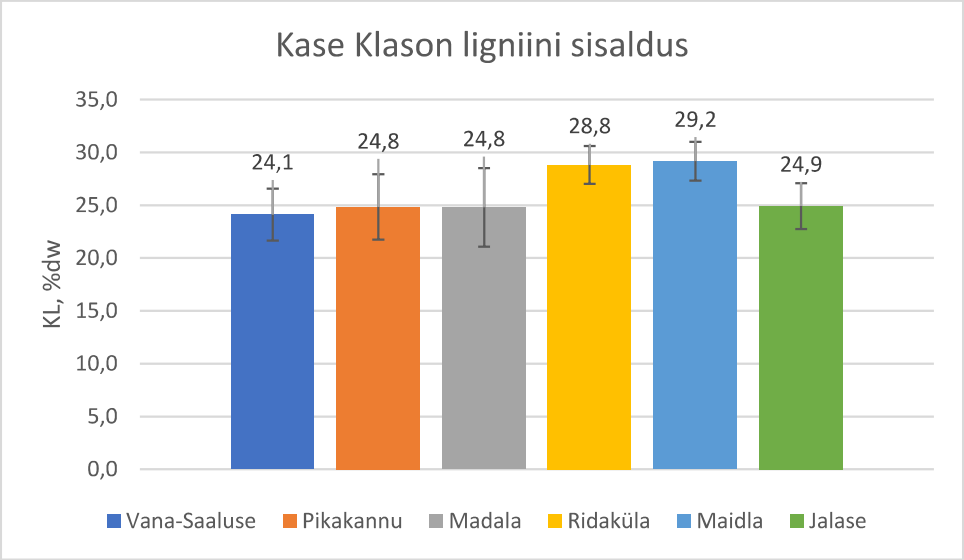
4.2 Klason meetodil ligniini koguse määramine

Käesolevas töös määrati Klason ligniini kogust kokku 88-s puiduproovis. Puiduproovides ligniinikoguse määramiseks Klason meetodil teostati igast proovist kaks sõltumatut paralleelkatset vastavalt biomassi kogusele. Andmed kanti tabelisse ning arvutati iga puidu KL(%) keskmised koos absoluutse standardhälbega vastavalt asukohale (Tabel 2) ja kujutati graafiliselt vastavad andmed kase (Joonis 14), kuuse (Joonis 15) ja männi puhul (Joonis 16). Arvutamisel on arvesse võetud proovi niiskussisaldust. Standardhälbed on vahemikus 1,6 - 3,7 ühikut ning näib, et ligniini sisaldus on puuliigile iseäralik ning ei sõltu kasvukohast.

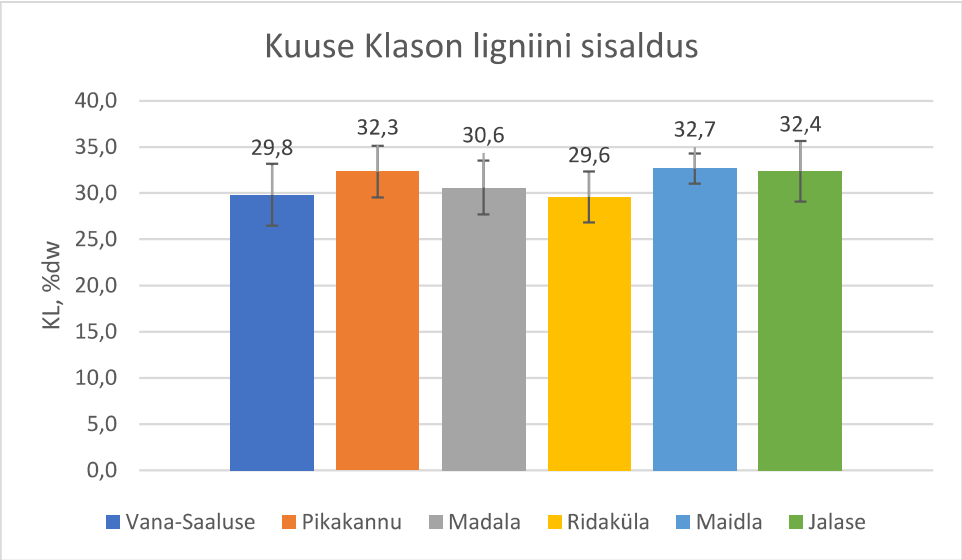
Tabel 2. Keskmine KL(%, dw*) kase, kuuse ja männi proovides

Puit	Kask (30)	Kuusk (28)	Mänd (30)
Vana-Saaluse	24,1 ± 2,5	29,8 ± 3,3	34,0 ± 3,5
Pikakannu	24,8 ± 3,1	32,3 ± 2,8	30,4 ± 3,3
Madala	24,8 ± 3,7	30,6 ± 2,9	30,8 ± 2,0
Ridaküla	28,8 ± 1,8	29,6 ± 2,8	31,6 ± 3,0
Maidla	29,2 ± 1,9	32,7 ± 1,6	32,3 ± 2,5
Jalase	24,9 ± 2,2	32,4 ± 3,3	34,1 ± 1,9
Keskmine	25,8 ± 3,2	31,1 ± 3,0	32,2 ± 3,0

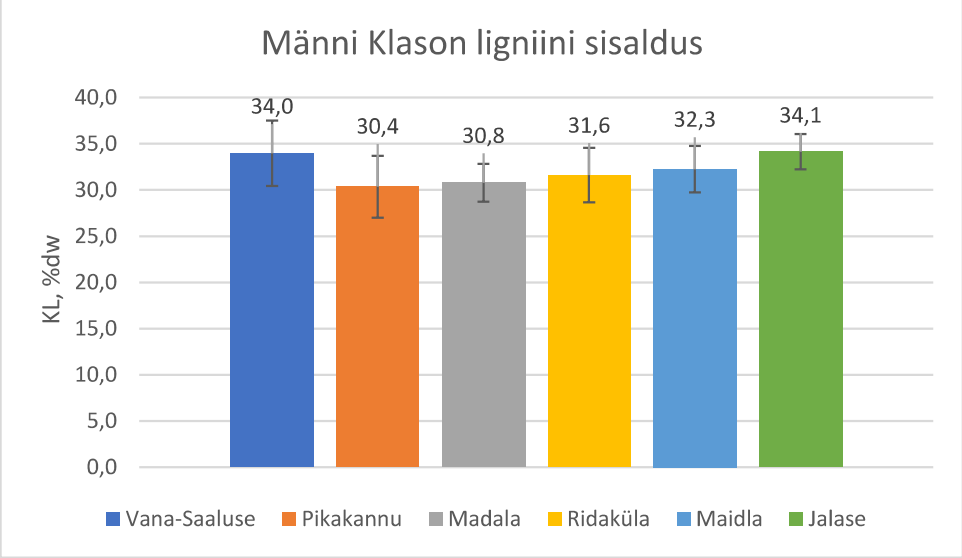
*kuivkaalu kohta



Joonis 14. Kase keskmine KL(%) igal raiealal



Joonis 15. Kuuse keskmine KL(%) igal raiealal



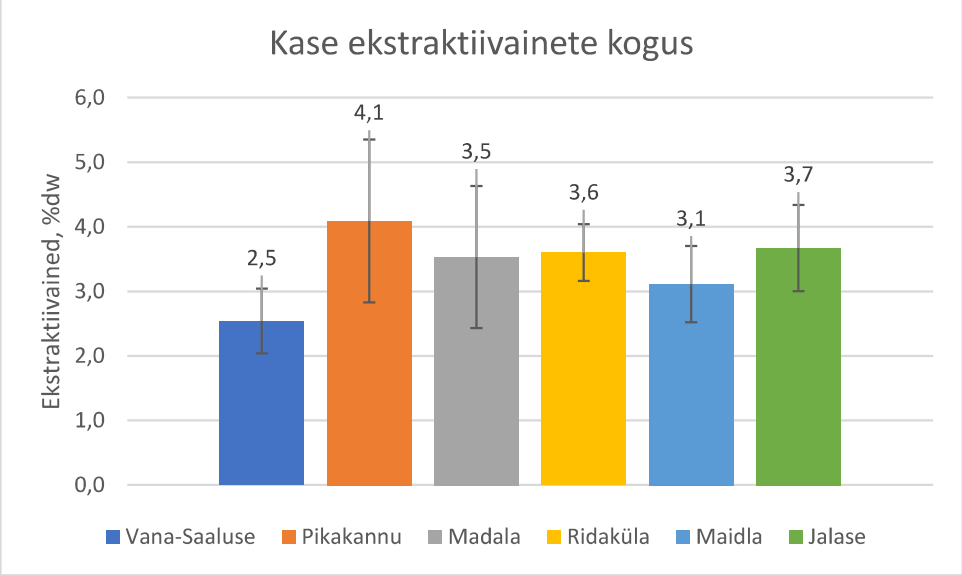
Joonis 16. Männi keskmine KL(%) igal raiealal

4.3 Soxhlet ekstraktsioonil ekstraktiivainete koguse määramine

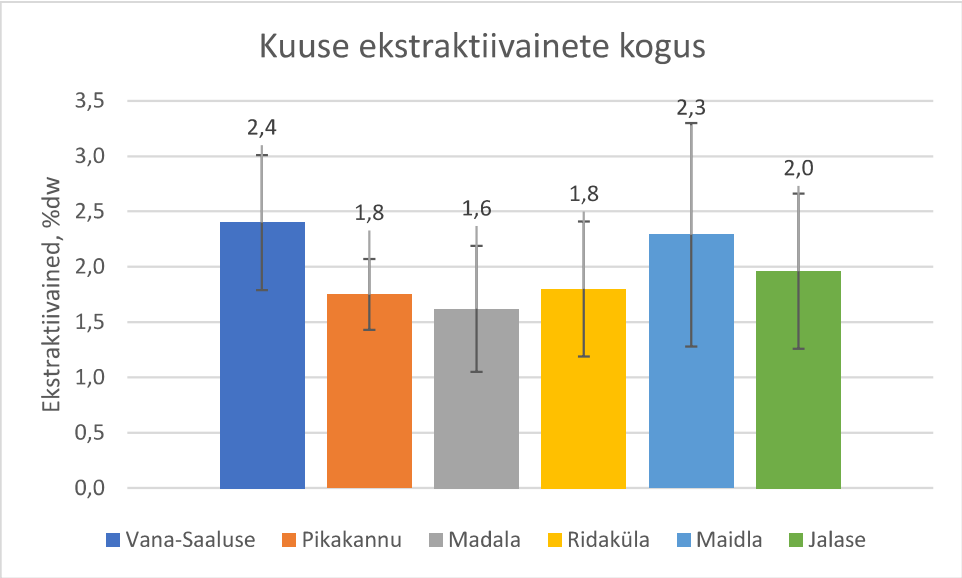
Kuna proovi kogused olid kohati väikesed, siis kõikide proovidega ei saanud läbi viia ekstraktsiooni. Ekstraktiivainete kogused kanti tabelisse, ning koostati tabel iga puidu keskmise ekstraktiivainete kogustega ja absoluutsete standardhälvetega vastavalt asukohale (Tabel 3) ning kujutati graafiliselt vastavad andmed kase (Joonis 17), kuuse (Joonis 18) ja männi puhul (Joonis 19). Arvutamisel on arvesse võetud proovi niiskussisaldust. Standardhälbed on vahemikus 0,1 – 3,3 ühikut ning näib, et ekstraktiivainete sisaldus pole männi puhul kuigi sarnane erinevates kasvukohtades, kuid kase ja kuuse ekstraktiivainete sisaldus on raiealade võrdluses sarnane.

Tabel 3. Keskmine EA(%,dw) kase, kuuse ja männi proovides.

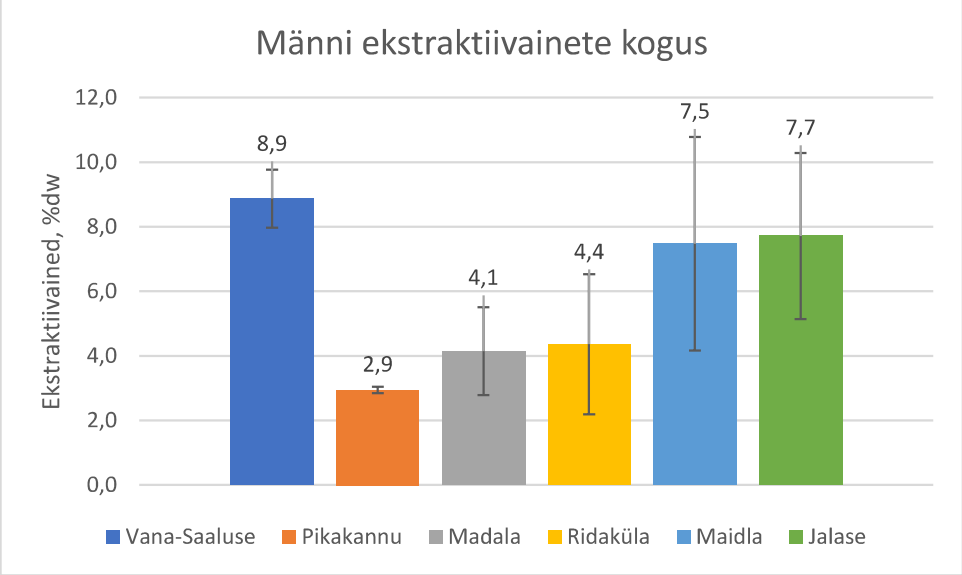
Puit	Kask (20)	Kuusk (19)	Mänd (19)
Vana-Saaluse	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,6	8,9 ± 0,9
Pikakannu	4,1 ± 1,3	1,8 ± 0,3	2,9 ± 0,1
Madala	3,5 ± 1,1	1,6 ± 0,6	4,1 ± 1,4
Ridaküla	3,6 ± 0,4	1,8 ± 0,6	4,4 ± 2,2
Maidla	3,1 ± 0,6	2,3 ± 1,0	7,5 ± 3,3
Jalase	3,7 ± 0,7	2,0 ± 0,7	7,7 ± 2,6
Keskmine	3,5 ± 0,8	2,0 ± 0,7	6,1 ± 3,0



Joonis 17. Kase keskmine ekstraktiivainete kogus igal raiealal



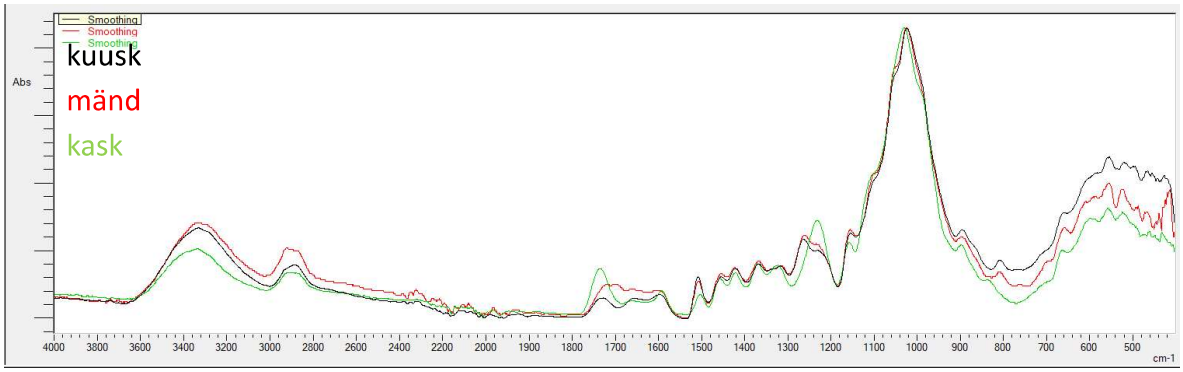
Joonis 18. Kuuse keskmine ekstraktiivainte kogus igal raiealal



Joonis 19. Männi keskmine ekstraktiivainete kogus igal raiealal

4.4 Infrapunaspektroskoopia

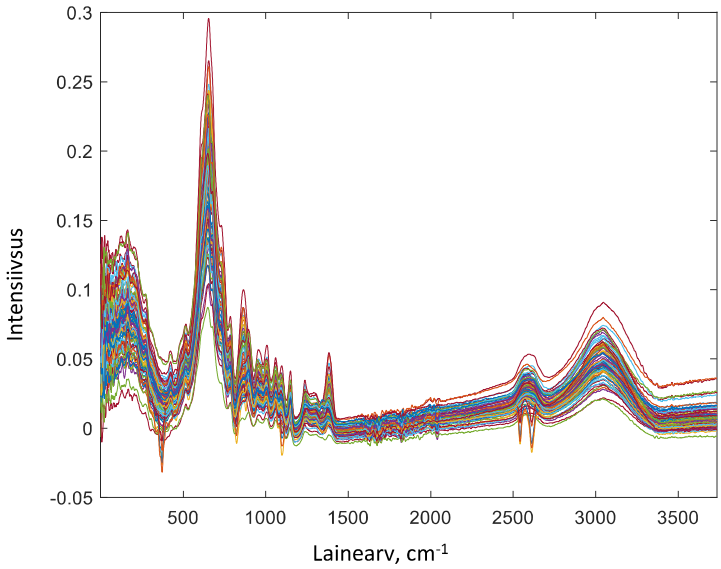
Kõigil spektritel on iseloomulikud piigid -OH ja -CH rühmale vastavalt 3400 ja 2840 cm^{-1} juures, nagu on näha Joonisel 20. Piik lainearvuga 1700 cm^{-1} viitab karbonüülrühma olemasolule ning vahemikus 1500-1600 cm^{-1} on nähtavad ka aromaatikale omased piigid. Vahemikus 1000-1300 cm^{-1} on C-O, C-H ja C=O vibratsioonidele vastavad piigid. Spektritel on kasutatud silumist ning autoskaleerimist.[17]



Joonis 20. Kase, kuuse ja männi infrapunaspektrid.

4.5 Andmete analüüs peakomponentide meetodil

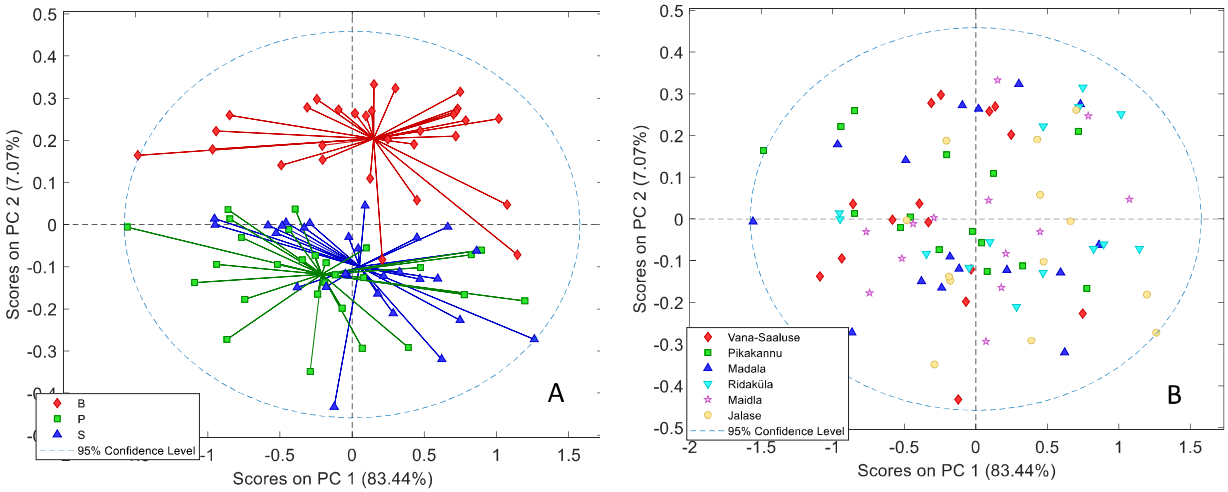
Joonisel 21 on esitatud 88 erineva puiduproovi (kolm liiki ja kuus asukohta) FTIR spektrid, kus x-teljel on lainearv (cm^{-1}) ja y-teljel on absorbtsioon. Selliste andmemassivide interpreteerimine kujutab ennast järelduste tegemist objektide (puitude) omaduste kohta ja objektide omavaheliste suhete kohta. Võimaliku hüpoteetilise ülesande aluseks, mida andmete analüüs peaks aitama lahendada, võiks olla väide, et puidu keemiline koostis (avaldatud spektraalse analüüsi tulemusena) sõltub puuliigist (mänd, kask, kuusk), puutüübist (okaspuu, lehtpuu) või kasvamise asukohast. Informatsioon ülaltoodud väidete kehtivusest on põhimõtteliselt arvudes olemas, kuid Joonisel 21 esitatud andmekogumi puhul ei ole see ülevaatlik ja järelduste tegemine on keeruline.



Joonis 21. 88 puiduproovi FTIR spektrid.

Selleks et andmemaatriksit lihtsustada teostati PCA analüüs. Peakomponendid on arvutatud NIPALS-algoritmi[37] järgi, kasutades Solo tarkvara (Eigenvector Research, Inc.). Arvutus näitas, et esimene

peakomponent kirjeldab 83% andmete variatsioonist ja kaks esimest peakomponenti vastavalt 90% andmete variatsioonist. Joonisel 22 on tulemused esitatud kahe esimese peakomponendi koordinaatides. Joonisel olevate punktide värvid viitavad kas vastavale puuliigile (A) või kasvukohale (B). Jooniselt 22 (A) on näha, et puiduproovid selgelt jaotuvad kaheks klastriks sõltuvalt puutüübist– kask ja mänd+kuusk (lehtpuu, okaspuu), kuid puidu koostise ja kasvukoha vahel korrelatsioon puudub.

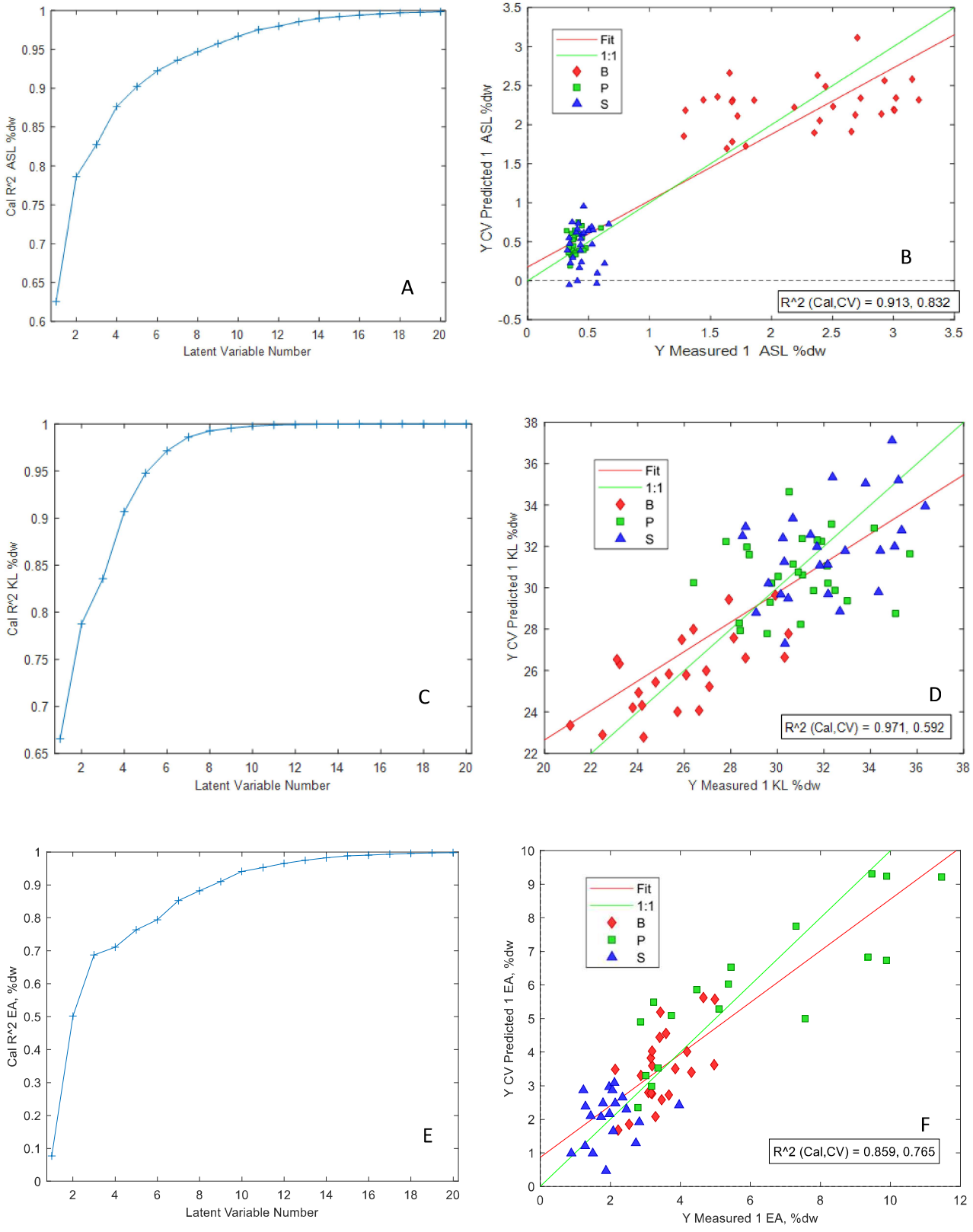


Joonis 22. Eesti puitude koostise analüüs peakomponentide meetodil, skooride graafikud (A) – puiduliigid B-(birch) kask, P-(pine) mänd, S- (spruce) kuusk; (B) – proovivõtu asukohad.

4.6 Osaliste vähimruutude meetodil loodud mudeli hindamine

Käesolevas töös loodi kolm PLS mudelit: happes lahustuva ligniini (ASL), Klason ligniini (KL) ja ekstraktiivainete (EA) koguste ennustamiseks puiduproovides kasutades FTIR spektrite kogumit (88 spektrit) ja vastavate näitajate mõõdetud kontsentratsioonide andmeid (KL ja ASL - 88 proovi, EA - 58 proovi).

Liigikaudu 90% vastuse muutuja variatsioonist oli arvestatud esimeses viies PLS peakomponendis kõikide arendatud PLS mudelite puhul (Joonis 23 (A, C, E)). Seega, ennustusmudelid olid loodud kasutades viit esimest faktorit iga vastuse muutuja jaoks (ASL, KL ja EA kogused erinevas puidus) ja ennustamise tulemuslikkus oli hinnatud kasutades rist-valideerimisprotseduuri (venetian blinds, 6 lahku (splits), välja jäetud andmed (left-out data) 17%). Saadud PLSR mudelid olid võimelised ennustama ASL, KL ja EA koguseid korrelatsiooni koefitsiendiga R^2 ~0,9 mudeli arendamisel ja R^2 0,6-0,8 kasutades täielikku rist-valideerimist (Joonis 23 (B, D, F).



Joonis 23. PLS mudelite iseloomustamine. (A, C, E) - PLS faktorite omaväärtused (eigenvalues). (B, D, F) – PLS mudelid kasutades 5 faktorit ja nende ennustamisvõime karakteristikud.

PLS mudelite ennustamisvõime demonstreerimiseks kasutati mudelite arendamisel välja jäetud FTIR spektrite andmed (kuus proovi) ning ennustati nende põhjal proovi happes lahustuva ligniini ja üldligniini sisaldust, ning ekstraktiivainete sisaldust. Tulemused on esitatud Tabelis 4.

Tabel 4. Kuue proovi mõõdetud ning ennustatud andmete võrdlus

Puit	ASL mõõdetud, %dw	ASL ennustatud, %dw	EA mõõdetud, %dw	EA ennustatud, %dw	KL mõõdetud, %dw	KL ennustatud, %dw
Kask	3,15	2,76	2,54	2,20	25,34	23,64
Kask	2,44	2,46	2,87	3,13	28,13	29,05
Mänd	0,57	0,46	8,87	10,76	30,66	31,98
Mänd	0,43	0,39	2,86	3,60	32,16	32,45
Kuusk	0,39	0,38	1,50	1,28	26,40	27,88
Kuusk	0,36	0,43	2,06	2,49	30,03	31,08

Tulemuste suhteline standardhälve varieerus 0,5-15%. Kuna märgkeemiliste meetoditega saadud mõõtetulemuste laiendmääramatus on vahemikus 15-20%, siis võib pidada saadud ennustused piisavalt usaldusväärseks ja arendatud PLS mudelid sobivaks kvantitatiivsete järelduste tegemiseks.

4.7 Arutelu

Kases on kirjanduse andmetel ligniini 24,0%[38] ja etanool+tolueeni seguga eraldatavaid ekstraktiivaineid 3,5%[39], ning mõlemad väärtused on käesolevas töös läbi viidud analüüside keskmise vea piirides (25,8 ± 3,2 % ja 3,5 ± 0,8 %). Kuuse puidus on kirjanduse andmetel ligniini 28,0% ja ekstraktiivained 3,7%[38] ehk KL% on üsna vea piiril ning ekstraktiivaineid on veidi rohkem (mõõdetud tulemused vastavalt 31,1 ± 3,0 % ja 2,0 ± 0,7 %). Kuna männi liiki polnud täpsustatud, siis võib see olla põhjendatud sellega, et kasutatud on erinevaid mände, samuti puiduproovide pikaajalise säilitamisega laboris (ca. 3 aastat). Selle aja jooksul võis osa lenduvatest ainetest kaduma minna. See võib olla ka seotud proovide ebahomogeensusega sõltuvalt männi puidu osast. Klason ligniini kogus on kirjanduse andmetel männis 27,8% ja ekstraktiivaineid on 3,2%[38] ehk ligniini sisaldus on varasemate mõõtmistega võrreldes madalam kui käesolevas töös leitud keskmine ja ekstraktiivainete sisaldus jääb veel vea piiridesse (mõõdetud vastavalt 32,2 ± 3,0 % ja 6,1 ± 3,0 %).

PCA analüüs näitas, et spektroskoopiliste andmete alusel on võimalik eristada lehtpuitu ja okaspuitu üksteisest, mis väljendub klastrite moodustumises kahes esimeses peakomponentide ruumis. Samas puudub korrelatsioon kasvuasukoha ja puuliigi koostise vahel. Saadud infot võib tulevikus rakendada puitude klassifitseerimisel PLS-diskriminantanalüüsi (PLS-DA) kasutades. Loodud PLSR mudelid happes lahustuva ligniini, Klason ligniini ja ekstraktiivainete koguste ennustamiseks tundmatutes proovides olid kõrge korrelatsiooni koefitsiendiga mudeli arendamisel ja ristvaliderimisel rahuldava R^2 väärtusega. Mudelite ennustusvõime testimisel saadi võrdlemisi hea suhteline standardhälve (0,5-15%), mis tähendab, et PLS mudelit võib rakendada ka edasistes puidu uuringutes.

Kokkuvõte

Uute analüütiliste meetodite ja lähenemiste arendus on oluline nii lignotseluloosse biomassi iseloomustamisel, kui ka selle väärindatud produktide kvaliteedi hindamisel. Käesolevas töös lignotselluloosse biomassi koostise iseloomustamiseks kasutati klassikalisi „märgkeemilisi“ ja spektroskoopilisi meetodeid, ning saadud mitmemõõtmelised andmekogumid analüüsiti kasutades kemomeetrilisi võtteid. Töö põhilised järeldused on:

1) Kokku analüüsiti 88 puiduproovi, kus mõõdeti Klason ligniini ja ekstraktiivainete koguseid, kasutades klassikalisi gravimeetrilisi meetodeid. Klason meetodi täpsus oli eelnevalt kinnitatud kasutades sertifitseeritud referentsmaterjali. Leiti, et kasepuidus on ligniini 25,8 ± 3,2 % ja ekstraktiivaineid 3,5 ± 0,8 %, kuusepuidus ligniini 31,1 ± 3,0 % ja ekstraktiivaineid 2,0 ± 0,7 % ning männipuidus ligniini 32,2 ± 3,0 % ja ekstraktiivaineid 6,1 ± 3,0 %. Tulemused olid kirjanduse andmetega väga lähedased. Edasist uurimist vajaksid ka teised puuliigid;
2) Kõikidele proovidele mõõdeti FTIR spektrid ja saadud andmetega teostati peakomponentide analüüs, mis näitas, et puiduproovid jaotuvad selgelt kaheks klastriks sõltuvalt puutüübist (lehtpuu, okaspuu), kuid puidu koostise ja kasvukoha vahel korrelatsioon puudus;
3) PLSR mudelite loomisel kasutati kvantitatiivset infot happes lahustuva ligniini, Klason ligniini ja ekstraktiivainete kohta ja FTIR andmeid. Regressiooni mudelid loodi kasutades viit esimest faktorit (peakomponenti) ja ennustamise tulemuslikkus oli hinnatud kasutades standardset rist-valideerimisprotseduuri. Saadud PLSR mudelid olid võimelised ennustama ASL, KL ja EA koguseid korrelatsiooni koefitsiendiga R^2 ~0,9 mudeli arendamisel ja R^2 0,6-0,8 kasutades täielikku rist-valideerimist;
4) PLSR mudeli testimisel ennustati mudeli arendamisel välja jäetud proovide ASL, KL ja EA sisaldused. Tulemused olid heas kooskõlas märgkeemiliselt saadud väärtustega, mida iseloomustas võrdlemisi madal suhteline standardhälve (kuni 15%).

Summary

Developing new analytical methods is crucial for characterisation of lignocellulosic biomass and quality control for valorised products. Composition of lignocellulosic biomass was determined using classical "wet-chemistry" and spectroscopic methods and multivariate data was analysed using chemometric methods. According to the aims of this thesis:

1) Klason lignin and extractives content were measured gravimetrically in 88 wood samples. The accuracy of Klason method was determined using a certified reference material. It was determined that birch contains 25,8 ± 3,2 % of lignin and 3,5 ± 0,8 % of extractives, spruce contained 31,1 ± 3,0 % lignin and 2,0 ± 0,7 % of extractives and pine contained 32,2 ± 3,0 % of lignin and 6,1 ± 3,0 % of extractives. There results were in compliance with data gathered from the literature. Other species of trees might be an appropriate study to conduct after this thesis;
2) Infrared spectra were measured for all samples and the data was used to conduct a PCA analysis, which showed that the samples clearly separated to hardwood and softwood clusters, but the area of logging and wood composition had no correlation;
3) Acid soluble lignin, Klason lignin and extractives amounts were used to build a PLSR model. Five PLS components were used, and the prediction performance was determined using standard cross-validation. PLS model was able to predict ASL, KL and EA content with a correlation coefficient of R^2~0,9 creating the model and R^2 0,6-0,8 cross-validating;
4) The PLSR model was able to predict ASL, KL and EA concentrations with a relatively low standard deviation (up to 15%) and the concentrations were close to measured concentrations.

Tänuavaldused

Suurim tänu juhendajatele Maria Kulp ja Tiit Lukk. Teie valgustate mu teadusteed ja hoiate mind õigel kursil. Aitäh Kristiina Leiman, Piia Jõul, Pille-Riin Laanet ja Piret Saar-Reismaa – te leiate igale küsimusele vastuse ja igale probleemile lohutava nalja (ja alles siis lahenduse). Ka kõige tagasihoidlikum lõunapaus muutub kvaliteetajaks tänu teile. Ka ükski särav silm ligniini biokeemia laborist ei ununе mul, aitäh teile! *Vivat, crescat, floreat* C!S!E!

Kasutatud kirjanduse loetelu

(1) Mankar, A. R.; Pandey, A.; Modak, A.; Pant, K. K. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review on Recent Advances. *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd August 1, 2021. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125235.

(2) Haldar, D.; Purkait, M. K. A Review on the Environment-Friendly Emerging Techniques for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: Mechanistic Insight and Advancements. *Chemosphere* **2021**, *264*, 128523. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.128523.

(3) *cell wall | Description, Properties, Components, & Communication | Britannica*. https://www.britannica.com/science/cell-wall-plant-anatomy#ref1268031 (accessed 2022-03-14).

(4) Singhvi, M. S.; Gokhale, D. v. Lignocellulosic Biomass: Hurdles and Challenges in Its Valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2019**, *103* (23–24), 9305–9320. https://doi.org/10.1007/S00253-019-10212-7/FIGURES/3.

(5) Sawada, D. *Making Cellulose More Accessible for Bioconversion | U.S. DOE Office of Science (SC)*. https://science.osti.gov/ber/Highlights/2014/BER-2014-07-p (accessed 2022-03-04).

(6) Routa, J.; Brännström, H.; Anttila, P.; Mäkinen, M.; Jänis, J.; Asikainen, A. *Wood Extractives of Finnish Pine, Spruce and Birch-Availability and Optimal Sources of Compounds A Literature Review*; 2017.

(7) Mattonai, M.; Pawcenis, D.; del Seppia, S.; Łojewska, J.; Ribechini, E. Effect of Ball-Milling on Crystallinity Index, Degree of Polymerization and Thermal Stability of Cellulose. *Bioresource Technology* **2018**, *270*, 270–277. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.029.

(8) Liao, Y.; de Beeck, B. O.; Thielemans, K.; Ennaert, T.; Snelders, J.; Dusselier, M.; Courtin, C. M.; Sels, B. F. The Role of Pretreatment in the Catalytic Valorization of Cellulose. *Molecular Catalysis*. Elsevier B.V. May 1, 2020. https://doi.org/10.1016/j.mcat.2020.110883.

(9) Hu, L.; Fang, X.; Du, M.; Luo, F.; Guo, S. Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences* **2020**, *11* (12), 2066–2079. https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1112146.

(10) Rowell, R.; Pettersen, R.; Tshabalala, M. Cell Wall Chemistry. In *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites, Second Edition*; CRC Press, 2012; pp 33–72. https://doi.org/10.1201/b12487-5.

(11) Otromke, M.; White, R. J.; Sauer, J. Hydrothermal Base Catalyzed Depolymerization and Conversion of Technical Lignin – An Introductory Review. *Carbon Resources Conversion*. KeAi Publishing Communications Ltd. April 1, 2019, pp 59–71. https://doi.org/10.1016/j.crcon.2019.01.002.

(12) Yoo, C. G.; Meng, X.; Pu, Y.; Ragauskas, A. J. The Critical Role of Lignin in Lignocellulosic Biomass Conversion and Recent Pretreatment Strategies: A Comprehensive Review. *Bioresource Technology* **2020**, *301*, 122784. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122784.

(13) Quina, M. J.; Pinheiro, C. T. Inorganic Waste Generated in Kraft Pulp Mills: The Transition from Landfill to Industrial Applications. https://doi.org/10.3390/app10072317.

(14) Xia, Z.; Li, J.; Zhang, J.; Zhang, X.; Zheng, X.; Zhang, J. Processing and Valorization of Cellulose, Lignin and Lignocellulose Using Ionic Liquids. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. KeAi Communications Co. May 1, 2020, pp 79–95. https://doi.org/10.1016/j.jobab.2020.04.001.

(15) Abejón, R. A Bibliometric Study of Scientific Publications Regarding Hemicellulose Valorization during the 2000-2016 Period: Identification of Alternatives and Hot Topics. **2018**. https://doi.org/10.3390/chemengineering2010007.

(16) Xu, Z.; Lei, P.; Zhai, R.; Wen, Z.; Jin, M. Recent Advances in Lignin Valorization with Bacterial Cultures: Microorganisms, Metabolic Pathways, and Bio-Products. *Biotechnology for Biofuels* **2019**. https://doi.org/10.1186/s13068-019-1376-0.

(17) el Mansouri, N. E.; Salvadó, J. Analytical Methods for Determining Functional Groups in Various Technical Lignins. *Industrial Crops and Products* **2007**, *26* (2), 116–124. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.02.006.

(18) Shuai, L.; Amiri, M. T.; Questell-Santiago, Y. M.; Héroguel, F.; Li, Y.; Kim, H.; Meilan, R.; Chapple, C.; Ralph, J.; Luterbacher, J. S. Formaldehyde Stabilization Facilitates Lignin Monomer Production during Biomass Depolymerization. *Science (1979)* **2016**, *354* (6310), 329–333. https://doi.org/10.1126/science.aaf7810.

(19) Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (Revised July 2011). **2008**.

(20) ASTM Standard. Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood - D1106. *ASTM International* **2013**, *96* (Reapproved 2013), 1–2. https://doi.org/10.1520/D1106-96R13.2.

(21) Aldaeus, F.; Fp, C.; Um, T. Protocol for Round Robin Test of Lignin Content in Lignin Samples (COST FP0901). **2010**, *3* (3), 14–16.

(22) Vo, K. *Spectrophotometry*. https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetcs/Spectrophotometry (accessed 2022-04-04).

(23) *Soxhlet Extraction - Principle, Working, Uses With Diagrams*. https://pharmagroww.com/soxhlet-extraction/ (accessed 2022-04-09).

(24) Generalic, E. *Soxhlet extractor*. Croatian-English Chemistry Dictionary & Glossary. https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=Soxhlet+extractor (accessed 2022-04-09).

(25) Lau, W. S. *Introduction To Infrared Spectrscopy*. www.chromacademy.com (accessed 2022-04-29).

(26) Henrique, C. M.; Te´ofilo, R. F. T.; Sabino, L.; Ferreira, M. M. C.; Cereda, M. P. Classification of Cassava Starch Films by Physicochemical Properties and Water Vapor Permeability Quantification by FTIR and PLS. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00342.x.

(27) Osibanjo, R.; Curtis, R.; Lai, Z. *Infrared Spectroscopy*. https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy/Infrared_Spectroscopy (accessed 2022-04-09).

(28) CHROMacademy. *Infrared Spectral Interpretation*. www.chromacademy.com (accessed 2022-04-29).

(29) *FTIR: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Principles and Applications*. https://www.findlight.net/blog/2019/03/27/ftir-principles-applications/ (accessed 2022-04-10).

(30) *Attenuated total reflectance (ATR) :: Anton Paar Wiki*. https://wiki.anton-paar.com/en/attenuated-total-reflectance-atr/ (accessed 2022-04-19).

(31) Mihkel Kaljurand. *Kemomeetria*; Tallinna Tehnikaülikool: Tallinn, 2008.

(32) Koel, M.; Kaljurand, M. *Usaldusväärsed Mõõtmised Keemias*; TalTech, 2020.

(33) Geladi, P.; Kowalski, B. R. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Analytica Chimica Acta* **1986**, *185* (C), 1–17. https://doi.org/10.1016/0003-2670(86)80028-9.

(34) L. Eriksson, T. B. E. J. J. T. C. V. *Multi- and Megavariate Data Analysis Basic Principles and Applications*, Third edition.; Umetrics Academy, 2013.

(35) Method, S. T. Standard Test Method for Ethanol-Toluene Solubility of Wood. *Paper Industry* **2001**, *84* (Reapproved), 5–6. https://doi.org/10.1520/D1109-84R13.1.

(36) Magnusson, B.; Hovind, H.; Krysell, M.; Lund, U.; Mäkinen, I. *Internal Quality Control*, 5.1.; 2018.

(37) *The NIPALS algorithm*. https://cran.r-project.org/web/packages/nipals/vignettes/nipals_algorithm.html (accessed 2022-05-23).

(38) *Phyllis2 - ECN Phyllis classification*. https://phyllis.nl/Browse/Standard/ECN-Phyllis#birch (accessed 2022-04-18).

(39) Kačík, F. *Analysis of Lipophilic Extractives in Hardwoods*.

Lisa
rektori 07.04.2020 käskkirjale nr 1-8/17

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks[1]

Mina, Olivia-Stella Salm

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
„Eesti puidu iseloomustamine erinevate keemiliste ja mitmemõõtmeliste statistiliste meetoditega“

mille juhendajad on Maria Kulp ja Tiit Lukk,

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.

01.06.2022

[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.*