# Kuusenkuoritanniinien nopeutetun liuotinuuton optimointi vastepintamallin avulla

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Soveltavan kemian osasto

29.5.2020

Nea Lintula

# TIIVISTELMÄ

Tämän työn kirjallisessa osassa tarkastellaan tanniinien kemiallista rakennetta, niiden uuttoa kuusen kuoresta ja käyttöä erityisesti vedenpuhdistuksessa. Kokeellisessa osassa optimoitiin kuusen kuumavesiuuttoa vastepintamallia hyväksi käyttäen. Testiin sisällytettiin lämpötilan, uuttoajan sekä raekoon vaikutus ja etsittiin näiden optimaalista yhdistelmää parhaimman mahdollisen tanniinien uuttosaannon saavuttamiseksi. Lisäksi tutkittiin myös kuorijauheen eri kuivausmenetelmien vaikutusta tanniinien uuttumiseen. Edellä mainitut tutkimukset analysoitiin UV/Vis-spektrometriä käyttäen sekä gravimetrisellä uuttosaannolla. Malliin sisällytettiin myös Luonnonvarakeskuksen Jokioisten toimipisteessä mitattuja HPLC-tuloksia. Lopuksi mitattiin kuusen kuoren varastoinnin vaikutuksia tanniinien pitoisuuteen.

# ESIPUHE

Tämän pro gradu -tutkielman kokeellinen osuus on tehty Jyväskylän yliopistossa vuoden 2018 aikana ja kirjallinen osuus valmistui vuonna 2020. Työ tehtiin osana TanWat-hanketta Luonnonvarakeskuksen Biojalostusteknologiat ja tuotteet –yksikölle, josta ohjausta antoivat tutkija Hanna Brännström sekä tohtorikoulutettava Eelis Halmemies. Soveltavan kemian osastolta ohjaajana toimi professori Raimo Alén. Erinomaisia neuvoja ja käytännön apua antoi myös laboratoriomestari Jouni Väli-Torala.

Haluaisin kiittää Hanna Brännströmiä ja Raimo Alénia mielenkiintoisesta aiheesta sekä kärsivällisyydestä. Kiitän myös perhettäni sekä ystäviäni, jotka ovat joutuneet oppimaan kaikenlaista puista ja tanniinien uuttamisesta.

# SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ ..... i

ESIPUHE ..... ii

SISÄLLYSLUETTELO ..... iii

KIRJALLINEN OSA ..... 1

1 JOHDANTO ..... 1

2 KUUSI ..... 2

2.1. Lajit ja levinneisyys ..... 2

2.2. Yleisrakenne ..... 3

3 KUORI ..... 5

3.1. Yleinen rakenne ..... 5

3.2. Kemiallinen rakenne ..... 6

3.2.1. Selluloosa ..... 6

3.2.2. Hemiselluloosat ..... 7

3.2.3. Ligniini ..... 10

3.2.4. Uuteaineet ..... 13

3.2.5. Kuoren tuotanto ja käyttökohteet ..... 15

4 TANNIINIT ..... 16

4.1. Hydrolysoituvat tanniinit ..... 16

4.2. Kondensoituneet tanniinit ..... 18

5 VEDENPUHDISTUS ..... 20

5.1. Vedenpuhdistuksen menetelmät ..... 21

5.2. Vedenpuhdistuksessa käytettävät polymeerit ..... 22

5.2.1. Polyakryyliamidi ja PolyDADMAC ..... 23

5.2.2. Kitosaani ..... 25

5.2.3. Tärkkelys ..... 27

5.2.4. Tanniinit ..... 28

6 KIINTEÄN AINEEN UUTTO ..... 30

6.1. Partikkelikoko ..... 30

6.2. Liuottimet ..... 31

6.3. Lämpötila ..... 32

6.4. Nopeutettu liuotinuutto ..... 32

KOKEELLINEN OSA ..... 34

7 TYÖN TARKOITUS ..... 34

8 MATERIAALIT JA METODIT ..... 35

8.1. Reagenssit ..... 35

8.2. Kuorinäytteet ..... 36

9 ANALYTIIKKA ..... 37

9.1. Tanniinistandardi ..... 37

9.1.1. ASE -uutto ja kosteuden määritys näytteestä ..... 37

9.1.2. Tanniinin puhdistus ja Sephadex -geelin käsittely ... 38

9.2. UV/Vis -spektrofotometri ... 39

9.2.1. UV-280 nm -menetelmä ... 39

9.2.2. Folin-Ciocalteu -menetelmä ... 40

9.2.3. Hapan butanoli -menetelmä ... 42

9.2.4. Kuiva-ainesaanto ... 43

10 VASTEPINTAMENETELMÄ ... 43

10.1. Koesuunnitelma ... 44

10.2. Tiedonkäsittely ... 45

10.3. Validointiuutot ... 47

11 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU ... 50

11.1. Vastepintakuvaaja (3D-kuvaaja) ... 50

11.2. Ääriviivakuvaaja (2D-kuvaaja) ... 51

11.3. Profiilikuvaajat ... 52

11.4. UV 280 nm -menetelmä ... 54

11.5. Folin-Ciocalteu -menetelmä ... 55

11.6. Hapan butanoli -menetelmä ... 56

11.7. Kuiva-ainesaanto ... 58

11.8. Kuivausmenetelmän vaikutus ... 59

11.9. HPLC-mittaukset ... 61

11.10. Varastoinnin vaikutus tanniinien pitoisuuteen kuoressa ..... 64

12 YHTEENVETO ..... 69

13 KIRJALLISUUSVIITELUETTELO ..... 72

# LYHENTEET

| | |
|---|---|
| 4-*O*-Me-α-D-Glc*p*A | 4-*O*-metyyli-D-glukuronihappo |
| ANOVA | Varianssianalyysi |
| ASE | Nopeutettu liuotinuutto |
| α-D-Ara*f* | α-D-arabinofuranoosi |
| α-D-Gal*p* | α-D-galaktopyranoosi |
| α-D-Gal*p*A | α-D-galakturonihappo |
| α-D-Glc*p* | α-D-glukopyranoosi |
| α-L-Ara*f* | α-L-arabinofuranoosi |
| α-L-Ara*p* | α-L-arabinopyranoosi |
| α-L-Fuc*p* | α-L-fukopyranoosi |
| α-L-Rham*p* | α-L-ramnopyranoosi |
| β-D-Gal*p* | β-D-galaktopyranoosi |
| β-D-Gal*p*A | β-D-galakturonihappo |
| β-D-Glc*p* | β-D-glukopyranoosi |
| β-D-Glc*p*A | β-D-glukuronihappo |
| β-D-Man*p* | β-D-mannopyranoosi |
| β-D-Xyl*p* | β-D-ksylopyranoosi |
| β-L-Ara*f* | β-L-arabinofuranoosi |
| BOD | Biologinen hapenkulutus |
| COD | Kemiallinen hapenkulutus |
| DADMAC | dialkyylidimetyyliammoniumkloridi |
| DoE | Koesuunnittelu |
| DP | Polymeraatioaste |
| ET | Ensiharvennustukki |
| FAO | Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestö |
| FC | Folin-Ciocalteu |
| GAE | Gallusihappoekvivalentti |
| HHDP | Heksahydroksidifeenihappo |
| HPLC | Korkean erotuskyvyn nestekromatografi |
| NDMA | *N*-nitronatriummetyyliamiini |
| OFAT | Yksimuuttujakoe |
| PAM | Polyakryyliamidi |
| RSM | Vastepintamenetelmä |
| TSS | Kiintoaine |
| TT | Tyvitukki |
| UHQ | Ultrapuhdas vesi |
| UV/Vis | Ultravioletti/näkyvä valo |
| VT | Välitukki |

# KIRJALLINEN OSA

## 1 JOHDANTO

Kuusen kuorta on kautta aikain käytetty moneen tarkoitukseen. Suomalaisille tuttu käyttötarkoitus oli nahan parkitseminen. Kuoren käyttö tässä tarkoituksessa tosin väheni huomattavasti synteettisen parkitsemisaineiden kehityksen myötä.[1] Varsinkin tammen, kuusen, ja pajun kuorta käytettiin parkitsemiseen niiden korkean parkkihappopitoisuuden vuoksi.[2]

Tanniinit uutetiin parkitsemista varten kuivaamalla kuori, jauhamalla se, liottamalla jauhetta vedessä ja lopuksi keittämällä. Nahat, jotka oli ensin säilötty ja niistä oli poistettu karvat, rasvat ja orvaskesi ja ne oli peitattu pehmeiksi, laitettiin likoamaan tähän keitettyyn tanniiniuutteeseen. Parkitsematon nahka on kuivana kovaa ja kosteana helposti mätänevää mutta parkitsemisen jälkeen nahka on hyvin säilyvää ja pehmeänä pysyvää. Kuorta itsessään on käytetty korien, kanoottien, mausteiden ja jopa kankaiden valmistukseen.[3]

Yhdistyneiden kansakuntien elintarvike- ja maatalousjärjestön (FAO) mukaan kokonaispuutavaran määrä maailmassa on arviolta 3 797 miljoonaa $m^3$. Näin ollen kuoren vuotuinen kokonaismäärä, käyttäen 10 %:n kuorisuhdetta, on noin 380 miljoona $m^3$.[4] Kuoren käyttö on ollut vähäistä viime vuosituhannen lopulla, koska kuori, joka tuotettiin puutavaran ja jalostuksen aikana, toimitettiin useimmiten kaatopaikoille. Nykyisellään kuorella on runsaasti käyttökapasiteettia, koska esimerkiksi pelkästään Kanadassa tuotetaan vuosittain yli 17 miljoonaa $m^3$ kuorta ja yli puolet siitä poltetaan tai toimitetaan kaatopaikoille.[5]

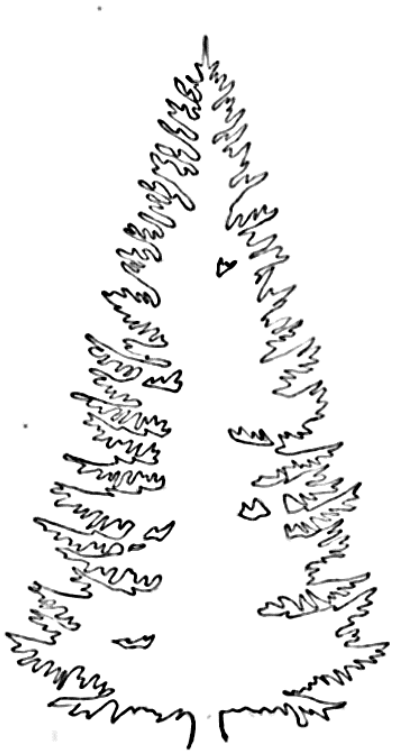
Vihreän kemian nousun myötä myös tanniinien monipuoliset ominaisuudet ovat nousset kiinnostuksen kohteeksi. Tanniineille on löydetty sovellutuksia nahan parkituksen lisäksi myös useilla muilla eri teollisuuden osa-alueilla. Tanniineista valmistetaan mm. liimoja ja muita sideaineita, puunsuoja-aineita, pinnoitteita, geelejä ja vaahtoja.[6] Tanniinien kyky sitoa erilaisia proteiineja ja metalleja on herättänyt kiinnostuksen myös sen käytöstä jäteveden käsittelyssä. Vettä on maapallolla runsaasti mutta vain hyvin pieni osa siitä, noin 3 % kaikkiaan, on makeaa vettä ja siitäkin helposti käytettävissä pohja- ja pintavetenä vain noin 30 %.[7]

# 2 KUUSI

## 2.1 Lajit ja levinneisyys

Kuusen (*Picea abies*) hyvin tunnistettava ulkonäkö on tuttu näky Suomen luonnossa. Kuusi on suorarunkoinen, kartiomainen havupuu, jolla on tummanvihreät neulaset. Kuusen juuristo on kohtalaisen kauas levittyvää ja pinnanmukaista ja kaarna harmahtavan ruskeasta aina punaruskeaan väriltään. Kuusi on hyvin monimuotoinen puu ja sen latvus voikin olla kaikkea tutusta joulupuumaisesta leveästä latvuksesta kapeisiin lapinkuusiin ja aina harvahaaraisiin käärmekuusien tapaisiin äärimmäisyysmuotoihin.[8]

Kuusia on 35 tunnettua lajia[9], mutta Suomessa esiintyvät kuuset edustavat kahta metsäkuusen alalajia[8]. Etelä-Suomessa vallalla on euroopankuusi (spp. *abies*), jonka leveälatvuksinen profiili on esitetty kuvassa 1. Pohjoisessa yleisempänä muotona on kapealatvuksinen, pylväsmäinen ja hieman lyhytkasvuisempi siperiankuusi (spp. *obovata*), joka on esitetty kuvassa 2.[10] Näiden kahden välimuodot ovat yleisiä Suomessa[8].



Kuva 1. Euroopankuusi.

Kuva 2. Siperiankuusi.

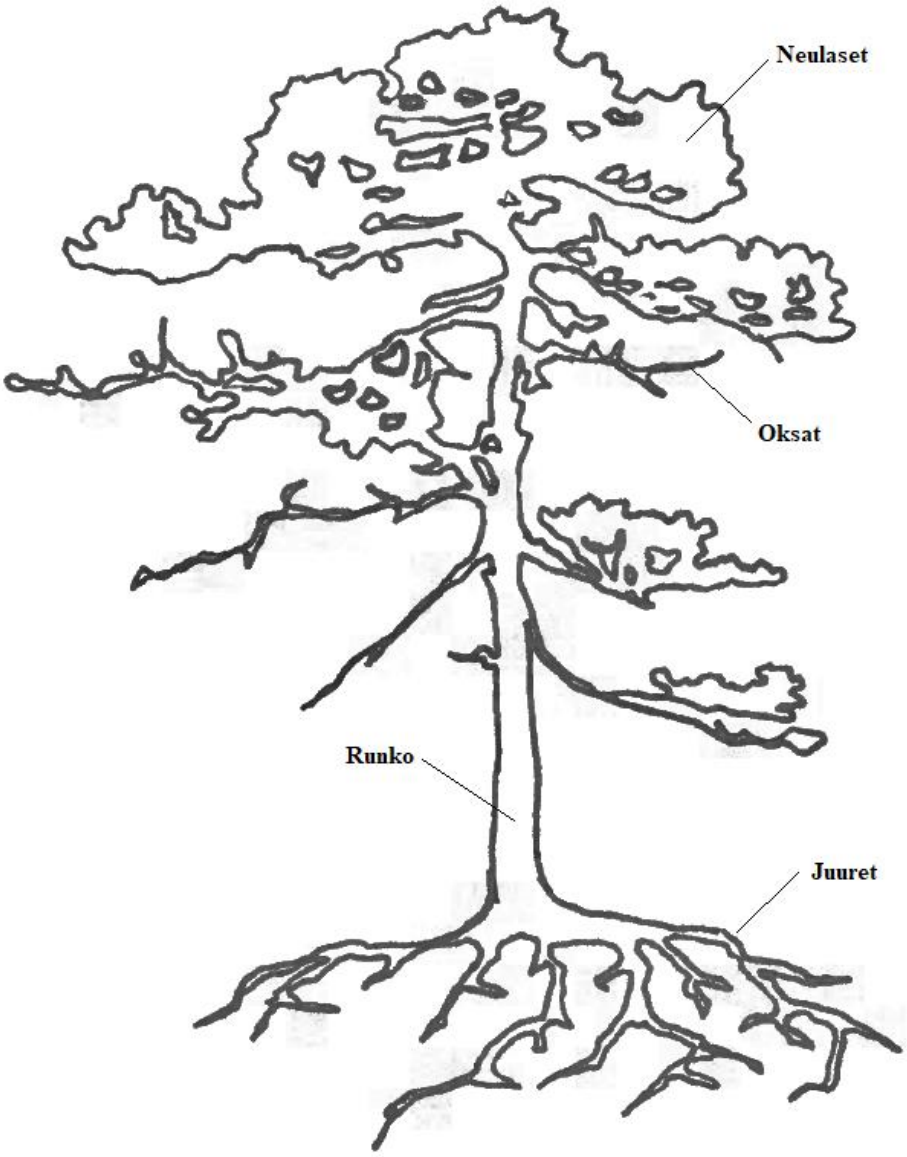
Suomessa kuusi on levinnyt lähes koko maahan aivan pohjoisinta Lappia lukuun ottamatta[10]. Maailmanlaajuisesti kuusen levinneisyysalue kattaa lähes koko pohjoisen havumetsävyöhykkeen. Euraasiassa kuusia esiintyy Pohjoismaissa sekä Euroopan vuoristoilla ja idässä levinneisyysalue ulottuu Venäjän Kaukoitään ja Japaniin asti. Metsäkuusen kahden alalajin esiintymisalueiden rajaa on vaikea määritellä muuallakin kuin Suomessa risteytymisen ja paikallisten sopeumien vuoksi.[9]

Kuusi vaatii mieluiten ravinteikkaan maaperän mutta pyrkii levittäytymään myös karummillekin seuduille. Pintajuuristonsa vuoksi kuusi on altis myrskyvaurioille ja sietää huonosti kuivuutta. Kuusi pärjää hyvin varjossa ja sen taimisto varttuukin hyvin toisten puiden, kuten koivun, varjossa.[11] Puolivarjoisten paikkojen kasvina kuusi kasvaa myös tiheinä kasvustoina ja onkin oivallinen kasvi myös pensasaitoihin[8].

Kuuset ovat metsiemme isoimpia puita ja voivat Suomessa kasvaa jopa yli 40 metrin korkeuteen. Kuuset ovat myös hyvin pitkäikäisiä puita ja Lapissa ne voivatkin elää jopa 500-700 vuotiaiksi. Etelä-Suomessa kuuset jäävät alle 300 vuoden ikäisiksi.[8] Kuusikko uudistetaan yleisimmin istuttamalla[11]. Kuusi on tuottoisa puulaji ja sitä hyödynnetään paljon metsätaloudessa. Vuonna 2017 Suomessa kuusen hakkuukertymä oli 26,6 milj. $m^3$, mikä oli 37 % kokonaishakkuukertymästä. Kuusen hakkuukertymä oli toiseksi suurin heti männyn jälkeen (49 %).[12]

## 2.2 Yleisrakenne

Kuusi, kuten muutkin puut, voidaan jakaa juuriin, runkoon, kuoreen, oksiin ja lehtiin. Kuva 3 nähdään puun yleinen rakenne. Juuret kiinnittävät kasvin maahan ja ottavat maasta vettä ja ravinteita. Varsi ja oksat kohottavat lehdet valoon. Varren sisällä on johtosolukoita, jotka välittävät lehdissä valmistetut aineet käyttöön kaikkialle kasviin sekä varastoitavaksi juureen. Samalla varren ja oksien kautta kulkee vettä ja ravinteita juurista lehtiin.[13,14]




Kuva 3. Puun yleinen rakenne.

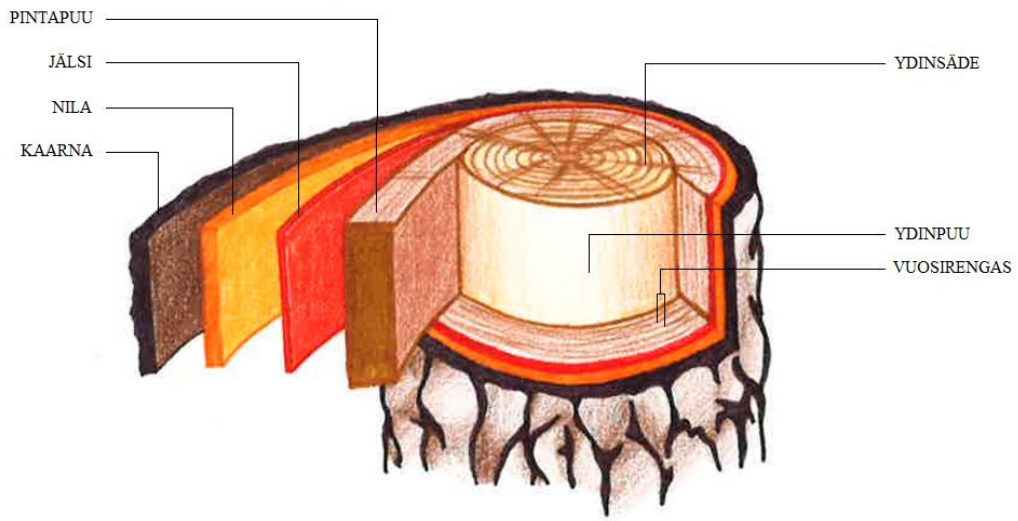
Puilla lehdet kiinnittyvät oksiin, jotka kasvavat puun rungosta. Oksat saavat alkunsa puun ytimestä ja niitä kutsutaan ydinoksiksi. Lehtien pääasiallisena tehtävänä on yhteyttäminen ja niiden kautta poistuu myös suurin osa haihtuvasta vedestä. Kuusen, kuten useimpien muidenkin paljassiemenisten, lehdet ovat ainavihreitä ja kuivuutta sietäviä[13]. Kuusen lehdet ovat kapean neulamaisia ja vahapintaisia. Kuusen lehtiä kutsutaan neulasiksi.[13,14]

Kasvien kasvaminen tapahtuu juurien, varren ja oksien päissä olevissa kasvupisteissä eli meristeemeissä. Puun pituuskasvu on niin sanottua primaarista kasvua ja se tapahtuu oksien ja juurien päissä. Puun paksuuntuminen on sekundaarista kasvua ja puolestaan tapahtuu jälsikerroksessa. Suurin osa aikuisen puun kasvusta on sekundaarista kasvua.[13,14]

# 3 KUORI

## 3.1 Yleinen rakenne

Kuorta on kaikki jälsin ulkopuolinen solukko puun rungossa, oksissa ja juurissa. Puun kokonaispainosta kuorta on huomattava osa, kuusessa 10-30 %. Pohjoisen kuusissa on suurempi määrä kuorta kuin etelän kuusissa.[1] Kuori voidaan jakaa rakenteen perusteella kahteen osaan, joista sisempi on sisäkuori eli nila ja ulompi on ulkokuori. Kuva 4 on esitetty kuusen rungon rakenne eri kerroksineen, mukaan lukien kuoren eri kerrokset.




Kuva 4. Kuusen rungon rakenne.[14]

Kuva 4 voidaan erottaa eri kerroksia, joista uloin on kaarna, joka on puuta suojaavaa kuollutta solukkoa. Kuoren alla on nila, jonka tehtävänä on kuljettaa lehdissä yhteyttämisen tuloksena syntyvää sokeria kasvin eri osiin. Nilan alla esiintyy ohut, jopa yhden solukerroksen paksuinen, jälsi. Jälsikerroksessa tapahtuu solunjakautuminen ja näin ollen puun rungon paksuuntuminen. Ulkokuoren solukoihin kuuluu myös peridermi, joka on yhteisnimitys korkkijällelle ja sen tuottamille solukoille.[1,13,15]

Puun keskiosassa on ydin, joka on muodostunut ensimmäisen kasvuvuoden aikana. Ytimen ympärille muodostuu johtojännekehä, jossa on johtojänteitä. Näiden tehtävänä on kuljettaa vettä puun sisällä. Ytimen ja jälsin välissä on ksyleemi eli puuaines. Puuaines on muodostunut enimmäkseen kuolleista soluista. Puussa näkyy myös ydinsäteitä, joista primaariset yltävät ytimestä kuoreen ja sekundaariset johonkin tiettyyn vuosirenkaaseen.[1,13,15]

Jälsikerroksessa solut jakautuvat ja erilaistuvat. Jällessä syntyy näin ollen sekä nilasoluja että puusoluja. Puun kasvu kiihtyy keväällä ja solunjakautuminen nopeutuu, jolloin jällen sisäpuolelle muodostuu vaalea kevätpuukerros. Kesällä kasvu tasautuu ja hidastuu ja puuaineksen muodostuu tummempi kesäpuukerros, jossa on paksumpiseinäisiä soluja. Näin muodostuvat puun vuosilustot, joista puun iän voi laskea.[1,13,15]

## 3.2 Kemiallinen rakenne

Kemiallisesti tarkasteltuna puun päärakenneosat ovat selluloosa, hemiselluloosat ja ligniini. Muita polymeerisiä aineosia ovat pektiini, tärkkelys ja proteiinit.[14,15] Taulukko 1 nähdään, että puun päärakenneosien suhteellinen esiintyvyys metsäkuusessa vaihtelee suuresti puun eri osissa. Muihin puun osiin verrattuna kuoressa on enemmän uuteaineita kuin muissa osissa, neulasia lukuun ottamatta, ja hyvin vähän hemiselluloosia. Selluloosaa ja ligniiniä esiintyy eniten rungon puuaineksessa, jossa on vastaavasti hyvin vähän uuteaineita.

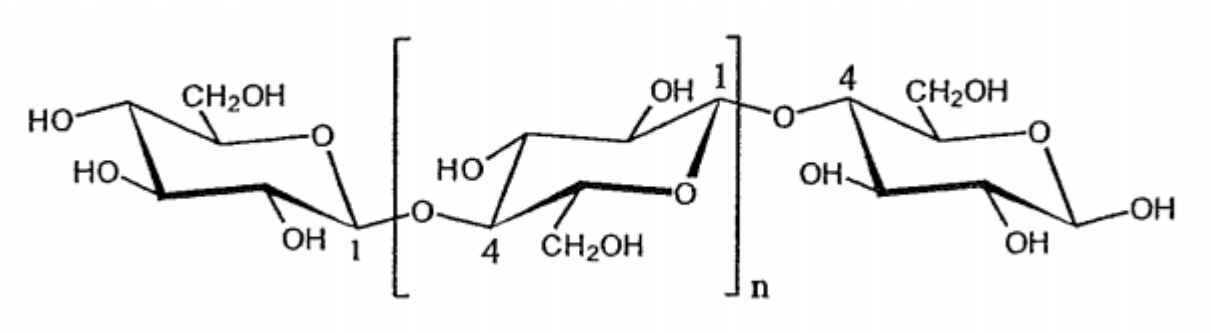
Taulukko 1. Puun kemiallisten rakenneosien esiintyvyys puun eri osissa[16]

| | **Selluloosa (%)** | **Hemiselluloosat (%)** | **Ligniini (%)** | **Uuteaineet (%)** |
|---|---|---|---|---|
| **Runko** | 42 | 27 | 27 | 2 |
| **Kuori** | 27 | 9 | 12 | 32 |
| **Oksat** | 29 | 30 | 23 | 16 |
| **Neulaset** | 28 | 25 | 8 | 43 |
| **Kanto** | 43 | 28 | 29 | 4 |

### 3.2.1 Selluloosa

Selluloosa on maakasvien soluseinän pääkomponentti ja maailman yleisin biopolymeeri.[17] Kuten aiemmasta Taulukko 1 nähtiin, niin selluloosan pitoisuus puun eri osissa on 30-40 %. Joissain kasvilajeissa, kuten hampussa, selluloosapitoisuus voi nousta jopa hieman yli 50 % kuiva-aineesta.[18] Selluloosaa on pääasiallisesti sekundaarisessa soluseinässä, jossa se antaa soluseinälle lujuuden, varsinkin kuidun vetolujuuden.[15,17]

Selluloosa on hydrofiilinen mutta veteen liukenematon, β-D-glukopyranoosi -yksiköistä (β-D-Glc*p*) muodostuva homopolysakkaridi. β-D-Glc*p*-yksiköt muodostavat (1→4)-glykosidisidoksilla ekvatoriaalisen eli tasosuuntaisen ketjun. Glykosidisidos on kovalenttinen sidos, joka muodostuu yhden sakkaridin C-1:stä toisen sakkaridin C-4:een, kuten voidaan nähdä Kuva 5. Tämä on hyvin pysyvä rakenne ja selluloosamolekyylin polymeraatioaste (DP) puussa voikin olla jopa 7000-10000.[15,19]



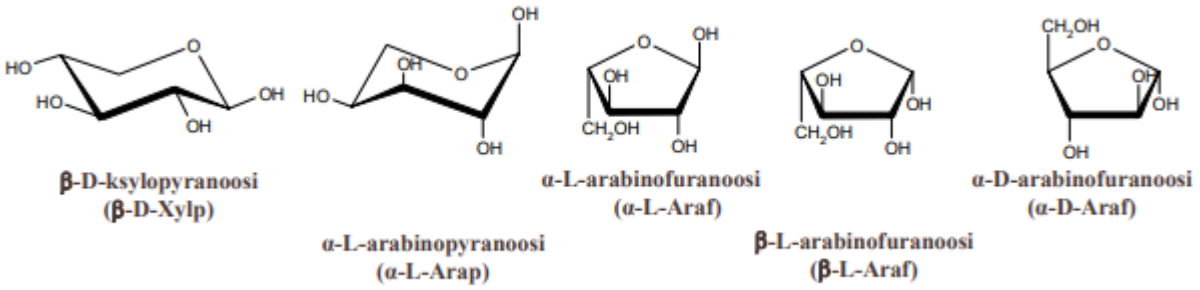

Kuva 5. Selluloosan toistuva rakenneyksikkö, jossa näkyy 1-4-glykosidisidos.[19]

Selluloosan polymeeriketju muodostaa glykosidisidosten lisäksi sekä molekyylin sisäisiä että molekyylien välisiä vetysidoksia. Näin muodostuvista molekyylikimpuista rakentuu mikrofibrillejä, joissa on tasaisesti järjestyneitä, kiteisiä alueita ja vähemmän järjestyneitä, amorfisia alueita. Selluloosaketjun rungossa on sekä pelkistävä että ei-pelkistävä pääteryhmiä. Vahvojen happojen ja emästen aikaansaama polymeeriketjun pilkkoutuminen alkaa pelkistävistä pääteryhmistä ja päättyy ei-pelkistäviin pääteryhmiin.[15,19]

### 3.2.2 Hemiselluloosat

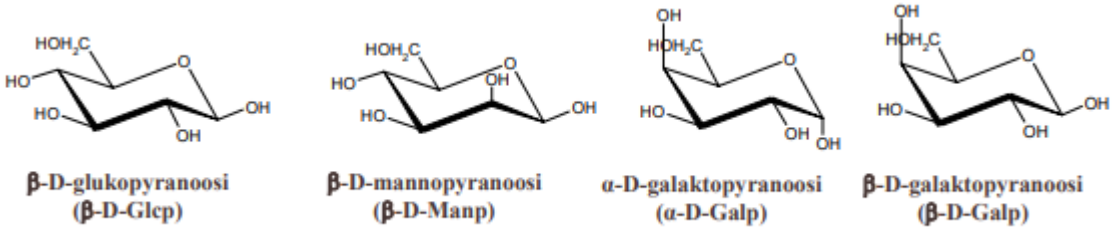
Hemiselluloosat ovat polysakkarideista muodostuvia heteropolymeerejä, jotka sijaitsevat pääosin selluloosarakenneyksiköiden yhteydessä kasvien soluseinässä. Hemiselluloosat muodostavat ristisidoksia ligniinin kanssa ja vaikuttavat soluseinäin joustavuuteen.[20] Toisin kuin selluloosa, joka on kiteistä ja rakenteeltaan lujaa, hemiselluloosat ovat amorfisia, epäsäännöllisiä ja heikompirakenteisia. Hemiselluloosat ovat myös huomattavasti lyhyempiä polymeerejä kuin selluloosa, joka voi olla 7000-15000 monomeeriyksikköä pitkä. Hemiselluloosien pituus on tyypillisesti 500-3000 monomeeriä. Hemiselluloosat ovat usein myös haaroittuneita polymeerejä.[21]

Kuten Taulukko 1 nähtiin, hemiselluloosien pitoisuus puun eri osissa vaihtelee välillä 25-30 % kuiva-aineesta. Kuoressa voi esiintyä jopa alle 10 % hemiselluloosia. Hemiselluloosien pitoisuuksien muutoksien lisäksi myös niiden koostumus vaihtelee, ja esimerkiksi havupuissa on erilainen hemiselluloosa koostumus kuin lehtipuissa.[16] Hemiselluloosat ovat heteropolysakkarideja, jotka muodostuvat erilaisista pentooseista, heksooseista, deoksiheksooseista sekä heksuronihapoista. Kuva 6 on esitetty hemiselluloosien viisihiiliset rakenneosat, pentoosit, joita on β-D-ksylopyranoosi ja erilaiset arabinoosit.[15,20]



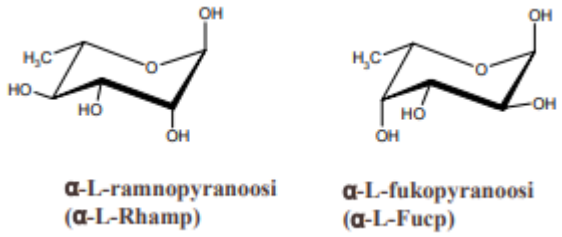

Kuva 6. Hemiselluloosan pentoosit: ksyloosi ja arabinoosit.[19]

Hemiselluloosien kuusihiilisiä sakkarideja kutsutaan heksooseiksi ja niihin kuuluva β-D-Glc*p* on myös selluloosan rakenneosa. Kuva 7 on esitetty lisäksi hemiselluloosien muiden heksoosien rakenteet, joita ovat mannoosi, sekä galaktoosin kaksi isomeeriä, α- ja β-D-galaktopyranoosit.[19,20]

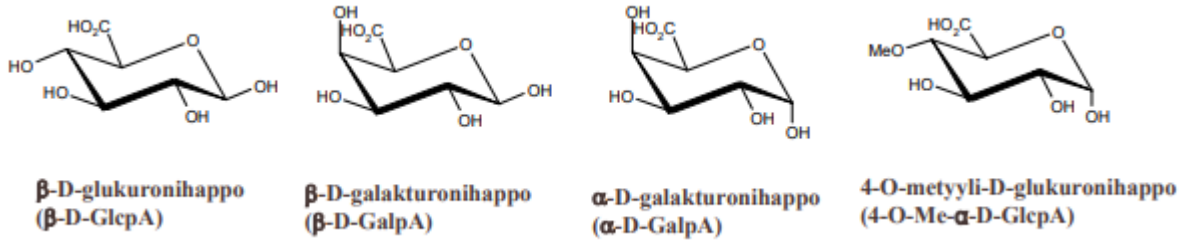



Kuva 7. Hemiselluoosien heksoosit: glukoosi, mannoosi ja galaktoosit.[19]

Hemiselluloosien muihin rakenneosiin kuuluu deoksiheksoosit (Kuva 8) sekä heksuronihapot (Kuva 9). Deoksiheksooseja ovat ramnoosi ja fukoosi. Heksuronihapot ovat nimensä mukaisesti happomuotoisia pyranooseja ja niitä on kahta erilaista glukuronihappoa ja kahta erilaista galakturonihappoa.[19,20]



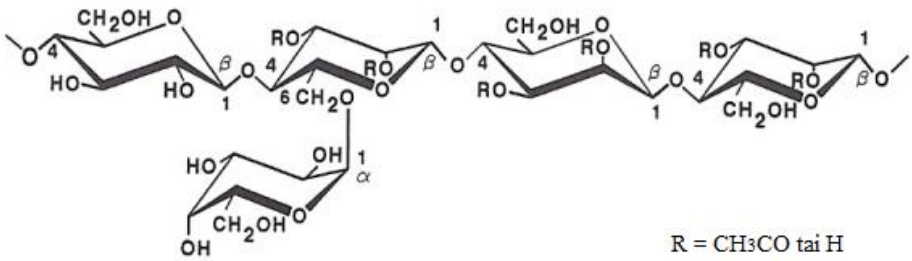

Kuva 8. Hemiselluloosien deoksiheksoosit: ramnoosi ja fukoosi.[19]




Kuva 9. Hemiselluloosien heksuronihapot: glukuroni- ja galakturonihapot.[19]

Kuten Kuva 6-Kuva **9** voidaan nähdä, hemiselluloosien rakenneosat koostuvat pääasiassa pyranoosista, joka on kuusihiilinen rengas, joko α- tai β-muodossa. Havupuiden hemiselluloosat koostuvat tyypillisesti enimmäkseen galaktoglukomannaaneista ja arabinoglukuronoksylaaneista. Lehtipuihin verrattuna havupuissa on vähemmän ksyloosia ja erilaisia asetyylihydroksyyli -ryhmiä.[19,20]

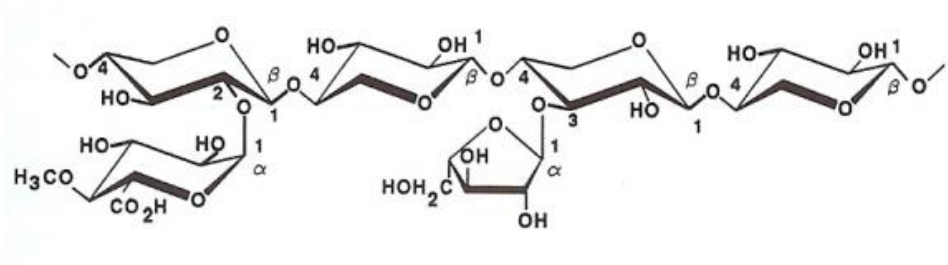
Galaktoglukomannaaneja on havupuun kuiva-aineesta 15-20 % ja arabinoglukuronoksylaaneja 5-10 % puun kuiva-aineesta. Galaktoglukomannaanin pääketjun muodostavat β-D-Glc*p* - ja β-D-Man*p* -yksiköt, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa (1→4)-glykosidisidoksilla. Näihin on kiinnittynyt (1→6)-glykosidisidoksilla väliin myös α-D-Gal*p* -yksiköitä. Galaktoglukomannaanin perusrakenne on esitetty Kuva 10.[19]




Kuva 10. Galaktoglukomannaanin perusrakenne.[19]

Toinen hemiselluloosien yleinen rakenne arabinoglukuronoksylaani puolestaan koostuu (1→4)-glykosidisellä sidoksella toisiinsa sitoutuneista β-D-Xyl*p* -yksiköitä. Näin muodostuneeseen pääketjuun on liittynyt (1→2)-glykosidisellä sidoksella 4-*O*-Me-α-D-Glc*p* -yksiköitä ja (1→3)-glykosidisellä sidoksella α-L-Ara*f* -yksiköitä. Arabinoglukuronoksylaanin perusrakenne on esitetty

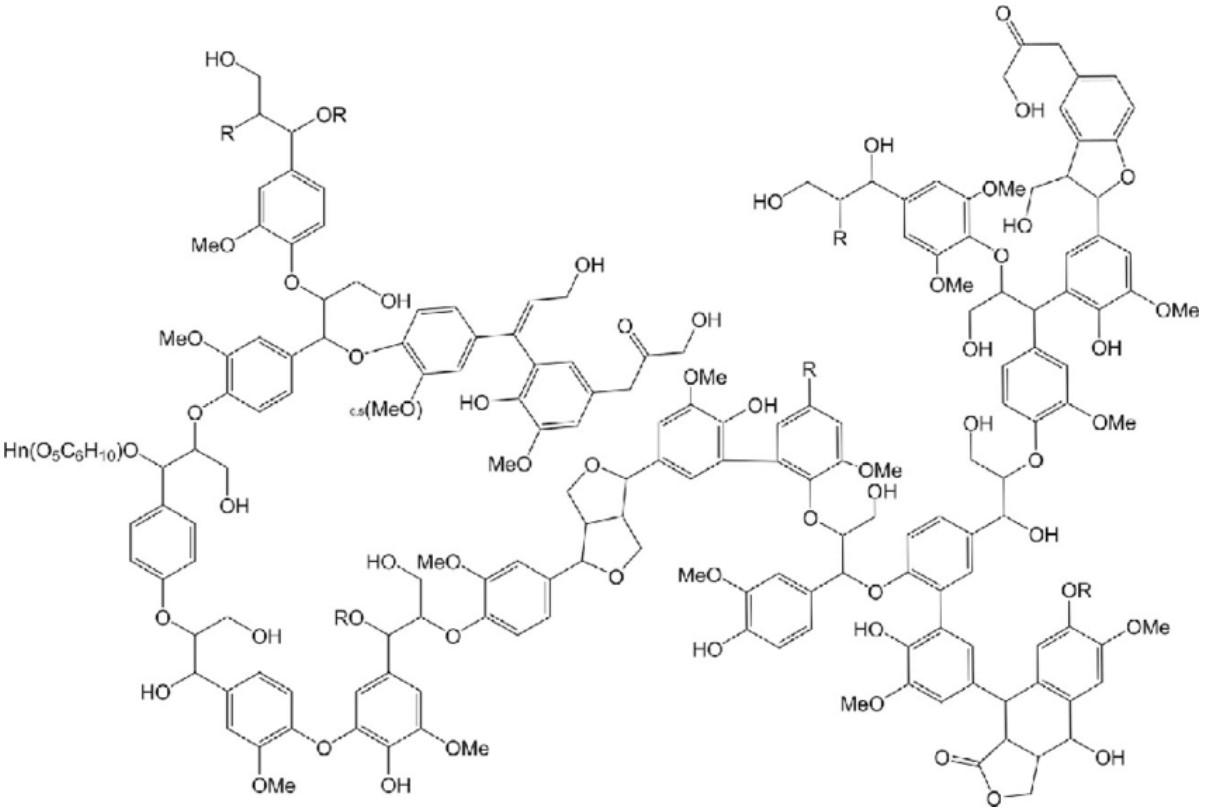
Kuva 11.[19]



Kuva 11. Arabinoglukuronoksylaanin perusrakenne.[19]

### 3.2.3 Ligniini

Ligniini on puun merkittävä ainekomponentti ja se on yksi maailman runsaimmista biopolymeereistä, joita on tutkittu laaja-alaisesti. Ligniini on amorfinen ja hydrofobinen polymeeri, mutta sen monimutkaista ja epäsäännöllistä rakennetta kasvin soluseinässä ei tiedetä, koska sen eristämäinen ilman rakenteen hajoamista on vaikeaa. Kuva 12 on esitetty Freudenbergin esittämä kuusen ligniinin osarakenne vuodelta 1964.[22]

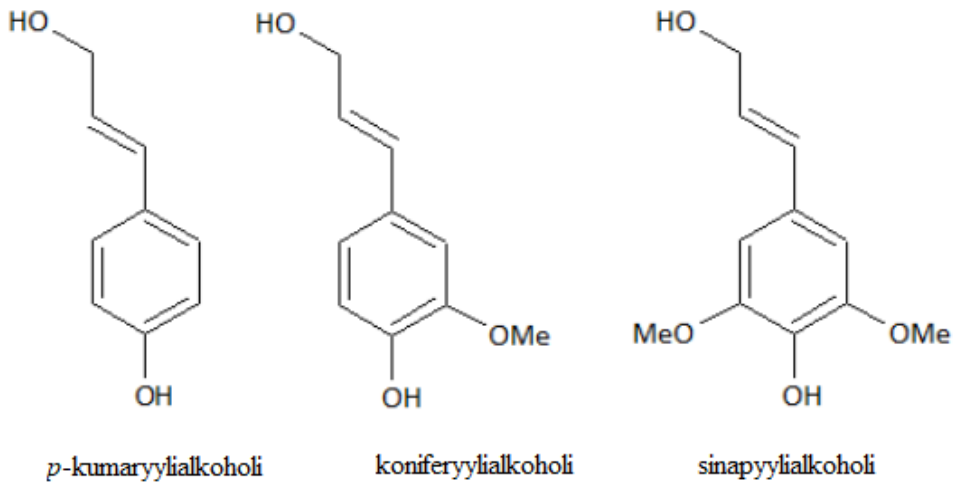



Kuva 12. Freudenbergin malli ligniinin osarakenteesta kuusen soluseinässä.[22]

Ligniinin fyysiset ja kemialliset ominaisuudet vaihtelevat puulajien välillä sekä riippuen sen eristystavasta. Natiivi ligniini voidaan jakaa karkeasti kolmeen ryhmään; havupuu-, lehtipuu- sekä ruoholigniiniin. Näiden lisäksi tunnetaan teollisesti eristettyjä ligniineitä, joita saadaan selluloosan kemiallisten valmistusprosessien sivutuotteina. Erilaiset tekniset ligniinit voidaan jaotella sellunvalmistusmenetelmän mukaisesti. Sellun sulfaattikeitosta saadaan sulfaattiligniiniä, soodakeitosta erotetaan alkaliligniiniä ja happamissa keitoissa muodostuu lignosulfonaatteja. Näiden lisäksi puumassasta voidaan erottaa ligniiniä myös esimerkiksi organosolv- ja hydrolyysimenetelmillä.[19]

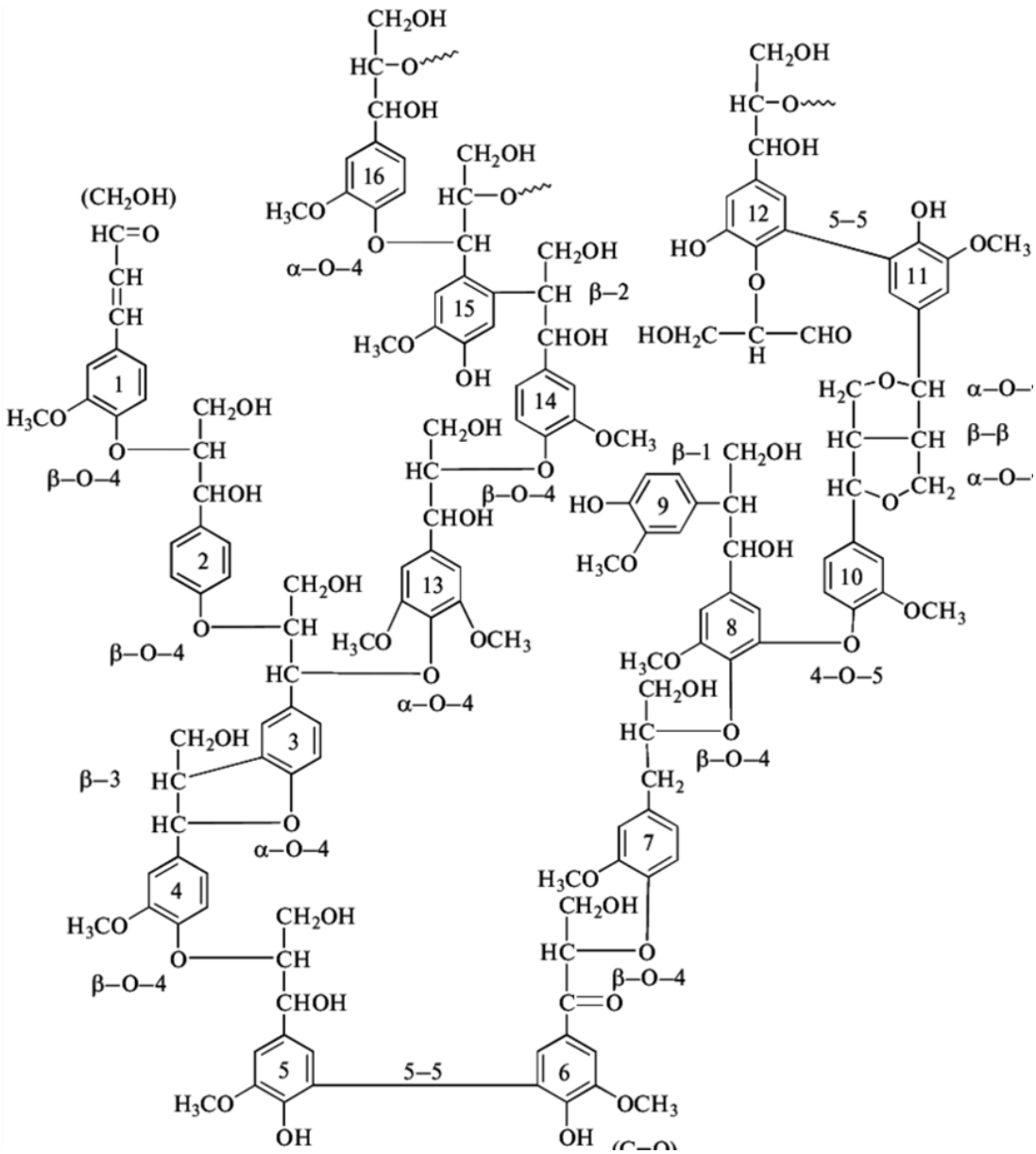
Yleiseltä rakenteeltaan ligniini on vahvoja sidoksia muodostava polyfenoli, jolla on runsaasti haaroittunut rakenne.[23] Ligniini toimii soluseinässä kuitujen sidosaineena antaen kasville mekaanista lujuutta.[24] Puuvartisten ja ruohovartisten kasvien rungossa nähdään eroja ligniinipitoisuudessa; puuvartisilla ligniinipitoisuus on yleensä huomattavasti korkeampi. Erilaisten viljojen ligniinipitoisuus on 12-19 % mutta joillain ruo’oilla, kuten bambulla, ligniinipitoisuus voi olla jopa 21-31 % kuiva-aineesta.[25] Lehtipuilla ligniinipitoisuus on 16-25 % ja havupuilla ligniinipitoisuus on jopa 24-33 % kuiva-aineesta.[23,25]

Ligniini on rakenteeltaan kolmiulotteinen fenolinen polymeeri, jonka biosynteesi pohjautuu kolmeen monomeeriin: *p*-kumaryylialkoholiin, koniferyylialkoholiin ja sinapyylialkoholiin[19,26]. Kuva 13 voidaan nähdä ero aromaattisessa renkaassa olevien metoksiryhmien määrässä; *p*-kumaryylialkoholissa metoksiryhmiä ei ole lainkaan, kun taas koniferyylialkoholissa on yksi metoksiryhmä kolmannessa hiilessä. Sinapyylialkoholissa näitä ryhmiä on puolestaan kaksi; kolmannessa ja viidennessä hiilessä.




Kuva 13. Ligniinin rakennemonomeerit[26]

Ligniini voidaan jaotella rakennemonomeeriensa perusteella. Havupuissa on enimmäkseen koniferyylialkoholista muodostunutta ligniiniä, jolloin ligniiniä kutsutaan guajasyyliligniiniksi. Lehtipuissa puolestaan on saman verran koniferyyli- ja sinapyylialkoholista muodostuvaa ligniiniä[27] ja tätä kutsutaankin guajasyyli-syringyyliligniiniksi. Ruohovartisilla kasveilla esiintyy kaikkia kolmea eri monomeeriä ja tämäntyyppistä ligniiniä kutsutaan *p*-hydroksifenyyli-guajasyyli-syringyyliligniiniksi.[23] Kuva 14 on esitetty osa oksidatiiviseen hajottamiseen perustuvaa ehdotusta kuusen ligniinin rakenteesta.




Kuva 14. Osa kuusen ligniinirakenteesta[28]. Rakenne jatkuu aaltoviivojen kohdalta.

### 3.2.4 Uuteaineet

Uuteaineiksi kutsutaan yhteisesti suurta joukkoa kemiallisesti varsin erilaisia yhdisteitä. Näille yhteistä on se, että niitä voidaan uuttamalla erottaa puuaineksesta. Uuteaineet ovat puulajista riippuvaisia eli erilaisissa puissa on erilaiset uuteainekoostumukset. Uuteaineita on paljon ydinpuussa, kuoressa ja pintapuussa. Tylppy- eli parenkyymisoluissa, jotka sijaitsevat pintapuussa, esiintyy fysiologista pihkaa, joka varastoi ravintoa. Sydänpuun uuteaineet, eli ns. sydänpuupihka, suojaa puuta erilaisia mikrobeja sekä lahoa, vastaan. Lisäksi havupuiden pihkatiehyissä on patologista pihkaa, joka suojaa puuta ulkopuolisilta vaurioilta.

Taulukko 2 on jaoteltu puiden orgaaniset uuteaineet kolmeen pääryhmään, alifaattisiin ja fenolisiin sekä muihin yhdisteisiin.[1,15,19]

Taulukko 2. Puun orgaanisten uuteaineiden luokittelu[19]

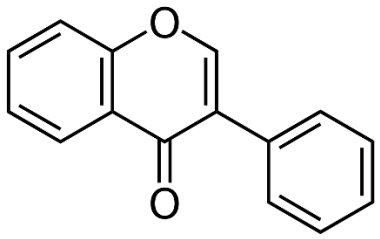
| Alifaattiset yhdisteet | Fenoliset yhdisteet | Muut yhdisteet |
|---|---|---|
| Terpeenit ja terpenoidit (sis. hartsihapot ja steroidit) | Yksinkertaiset fenolit | Sokerit |
| Rasvahappojen esterit (rasvat ja vahat) | Stilbeenit | Sykliset polyolit |
| Rasvahapot ja alkoholit | Lignaanit | Tropolonit |
| Alkaanit | Isoflavonit | Aminohapot |
| | Flavonoidit | Alkaloidit |
| | Proantosyanidiinit | Kumariinit |
| | Hydrolysoituvat tanniinit | Kinonit |
| | | Aminohapot |

Alifaattiset yhdisteet ovat rasvaliukoisia ja niitä voidaan uutta polaarittomilla liuottimilla, kuten heksaanilla tai dikloorimetaanilla. Kuten Taulukko 2 voidaan nähdä, niin alifaattisiin uuteaineisiin kuuluvat terpeenit ja terpenoidit, mukaan lukien hartsihapot ja steroidit. Myös vahat, rasvat, rasvahapot ja alkoholit lasketaan alifaattisiin yhdisteisiin. Näiden lisäksi alifaattisia yhdisteitä ovat myös alkaanit ja muut hapettuneet yhdisteet. Alifaattisista uuteaineista mm. hartsihapot, sterolit ja terpenoidit esiintyvät enimmäkseen havupuiden kuoren pihkatiehyissä.[15,19]

Fenoliset yhdisteet sisältävät yhden tai useamman bentseenirenkaan, johon on suoraan liittynyt vähintään yksi hydroksyyliryhmä (-OH). Puun fenoliset yhdisteet ovat usein kromoforisia ja antavat puulle sen värin. Kyseisiä yhdisteitä esiintyy merkittävästi sekä puun kuoressa että sydänpuussa ja ne toimivat puun puolustuksessa erilaisia mikrobeja ja sieniä vastaan. Puu erittää erilaisia fenoliyhdisteitä myös fyysisen vaurioitumisen seurauksena. Fenolisten uuteaineiden pääryhmiä ovat yksinkertaiset fenolit, stilbeenit, lignaanit, isoflavonoidit ja flavonoidit sekä tanniinit. Tanniineihin lasketaan kondensoituneet tanniinit eli proantosyanidit sekä hydrolysoituvat tanniinit.[15,19]

Fenoliset molekyylit ovat monipuolinen uuteaineryhmä ja niitä esiintyy laaja-alaisesti kaikissa puun eri osissa. Stilbeenejä on erityisesti sydänpuussa ja ne suojaavat puuta lahoamiselta.

Flavonoidit antavat kasveille niiden maun ja kaarnalle sen värin ja auttavat suojaamaan puuta ultraviolettisäteilyltä.[15] Isoflavoneista puolestaan monet ovat biologisesti aktiivisia, toimien antioksidantteina tai jopa antibioottisina aineina. Isoflavonit ovat kasviestrogeeneja ja ne pystyvät sitoutumaan estrogeenireseptoreihin antaen siis saman biologisen vasteen kuin estrogeeni. Isoflavonien perusrakenneosa on Kuva 15 esitetty 3-fenyylikromenoni.[29]




Kuva 15. Isoflavonien perusrakenneosa 3-fenyylikromenoni.[29]

Fenoliset uuteaineet uuttuvat parhaiten poolisiin liuottimiin, kuten asetoniin ja etanoliin. Myös suuri osa niin sanotuista muista uuteaineista on hydrofiilisiä, pieniä molekyylejä ja ne liukenevat myös edellä mainittuihin asetoniin ja etanoliin ja uuttosaantoa voidaan parantaa lisäämällä vettä liuotinseokseen.[30]

### 3.2.5 Kuoren tuotanto ja käyttökohteet

Puun kuorta on hyödynnetty monipuolisesti kautta aikain maapallolla. Pohjois-Amerikan intiaanit valmistivat koivun kuoresta kanootteja ja Tyynenmeren saarilla kuristajaviikunan ja silkkipuun kuoresta on valmistettu tapa-kankaita.[3] Eri puulajien kuoria käytetään myös mausteina, kuten kaikille tuttua kanelia ja juurioluissa käytettäviä sassafraseja. Kiinanpuun kuoresta saatavaa alkaloidia, kiniiniä, on käytetty malarian hoitoon vielä viime vuosiin asti.[31] Kuusenkin kuorelle oli aiemmin erilaisia käyttötarkoituksia, kuten nahan parkitseminen, joka on kuitenkin huomattavasti vähentynyt uusien, synteettisten aineiden tultua markkinoille.[1]

Kuoren korkkikerros voi tietyissä puulajeissa olla erityisen paksu, kuten korkkitammessa. Kuoresta saatavaa korkkia käytetään niin viinipullon korkkeina, ääni- ja lämpöeristeinä ja jopa pelastusliiveissä. Kuoresta voidaan eristää useita erityyppisiä kemikaaleja, esimerkiksi erilaisia flavanoideja, fenoleja, alkaloideja, inositoleja, terpenoideja ja estereitä. Uusia mielenkiintoisia käyttökohteita kuoren johdannaisille ovat erilaiset lääketieteelliset sovellukset.[3] Kuoren eri

tuotteiden ja johdannaisten valtava kirjo ei heijasta pelkästään kuoren rakenteen ja koostumuksen monimutkaisuutta, vaan myös eri lajien kuorien välisiä äärimmäisiä eroja.

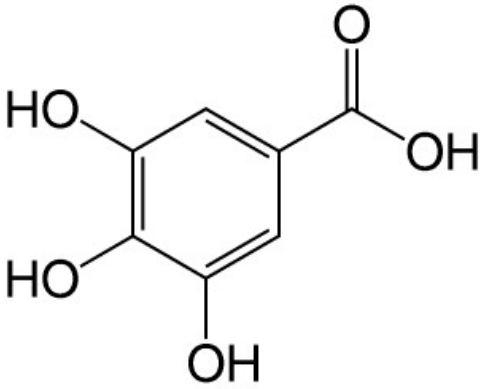
Käytettävää kuorta syntyy sellu- ja metsäteollisuuden sivuaineena ja esimerkiksi sellutehtailla kuorta poltetaan energiaksi. Suomessa puuston vuotuinen kasvu on selvästi poistumaa suurempi. Vuonna 2017 mitattu metsän kasvu oli 107 miljoonaa kuutiometriä vuodessa ja vuotuinen poistuma oli 87 miljoonaa kuutiometriä. Puuston poistuma koostuu hakkuukertymästä, metsään jäävistä runkopuun osista sekä luontaisesti kuolleista puista. Hakkuukertymään lasketaan metsäteollisuuden sekä pientalokiinteistöjen käyttämä puu. Koko hakkuukertymästä 63,3 miljoonaa kuutiometriä oli metsäteollisuuden raaka-aineeksi menevää tukki- ja kuitupuuta[12], josta kuorta on noin 10 % osuus[1].[12]

# 4 TANNIINIT

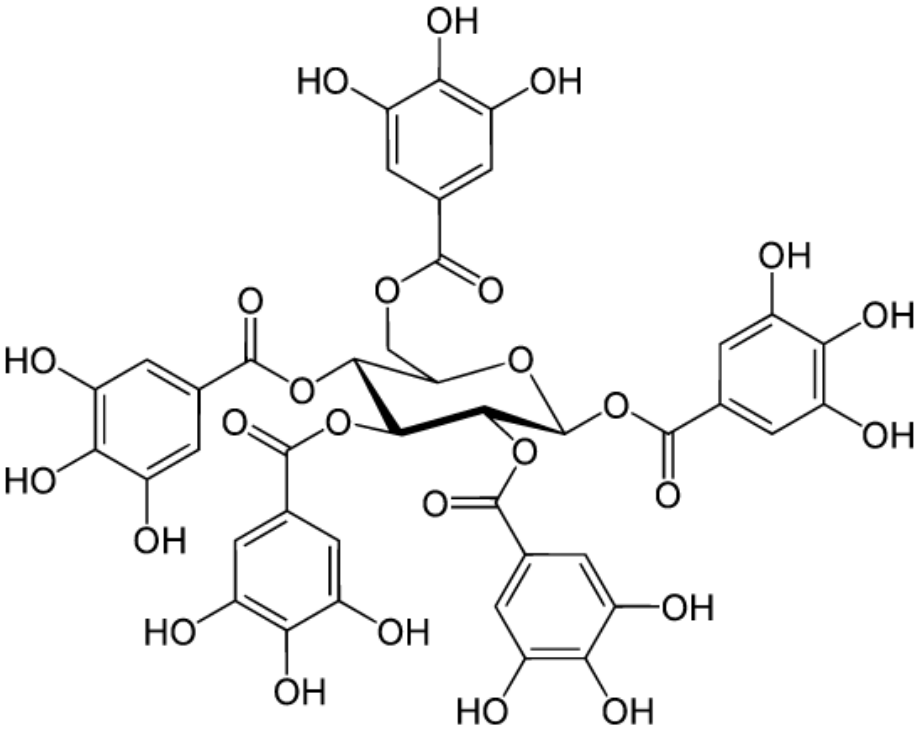
Tanniinit kuuluvat niin sanottuihin toissijaisiin yhdisteisiin yhdessä alkaloidien, terpeenien ja useiden muiden fenolisten yhdisteiden kanssa. Nämä yhdisteet eivät osallistu kasvin metaboliaan ja muuhun energiansiirtoon, mutta niillä on tärkeä osa, mm. kasvin suojautumisessa erilaisia ulkopuolisia uhkia vastaan.[32] Tanniinin ovat vesiliukoisia polyfenolisia yhdisteitä, joiden molekyylipaino on luokkaa 500-3000 Da. Tanniinit erottuvat muista kasvin fenolisista yhdisteistä niiden proteiinien saostuskyvyn ansiosta. Tanniinit kykenevät saostamaan alkaloideja, gelatiinia ja muita proteiineja, mm. eläinten nahassa esiintyviä proteiineja. Tietyt tanniinit kykenevät saostamaan myös erilaisia polysakkarideja.[33]

## 4.1 Hydrolysoituvat tanniinit

Hydrolysoituvat tanniinit ovat gallushapon (3,4,5-trihydroksibentoehappo) johdannaisia. Gallushappo rakentuu bentsoehapon ympärille ja siihen on liittyneenä kolme hydroksyyliryhmää Kuva 16 näkyvällä tavalla. Hydrolysoituvat tanniinit muodostuvat gallushapon esteröityessä ydinpolyoliksi ja näin muodostuneet molekyylit voivat edelleen esteröityä, jolloin saadaan monimutkaisempia hydrolysoituvia tanniineja. Yksinkertaisimmat hydrolysoituva tanniinit ovat gallotanniineja, jotka ovat gallushapon sokeriestereitä. Kuva 17 on esitetty tällainen galloyyliglukoosi, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyyli-β-D-glukoosi, joka on eräs yksinkertaisimmista gallotanniineista.[34]

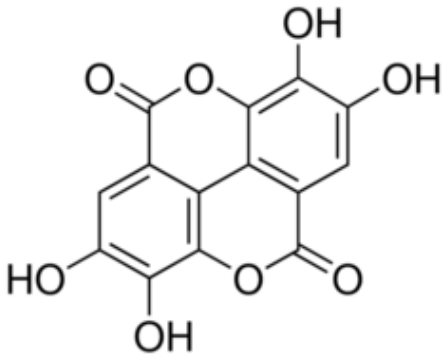



Kuva 16. 3,4,5-Trihydroksibentsoehappo eli gallushappo.[35]

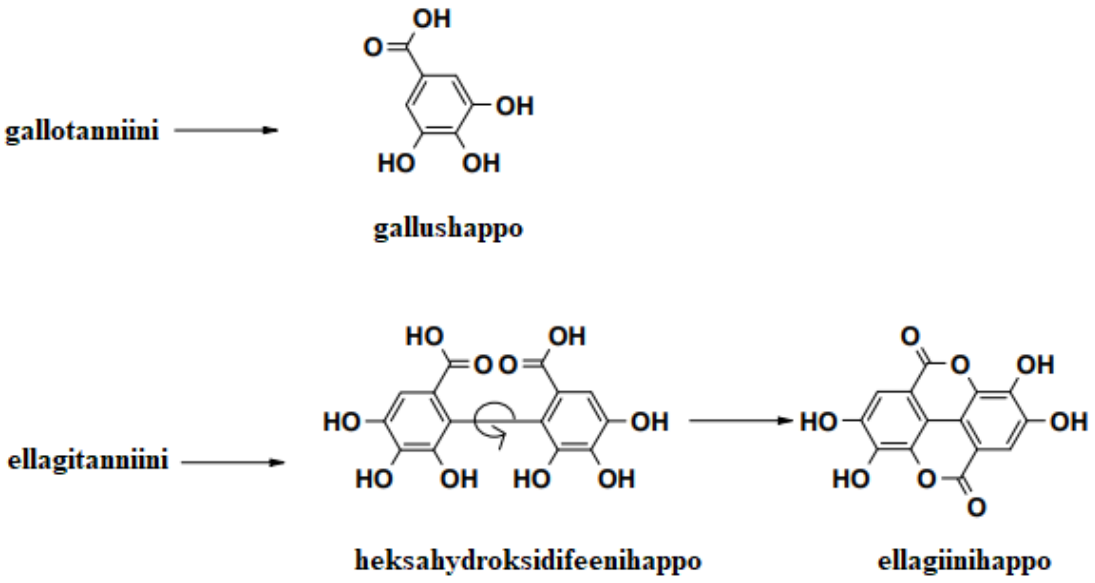



Kuva 17. Yksinkertaisen gallotanniinin (1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyyli-β-D-glukoosin) rakenne.[34]

Ellagitanniinit puolestaan ovat heksahyroksidifeenihapon (HHDP) estereitä. HHDP muodostuu kahdesta gallushaposta ja se helposti laktonisoituu ellagiinihapoksi (Kuva 18) happamissa olosuhteissa Kuva 19 mukaisesti.




Kuva 18. Ellagihapon rakenne.[36]

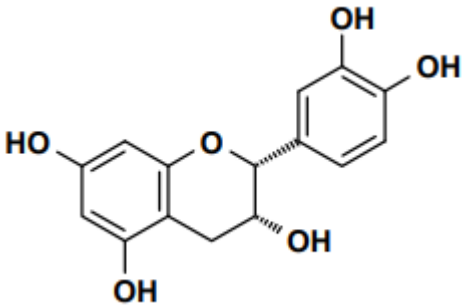


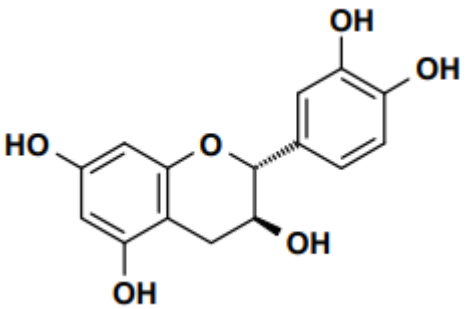

Kuva 19. Gallotanniinit sisätävät gallushappoa ja ellagitanniinit ellagiinihappoa.[32]

Gallo- ja ellagitanniinit hydrolysoituvat helposti ja sen seurauksena niistä lohkeaa gallus- ja ellagihappoja, monosakkarideja ja glukoosia.[32]

## 4.2 Kondensoituneet tanniinit

Kondensoituneet tanniinit eli proantosyaanit ovat polymeerisiä flavanoleja, joiden perusrakenneosia ovat flavan-3-olimonomeerit ja ne eivät sisällä sokeriosaa. Kaksi eniten tutkittua proantosyaania ovat epikatekiini (Kuva 20) ja katekiini (kuva 21).

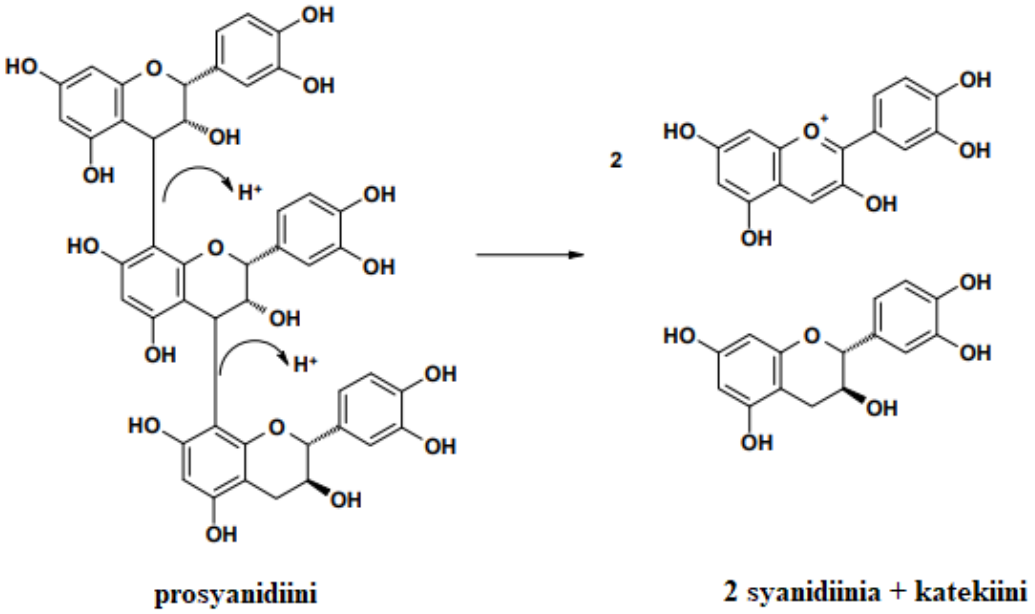



Kuva 20. Epikatekiinin rakenne.

Kuva 21. Katekiinin rakenne.

Proantosyaaneista saadaan antosyaanipigmenttejä hapettavan pilkkoutumisen seurauksena kuumissa alkoholeissa. Tähän reaktioon, joka on esitetty Kuva 22, perustuu hapan butanoli -menetelmä, jota käytetään kondensoituneiden tanniinien UV/Vis-analyyseissä.




Kuva 22. Kondensoituneiden tanniinien hapan butanoli -reaktion periaate.[32]

Hapan butanoli -reaktion lopputuotteet ovat pääteyksikkö, joka yllä olevassa kuvassa on katekiini sekä kaksi värillistä jatkosyksikköä, jotka tässä tapauksessa ovat syanidiineja. Katekiini ja epikatekiinipohjaiset polymeerit tuottavat tässä reaktiossa syanidiinia ja siitä johtuu prosyanidiininimitys. Gallokatekiinit ja epigallokatekiinit puolestaan tuottavat delfinidiinejä. Hapan butanoli -menetelmässä voidaan käyttää nukleofiilistä ansastusainetta, jolloin jatkosyksiköt saadaan derivatisoitua. Lopputuotteet voidaan sen jälkeen erottaa ja määrittää HPLC:llä kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti, jolloin saadaan määritettyä alkuperäisen tanniinin määrää ja rakennetta.[32]

# 5 VEDENPUHDISTUS

Vesi peittää maapallon pinnasta noin 75 % kun lasketaan yhteen kaikki suolainen ja makea vesi, mukaan lukien pohjavesi ja jäätiköt. Merien suolavettä on tästä noin 97 %, joten makeaa vettä on kaikesta vedestä vain noin 3 %.[14] Makeasta vedestä 68,9 % on sitoutunut jäätiköihin, 30,8 % on pohjavetenä ja vain 0,3 % on järvissä, joissa ja muissa pintavesialtaissa[7].

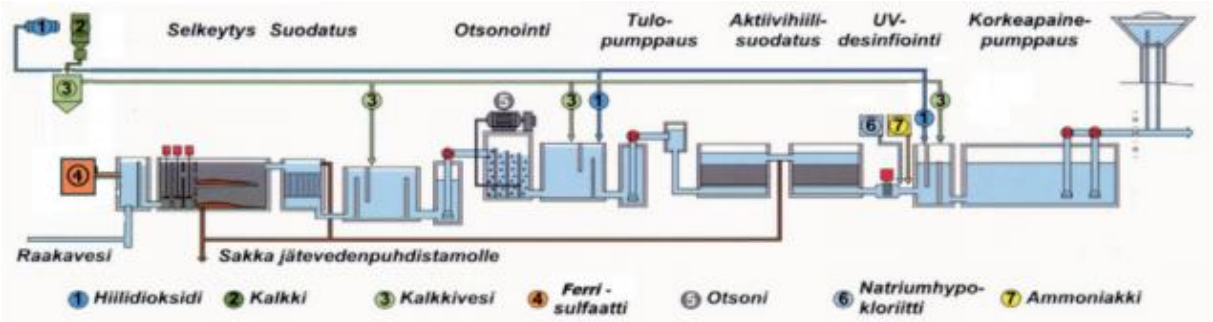
Veden kiertokululla tarkoitetaan veden olomuodon vaihtumista nesteestä vesihöyryksi ja jääksi ja taas nesteeksi ja kaiken kaikkiaan veden jatkuvaa liikettä vesikehässä. Vesikehässä on neljä vaihetta, jotka voidaan nähdä Kuva 23. Sadanta on ilmakehässä tiivistynyttä vesihöyryä, joka näkyy pilvinä ja joka tiivistyy ja sataa alas joko vetenä tai lumena. Valunta puolestaan tarkoittaa, sitä miten pintavedet virtaavat pääasiassa jokina mantereilta mereen. Haihdunta voi tapahtua joko evaporaationa tai kasvien hengityksessä transpiraationa. Haihdunnan seurauksena vesi siirtyy jälleen ilmakehään. Neljäs vaihe on imeytyminen, jossa vesi siirtyy maaperän läpi pohjavedeksi. Vesi voi kulkeutumisena varrella myös varastoitua joksikin aikaa vesistöihin, pohjaveteen, jäätiköihin tai ilmakehään.[14]

Kuva 23. Veden yleinen kierto maapallolla (muokattu).[14]

## 5.1 Vedenpuhdistuksen menetelmät

Käytettävissä olevan makean veden suhteellisen vähyyden vuoksi on tarpeen puhdistaa vettä ja kierrättää jätevesiä. Puhdistettavan veden laadun ja tulevan käyttötarkoituksen mukaan puhdistusmenetelmät vaihtelevat, mutta yleisiä menetelmiä ovat alkalointi, suodatus, desinfiointi ja kemiallinen saostus. Näille kaikille on olemassa useita eri tekniikoita. Suomessa juomavettä valmistetaan pohjavedestä tai pintavedestä. Periaatteessa merivedestäkin voidaan valmistaa juomavettä.[37]

Pohjavesiä ei tarvitse puhdistaa niin paljoa kuin pintavesiä ja usein pohjavesi on sellaisenaan juotavaksi kelpaavaa. Kuva 24 on esitetty Helsingin veden pintavesilaitoksen prosessikaavio, josta nähdään yleiset vedenpuhdistuksen tekniikat. Aluksi veteen lisätään saostuskemikaaleja orgaanisen aineksen sekä raudan poistamiseksi ja vettä hämmennetään sakan muodostamiseksi. Tämän jälkeen sakka poistetaan joko gravitaation avulla altaan pohjalle tai ilmastuksen avulla kelluttamalla altaan pinnalle ja kirkastettu vesi johdetaan eteenpäin. Seuraavassa vaiheessa vesi suodatetaan joko hiekan tai aktiivihiilisuodattimien läpi ja siitä poistuu pienhiukkasia.[37]




Kuva 24. Prosessikaavio Helsingin veden pintavedenkäsittelylaitokselta.[37]

Puhdistettu vesi ja suomalainen pohjavesi ovat lievästi happamia, mikä voi johtaa vesijohtoverkoston syöpymiseen. Tämän estämiseksi vesi alkaloidaan eli sen pH:ta nostetaan. Alkalointi voidaan tehdä esimerkiksi lisäämällä veteen sammutettua kalkkia eli kalsiumhydroksidia ($Ca(OH)_2$), natriumkarbonaattia ($Na_2CO_3$) tai natriumhydroksidia (NaOH). Vesi voidaan myös suodattaa kalkkikivikerroksen läpi, jolloin kalsiumkarbonaatti toimii alkalointikemikaalina.

Veden alkaloinnissa sammutettu kalkki lisätään veteen, jolloin negatiivisesti varautuneita hydroksidi-ioneja vapautuu kaavan 1 mukaisesti.[37]

$$Ca(OH)_2 \leftrightarrow Ca^+ + 2HO^- \quad (1)$$

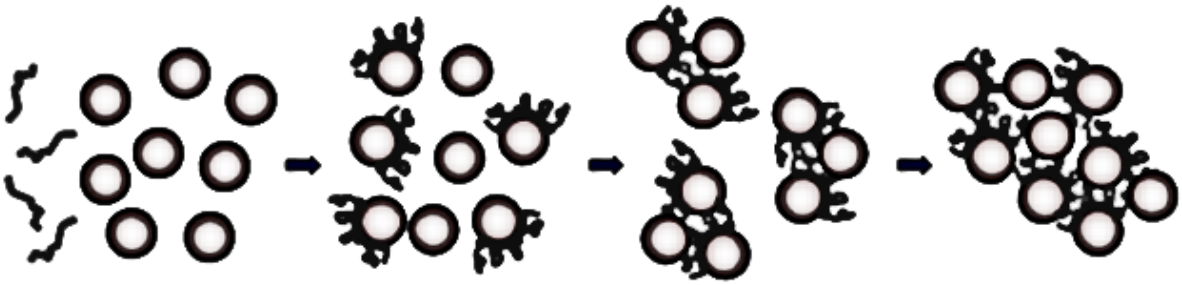
Nämä $HO^-$ -ionit reagoivat happaman veden oksoniumioneiden ($H_3O^+$) muodostaen vettä kaavan 2 osoittamalla tavalla.

$$H_3O^+ + HO^- \leftrightarrow 2H_2O \quad (2)$$

Kun kalsiumhydroksidia lisätään ylimäärä niin veteen jää reaktioon osallistumattomia $HO^-$ -ioneja ja veden pH nousee alkaliseksi. Vedenpuhdistuslaitoksella pH säädetään välille 7,5 – 8,5, jolloin vesi on turvallista juotavaksi, eikä se syövytä vesiputkia. Lopuksi vesi desinfioidaan joko klooraamalla, otsonoinnilla tai UV-valolla. Klooraus rajoittaa mikrobikasvua vielä vedenpuhdistuslaitoksen jälkeen vesijohtoverkostossa.[37]

## 5.2 Vedenpuhdistuksessa käytettävät polymeerit

Kemiallisessa saostuksessa tapahtuu kaksi ilmiötä; koagulaatio ja flokkulaatio. Jätevedessä olevat liukenemattomia pieniä kolloideja on hyvin vaikea poistaa, koska ne ovat usein negatiivisesti varautuneita ja hylkivät toisiaan, mikä johtaa niiden suhteelliseen dynaamiseen stabiilisuuteen vedessä. Koagulointi on yksi yleisimmin käytetyistä tekniikoista sameuden poistamiseen. Koagulointi on prosessi, jossa suspensoituneiden partikkeleiden pintavarausta pyritään pienentämään tai jopa kokonaan poistamaan lisäämällä seokseen koagulanttia. Pintavarausten pienemisen seurauksena partikkelit destabiloituvat ja kykenevät liikkumaan lähemmäs toisiaan. Flokkulaatiossa polymeerit keräävät epävakaat hiukkaset yhteen ja aiheuttavat niiden agglomeraation, jolloin ne saostuvat liuoksesta.[38] Tämä tapahtumasarja on esitetty Kuva 25.



Kuva 25. Suspensiossa olevien partikkeleiden destabiloituminen niiden välille muodostuvien siltojen kautta.[38]

Perinteiset vedenpuhdistuksessa käytettävät koagulantit ovat kolmiarvoisten metallien epäorgaanisia suoloja, jotka voidaan karkeasti jakaa alumiini- ja rautapohjaisiin yhdisteisiin. Alumiinipohjaisiin yhdisteisiin kuuluu alumiinisulfaatti, joka on eräs yleisimmin käytetyistä vedenpuhdistuskoagulanteista maailmassa. Muita yleisiä alumiinipohjaisia koagulantteja ovat alumiinikloridi ja polyalumiinikloridit, jotka ovat kalliimpia kuin alumiinisulfaatti sekä tätä haitallisempia käsitellä ja syövyttäviä.[39] Rautapohjaisista vedenpuhdistuskemikaaleista yleisimmät ovat ferrikloridi ja ferrisulfaatti[40].

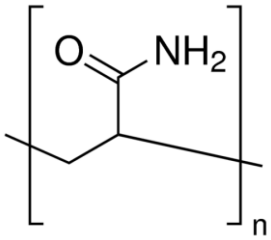
Metallisten koagulanttien ohessa on perinteisesti käytetty myös synteettisiä polymeerejä, kuten polyakryyliamideja. Polymeerien käytöllä voidaan vähentää koagulanttiannoksia, jolloin käsitellyn veden ionikuormitus vähenee. Polymeerien lisäämisen etuna, pelkkien metallisten koagulanttien käyttöön verrattuna, on myös pienempi lietteen määrä, erottumisnopeuden kasvu, parempi tehokkuus alhaisissa lämpötiloissa, minkä lisäksi polymeerit myös vähentävät prosessin pH-riippuvuutta. Metallisten koagulanttien ja synteettisten flokkulanttien käyttöön liittyy kuitenkin mahdollisia ongelmia, joista suurimmat lienevät biohajoavuuden puute ja polymeeritoksisuus. Käsiteltyyn veteen jäävät synteettisten polymeerien epäpuhtaudet syntyvät yleensä reagoimattomista jäljelle jääneistä monomeereistä, reagoimattomista kemikaaleista ja reaktion sivutuotteista. Tämän takia erilaisia ympäristöystävällisiä polymeerejä, kuten kitosaania, tärkkelystä ja tanniineja on tutkittu vaihtoehdoksi synteettisille polymeereille.[41,42]

### 5.2.1 Polyakryyliamidi ja PolyDADMAC

Polyakryyliamidi (PAM) ja polydialkyylidimetyyliammoniumkloridi (polyDADMAC) ovat erittäin yleisiä ensisijaisia koagulantteja ja flokkulantteja jätevedenpuhdistamoilla ympäri

maailman. Esimerkiksi Etelä-Afrikassa 75 % vedenpuhdistamoista käyttää polyDADMAC:a koagulanttina. Molempia käytetään usein yhdessä perinteisten metallisten koagulanttien kanssa.[43]

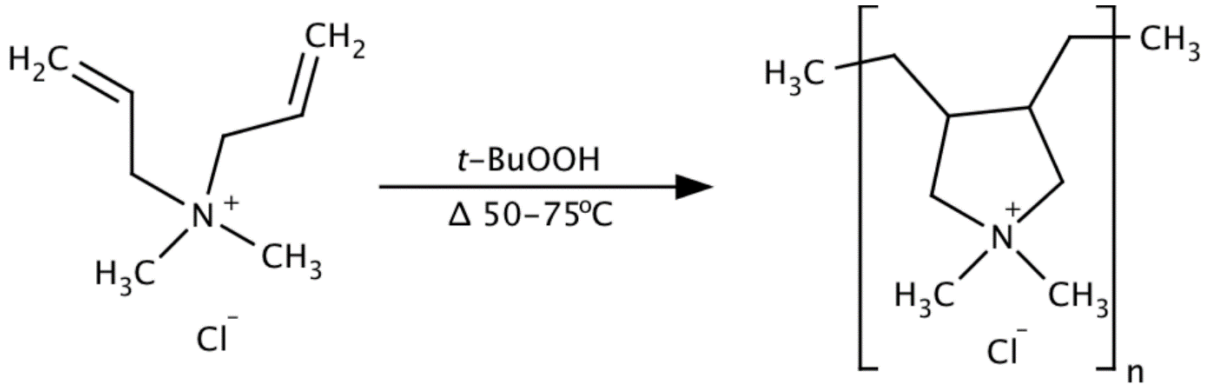
PAM, jonka rakenne voidaan nähdä Kuva 26, muodostetaan polymeroimalla monomeerista akryyliamidia, jota puolestaan saadaan akrylonitriilin ja väkevän rikkihapon reagoidessa keskenään[35]. Polyakryyliamidi on monipuolinen, vesiliukoinen polymeeri, joka voidaan syntetisoida joko yksinkertaisena lineaarisena ketjuna tai monimutkaisena verkkomaisena rakenteena. Jos ketjussa on vain akryyliamidimonomeereja, niin polymeeri on neutraali, mutta eri monomeereja lisäämällä ja vaihtamalla sen varausta voidaan muunnella anionisesta kationiseen.[44]




Kuva 26. Neutraalin polyakryyliamidin monomeerinen rakenneosa.[35]

Jäteveden käsittelyssä tai lietteen vedenpoistossa käytetty PAM päätyy usein täyttömaahan tai biokaasureaktoreihin. Epäorgaanisten mikrobien on huomattu hydrolysoivan PAM-ketjuja tietyissä olosuhteissa. Tietyissä tutkimuksissa on huomattu myös se, että kationinen PAM voi hajota metaaniksi mikrobitoiminnan seurauksena ja ympäristölle haitallisia akryyliamidi- ja akryylihappoyksiköitä voi tällöin vapautua.[44]

PolyDADMAC on lineaarinen ja kationinen polyeeri, jota käytetään laajalti jäteveden puhdistuksen kemiallisessa saostuksessa. PolyDADMAC:n monomeeria, DADMAC:a valmistetaan allyylikloridista ja dimetyyliamiinista. PolyDADMAC:a saadaan DADMAC:sta radikaalisella polymeroinnilla peroksidin toimiessa katalyyttinä Kuva 27 esitetyn reaktion mukaisesti. Reaktio suosii enemmän pyrrolidiini lopputuotetta vaihtoehtoisen piperidiinin sijaan.[45]



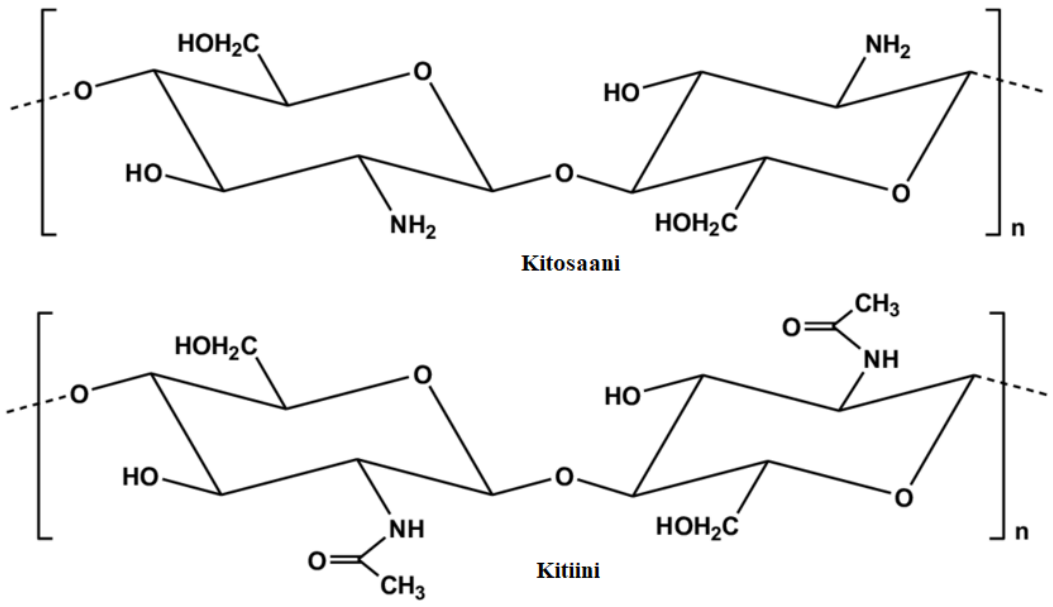

Kuva 27. DADMAC:n polymerointi polyDADMAC:ksi, reaktio suosii pyrrolidiini-muotoa.[45]

PolyDADMAC vähentää lietteen tilavuutta verrattuna epäorgaanisiin koagulantteihin ja on edullinen käyttää. Polymeerijäämien on kuitenkin todettu reagoivan puhdistetun veden kloorin kanssa, jolloin muodostuu *N*-nitronatriummetyyliamiinia (NDMA). NDMA:n muodostuminen juomaveteen on hyvin epätoivottavaa sen karsinogeenisuuden vuoksi.[43,46]

### 5.2.2 Kitosaani

Kitosaani on polykationinen polymeeri, jota saadaan deasetyloimalla äyriäisten kuoren kitiiniä emäksisissä olosuhteissa tai vaihtoehtoisesti entymaattisella hydrolyysillä. Kitosaani on myrkytöntä, biohajoavaa, regeneroitavaa ja sillä on kyky flokkuloida erilaisia molekyylejä. Kitosaania käytetään näiden ominaisuuksiensa vuoksi paljon kationisena flokkulenttina orgaanisten aineiden poistamisessa, mm. viinitilojen jätevedestä.[47] Kitosaania käytetään samojen ominaisuuksien vuoksi myös esim. viinin kirkastimena[48].

Kitosaani muodostuu enimmäkseen *N*-asetyyli-2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköistä ja 2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköistä, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa β-(1→4) -sidoksin. Kitiini puolestaan muodostuu enimmäkseen 2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköistä ja joistain *N*-asetyyli-2-amino-2-deoksi-D-glukoosiyksiköistä.[49] Kuten Kuva 28 nähdään, niin kitiini ja kitosaani muistuttavat rakenteeltaan hyvin paljon selluloosaa. Kitiini onkin maailman toiseksi yleisin polysakkaridi, heti selluloosan jälkeen ja sitä muodostuu vuosittain yli 10 gigatonnia.[50]




Kuva 28. Kitosaanin ja kitiinin rakenne.[49]

Kitosaanin *N*-asetyyli-2-amino-2-deoksi-D-glukoosiketju sisältää runsaasti reaktiivisia hydroksyyli- ja amiiniryhmiä. Kitosaanin ketju sisältää yhden amiiniryhmän ja kaksi hydroksyyliryhmää jokaista kitosaanipolymeerin toistuvaa yksikköä kohti. Jokainen näistä ryhmistä voi saada positiivisen varauksen ja tämä mahdollistaa kitosaanin monipuoliset sovellutukset lääketieteen, biokemian, bioteknologian, kosmetiikan, paperiteollisuuden, elintarviketeollisuuden ja tekstiiliteollisuuden parissa.[51] Kitosaania voidaan näillä aloilla käyttää esim. biologisesti hajoavien kalvojen valmistukseen, proteiinien saostamiseen, nesteiden kirkastamiseen, ruoan säilyvyyden parantamiseen sekä vedenpuhdistukseen.[52,53]

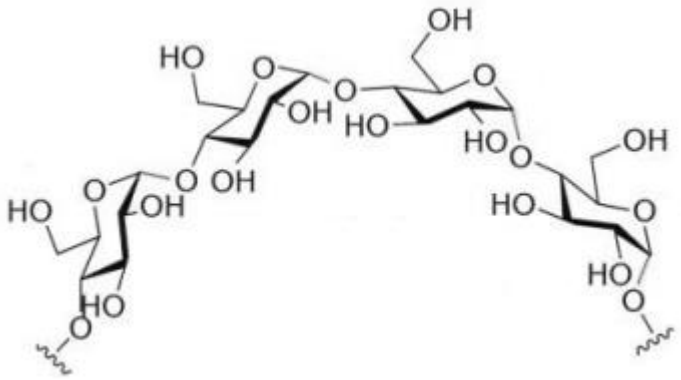
Kitosaanilla on kyky sitoa selektiivisesti raskasmetalleja, minkä on todettu estävän mikrobien toksiinien tuotantoa[54]. Kitosaanilla on sekä koagulantti- että flokkulanttiominaisuuksia biomolekyylejä kohtaan. Osaksi tämä liittyy niiden kykyyn sitoa metalleja. Metallien ja kitosaanin väliset vuorovaikutukset ovat kuitenkin monimutkaisia, eikä niitä ole ymmärretty vielä täysin. Todennäköisesti kitosaanin metalliensitomiskyky on samanaikaisesti adsorptiota, ioninvaihtoa ja kelatointia. Tämän vuoksi kitosaania voidaankin käyttää jäteveden käsittelyyn raskasmetallien ja radioisotooppien poistamiseksi sekä arvometallien talteenottoon. Kitosaanin ja metallin vuorovaikutuksessa tärkeitä tekijöitä ovat polymeroitumisaste, deasetylaatio ja asetyyliryhmien jakautuminen polymeeriketjuun. Näihin ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa erilaisia johdannaisia valmistamalla.[55,56]

### 5.2.3 Tärkkelys

Erilaisten kasvien tärkkelyksistä voidaan eristää ja valmistaa orgaanisia tärkkelysjohdannaisia käytettäväksi koagulanttina ja flokkulanttina. Tärkkelys on yksi maailman runsaimmista luonnollisesti esiintyvistä polymeereistä. Tärkkelys on edullinen, biohajoava ja nopeasti uusiutuva ja sitä on helppo modifioida kemiallisesti. Tällä hetkellä kationinen tärkkelys on yksi yleisimmin tutkituista tärkkelysjohdannaisten koagulanteista.[57]

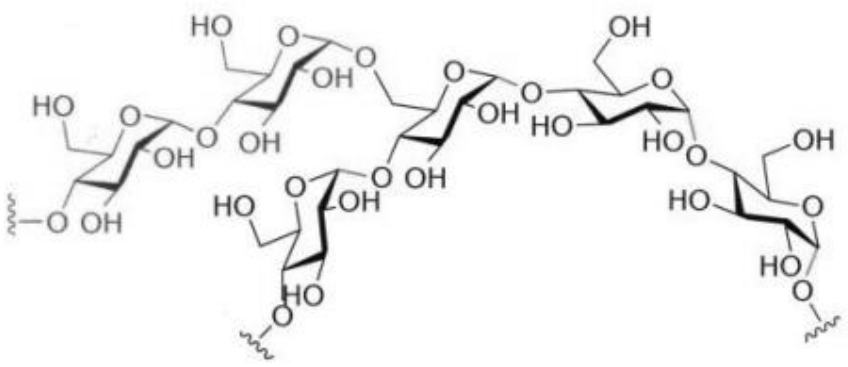
Tärkkelys muodostuu itseasiassa kahden eri polymeerin, amyloosin ja amylopektiinin, seoksesta. Kasvista riippuen tärkkelys on amyloosia on 10-30 %:sti ja amylopektiiniä loput 70-90%, lukuun ottamatta pieniä määriä muita proteiineja, lipidejä ja mineraaleja. Molemmat näistä polymeereista koostuvat α-D-glukopyranoosiyksiköistä (α-D-Glc*p*), jotka ovat sitoutuneet toisiinsa (1→4)-glykosidisilla sidoksilla ja amylopektiinissä myös (1→6)-glykosidisilla sidoksilla. Amyloosin ketju on lineaarinen ja kiertynyt vetysidoksilla spiraalimaiseksi α-heliksiksi, kun amylopektiinilla on puolestaan haaroittunut ketju.[58]

Amyloosi ja selluloosa ovat isomeerejä, joilla on erilainen glykosidisidoksen suuntautuminen. Selluloosan glykosidiset sidokset ovat ekvatoriaalisia (Kuva 5), joista rakentuu tasosuuntainen ketju. Amyloosilla on vuoritellen aksiaalinen ja ekvatoriaalinen sidos, jolloin muodostuu kierteinen rakenne (Kuva 29). Toisin sanoen amyloosin rakenneyksiköt ovat sitoutuneet toisiinsa *α*-(1→4)-sidoksilla eli renkaan C-1:ssä oleva hydroksyyliryhmä suuntautuu alaspäin, kun selluloosa puolestaan on sitoutunut β-(1→4)-sidoksilla. Amyloosilla yhden heliksin kierre muodostuu aina kuudesta α-D-Glc*p* -yksiköstä.[58]




Kuva 29. α-D-Glc*p* -ketju, jossa ensimmäisen hiilen sidos on alaspäin suuntautunut, mikä johtaa ketjun kiertymiseen.[58]

Amylopektiini muodostuu samanlaisesta α-D-Glc*p* -ketjusta kuin amyloosikin, mutta *α*-(1→4)-sidoksien lisäksi amylopektiini haaroittuu noin kahdenkymmenen glukoosiyksikön välein (1→6)-glykosidisilla sidoksilla. Amylopektiinin rakenne haaroittumisineen on esitetty Kuva 30. Haaraketjut ovat jakaantuneet lyhyisiin ketjuihin, joiden polymeraatioaste (DP) on noin 15, ja tätä pidempiin ketjuihin, joiden DP on noin 45. Yksittäiset sivuketjut ovat kierteisiä ja parittaiset sivuketjut ovat kaksoiskierteisiä. Tämän järjestyneisyyden vuoksi amylopektiini on kiteistä tärkkelyksen täysrakenteessa, kun amyloosiosat ovat amorfista.[58]



Kuva 30. Amylopektiinin rakenne, mikä haarautuu (1→6)-glykosidisin sidoksin.[58]

Tärkkelystä voidaan helposti muokata kemiallisesti, mutta monet näistä kemikaaleista, esim. formaldehydi, voivat olla ympäristölle haitallisia. Tämän vuoksi on testattu myös muokkaamatonta tärkkelystä jäteveden puhdistuksessa. Chee tutki muokkaamatonta riisitärkkelystä yhdessä alumiinisulfaatin kanssa palmuöljyteollisuuden jätevesien käsittelyyn. Muokkaamattoman riisitärkkelyksen ansiosta alumiinisulfaatin annostusta voitiin vähentää noin 48 % ja laskeutumisaika pieneni noin 59 %. Muokkaamattoman riisitärkkelyksen ja alumiinisulfaatin avulla jäteveden kiintoainesta (TSS) pystyttiin poistamaan noin 86 % ja orgaanisesta eli eloperäistä aineesta (COD) noin 49 %.[59]

### 5.2.4 Tanniinit

Tanniinit ovat hyvä vaihtoehto vihreän kemian raaka-aineeksi, koska ne ovat täysin kasviperäisiä uutteita. Tanniineja esiintyy monissa kasvilajeissa ja niiden uuttaminen onnistuu yksinkertaisillakin menetelmillä ja niillä on reaktiivinen, fenolinen rakenne, ne sitovat proteiineja ja voivat toimia antioksidantteina. Tanniinien monipuolinen kemiallinen rakenne

mahdollistaa niiden hyötykäytön useissa eri sovellutuksissa. Tällä hetkellä tanniineja käytetään nahan parkituksessa, erilaisten liimojen valmistuksessa, juomien valmistuksessa, eläinten rehussa ja monissa muissa sovellutuksissa. Viime aikoina on tehty myös tutkimusta mahdollisuudesta käyttää tanniineja erilaisten biopohjaisten vaahtojen, puunsuoja-aineiden, korroosionestoaineiden, polyuretaanipinnoitteiden, epoksiliimojen ja jopa teflonpinnoitteiden sideaineiden valmistuksessa.[6]

Tanniinien käyttöä flokkulanttina vedenpuhdistuksessa on myös tutkittu laajasti. Tanniinien kyky sitoa metalleja, kuten lyijyä, kadmiumia ja kuparia on nostanut kiinnostusta niiden soveltuvuudesta jalometallien talteenotossa. Hylätyt elektroniset materiaalit, kuten tietokoneet, matkapuhelimet, tulostimet ja televisiot, johtavat erilaisten raskasmetalli-ionien huomattaviin pitoisuuksiin monien teollisuudenalojen ja maaperän jätevedessä. Raskasmetallit ovat ympäristöriski ja niillä on taipumusta kertyä eläviin organismeihin, mutta ne ovat myös kalliita ja niiden kierrätettävyys olisi myös taloudellisesti kannattavaa.[60]

Raskasmetalleja voidaan ottaa talteen jätevesistä useilla erilaisilla metodeilla, kuten sakkaamalla, ionivaihdolla ja suodattamalla. Useat näistä menetelmistä ovat kuitenkin kalliita verrattuna jätevesien metallipitoisuuksiin. Tanniineja voidaan eristää useista eri lähteistä suhteellisen pienin raaka-aine- ja prosessikustannuksin.[60] Tanniinipohjaista absorbenttigeeliä on menestyksekkäästi tutkittu lyijyn talteenottoon teollisuuden jätevesistästä.[61] Vastaavaa tanniinipohjaista geeliä on tutkittu myös ympäristöystävällisempään kromin talteenottoon,[62] samoin kuin myös palladiumin.[63] Tanniinien on todettu absorboivan raskasmetalleja melko tehokkaasti myös ilman gelatointia pakatussa kolonnissa jossa oli tanniinien lisäksi myös muokkaamatonta puun kuorta.[64]

Useista eri puulajeista uutettuja tanniinipohjaisia koagulantti-flokkulantteja on tutkittu hyvin tuloksin niin pinta-aktiivisten aineiden poiston, värinpoiston, kunnallisten jätevesien puhdistamisen kuin pintavesien selkeyttämisen yhteydessä.[65] Tanniinipohjaisia vedenkäsittelykemikaaleja voidaan käyttää yksistään tai yhdessä esimerkiksi mineraalikoagulanttien, kuten $Al_2(SO_4)_3$:n kanssa. Tanniinipohjaisten koagulantti-glokkulanttien on todettu olevan erinomaisia veden sameuden poistamisessa, joissain tutkimuksissa on päästy jopa 100 % sameudenpoistoon. Myös BOD5- ja COD-testien tuloksissa on päästy samoihin, tai jopa parempiin, tuloksiin kuin perinteisillä vedenpuhdistuskemikaaleilla. Tanniinien koaguloimis- ja flokkuloimiskyky ei ole lämpötilariippuvainen ja sen toiminta on suhteellisen vakaata riippumatta sekoitusnopeudesta ja ajasta.[66-68] Pohjoismaisten puulajien tanniinien etu verrattuna nyt kaupallisesti käytettyihin

akaasia ja quebracho-puun tanniineihin on niiden suurempi reaktiivisuus ja korkeampi viskositeetti[69].

# 6 KIINTEÄN AINEEN UUTTO

Kiinteän aineen nesteuutto on näytteen valmistusprosessi, jossa siirretään haluttu komponentti kiinteästä aineesta nestefaasiin uuttamisen avulla. Nesteseokseen liuenneet tai suspensoidut yhdisteet erotetaan muista seoksissa olevista yhdisteistä niiden fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien mukaisesti. Kiinteän aineen uuttoa käytetään yleensä näytteen väkevöintiin ja puhdistukseen.[70,71]

Uuttaminen kiinteästä aineesta tapahtuu kolmessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa liuotin ja kiinteä aine saatetaan kosketuksiin toistensa kanssa aineensiirron aikaansaamiseksi. Tällöin tapahtuu faasimuutos, jossa uutettava aine liukenee liuottimeen. Toisessa vaiheessa, liuotuksen jälkeen, liuennut aine erotetaan jäljellä olevasta kiinteästä aineesta. Viimeisessä vaiheessa uutettu aines pestään tarpeettoman aineksen poistamiseksi. Uuttoasteeseen vaikuttaa useat tekijät, kuten hiukkaskoko, lämpötila, liuotin sekä nesteen sekoittaminen.[72]

## 6.1 Partikkelikoko

Materiaali lähellä pintaa liukenee ensin liuottimeen, jolloin kiintoaineeseen jää huokoinen rakenne. Uuttonopeus hidastuu mitä syvemmälle liuottimen on tunkeuduttava saavuttaakseen liukeneva aine. Kiinteän aineen uutossa liukeneminen tapahtuu nesteen virratessa huokoisen materiaalin läpi tai partikkeleiden väliin. Aluksi neste virtaa hiukkasten väliseen avoimeen tilaan tai huokosiin. Neste virtaa kiinteän aineen pinnan yli, mikä aiheuttaa kitkahäviön ja johtaa painehäviöön. Paineen väheneminen aiheuttaa liuottimen virtauksen huokoseen, joka puolestaan lisää kitkahäviötä ja painehäviötä. Näin ollen kiinteän aineen ja nesteen välinen rajapinta-ala kasvaa uuton aikana.[70,72]

Tähän massansiirtoprosessiin voidaan vaikuttaa partikkelikoolla. Mitä pienempiä kiinteän aineen partikkelit ovat, sitä suurempi on reaktiopinta-ala nesteen ja kiinteä aineen välillä ja sitä suurempi on massansiirtonopeus. Uuttamista voidaan nopeuttaa partikkelikoon pienentämisen lisäksi myös sekoittamalla seosta. Sekoitus kasvattaa kiinteän aineen ja liuottimen kontaktia

tuomalla uutta, vähemmän väkevöitynyttä liuotinta aineiden rajapintaan, mikä kasvattaa massansiirtoa. Sekoitus voi myös hajottaa kiinteää ainetta, mikä lisää jälleen faasien välistä pinta-alaa.[70,72]

## 6.2 Liuottimet

Useita erilaisia liuottimia voidaan käyttää eri komponenttien uuttamiseen puusta. Liuottimen valinta on erityisen tärkeää, koska jokaisella liuoksella ja niiden seoksella saadaan oma, erilainen uutteensa. Yleisimmin käytettyjä liuottimia ovat vesi, etanoli, bentseeni, metanoli, asetoni ja niiden erilaiset seokset sekä erilaiset alkaanit. Aiemmin käytetyn karsinogeenisen dikloorimetaanin sijasta käytetään nykyään useimmiten asetonia, jolla ei ole vastaavia terveys- ja ympäristöhaittoja.[30]

Taulukko 3 esitetään eräs tapa puun uuteaineiden jaottelulle niiden liukoisuuden perusteella. Taulukosta voidaan nähdä, että veteen liukenemattomat, lipofiiliset yhdisteet liukenevat parhaiten neutraaleihin liuottimiin, kuten dikloorimetaaniin ja alkaaneihin. Kuoresta uutettavat tanniinit liukenevat puolestaan paremmin polaarisiin liuottimiin, kuten asetoniin ja etanoliin ja tietyssä määrin myös veteen. Asetoni ja etanoli ovat molemmat melko hyviä yleisliuottimia erilaisille uuteaineille.[30]

Taulukko 3. Puun uuteaineiden jaottelu liukoisuuden perusteella (mukailtu)[30]

| | Alkaanit | Dikloorimetaani | Asetoni | Etanoli | Vesi |
|---|---|---|---|---|---|
| Hartsihapot, monoterpenoidit, muut terpenoidit | +++ | +++ | +++ | ++ | - |
| Rasvat, rasvahapot, steryyliesterit, sterolit | +++ | +++ | +++ | ++ | - |
| Fenolit | - | ++ | +++ | +++ | + |
| Glykosidit, sokerit, tärkkelys, proteiinit | - | - | ++ | + | +++ |
| Epäorgaaniset yhdisteet | - | - | + | + | ++ |

**+++** = *helposti liukeneva,* **++** = *liukeneva,* **+** = *hieman liukeneva,* **-** = *ei liukene*

## 6.3 Lämpötila

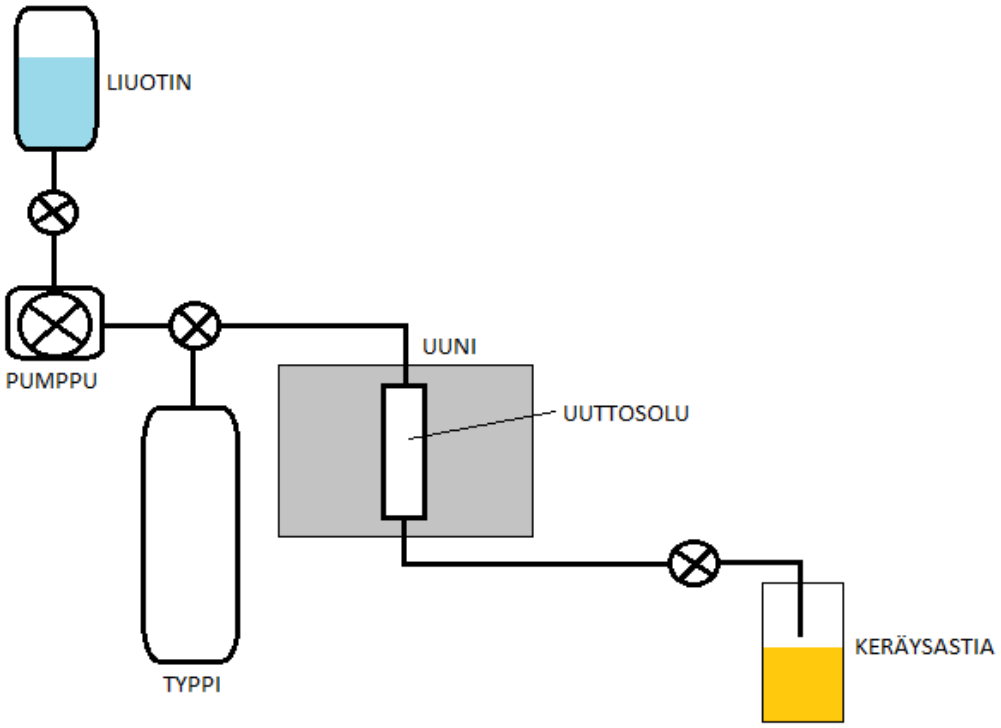
Yleisesti ottaen uuttonopeus paranee lämpötilan nousun myötä. Uuttonopeuden kasvaminen lämpötilannousun myötä johtuu osittain diffuusiokertoimen suurenemisesta. Lämpötila vaikuttaa myös kiinteän aineen liukenevuuteen sekä sen sekoittuvuuteen liuottimen kanssa. Liuottimen viskositeetti laskee lämpötilan noustessa ja näin liuotin pääse tunkeutumaan kiintoaineeseen helpommin, jolloin uuttamisnopeus kasvaa.[72]

Lämpötila voi vaikuttaa uuttumisnopeuteen monilla muillakin tavoilla kuin vain reaktiokinetiikkaa muuttamalla ja vaikuttamalla liuottimen viskositeettiin. Lämpötila vaikuttaa myös liukenevuuteen, höyrynpaineeseen, liuenneen aineen diffuusiokykyyn sekä reaktiotasapainoon.[72]

## 6.4 Nopeutettu liuotinuutto

ASE -uutto eli nopeutettu liuotinuutto (Accelerated Solvent Extraction) on Dionexin kehittämä uuttomenetelmä kiinteille ja puolikiinteille näytteille. ASE -uutto on kiinteä-nesteuutto, joka tapahtuu korotetussa paineessa (500 – 3000 psi) ja jopa lämpötilassa 200 °C.[73] Uuton nopeus ja tehokkuus perustuu korkeaan lämpötilaan, joka nopeuttaa uuttokinetiikkaa. Korkeassa lämpötilassa yhdisteiden desorptio matriisissa nopeutuu, mikä parantaa liukoisuutta uuttoliuottimeen. Uuttosolun sisällä on korkea paine, jonka ansiosta kuumennettu liuotin pysyy nestemuodossa. Tämä auttaa myös pakottamaan liuottimen näytematriisiin.[74]

Perinteisiin kiinteä-neste -uuttomenetelmiin, kuten Soxhlet -uuttoon, verrattuna ASE -menetelmällä saadaan lyhennettyä uuttoaikaa huomattavasti sekä liuotinmäärään vähennettyä merkittävästi.[73,74] ASE -uutolla voidaan esimerkiksi kuusen kuoren etanoliuuton uuttoaikaa lyhentää 40 minuuttiin vaikka uuttosaanto pysyy vastaavana kuin 540 minuutin Soxhlet -uutossa.[75] ASE-laitteiston rakenne on esitelty Kuva 31.[73]




Kuva 31. ASE-laitteiston periaatekaavio.[73]

ASE-uuttomenetelmässä liuotin virtaa kuumennettuun uuttosoluun, jossa tapahtuu paineistettu, staattinen uuttovaihe. Uuttosolu näkyy kuvassa 31 keskellä uunia. Uuttosolut ovat yleensä teräksisiä ja rakenteeltaan vahvoja, jotta ne kestävät uutossa käytetyn, jopa 3000 psi:n paineen. Uuttosoluja on eri kokoisia, yleensä tilavuudeltaan 50-100 mL. Aluksi laitteiston uuni lämmitetään haluttuun lämpötilaan, minkä jälkeen uuttosolu asetetaan paikoilleen. Uuttosolua ei tule lämmittää ennen liuottimen lisäämistä, koska tällä voi olla vaikutusta saantoa vähentävä vaikutus helposti haihtuvien komponenttien osalta. Liuotinta pumpataan uuttosoluun vakiopaineella 7-20 MPa kunnes uuttosolu on täynnä.[73]

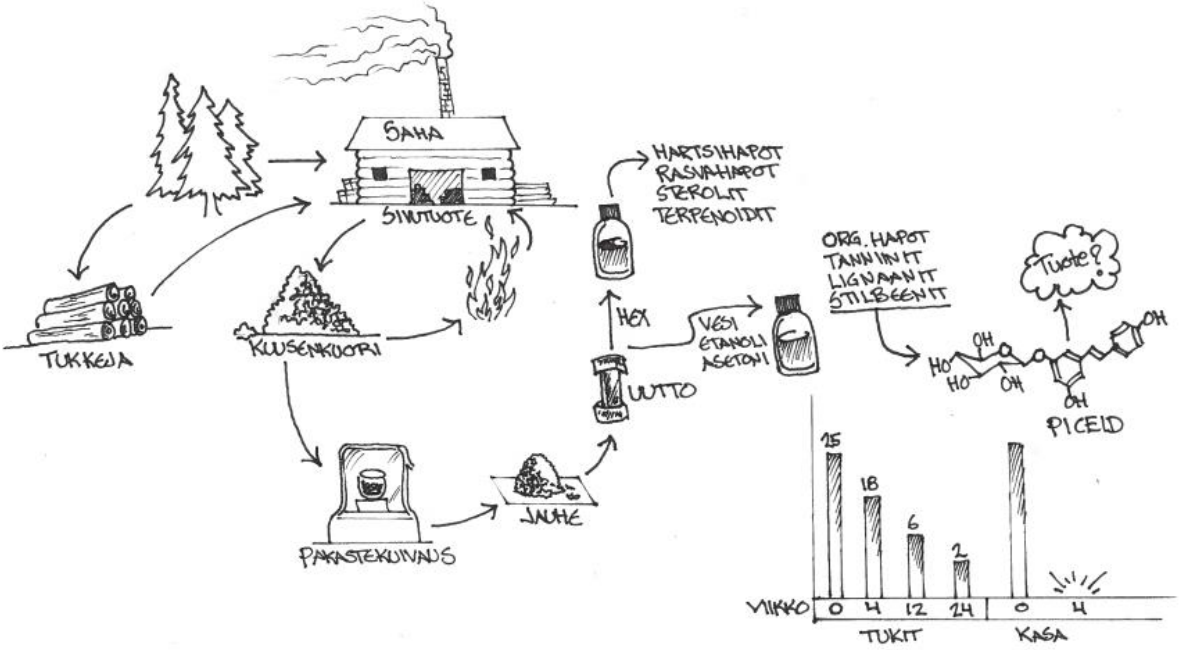
Staattinen uuttovaihe tapahtuu paineistetussa tilassa, jotta liuotin pysyy nestemäisenä korkeassa lämpötilassa. Staattinen uuttoaika voi vaihdella muutamasta minuutista useaan tuntiin riippuen uutettavasta matriisista ja uutettavista komponenteista. Staattisen uuttovaiheen päätteeksi paine lasketaan uuttosolusta ulostuloventtiilin avulla, jolloin liuotinta vapautuu vastaanottoastiaan. Uuttosolun pumpataan mitattu tilavuus, yleensä 40-60 % näytekammion tilavuudesta, jolla näytematriisia huuhdellaan. Lopuksi näytekammio ja putkisto huuhdellaan typpikaasulla, jolloin saadaan kaikki uutettuja aineita sisältävä liuotin vastaanottoastiaan.

# KOKEELLINEN OSA

## 7 TYÖN TARKOITUS

Tämän työn tarkoitus oli optimoida kuusen kuumavesiuutto vastepintamallia hyväksi käyttäen. Kuumavesiuutto tehtiin ASE -laitteistolla ja optimoitavina muuttujina oli kuorijauheen raekoko, staattinen uuttoaika sekä lämpötila. Myöhemmässä vaiheessa myös kuoren erilaisten kuivausmenetelmien eroja tarkasteltiin samalla mallinnusalueella. Optimoitua uuttomenetelmää käytettiin tutkittaessa varastoinnin vaikutusta kuoren tanniinipitoisuuksiin. Mallinnuksesta saatuja löydöksiä lämpötilan, uuttoajan ja raekoon vaikutuksesta uuttosaantiin tultiin myöhemmin käyttämään myös pohjana pilottitehdaskokeille.

Kuva 32 esitellään kokeellisen osuuden tutkimusasetelma. Kuuset kaadettiin metsässä ja karsittiin tukeiksi, jotka kuljetettiin sahalle. Sahalla tukit kuorittiin ennen niiden jatkokäsittelyä. Enimmäkseen kuorta poltetaan sahan omaan energian tuotantoon. Kuoren koostumusta tutkittiin kylmäkuivatusta kuorihakkeesta.




Kuva 32. Kuusen kuoren käsittely, uutto ja analyysi.

Kylmäkuivauksen jälkeen kuori jauhettiin ja uutettiin ASE -laitteistolla. Aluksi voidaan tehdä heksaaniuutto, jolloin uuttuvat rasvaliukoiset uuteaineet, kuten hartsi- ja rasvahapot, sterolit sekä terpenoidit. Polaariset yhdisteet voidaan uuttaa veteen, etanoliin, asetoniin tai näiden seokseen. Polaarisilla liuottimilla uuttuvat esimerkiksi orgaaniset hapot, tanniinit, lignaanit

sekä stilbeenit. Tässä työssä heksaaniuuttoa ei tehty, koska haluttiin käyttää liuottimena ainoastaan vettä. Uutteista tehtiin kvalitatiivisia ja kvantitatiivisia analyysejä, joilla selvitettiin mitä uutteissa on ja kuinka paljon. Varastointikokeita analysoimalla saatiin selville, kuinka erilaiset uuteaineet hajosivat varastoinnin seurauksena ja millä aikavälillä.

# 8 MATERIAALIT JA METODIT

## 8.1 Reagenssit

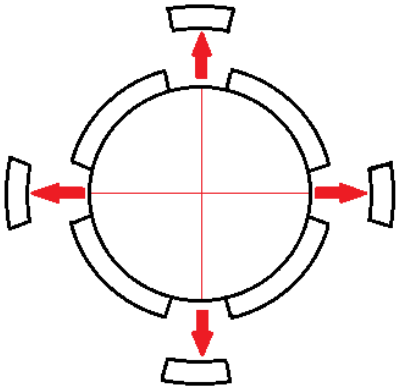
Taulukko 4 on esitetty kaikki työssä käytetyt reagenssit ja liuottimet. Työssä käytetty vesi oli laadultaan ultrapuhdasta (UHQ-vesi).

Taulukko 4. Reagenssit ja liuottimet menetelmien mukaan jaoteltuna

| **Reagenssi / Liuotin** | **Valmistaja** | **Puhtaus** |
|---|---|---|
| **Tanniinin puhdistus** | | |
| Heksaani | Acros Organics | 98 % |
| Urea | Sigma-Aldrich | >99 % |
| Asetoni | VWR Chemicals | 37 % |
| Absoluuttinen etanoli | Altia Industrial | ≥ 99.5 p-% |
| **Folin-Ciocalteu – menetelmä** | | |
| 3,4,5-trihydroksibentsoehappo (gallushappo) | Acros Organics | 98 % |
| Folin-Ciocalteu -reagenssi | Sigma-Aldrich | 2 M |
| Natriumkarbonaatti | VWR Chemicals | 37 % |
| **Hapan butanoli – menetelmä** | | |
| Asetoni | VWR Chemicals | 100,0 % |
| Rauta (III) ammoniumsulfaatti | Sigma-Aldrich | ≥ 99 % |
| 1-butanoli | VWR Chemicals | 99,8 % |
| Vetykloridihappo | VWR Chemicals | 37 % |

## 8.2 Kuorinäytteet

Kuorinäytteet otettiin yhteensä viidestä tyvitukista ja viidestä välitukista. Näytteenottokohdat olivat neljässä kohdassa runkoa ja kuorta kerättiin koko rungon pituudelta. Kuva 33 on esitetty nuolilla näytteenottokohdat tukin tyvipäästä päin katsottuna.



Kuva 33. Näytteenottokohdat tukin tyvipäästä katsottuna.

Näytteenoton jälkeen tyvitukeista otetut näytteet sekoitettiin keskenään ja välitukeista otetut näytteet sekoitettiin keskenään. Tyvi- ja välitukeista otetut näytteet pidettiin erillään toisistaan, jotta myöhemmin voitaisiin arvioida, muuttuiko tanniinien pitoisuus rungon eri korkeuksilla. Sekoituksen jälkeen näytteet murskattiin ulkolämpötilassa (pakkasessa), ennen näytepusseihin jakamista. Näytteet säilytettiin pakastimessa -20 $^{o}$C:ssa. Taulukko 5 on esitetty mallinnuksessa käytettyjen näytteiden kuiva-ainepitoisuudet, jotka on mitattu ennen uuttojen aloittamista.

Taulukko 5. Mallinnuksessa käytetyt näytteet ja niiden kuiva-ainepitoisuus

| Malli | Näyte | Kuiva-aine (%) |
|---|---|---|
| Malli 1 | TanWat – TT – 3 mm – 6.3.2018 | 56 % |
| Malli 2 | TanWat – TT – 3 mm – 14.8.2018 | 71 % |

# 9 ANALYTIIKKA

Uutteet analysoitiin kolmella eri UV/Vis -spektroskopiaan perustuvalla menetelmällä: Folin-Ciocalteu -määritys, hapan butanoli -määritys sekä UV-280 nm -menetelmä. Nämä mittaukset tehtiin Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis -spektrofotometrilla. Pitoisuudet määritettiin standardisuorien avulla. Folin-Ciocalteu -menetelmässä standardisuora valmistettiin gallushaposta. Hapan butanoli- sekä UV-280 nm -menetelmissä käytettiin standardina näytemateriaalista puhdistettua tanniinia. UV/Vis -määritysten lisäksi uutteista mitattiin gravimetrisesti kuiva-aine saanto. Myös HPLC -mittauksia käytettiin tarkasteltaessa uuttosaantoa.

## 9.1 Tanniinistandardi

Puhdistettu tanniini, jota käytettiin standardisuorissa, valmistettiin Hagermanin Tannin Handbook[32]:ssa kuvatuilla näytemateriaalina olleesta kuusen kuoresta (näyte: TanWat – VT, tuore – 3 mm, 6.3.2018).

### 9.1.1 ASE -uutto ja kosteuden määritys näytteestä

Pakastetulle kuorijauheelle tehtiin ASE -uutto, jotta puhdistettua tanniinia saataisiin kerättyä näytemateriaalista UV/Vis -mittausten standardisuoria varten. Näytettä punnittiin noin 4 g uuttosoluun ja siitä tehtiin myös kosteuden määritys.

Uutto tehtiin 10 minuutin staattisella uuttoajalla lämpötilassa 70 $^{o}$C. Huuhtelutilavuus oli 60 %. Ensin tehtiin heksaaniuutto, jonka jälkeen tehtiin kuumavesiuutto 2 % urealla. Vesiuute siirrettiin kolviin ja kylmäkuivattiin.

Kosteuden määritys kuusen kuorijauheesta tehtiin gravimetrisesti. Taarattuun upokkaaseen ($m_1$) punnittiin noin 1 g kuorijauhetta. Kostea kuorijauhe upokkaassa ($m_2$) laitettiin uuniin (105 $^{o}$C) 24 tunniksi, minkä jälkeen upokas jauheineen punnittiin uudelleen ($m_3$).

Punnituista massoista laskettiin kuorijauheen kuiva-ainepitoisuus kaavan 3 mukaisesti.

$$kuiva - aine\% = \frac{m_3(upokas + kuiva\ näyte) - m_1(upokas)}{m_2(upokas + kostea\ näyte) - m_1(upokas)} \times 100 \qquad (3)$$

Puhdistetun tanniinin riittävän määrän varmistamiseksi uuttoja tehtiin kaksi. Uuttoon punnitut kuorimäärät sekä niiden kuiva-ainepitoisuus on esitetty Taulukko 6.

Taulukko 6. Kuiva-aineen määritys puhdistetun tanniinin valmistukseen käytetystä kuorijauheesta

| Näyte | Uutto (g) | $m_1$ (g) | $m_2$ (g) | $m_3$ (g) | Kuiva-aine (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| TanWat – VT – 3mm, 6.3.2018 | 4,1212 | 26,8594 | 27,8262 | 27,3264 | 48 |
| TanWat – VT – 3mm, 6.3.2018 | 4,1396 | 33,3802 | 34,3330 | 33,8482 | 49 |

### 9.1.2 Tanniinin puhdistus ja Sephadex -geelin käsittely

Kylmäkuivattua kuusen kuoriuutetta punnittiin noin 1 g. Jauhe sekoitettiin noin 17 mL:aan 80 %:sta etanolia, kunnes jauhe ei enää tarttunut kolvin reunoihin. Seoksen annettiin olla jääkaapissa yön yli. Tässä vaiheessa valmisteltiin myös Sephadex LH 20 -dekstraanigeeli käyttövalmiiksi.

Sephadex LH 20 -dekstraanigeeli säilytetään 70 %:ssa asetonissa ja sille suoritettiin liuottimen vaihto. Geeli imusuodatettiin sintterissä kuivaksi ja pestiin 80 %:lla etanolilla kolme – neljä kertaa. Etanolilla pesty geeli siirrettiin korkeaan dekantterilasiin 80 %:ssa etanolissa niin, että geelin laskeuduttua sitä oli astiassa noin 75 tilavuus-% ja liuotinkerrosta tämän päällä noin 25 tilavuus-%.

Seuraavana päivänä jääkaapissa seisonut uute kaadettiin Sephadex -geeliin koko ajan sekoittaen. Sekoitusta lasisauvalla jatketiin 3 minuuttia. Tämän jälkeen geeli kaadettiin sintteriin ja imusuodatettiin kuivaksi. Geeliä pestiin suodatuksessa absoluuttisella etanolilla ja sen annettiin seisoa ajoittain ilman imua etanolissa pesun tehostamiseksi, kunnes suodos oli kirkasta.

Etanolipesun jälkeen geeliä pestiin 50 %:lla asetonilla, jälleen antaen liuottimen seisoa sintterissä suodatusten välillä. Pesua jatkettiin, kunnes geeli oli valkoista ja suodos väritöntä. Asetonijae otettiin talteen punnittuun kolviin. Pesun jälkeen Sephadex -geeli siirrettiin 70 %:n

asetonissa varastoon jääkaappiin. Asetonijae kuivattiin pyöröhaihduttimella kuivaksi. Puhtaan tanniinin saanto menetelmässä oli valitettavan pieni mutta riittävää.

## 9.2 UV/Vis -spektrofotometri

UV/Vis -spektrofotometri on laite, joka kykenee erottelemaan eri aallonpituudet toisistaan sekä mittaamaan kunkin aallonpituuden intensiteetin. UV/Vis -spektrofotometrien mittausaallonpituus on ultraviolettisäteilyn (UV) ja näkyvän valon (Vis) aallonpituuksien väli eli 190…1000 nm. UV/Vis -spektrofotometrien pääkomponentit ovat säteilylähde, monokromaattori, näytetila, johon näytettä sisältävä kyvetti asetetaan ja valodetektori. Spektrofotometrillä mitataan näytteeseen tulevan ja sen läpi kulkeneen valon intensiteettien suhde, josta lasketaan lopulta näytteen absorptio.[76]

### 9.2.1 UV-280 nm -menetelmä

Yleinen UV/Vis -spektroskopiaan perustuva menetelmä, jolla havaitaan kaikki vesiuutteen UV-aktiiviset yhdisteet. Tällaisia yhdisteitä ovat ne, joissa esiintyy konjugoituneita kaksoissidoksia, kuten peräkkäisiä kaksoissidoksia tai aromaattisia renkaita. Konjugoituneiden kaksoissidoksien $\pi$-elektronien virittyminen vaatii vähemmän energiaa ja tapahtuu näin ollen helpommin kuin yksöissidoksien $\pi$-elektronit. Tällaista atomiryhmää, jonka elektroninen siirtymä on vastuussa valon absorptiosta, kutsutaan kromoforiksi.[77]

Mitä konjugoituneempi molekyyli on, sitä voimakkaampi on UV-spektrin absorptiovyö. Käytetty liuotin voi siirtää spektrin piikkejä kohti lyhyempää aallonpituutta, ns. sinisiirtymä, varsinkin polaaristen, hydrolyyttisten liuottimien kohdalla. Tällaisia ovat esimerkiksi vesi ja alkoholi. Molekyylin rakenteeseen liittyneet auksokromit, jotka ovat kromoforiin liittyneitä funktionaalisia ryhmiä, (esim. –OH, $–NH_2$) puolestaan johtavat piikin intensiteetin kasvuun ja punasiirtymään. Punasiirtymässä absorption maksimi siirtyy korkeammalle aallonpituudelle. Absorptiomaksimi siirtyy pidemmälle aallonpituudelle myös kaksoissidoksien määrän kasvaessa.[78] UV-280 nm -menetelmässä mittaukset on muistettava suorittaa kvartsikyveteissä, koska valo ei UV-aallonpituudella läpäise lasikyvettiä[79].

Tässä työssä UV-280 nm -menetelmällä mitattiin uuttumisen tehokkuutta. Tällä menetelmällä uutteista havaitaan kaikki UV-aktiiviset yhdisteet, kuten fenoliset yhdisteet, mutta sen avulla ei pystytä erittelemään näitä molekyylejä. Standardisuora valmistettiin laimentamalla ultrapuhtaalla vedellä puhdistetusta tanniinista. Kuusen vesiuutteet laimennettiin 1:100 UHQ-vedellä. Tällöin pipetoitiin koeputkeen kuoren vesiuutetta (1,0 mL) sekä UHQ-vettä (9,0 mL). Näin saatiin 1:10 laimennos, josta tehtiin vielä toinen 1:10 laimennos, jotta päädyttiin laimennokseen 1:100. Tätä laimennosta käytettiin myöhemmin myös Folin-Ciocalteu -menetelmässä.

Standardit sekä näytteet mitattiin UV/Vis-spektrofotometrillä 280 nm aallonpituudella. Pitoisuus määritettiin vertaamalla näytteitä standardisuoraan, joiden pitoisuudet on esitetty Taulukko 7. Nollanäytteenä toimi UHQ-vesi. Menetelmän standardisuora yhtälöineen on esitetty liitteessä 1.

Taulukko 7. Standardisuorien pitoisuudet UV-280 nm -menetelmässä

| Laimennos | Pitoisuus (mg/mL) |
|---|---|
| 1,0 mL st + 9,0 mL $H_20$ | 0,1 |
| 2,5 mL st + 7,5 mL $H_20$ | 0,25 |
| 5,0 mL st + 5,0 mL $H_20$ | 0,50 |
| 7,5 mL st + 2,5 mL $H_20$ | 0,75 |
| 10,0 mL st + 0,0 mL $H_20$ | 1,00 |

### 9.2.2 Folin-Ciocalteu -menetelmä

Folin-Ciocalteu -menetelmä eli gallusihappoekvivalentti-menetelmä (GAE) on kolorimetrinen eli väri-indikaattorimenetelmä hydrolysoituvien tanniinien mittaamiseksi. Reagenssin toiminta perustuu molybdeeni- ja wolframifosfaatin reaktioon tyrosiinin kanssa, joka proteiinin läsnäollessa muuttaa liuoksen siniseksi. Värinmuutoksen intensiteetti on verrannollinen tutkittavaan aineen määrään.[80] Folin-Ciocalteu -reagenssi on Folin-Denisin -reagenssin paranneltu muoto, jota käytettiin 1900-luvun varhaisessa vaiheessa tyrosiinin ja tryptofaanin määrittämiseksi proteiineista[81]. Harvard Medical School:n tutkijat Folin ja Ciocalteu paransivat menetelmän herkkyyttä kasvattamalla molybdeenin osuutta ja lisäämällä reagenssiin saostumista estävää litiumsulfaattia.[80,82]

Folin-Ciocalteu -reagenssin tarkkaa reaktiomekanismia ei tunneta mutta käytännössä FC-reagenssi pelkistyy ja fenolit hapettuvat. Fenolien HO-ryhmä toimii reaktiossa elektronin luovuttajana[83]. Reaktio vaati alkaliset olosuhteet, jotka saatiin aikaan lisäämällä natriumkarbonaattia ($Na_2CO_3$) reaktioseokseen. Alkalisissa olosuhteissa, pH:n ollessa noin 10, fenolihapot ja -alkoholit muuttuivat fenolaatti-ioneiksi. Fenolaatti-ionit sitten pelkistivät FC-reagenssin ja liuoksen väri muuttui siniseksi ja värinmuutoksen vahvuus mitattiin spektrofotometrillä. FC-menetelmä ei ole kovinkaan spesifinen ja muutkin aineet fenolien lisäksi voivat pelkistää reagenssin ja näin ollen väärentää tuloksia. Tällaisia häiritseviä molekyylejä ovat esim. askorbiinihappo ja pelkistävät sokerit.[80,82,83]

FC-menetelmän standardisuora valmistettiin laimentamalla gallushaposta. Valmistettiin 1:10 v/v FC-reagenssi laimentamalla kaupallista reagenssia ultrapuhtaalla vedellä. Punnittiin 75 g natriumkarbonaattia litraan ultrapuhdasta vettä. Kuusenkuoriuuteet laimennettiin 1:100 ultrapuhtaalla vedellä. Standardisuoran laimennokset, jotka on esitetty Taulukko 8, valmistettiin pitoisuusvälille 0,01 – 0,1 mg/mL. Standardisuora yhtälöineen on liitteessä 2.

Taulukko 8. Standardisuorien pitoisuudet Folin-Ciocalteu -menetelmässä

| Laimennos | Pitoisuus (mg/mL) |
|---|---|
| 1,0 mL st + 9,0 mL $H_20$ | 0,1 |
| 2,5 mL st + 7,5 mL $H_20$ | 0,25 |
| 5,0 mL st + 5,0 mL $H_20$ | 0,50 |
| 7,5 mL st + 2,5 mL $H_20$ | 0,75 |
| 10,0 mL st + 0,0 mL $H_20$ | 1,00 |

Koeputkeen otettiin 0,5 mL laimennettua uutetta ja siihen lisättiin 2,5 mL FC-reagenssia ja 2,0 mL natriumkarbonaattia. Koeputki suljettiin ja liuosta ravistettiin voimakkaasti. Koeputki asetettiin vesihauteeseen (50 $^{o}$C) viideksi minuutiksi. Näytteen annettiin jäähtyä 10 minuuttia, jonka jälkeen sininen värimuutos mitattiin UV/Vis-spektrofotometrillä aallonpituudella 760 nm. Pitoisuus määritettiin vertaamalla näytteitä gallushapon standardisuoraan, jotka käsiteltiin samoin kuin näytteet.

Nollana käytettiin UHQ-vettä, joka myös käsiteltiin samoin kuin näytteet. Tulokset ilmaistiin yksikkönä GAE/g kuoren kuiva-ainetta.

### 9.2.3 Hapan butanoli -menetelmä

Hapan butanoli -menetelmä on yksinkertainen ja yleisesti käytetty menetelmä kondensoituneiden tanniinien määrittämiseksi. Menetelmän reaktiossa, joka on esitetty Kuva 22, hapan alkoholi lohkoo proantosyaanin flavan-3-olimonomeerien väliset sidokset ja vapautuneiden, värillisten antosyaanien aiheuttama värinmuutos liuoksessa voidaan määrittää fotometrisesti.

Kondensoitueet tanniinit ovat suurin sekundaaristen aineenvaihduntatuotteiden ryhmä kasveissa ja niiden kemiallinen rakenne voi vaihdella suuresti riippuen lajista, genotyypistä, iästä, kudostyypistä ja ympäristöolosuhteista. Tämän takia hapan butanoli -menetelmällä saadaan hyvin arvioitua kondensoitujen tanniinien määrää, mutta erilaisten tanniinien vaihtelevat kemialliset ominaisuudet voivat vaikuttaa värimuutoksen intensiteettiin. Esimerkiksi quebracho-puun tanniinit johtavat tällä menetelmällä huomattavasti vaaleampaan värimuutokseen kuin durrakasvin tanniinit, koska niiden flavonoidiyksiköiden välisten sidosten lujuus on hyvin erilainen. Eri proantosyaanien erilaisen reaktiivisuuden takia on suositeltavaa käyttää tutkittavasta materiaalista puhdistettua tanniinia referenssinä menetelmän kalibrointisuorassa.[32]

Aluksi valmistettiin standardisuora 0,05 – 0,25 mg/mL 50 %:ssa asetonissa puhdistetusta tanniinista, Taulukko 9 mukaisesti. Standardisuora on esitetty liitteessä 3. 95:5 v/v 1-butanoli-HCl -reagenssi valmistettiin mittalasissa. Tällöin punnittiin 2 g $NH_4Fe(SO_4)_2$ 100 mL:aan 2 M suolahappoa 2 %:sen rauta(III)ammoniumsulfaatin valmistamiseksi. Kuusen vesiuutteet laimennettiin ja siirrettiin 50 %:seen asetoniin. Tällöin pipetoitiin 1,0 mL vesiuutetta koeputkeen ja lisättiin 1,0 mL puhdasta asetonia, minkä jälkeen lisättiin 8 mL 50 %:sta asetonia, jotta saatiin 1:10 laimennos 50 %:n asetonissa. Lisälaimennokset tehtiin 50 %:lla asetonilla.

Taulukko 9. Standardisuorien pitoisuudet happo butanoli -menetelmässä.

| Laimennos | Pitoisuus (mg/mL) |
|---|---|
| 1,0 mL st + 9,0 mL $H_20$ | 0,1 |
| 2,5 mL st + 7,5 mL $H_20$ | 0,25 |
| 5,0 mL st + 5,0 mL $H_20$ | 0,50 |
| 7,5 mL st + 2,5 mL $H_20$ | 0,75 |
| 10,0 mL st + 0,0 mL $H_20$ | 1,00 |

Koeputkeen otettiin 1,0 mL laimennettua uutetta ja siihen lisättiin 6,0 mL 1-butanoli- HCl -liuosta sekä 0,2 mL rauta(III)ammoniumsulfaattia. Koeputki suljettiin ja liuosta ravistettiin voimakkaasti. Koeputki asetettiin vesihauteeseen (95 $^{o}$C) 50 minuutiksi, aina välillä sekoittaen. Näytteen annettiin jäähtyä 10 minuuttia, jonka jälkeen vaaleanpunainen värimuutos mitattiin UV/Vis -spektrofotometrillä aallonpituudella 550 nm. Pitoisuus määritettiin vertaamalla näytteitä standardisuoraan, jotka käsiteltiin samoin kuin näytteet. Nollanäytteenä oli 50 %:nen asetoni, joka käsiteltiin samoin kuin näytteet.

### 9.2.4 Kuiva-ainesaanto

Uutteiden saantoprosentti (saanto-%) määritettiin vesiuutteiden kuiva-ainepitoisuutena. Uuton jälkeen ASE:n vastaanottoastian sisältö siirrettiin 100 mL:n mittapulloon ja täytettiin merkkiin UHQ-vedellä. Näin kaikkien uutteiden lopputilavuus oli 100 mL. Tästä vesiuutteesta otettiin 20 mL ja siirrettiin se taaratussa pyörökolvissa pakastimeen. Pakastettu näyte kylmäkuivattiin ja vedettömän, kuivan näytteen määrä punnittiin. Kuiva-aineen saanto-% laskettiin kaavan 4 mukaisesti.

$$saanto\% = \frac{m_2(kolvi+kuivattu\ uute) - m_1(kolvi)\ x \frac{V_1(uutteen\ tilavuus)}{V_2(kuivatun\ uutteen\ tilavuus)}}{m_3(punnittu\ kuori)} \times 100 \qquad (4)$$

## 10 VASTEPINTAMENETELMÄ

Vastepintamenetelmä (Response Surface Methodology, RSM) on kokoelma matemaattista ja tilastollista tekniikoita empiirisen mallin rakentamiseen. Tämä tehdään huolellisella koesuunnitelulla, jonka tavoitteena on optimoida vaste (output variable), johon useat riippumattomat muuttujat (input variables) vaikuttavat. Toisin sanoen, vastepintamenetelmässä tutkitaan, kuinka mitattu ominaisuus muuttuu vasteena prosessin eri tekijöiden muunteluun. Näiden mittausten perusteella lasketaan tilastollinen malli, jolla vasteen muutosta voidaan ennustaa pisteissä, joista ei ole tehty mittausta. Vastepintamenetelmä on eräs tilastollisen koesuunnittelun (Design of Experiments, DoE) menetelmistä.[84]

Koesuunnitelmia on useita erilaisia mutta ne voidaan jakaa pääpiirteittäin neljään eri tyyppiin. Näitä ovat yksimuuttujakokeet (One Factor at a Time, OFAT), haravointikokeet (screening),

karakterisointikokeet (characterization) ja optimointikokeet (optimizing).[84] Vastepintamenetelmä esiteltiin ensimmäisen kerran 1951 tilastotieteilijöiden Boxin ja Wilsonin toimesta. Vastepintamenetelmä perustuu muuttujien ja vasteen välisen riippuvuuden kuvaamiseen toisen asteen polynomimuotoisen yhtälön avulla. Matemaattisesti rajatulla alueella toisen asteen polynomin approksimointi ja soveltaminen on suhteellisen helppoa, vaikka tutkittavasta mekanismista tiedettäisiin vain vähän.[85]

Kemiallisissa prosesseissa tuotteen saantoon vaikuttaa usein kymmenet, jopa sadat eri tekijät. Tämän takia onnistunut koesuunnittelu vaatii hyvää prosessituntemusta, jotta merkittävimmät näistä muuttujista saadaan tunnistettua. Tilastollisen koesuunnitellun etu perinteiseen yhden muuttujan menetelmään verrattuna on aika- ja kustannustehokkuus. Tilastollisella koesuunnitelulla saadaan mahdollisimman pienellä määrällä kokeita mahdollisimman suuri määrä informaatiota, mikä loppujen lopuksi säästää aikaa ja rahaa.[86]

## 10.1 Koesuunnitelma

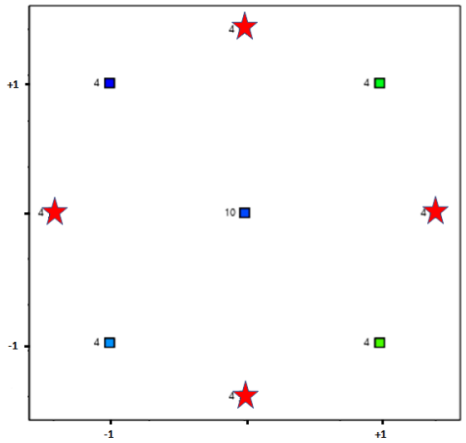
Koesuunnitelma tehtiin Design Expert 11 ohjelmalla. Mallinnettava koesuunnittelu oli vastepintamenetelmä (Central Composite – Reduced Cubic, Randomized). Mallinnettavat muuttujat arvoineen on esitetty Taulukko 10.

Taulukko 10. Vastepintamenetelmän koesuunnittelun muuttujien mallinnustiedot

| Factor | Name | Units | Type | Min. | Max. | Coded Low | Coded High | Mean |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Time | min | Numeric | 1,5 | 93,5 | -1 ↔ 15,00 | +1 ↔ 80,00 | 47,50 |
| B | Temperature | ºC | Numeric | 53,8 | 96,2 | -1 ↔ 60,00 | +1 ↔ 90,00 | 75,00 |
| C | Particle Size | mm | Categoric | 1 | 3 | **Levels:** | 2 | |

Malli rakentui siis aika- ja lämpötila-alueen sekä partikkelikoon muodostamalle alueelle, jonka sisällä kaikki testiuutto-olosuhteet mitattiin. Kuva 34 on esitetty graafinen esitys kahden muuttujan vastepintakokeen suunnittelumatriisista. Suunnitelmaa voidaan kuvata neliöllä, jossa kumpikin muuttuja vaihtuu pisteiden -1 ja +1 välillä. Malli 1:n tapauksessa ajalle -1: 15 min ja +1: 80 min sekä lämpötilalle -1: 60 ºC ja +1: 90 ºC. Kuvassa näkyvät tähtipisteet eli niin sanotut aksiaalipisteet olivat uuttojen minimi, ja maksimipisteet, jotka yhdessä keskipisteen kanssa auttoivat testaamaan mallinnettavan pinnan kaarevuutta. Ajalle ne olivat noin 2 min ja 94 min

ja lämpötilalle noin 54 ºC ja 96 ºC. Edellä mainittu suunnitelma tehtiin sekä partikkelikoilla 1 mm, että 3 mm, ja jokaiselle pisteelle on rinnakkainen mittaus, jolloin jokainen aika/lämpötila -yhdistelmä oli uutettu kaikkiaan neljä kertaa. Keskipisteitä oli 5 per partikkelikoko, jolloin päädyttiin yhteensä 42 uuttoon.




Kuva 34. Mallin 1 koesuunnitelman mittauspisteet.

Malli 2 oli aika- ja lämpötilapisteiltään samanlainen kuin Malli 1, mutta partikkelikoon sijasta kategorisena muuttujana on kolme erilaista jauheen esikäsittelyä; pakastettu ilman kuivausta, uunikuivattu (60 ºC) ja kylmäkuivattu. Tällöin saatiin kolme aika/lämpötila -mittauspisteiltään samanlaista aluetta eli jokainen mallinnuspiste mitattiin sekä kuivaamattomasta, uunikuivatusta sekä kylmäkuivatusta näytteestä samoilla uuton aika- ja lämpötilaolosuhteilla. Näin saatuun aineistoon sovitettiin tilastollista mallia, jotta optimiolosuhteet saatiin simuloitua.

Malliin sisällytetyt vasteet olivat uutteen kuiva-ainepitoisuus, UV-aktiiviset aineet (UV 280 nm), fenoliset aineet (Folin-Ciocalteu), kondensoituneet tanniinit (hapan butanoli), sekä rajoitetuin osin HPLC-analyyseistä saadut pitoisuudet. HPLC-mittausten mallinnus tehtiin ensimmäisen mallin partikkelikoon 1 mm näytteistä.

## 10.2 Tiedonkäsittely

Mallin suunnitteluun ja analysointiin käytettiin Design Expert 11-ohjelmaa. Design Expert sisältää laajan valikoiman erilaisia tilastollisia työkaluja, jotka helpottavat tulosten analysointia. Ohjelma esittää tulokset useiden erilaisten graafisten kuvaajien avulla, mikä helpottaa niiden tulkintaa, vaikka tilastolliset menetelmät eivät olisi käyttäjälle tuttuja.

Design Expert 11 analysoi mitattua dataa erilaisten tilastollisten menetelmien avulla, joiden tuloksia voitiin tarkastella ohjelmasta. Yksi näistä oli yksisuuntainen varianssianalyysi eli ANOVA. Tärkein yksittäinen huomattava asia ANOVA:ssa on regressiomallin selitysosuus $R^2$. Tämä luku kertoi periaatteessa sen, kuinka suuren osuuden selitettävän muuttujan (vasteet) vaihtelusta selittävät muuttujat (uutto-olosuhteet) pystyvät selittämään. Tämä tarkoittaa, että jos $R^2$ oli pieni, niin uutto-olosuhteet selittivät vain vähän vasteiden vaihtelusta, ja jos $R^2$ oli korkea, niin testatut muuttujat selittivät paljon mitatusta muutoksesta.

$R^2$ voidaan lukea prosenttiosuutena. Esim. Mallin 1 UV 280 nm $R^2$ oli 0,9313 (Liite 4). Tämä voitiin tulkita niin, että 93 % UV-aktiivisten aineiden mitatusta pitoisuuden muutoksesta voitiin selittää uuton ajan, lämpötilan ja partikkelikoon muutoksella. Korjattu $R^2$-luku (adjusted R2) ottaa huomioon kaikki mallin sisältämät selittävät muuttujat ja sitä käytetään, kun halutaan vertailla kahden regressioanalyysin tuloksia keskenään. Koska tässä tapauksessa tarkasteltavana oli useita regressiomalleja, perusteltua oli käyttää korjattua $R^2$-lukua selitysasteena. Malli 1:n eri vasteiden yksisuuntaisten varianssianalyysien tulokset on esitetty liitteissä 4-7 ja Malli 2:n liitteissä 8-11.

Muita erityisesti huomioonotettavia asioita mallin analysoinnissa olivat Lack of Fit, outlierit ja F-testi. Lack of Fit eli sopivuuden puute kertoi, sopiko mitattu data regressiomalliin. Mahdollisia syitä sille, että data ei olisikaan sopinut regressiomalliin, voi olla useita. Mahdollisesti muuttujat olisi valittu huonosti, tai tärkeitä termejä ei olisi ollut sisällytetty kokeeseen. Outlierit ovat otosarvoja, jotka poikkeavat niin suuresti keskiarvosta, että niiden katsotaan syntyneen virheen seurauksena. Keskiarvo muuttuu melko herkästi, jos aineistossa on muutama epätavallisen suuri tai pieni luku. Tämä voi johtaa siihen, että keskiarvo antaa harhaanjohtavan kuvan muuttujan todellisesta koosta. Design Expert pohjaa analyysissaan, sekä muuttujien, että vasteiden keskiarvoihin, joten oli tärkeää, että outlierit poistettiin mallinnettavasta datasta. F-testi on tilastollinen testi, jonka avulla voitiin arvioida, pystyttiinkö regressioanalyysissa olevilla muuttujilla selittämään selitettävän muuttujan vaihtelua.

Tässä työssä käytettiin usean muuttujan regressioanalyysiä, koska haluttiin tarkastella useita muuttujia ja niiden yhteisvaikutuksia. Usean muuttujan regressioanalyysissä eri muuttujien regressiokertoimet kertovat, kuinka paljon kunkin selitettävän muuttujan arvo muuttuu, kun kaikkien muiden muuttujien arvo pidetään samana. Tällainen analyysi kertoo siis selittävän muuttujan vaikutuksen selitettävään muuttujaan ilman mallin muiden muuttujien vaikutusta.

## 10.3 Validointiuutot

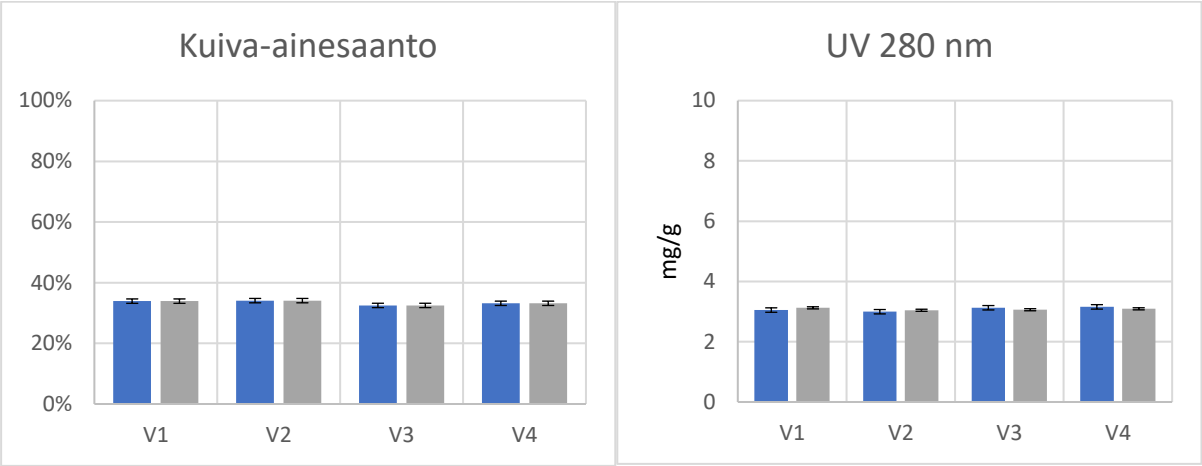
Validointiuutot suoritettiin, jotta nähtäisiin kuinka tarkasti malli ennustaisi vasteiden muutoksia. Validointia varten valittiin pisteitä, joille malli ennusti vasteiden arvon. Tämän jälkeen uutot kyseisissä pisteissä suoritettiin ja mitattuja arvoja verrattiin ennustettuihin arvoihin. Validointiuuttoja tehtäessä tutkittiin samanaikaisesti lyhytaikaisen jääkaappisäilytyksen vaikutusta mallinnettaviin mittauksiin. Validointiuutot tehtiin sekä Malli 1:lle, että Malli 2:lle.

Validointiuutot tehtiin jakamalla 100 mL:aan laimennettu uute kahteen osaan ja laittamalla ensimmäinen osa suoraan pakastimeen (Frozen) ja pitämällä toista osaa kolme päivää jääkaapissa ennen pakastusta (Refridgerated). Jäätyneet uutteet sulatettiin samaan aikaan ja kaikista tehtiin UV/Vis -määritykset samana päivänä. Näin saatiin selville, oliko lyhytaikaisella jääkaappisäilytyksellä merkittävää vaikutusta mallinnettaviin tuloksiin.

Malli 1:n validointiuutot tehtiin samasta näytteestä kuin mallinnusuutot (TanWat – TT – 1 mm, 6.3.2018), 30 min uuttoajalla lämpötilassa 75 $^{o}$C. Malli 1:n validointiuuttojen keskihajontaa tarkasteltaessa voitiin nähdä, että uutteiden spektrometrisen mittaukset olivat hyvin toistettavia ja niiden hajonta on erittäin pieni. Taulukko 11 voitiin tarkastella keskihajontaa rinnakkaisten mittausten välillä. Hapan butanoli -menetelmän hajonta oli suurempaa kuin muilla, mutta ei siltikään merkittävää. Saanto-%:n hajonta oli puolestaan erityisen pientä. Hajontojen keskinäinen vertailu ja niiden pienuus voitiin havainnollistaa paremmin graafisista kuvaajista, Kuva 35 ja Kuva 36.

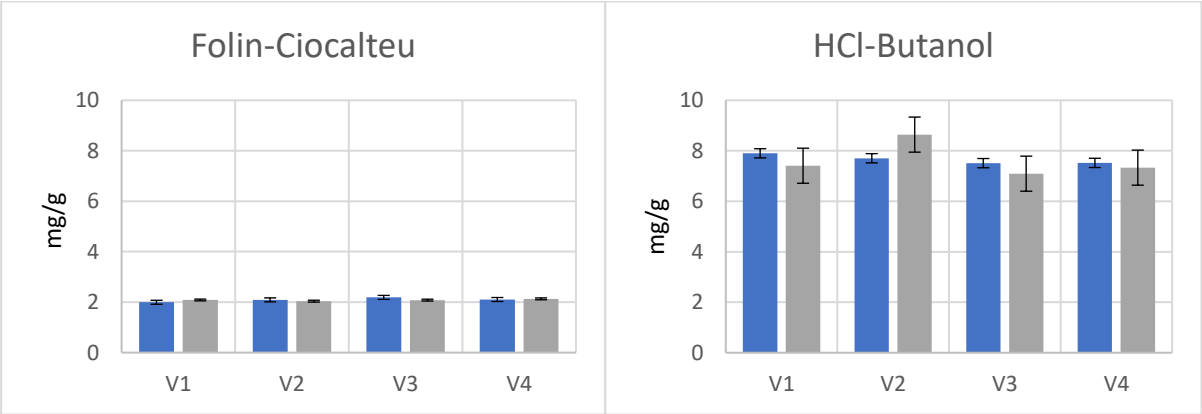
Taulukko 11. Malli 1:n validointiuuttojen pakastettujen ja jääkaapissa ikäännytettyjen rinnakkaismittausten keskihajonnat

| Menetelmä | Frozen | Refridgerated |
|---|---|---|
| Saanto-% | 0,00722 | 0,00722 |
| UV- 280nm | 0,07334 | 0,03512 |
| Folin-Ciocalteu | 0,07887 | 0,03625 |
| Hapan butanoli | 0,18365 | 0,69501 |




Kuva 35. Malli 1:n validointiuuttojen saanto-%:n ja UV 280 nm - menetelmien rinnakkaismääritysten pitoisuuksien vertailu (sininen = frozen, harmaa = refridgerated).

Kuva 35 nähtiin, että neljän rinnakkaisen mittauksen tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan, sekä saanto-%, että UV-aktiivisten molekyylien pitoisuuksien osalta. Näiden menetelmien tuloksissa ei voitu havaita, että kolmen päivän jääkaappisäilytyksellä olisi ollut merkittävää vaikutusta näytteiden pitoisuuksiin, verrattuna heti uuton jälkeen pakastettuihin rinnakkaisnäytteisiin.




Kuva 36. Malli 1:n hydrolysoituvien (FC) ja kondensoituneiden tanniinien (hapan butanoli) validointimittausten pitoisuudet (sininen = frozen, harmaa = refridgerated).

Kuva 36 voitiin havaita, että neljän rinnakkaisen mittauksen tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan myös hydrolysoituvien tanniinien mittauksessa. Kondensoituneiden tanniinien rinnakkaisten mittausten pitoisuuksissa havaittiin suurempaa hajontaa kuin muissa mittauksissa. Hajonta oli pienempää heti uuton jälkeen pakastetuiden näytteiden välillä kuin

jääkaapissa säilytettyjen näytteiden. Jääkaapissa säilytettyjen uutteiden kondensoituneiden tanniinien pitoisuuksien ero ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkittävä.

Taulukko 12. Malli 1:n validointiuuttojen tulosten keskiarvo ja selitettävien muuttujien 95 %:n ennusteväli

| Vaste | Ennustettu keskiarvo | Ennustettu mediaani | Keskihajonta | n | Ennustettu keskivirhe | 95% PI alaraja | Data keskiarvo | 95% PI yläraja |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UV280 nm | 3,1428 | 3,1428 | 0,0771 | 8 | 0,0417 | 3,0575 | 3,0813 | 3,2280 |
| FC | 1,0546 | 1,0546 | 0,0543 | 8 | 0,0298 | 0,9936 | 1,0446 | 1,1156 |
| Hapan but. | 5,9782 | 5,9782 | 0,5973 | 8 | 0,2546 | 5,4628 | **7,6396** | 6,4935 |
| Saanto-% | 21,7031 | 21,7031 | 0,6016 | 8 | 0,3258 | 21,0368 | 22,0547 | 22,3694 |

Taulukko 12 on koottu Malli 1:n varmennusuuttojen (n=8) tulokset. Vastepintamalli ennusti jokaiselle vasteelle keskiarvon ja mediaanin, joita verrattiin validointiuuttojen mitattujen arvojen keskiarvoihin. UV 280 nm- ja FC-menetelmien, sekä kuiva-ainesaantojen mitattujen tulosten keskiarvot osuivat Malli 1:n 95 %:n ennustevälin (95 % PI) sisälle eli voitiin sanoa Malli 1:n ennustavan varsin hyvin näiden mallinnettavien vasteiden arvoja. Hapan butanoli -menetelmän varmennusuuttojen pitoisuuden keskiarvo oli korkeampi kuin vastepintamallin 95 %:n ennusteväli. 95 %:n ennusteväliä tarkasteltaessa Malli 1 ennusti siis pienempiä kondensoituneiden tanniinien pitoisuksia kuin mitä uutteista todellisuudessa mitattiin.

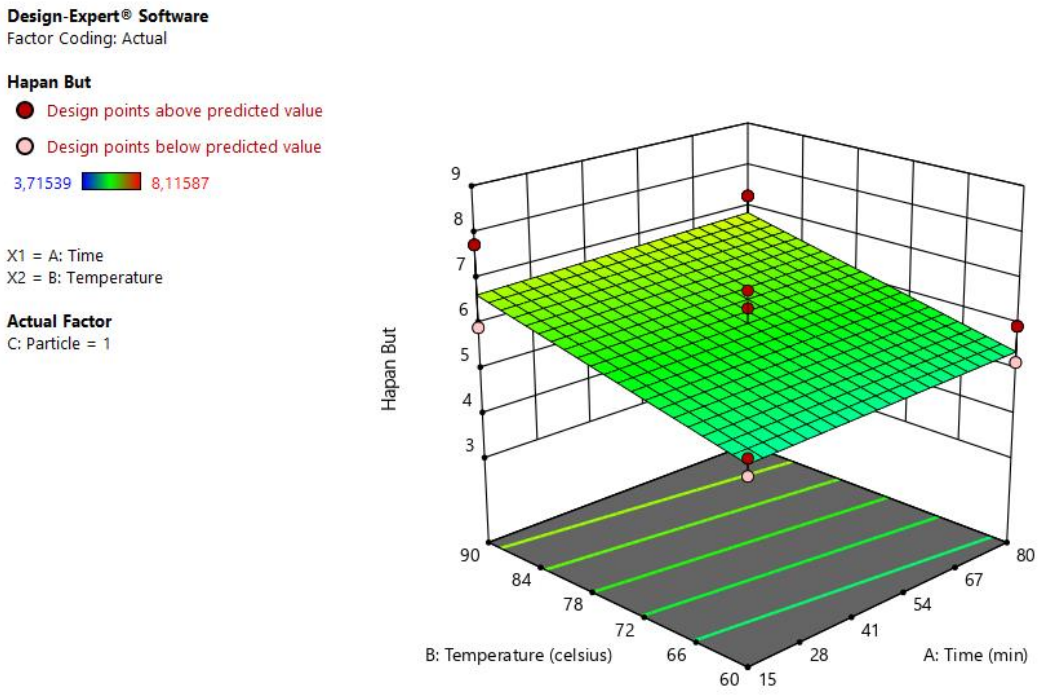
Malli 2:n validointiuutot tehtiin kuivaamattomasta näytteestä (TanWat-TT-1 mm, 14.8.2018), 80 min 95 $^{o}$C. Uuttojen tulokset on esitetty liitteessä 12. Malli 2:n tapauksessakin eri menetelmien sisäinen hajonta oli pientä eikä lyhytaikainen jääkaappisäilytys merkittävästi muuttanut mitattuja pitoisuuksia uutteissa. Malli 2:n 95 %:n ennusteväli oli UV 280 nm- ja FC-menetelmien vasteen suhteen hieman korkeampi, kuin mitä varmennusuuttojen pitoisuuksien keskiarvo oli. Hapan butanoli -menetelmän ja kuiva-ainesaannon varmennusuuttojen pitoisuuksien keskiarvo osui 95 %:n ennusteväliin. Malli 2:n varmennusuuttojen tulokset ovat rohkaisevia, koska ne tehtiin mallinnettavan alueen ulkorajoilla, jossa ennustettavuuden voi olettaa olevan huonompi kuin mallinnettavan alueen keskellä. UV 280 nm -menetelmän varmennusuuttojen tulokset mahtuvat 80 %:n ennusteväliin ja FC-menetelmän tulokset jopa 90 %:n ennusteväliin.

# 11 TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Mallinnettua vastepintaa voitiin tarkastella useiden erilaisten kuvaajien avulla ennen kuin suoritettiin varsinainen optimointi. Näistä kuvaajista selvisi mitkä olivat mallinnettujen muuttujien ja vasteiden suhde eli niistä voitiin nähdä, kuinka uuttotulos muuttui, esimerkiksi ajan ja lämpötilan suhteen.

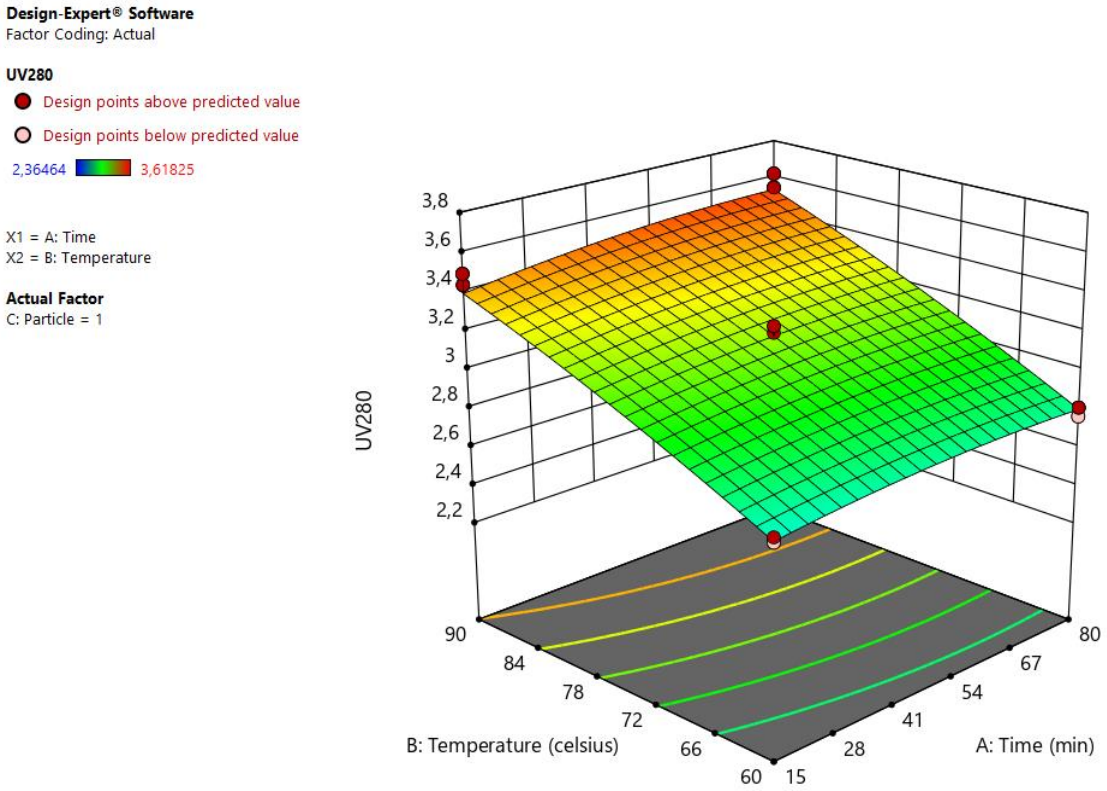
## 11.1 Vastepintakuvaaja (3D-kuvaaja)

Vastepintakuvaaja on kolmiulotteinen kuva, jossa x- ja y- akselit olivat tässä tapauksessa muuttujien eli ajan ja lämpötilan ennusteet sekä z-akseli, joka edusti vastearvojen ennustetta. Z-akselilla olevat vasteet kuvattiin jatkuvana pintana, jonka korkeus vaihteli pitoisuuden mukaan. Kuvaajissa näkyvät huiput ja laaksot vastaavat x: n ja y: n yhdistelmiä, jotka tuottavat paikallisia maksimeita tai minimejä. Korkeuden lisäksi kuvaajan väri auttaa hahmottamaan kuvaajaa, tämän työn malleissa punainen esiintyi korkealla ja sininen matalalla. Ennusteet, joissa muuttujilla ei ollut juurikaan vaikutusta mitattuun vasteeseen, näyttivät kuvaajassa tasaisilta, vihreiltä pinnoilta. Tämä on havainnollistettu hyvin Malli 1:n hapan butanoli -menetelmän vastepinnassa Kuva 37.




Kuva 37. Malli 1:n hapan butanoli- menetelmän vastepinta partikkelikoolla 1 mm.

Edellä mainittujen periaatteiden mukaisesti voitiin tarkastella esimerkiksi Malli 1:n UV 280 nm -mittauksen pitoisuusennusteita partikkelikoolla 1 mm. Kuva 38 aika-akselia ja vastepinnan muotoa tarkasteltaessa nähtiin, että vastepinta oli melko tasainen ajan suhteen, nousten vain hieman ajan kuluessa. Tämä tarkoitti, että ajalla ei ollut suurtakaan vaikutusta UV-aktiivisten aineiden pitoisuuteen uutteissa. Lämpötilan ja vastepinnan suhteen selkeää eroa kuitenkin näkyi. Pitoisuutta edustavan vastepinnan kaltevuus asettui niin, että se oli korkeimmillaan lämpötila-akselin yläpäässä ja matalimmillaan lämpötila-akselin alapäässä. Tämä tarkoitti, että uutteen UV-aktiivisten yhdisteiden pitoisuus kasvoi lämpötilan noustessa.



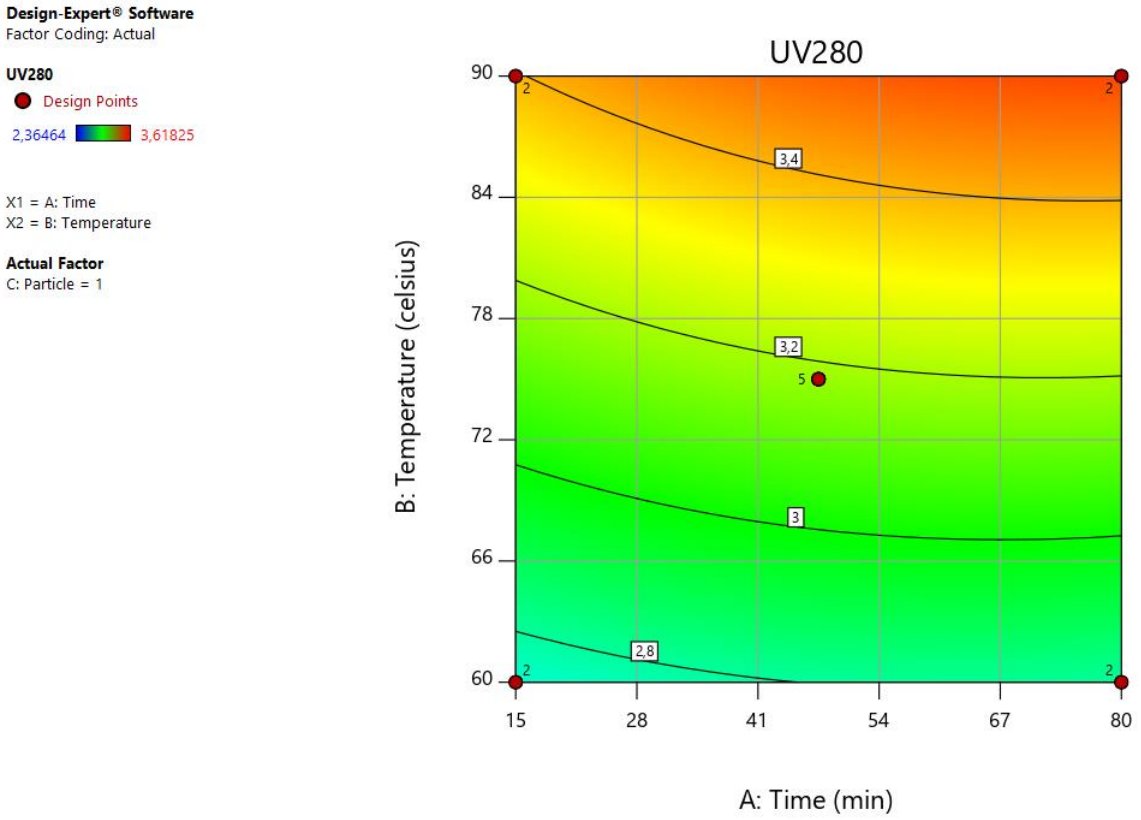

Kuva 38. Malli 1:n UV 280 nm -mittauksen vastepinta partikkelikoolla 1 mm.

## 11.2 Ääriviivakuvaaja (2D-kuvaaja)

Ääriviivamallin, joka on 2D-kuvaaja, voidaan ajatella olevan eräänlainen korkeuskäyräkuvaaja topografisen kartan tapaan. Tämän työn malleissa vaaka-akselilla oli aika 15 minuutista 80 minuuttiin ja pystyakselilla lämpötila 60 ºC:sta 90 ºC:een. Tällaisessa kuvaajassa ennustetun suureen arvo on esitetty korkeuskäyrien avulla ja kuvaajasta voidaan lukea, minkä arvon vaste saa milläkin tekijöiden yhdistelmällä. Kuten kartassa, niin tässäkin kuvaajassa pinnan muotoa

voitiin tarkastella korkeuskäyrien avulla. Mitä lähempänä viivat olivat toisiaan, sitä jyrkempi muutos oli. Ääriviivakuvaajassa, kuten vastepintakuvaajassakin, vasteen korkeutta voitiin arvioida värin perusteella, punaisen edustaessa korkeaa pitoisuutta ja sinisen matalaa.

Tarkastellaan esimerkin vuoksi uudelleen Malli 1:n UV 280 nm -mittauksen pitoisuusvastetta partikkelikoolla 1 mm, mutta tällä kertaa kaksiulotteisena. Kuva 39 nähtiin, että pitoisuus oli mallinnetulla alueella matalimmillaan 2,36 mg/l (sininen) ja korkeimmillaan 3,62 mg/l (punainen) eli uuttoaikaa ja lämpötilaa säätämällä UV-aktiivisten aineiden pitoisuus uutteissa vaihteli yli 30 %. Korkeimmat UV-aktiivisten aineiden pitoisuuden ennusteet saavutettiin maksimilämpötilan ja -uuttoajan yhdistelmällä.



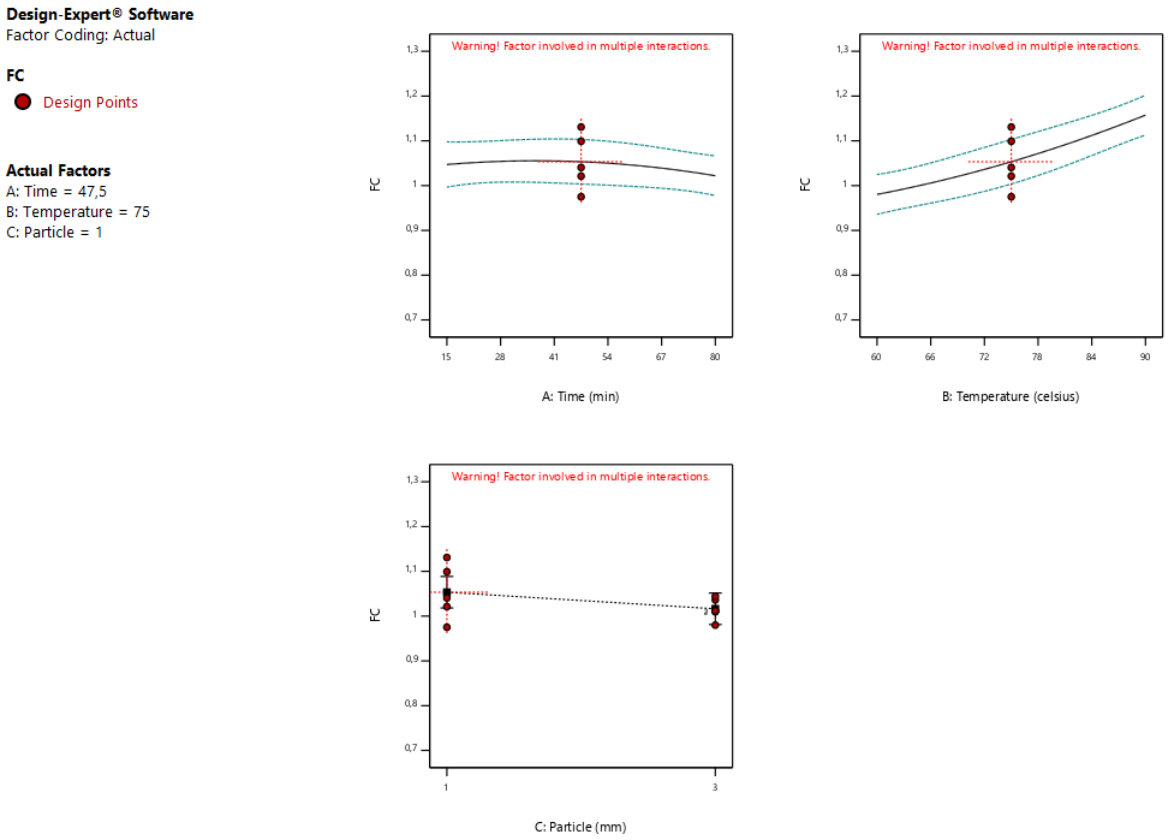

Kuva 39. Malli 1:n UV 280 nm -mittauksen ääriviivakuvaaja partikkelikoolla 1 mm.

## 11.3 Profiilikuvaajat

Profiilikuvaajissa mallinnettavat muuttujat jaettiin itsenäisiksi kuvaajiksi, joiden avulla voitiin pitoisuuden muutosta tarkastella yhden muuttujan funktiona. Kokonaiskuvan saavuttamiseksi oli tarkasteltava sekä pitoisuuden muutosta ajan funktiona, että toisesta kuvaajasta lämpötilan

funktiona. Profiilikuvaajien etu kaksi- ja kolmiulotteisiin kuvaajiin nähden oli niiden helppolukuisuus mutta kokonaispitoisuuden muutosta eri muuttujien funktiona oli hankala arvioida koska yksi kuvaaja antaa vain osan tarvittavasta tiedosta. DesignExpert -ohjelmassa nämä kuvaajat ovat dynaamisia ja niiden avulla voitiin tarkastella ennustetun pitoisuuden muutosta yksitellen eri uutto-olosuhteissa. Profiilikuvaajia käytettiin lähinnä kyseisen vasteen ja kunkin muuttujan vuorovaikutussuhteen muodon tulkintaan, ei niinkään varsinaisten numeeristen arvojen tarkasteluun.

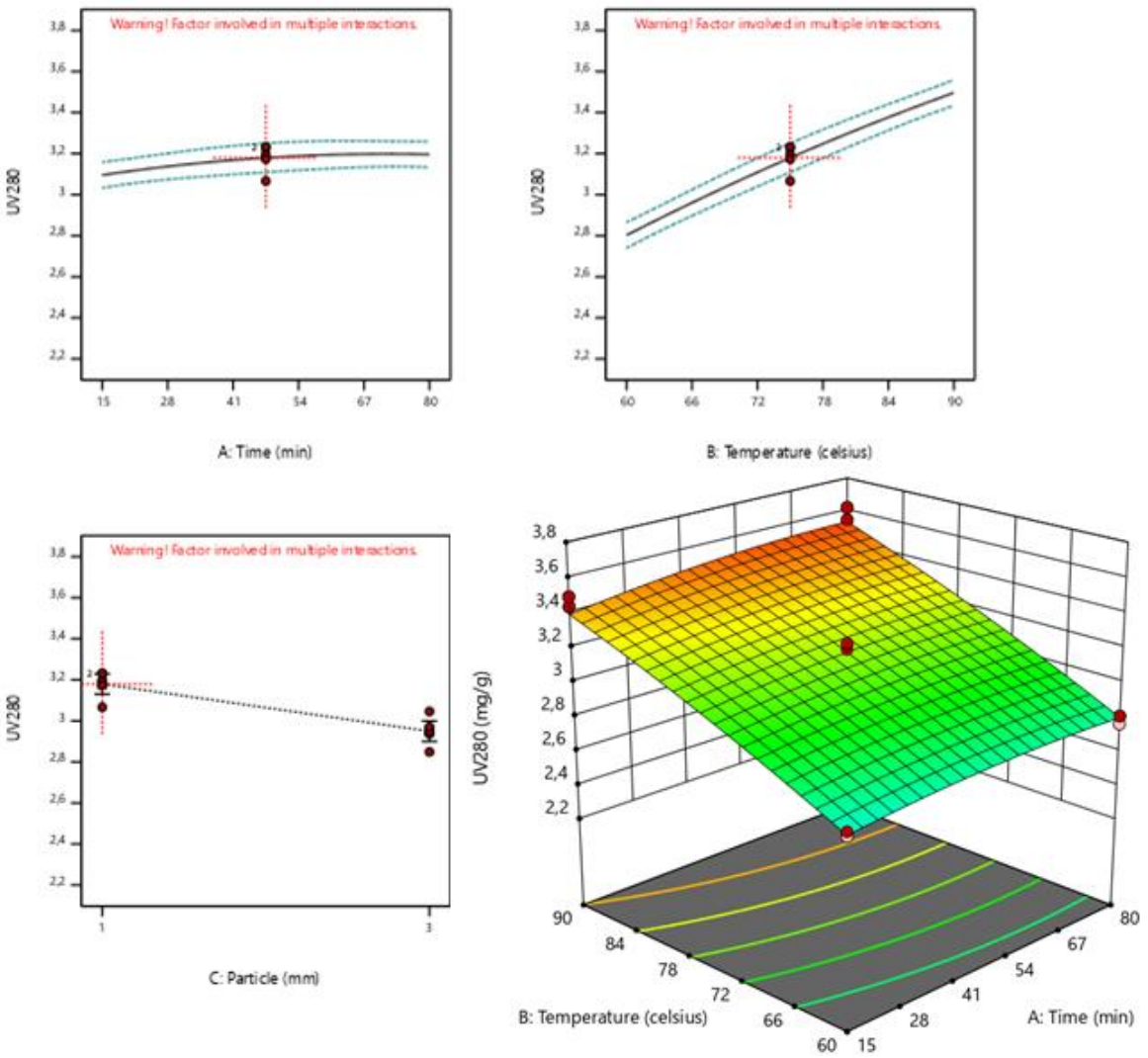
Kuva 40 olevat profiilikuvaajat esittävät hydrolysoituvien tanniinien pitoisuuden muutoksen ennusteen Malli 1:n keskipisteessä (47,5 min, 75 $^{o}$C). Lämpötilan profiilikuvaaja näyttää selkeästi, että uutteen hydrolysoituvien tanniinien pitoisuus kasvaa uuttolämpötilan noustessa. Samoin hyvin selvästi huomattiin, että uuttotulos partikkelikoolla 1 mm oli parempi kuin partikkelikoolla 3 mm. Hydrolysoituvien tanniinien pitoisuus ei uuttoaikaa pidentämällä muuttunut merkittävästi ja jopa hieman laski kaikista pisimmillä uuttoajoilla.




Kuva 40. Malli 1:n hydrolysoituvien tanniinien pitoisuuden ennusteiden profiilikuvaajat.

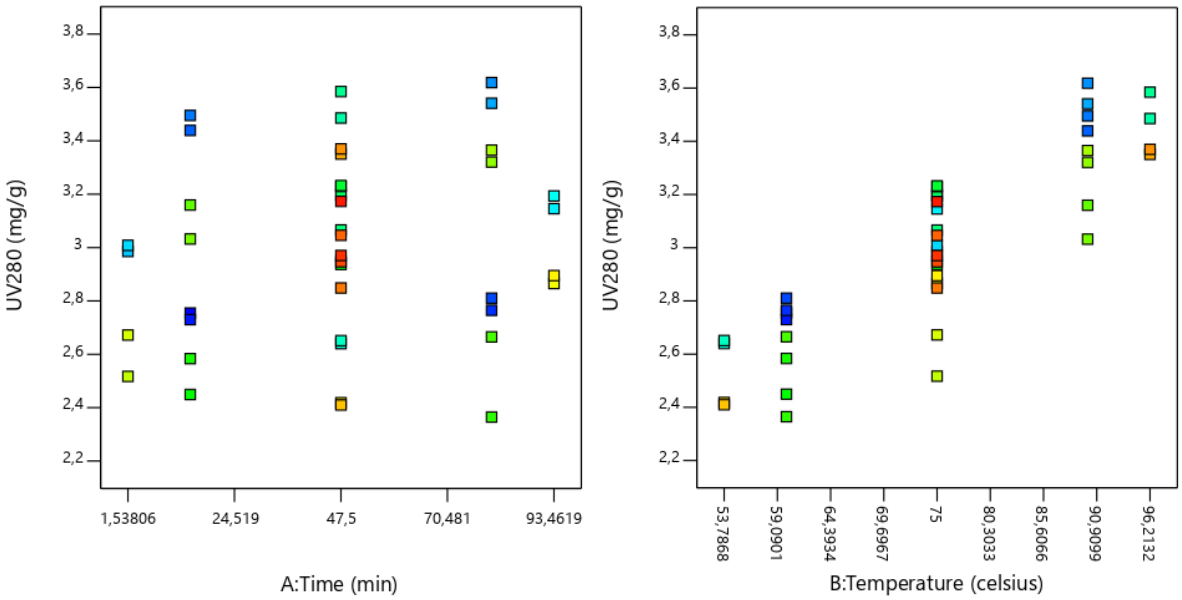
## 11.4 UV 280 nm -menetelmä

Malli 1:n UV 280 nm -menetelmän mittausten avulla mallinnettua UV-aktiivisten aineiden saannon vastepintaa tarkasteltaessa voitiin havaita, että saanto parani mitä pitempään ja mitä korkeammassa lämpötilassa uutto suoritetiin. Profiilikuvaajista (Kuva 41) nähtiin, että lämpötilan muutoksella oli selvästi suurempi vaikutus saantoon, kuin uuttoajan muuttamisella. Pienempi partikkelikoko (1 mm) nosti selvästi saantoa verrattuna suurempaan 3 mm:n partikkelikokoon. Malli 2:n UV 280 nm -menetelmän vastepinnat ajan ja lämpötilan suhteen kaikilla tutkituilla kuivausmenetelmillä olivat hyvin samankaltaisia kuin Malli 1:n (liite 13).




Kuva 41. Malli 1:n UV-aktiivisten aineiden pitoisuuksien ennusteiden profiilikuvaajat sekä vastepinta.

Ajan ja lämpötilan vaikutusta UV-aktiivisten aineiden saantoon voitiin tarkastella myös korrelaation kautta. **Error! Reference source not found.** on esitetty UV-aktiivisten aineiden pitoisuus ajan ja lämpötilan suhteen. Voitiin havaita, että mitatut pitoisuudet korreloivat vain heikosti (0,166) ajan kanssa mutta hyvin vahvasti (0,872) lämpötilan kanssa. Tästä voitiin päätellä, että lämpötilan muutos selitti enemmän UV-aktiivisten aineiden pitoisuuden muutoksesta, kuin uuttoajan muutos.

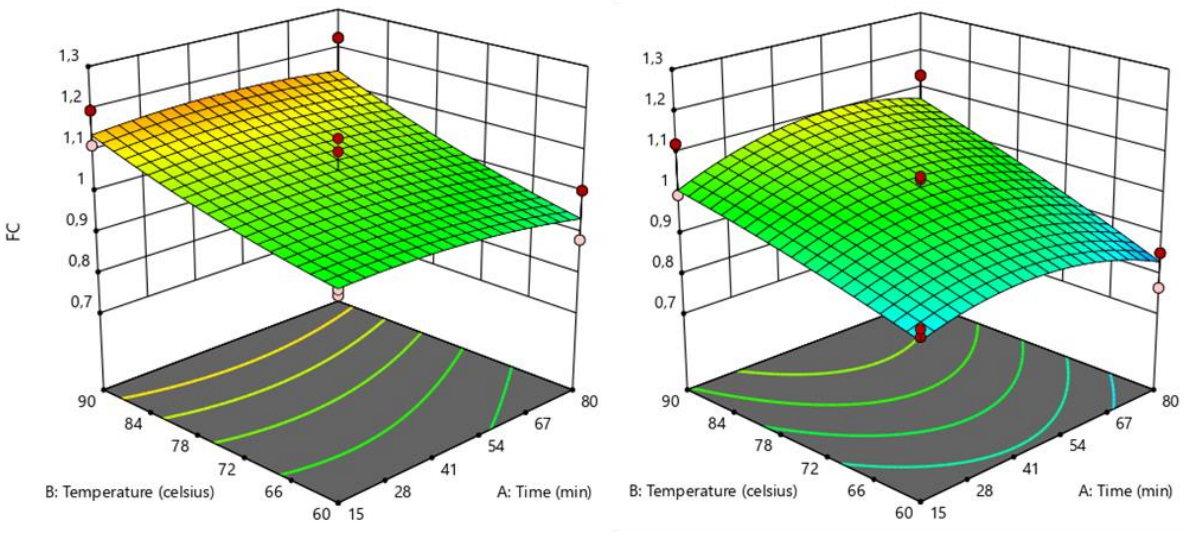



Kuva 42. Malli 1:n UV 280 nm -menetelmän pitoisuuksien korrelaatio ajan (0,166) ja lämpötilan (0,872) suhteen.

## 11.5 Folin-Ciocalteu -menetelmä

FC -menetelmällä analysoitujen hydrolysoituvien tanniinien pitoisuuksia Malli 1:n uutteissa tarkasteltaessa havaittiin, että partikkelikokojen 1 mm ja 3 mm vastepinnoissa oli eroja uuttoajan vaikutuksen suhteen. Partikkelikoosta riippumatta lämpötilan muutoksella oli suurin vaikutus hydrolysoitujen tanniinien pitoisuuteen uutteissa. Pienemmällä partikkelikoolla aika ei selittänyt juuri lainkaan pitoisuuden muutoksia, eikä näin ollen vaikuttanut lähes ollenkaan vastepintaan (Kuva 43, vasen kuvaaja). Suuremmalla partikkelikoolla sen sijaan voitiin havaita, että uuttoajan muutoksella oli lievä mutta selvä vaikutus pitoisuuteen (Kuva 43, oikeanpuoleinen kuvaaja). Uuttoaikaa pidennettäessä hydrolysoituvien tanniinien pitoisuus ensin kasvoi uutteissa mutta alkoi sitten vähentymään eli sekä lyhyet uuttoajat, että pitkät

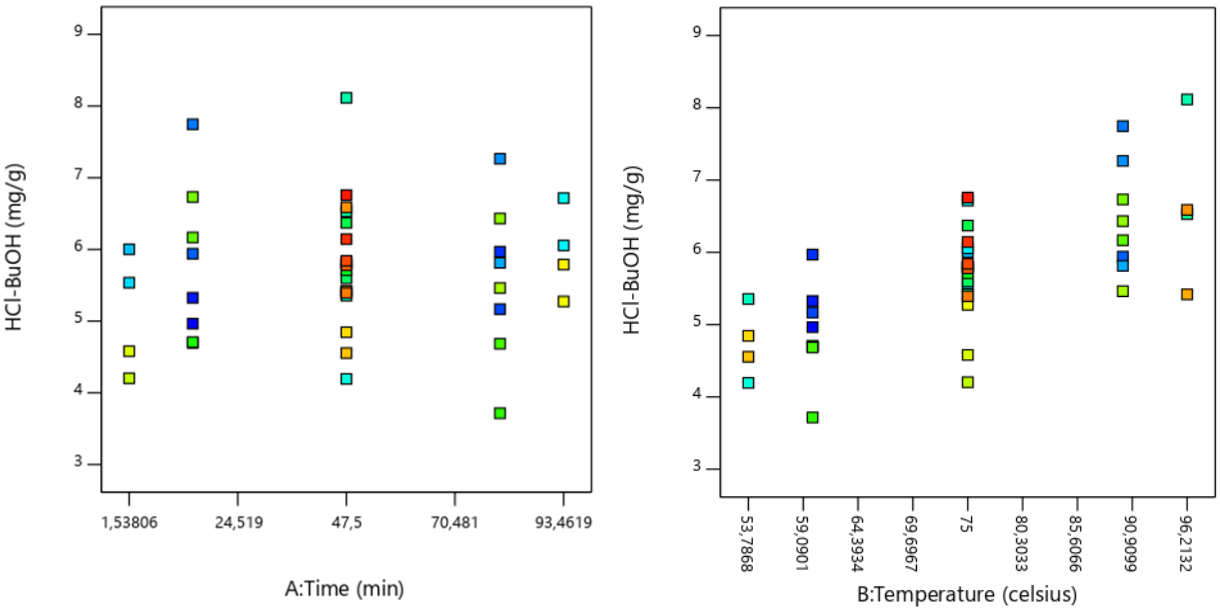
uuttoajat vähensivät uuttosaantoa. Tämä tarkoitti, että hydrolysoituville tanniineille on partikkelikoosta riippuvainen optimiuuttoaika.




Kuva 43. FC -menetelmän vastepinta 1 mm partikkelikoolla (vas.) ja 3 mm partikkelikoolla (oik.).

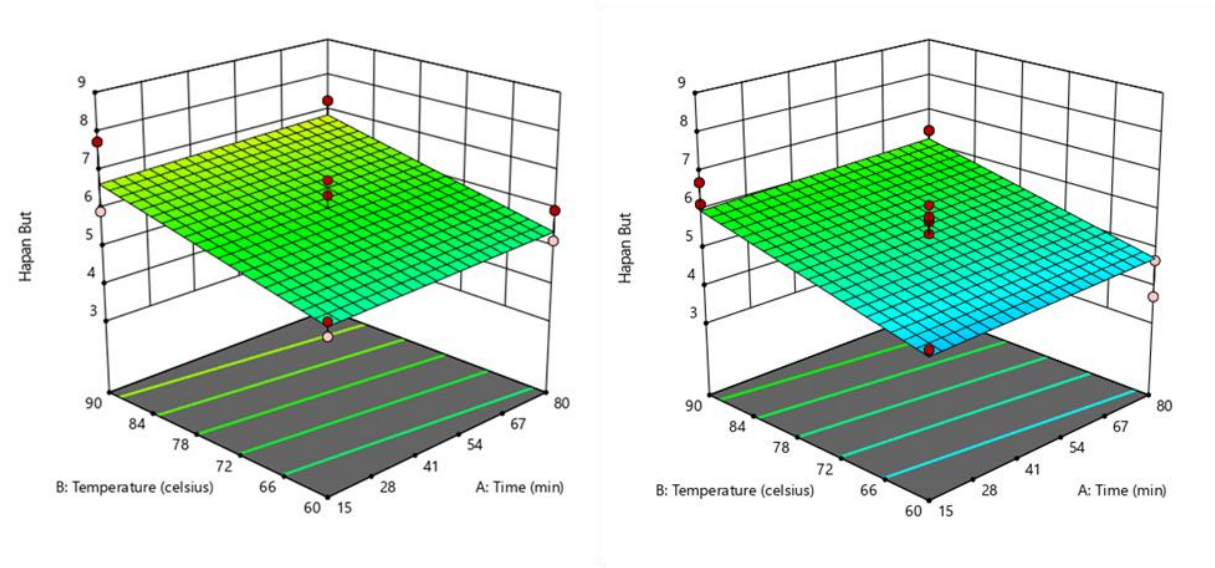
## 11.6 Hapan butanoli -menetelmä

Kondensoituneiden tanniinien pitoisuus, jota mitattiin hapan butanoli -menetelmällä, ei vaikuttanut muuttuvan lainkaan uuttoajan suhteen. Kondensoituneiden tanniinien pitoisuus ei korreloinut lainkaan uuttoajan kanssa, mikä nähtiin Kuva 44. Samassa kuvassa on esitetty Malli 1:n korrelaatio uuttolämpötilan suhteen, mikä oli selvästi vahvempi ja uuttolämpötilan muuttumisella voidaan selittää jopa 69 % pitoisuuden muutoksesta uutteissa.



Kuva 44. Malli 1:n kondensoituneiden tanniinien pitoisuuden korrelaatio uuttoajan (0,095) ja lämpötilan (0,69) suhteen.

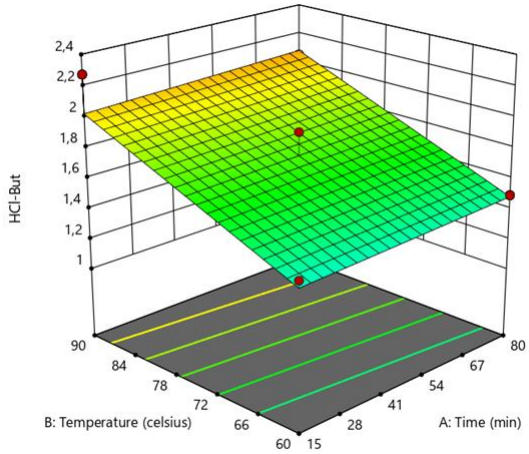
Vaikka uuttolämpötila selittikin melko hyvin kondensoituneiden tanniinien pitoisuuden muutoksen niin mallinnettu vastepinta oli melko tasainen eikä saanto juuri muuttunut mallinnetuissa uutto-olosuhteissa. Kuva 45 näkyi, että kondensoituneiden tanniinien saannon ennuste ei muuttunut lainkaan uuttoajan muutoksen suhteen ja muutos lämpötilan muutoksen suhteen on hyvin loiva.




Kuva 45. Malli 1:n kondensoituneiden tanniinien vastepinta partikkelikoolla 1 mm (vas.) ja 3 mm (oik.).

Malli 2:n tapauksessa uuttolämpötilan vaikutus kondensoituneiden tanniinien pitoisuuteen oli selkeämpi kuin Malli 1:n vastepinnoissa.

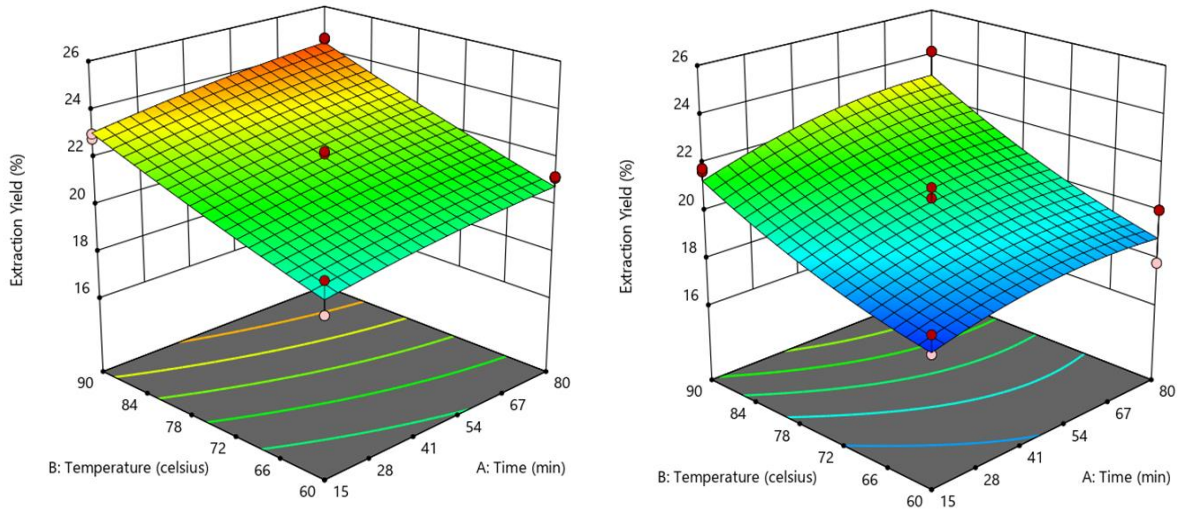
Kuva 46 nähtiin, että tässäkään mallinnuksessa uuttoajalla ei ole mitään vaikutusta kondensoitujen tanniinien saantoon mallinnetulla uuttoaika-alueella.



Kuva 46. Malli 2:n kondensoituneiden tanniinien pitoisuuden mallinnettu vastepinta partikkelikoolla 1 mm, pakastettu ilman kuivausta.

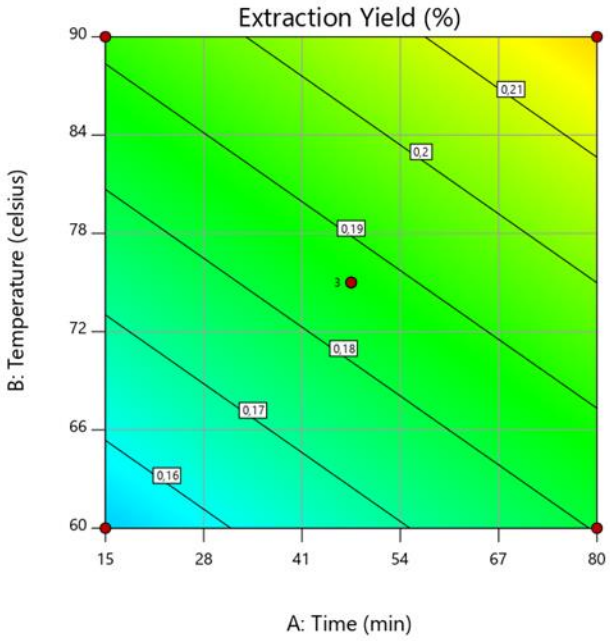
## 11.7 Kuiva-ainesaanto

Uutteen kuiva-aineessa oli mukana kaikki vesiliukoiset aineet kuusen kuoresta eli tanniinien lisäksi myös erilaisia sokereita. Kuiva-ainesaanto oli noin 20 % kuoren kuiva-aineesta. Malli 1:n vastepintoja tarkasteltaessa (Kuva 47) huomattiin, että uuttoaika ei vaikuttanut uuttosaantoon merkittävästi mutta uuttolämpötilan nosto paransi uuttosaantoa. Kuiva-ainesaanto oli korkeampi kautta koko mallinnusalueen pienemmällä 1 mm:n partikkelikoolla kuin suuremmalla 3 mm:n partikkelikoolla.




Kuva 47. Malli 1:n kuiva-ainesaannon vastepinnat 1 mm partikkelikoolla (vas.) ja 3 mm:n partikkelikoolla (oik.).

Malli 2:n kuiva-ainesaannon vastepinnat olivat hyvin samankaltaisia kuin Malli 1:n. Malli 2:n kuiva-aineen vastepinnasta (Kuva 48) nähtiin, että kuiva-ainesaanto parani, kun uuttolämpötilaa nostettiin ja uuttoaikaa pidennettiin. Jälleen lämpötilalla oli suurempi vaikutus uuttosaantoon kuin uuttoajalla. Eri kuivausmenetelmillä ei ollut vaikutusta kuiva-ainesaantoon.



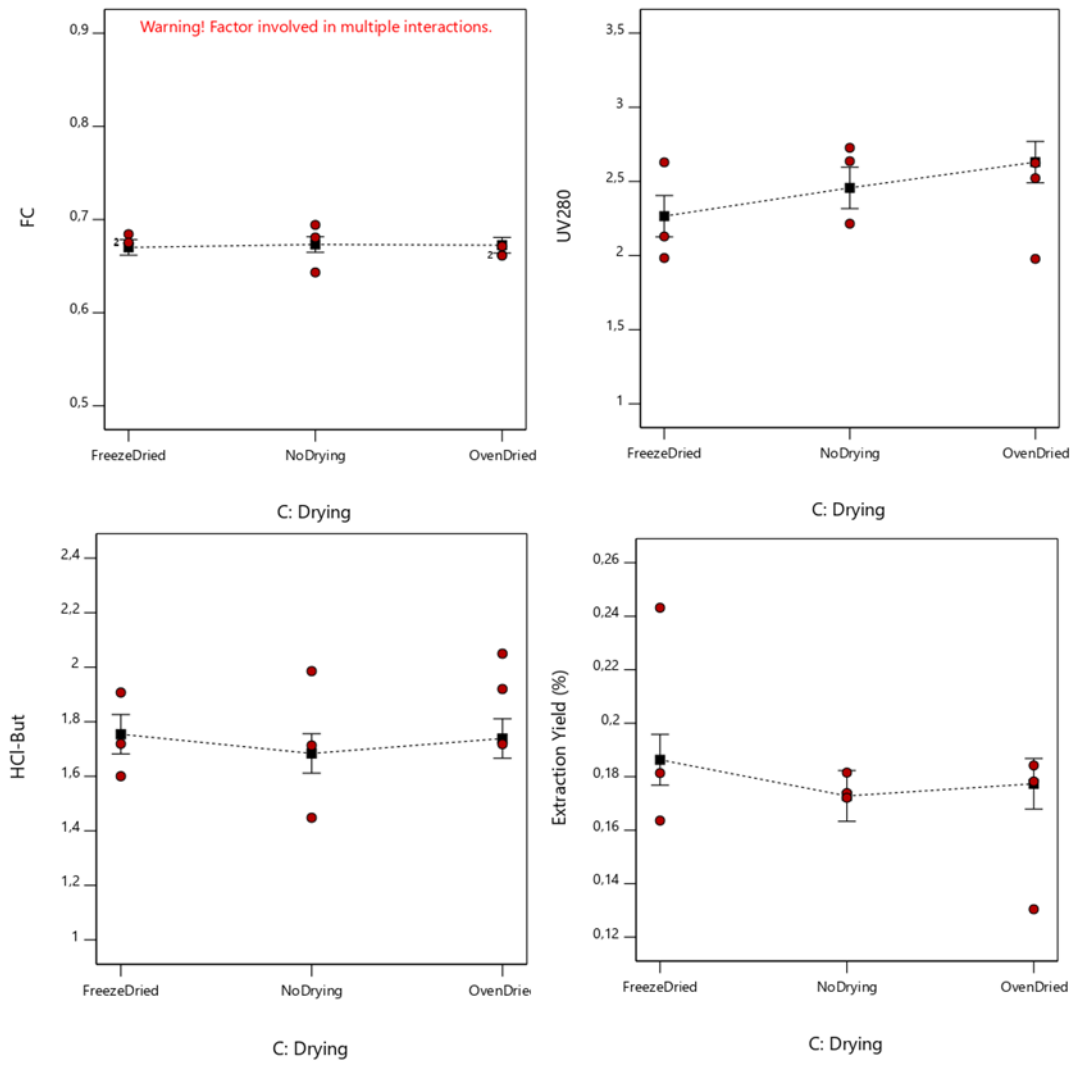

Kuva 48. Malli 2:n kuiva-ainesaannon vastepinta kuivaamattomalla kuorella.

## 11.8 Kuivausmenetelmän vaikutus

Malli 2:n muutos ensimmäiseen mallinnukseen oli purun kuivausmenetelmän tutkiminen partikkelikoon sijaan. Tutkittuja kuivausmenetelmiä oli kaksi, kylmäkuivaus ja uunikuivaus. Verrokkina toimi kuivaamaton näyte, joka oli säilytetty tuoreena pakastimessa. Tuoretta, pakastettua näytettä jauhettiin partikkelikokoon 1 mm, minkä jälkeen osa laitettiin takaisin pakastimeen. Loput jauhetusta näytteestä jaettiin kahteen osaan, joista toinen kuivattiin kylmäkuivurissa. Jäljelle jäänyt osa jauhetusta näytteestä laitettiin Kuva 49 näkyvissä alumiiniastioissa uuniin (60 $^{o}$C) kolmeksi tunniksi. Näin saadut kolme näytettä uutettiin samoissa uutto-olosuhteissa kuin Malli 1:n näytteet ja analysoitiin. Mallinnetut vastepinnat vastasivat erittäin hyvin Malli 1:n vastepintoja eli Malli 1:n vastepinnoista tehdyt päätelmät olivat toistettavia.

Kuva 49. Kuorijauhe kuivattiin alumiiniastioissa uunissa lämpötilassa 60 ºC noin 3 tuntia.

Kuivaamisella ja siihen käytetyillä menetelmillä oli havaittava mutta ei tilastollisesti merkittävä vaikutus uuttosaantoihin. Kuva 50 nähtiin, että kuivaamisella oli erilainen vaikutus eri vasteisiin. Vasemmassa yläkulmassa olevaan FC-menetelmän saantoon kuivaamisella ei ollut minkäänlaista havaittavaa vaikutusta verrattuna keskipisteenä olevaan pakastettuun verrokkinäytteeseen. Oikealla ylhäällä näkyvään UV 280 -menetelmän saantoon kuivaamisella sen sijaan oli vaikutus. Kylmäkuivattujen kuorien uutteiden saannot jäivät alhaisemmiksi kuin verrokki ja uunikuivattujen näytteiden saannot olivat puolestaan korkeammat kuin verrokin. Kondensoituneiden tanniinien saanto vaikutti parantuvan verrokkiin nähden, kun kuori oli kuivattu, mikä nähdään kuvassa vasemmalla alhaalla. Kumpikin kuivausmenetelmä paransi saantoa yhtäläisesti verrokkiin nähden. Oikealla alhaalla oleva kuiva-ainesaannon profiilikuvaaja osoitti kylmäkuivauksen parantavan kuiva-ainesaantoa enemmän kuin uunikuivaus.




Kuva 50. Malli 2:n vasteiden tarkastelu kuivausmenetelmien profiilikuvaajien avulla.

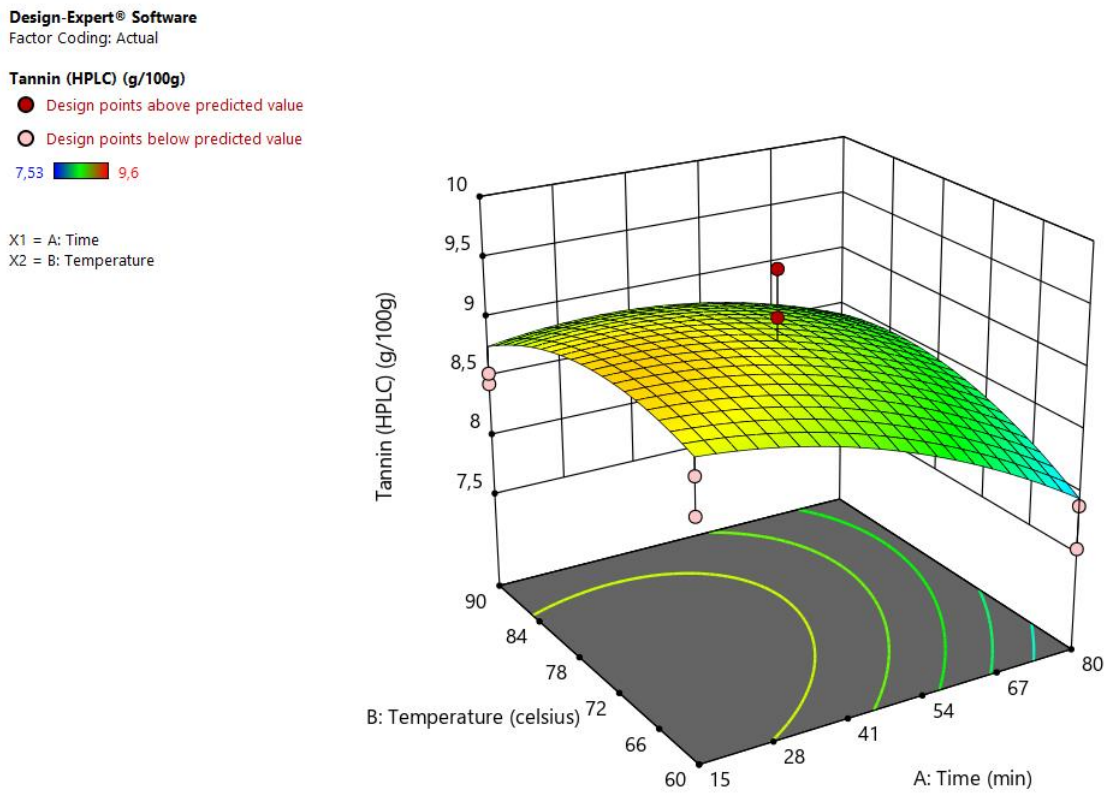
## 11.9 HPLC-mittaukset

HPLC-mittauksiin Luonnonvarakeskuksen toimipaikkaan Jokioisiin lähetettiin vain osa alkuperäisen Malli 1:n näytteistä mittauskapasiteetin rajoitusten vuoksi. On huomattava, että tilastollisesti HPLC-mittausdatasta rakennettu malli ei välttämättä ollut laadukkain, koska kyseessä oli käytännössä osa datasetistä, josta Malli 1 oli rakennettu. Tämän lisäksi muutokset vastearvoissa olivat hyvin pieniä. Kuusen kuoren vesiuutteiden proantosyanidiinipitoisuuksista mallinnettu vastepinta kuitenkin osoitti kohti samoja johtopäätöksiä maksimiuuttolämpötilan suhteen kuin kirjallisuus.

Lämpötilan todettiin kokonaisuudessaan parantavan uuton kokonaissaantoa, mutta ei itse tanniinien saantoa. Kuumavesiuutossa uuttuu tanniinien lisäksi myös useita muita kuin

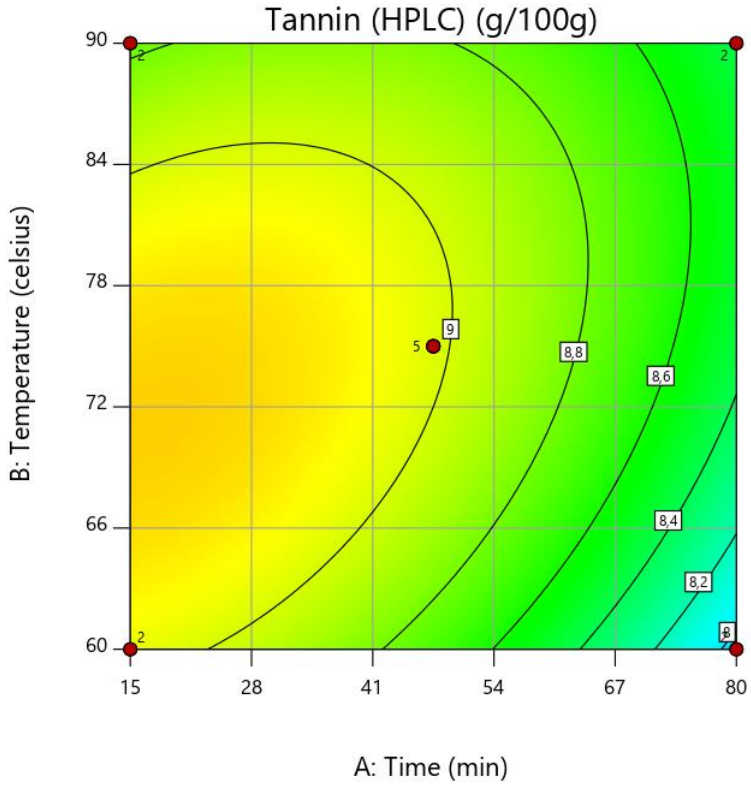
polyfenolisia yhdisteitä, kuten polymeroituneita hiilihydraatteja ja varsinkin yksinkertaisia sokereita.[87] Näiden yhdisteiden pitoisuuden on todettu pysyvän melko tasaisena välillä 20-80 $^{o}$C, mutta näitä korkeammissa lämpötiloissa sokereiden pitoisuus uutteessa alkaa kasvaa merkittävästi[88]. Brosse ja Pizzi suosittelevatkin optimiuuttolämpötilaksi kaikille tanniineille 70-75 $^{o}$C[89].

Mallin rajoitteista huolimatta vastepinta osoitti selvästi, että kuusenkuorien kuumavesiuutteiden optimiuuttolämpötila proantosyanidiinipitoisuuden saannon maksimoimiseksi osui juuri tuohon lämpötilaväliin (Kuva 51).

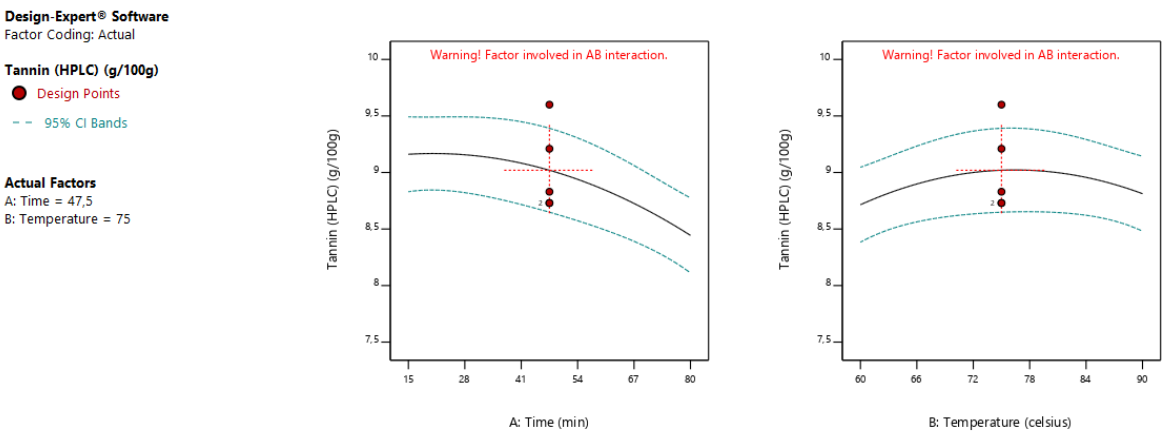



Kuva 51. Kuusen kuoriuutteiden proantosyaniidien mallinnettu pitoisuuden vastepinta.

Vastepinnan optimialue näkyi paremmin ääriviivakuvaajasta (Kuva 52) sekä erikseen tarkasteltuna ajan ja lämpötilan profiilikuvaajista (Kuva 53). Kuvaajista nähtiin selvästi, että tanniinien uuttosaannolle oli olemassa sekä aika-, että lämpötilamaksimi. Malli ennusti korkeimman vasteen proantosyaniidien pitoisuudelle noin 75 $^{o}$C uuttolämpötilan ja noin 20 minuutin staattisen uuttoajan yhdistelmälle.




Kuva 52. Proantosyaniidipitoisuuden ääriviivakuvaaja.




Kuva 53. Proantosyanidipitoisuuden vasteen muutoksen tarkastelu erikseen ajan ja lämpötilan suhteen.

## 11.10 Varastoinnin vaikutus tanniinien pitoisuuteen kuoressa

Varastoinnin vaikutusta kuoren tanniinipitoisuuteen tutkittiin uuttamalla vedellä partikkelikokoon 1 mm jauhettuja näytteitä 25 minuuttia lämpötilassa 95 $^{o}$C. Uuttoon punnitut kuorimäärät sekä niiden kuiva-ainepitoisuus on esitetty Taulukko 13.

Taulukko 13. Varastointikokeen näytteiden varastointiajat sekä kuiva-ainepitoisuudet

| Näyte | Uutto (g) | $m_1$ (g) | $m_2$ (g) | $m_3$ (g) | Kuiva-aine (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| TT – nolla | 4,0272 | 26,3782 | 27,3976 | 27,3622 | 97 % |
| TT – 14 vko | 4,0325 | 27,2948 | 28,2405 | 28,2231 | 98 % |
| TT – 23 vko | 4,0481 | 26,5488 | 27,8496 | 27,7722 | 94 % |
| VT – nolla | 4,0304 | 34,8619 | 35,8645 | 35,8473 | 98 % |
| VT – 14 vko | 4,0202 | 36,5885 | 37,7272 | 37,708 | 98 % |
| VT – 23 vko | 4,0404 | 34,2921 | 35,5584 | 35,476 | 93 % |
| ET – nolla | - | - | - | - | - |
| ET – 14 vko | 4,0014 | 35,6586 | 36,6922 | 36,6392 | 95 % |
| ET – 23 vko | 4,0656 | 26,0276 | 27,0352 | 27,0144 | 98 % |

**TT**: tyvitukki **VT**: välitukki **ET**: ensiharvennustukki

Ensiharvennustukin tuloksia ei tarkasteltu uuttojen epäluotettavuuden vuoksi. Kyseisen näytteen uutot keskeytyivät uuttosolun tukkeutumisen vuoksi ja 14 viikon ja 23 viikon näytteisiin jouduttiin lisäämään hiekkaa uusintauutoissa. Hiekka auttoi kuohkeuttamaan liian hienojakoista näytettä, joka muutoin tiivistyi liiaksi. Liuotin ei kyennyt tunkeutumaan tällaisen tiiviin jauhekakun sisälle ja osa näytteestä jäi kuivaksi. Tässä tapauksessa koko näytemäärä ei tullut uutetuksi, kuten Kuva 54 osoittaa. Liian hienojakoinen näyte myös tukki uuttosolun suodattimen, eikä ASE-laite kyennyt tyhjentämään solua uuton päätteeksi. Uuttosolun tukkeutuminen on esitetty Kuva 55. Alaoikealla sama näyte puhdistettuun hiekkaan sekoitettuna, mikä on mahdollistanut uuttoliuoksen tasaisen jakautumisen näytteeseen ja estänyt suodattimen tukkeutumisen.

Kuva 54. Hienojakoisen näytteen tiivistymisestä aiheutuneen näytepaakun kuiva sisus uuton jälkeen.

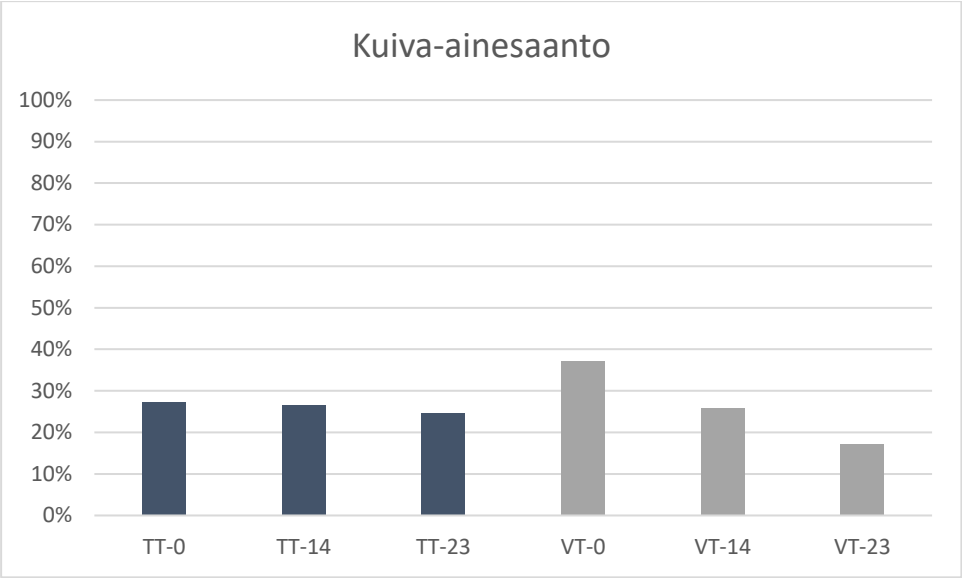
Kuva 55. Hienojakoisen kuorinäytteen aiheuttama uuttosolun tukkeutuminen ja sama näyte hiekkaan sekoitettuna uuton jälkeen.

Kuusenkuorinäytteet tummuivat selkeästi varastoinnin edetessä. Kuva 56 nähtiin selvästi, kuinka nollanäyte eli tuore kuori vasemmalla oli vaaleaa purua ja väri tummui varastoinnin edetessä. Kuvassa keskellä oleva 14 viikkoa vanhentunut kuoripuru oli selkeästi tummentunut. Oikealla oleva 23 viikkoa vanha puru oli tummumisen lisäksi myös huomattavasti punertavampaa kuin tuore puru.

Kuva 56. Varastointikokeen näytteiden tummuminen varastointiajan edetessä.

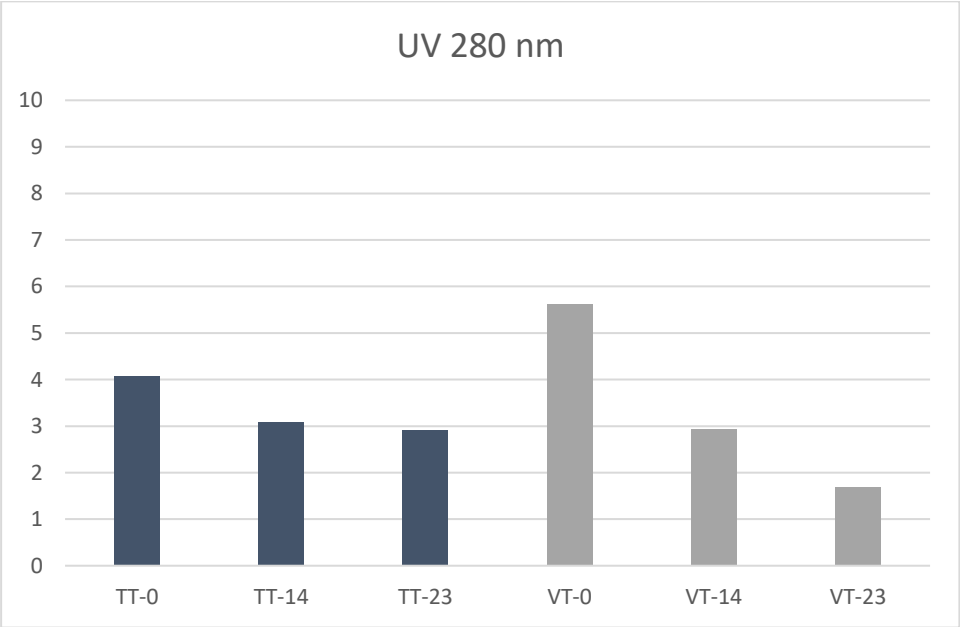
Varastointikokeen näytteiden vesiuutteista analysoitiin kuiva-ainesaanto, UV-aktiiviset komponentit, hydrolysoituvat tanniinit sekä kondensoituneet tanniinit samoilla menetelmillä kuin uuton optimoinnissa.

Kuiva-ainesaantoa tarkasteltaessa Kuva 57, voitiin nähdä, että tyvitukissa uuttosaanto pysyi jotakuinkin samana koko 23 viikon ajan. Välitukissa puolestaan uuton kuiva-ainesaanto oli aluksi korkeampi kuin tyvitukissa. Saantoprosentti kuitenkin alkoi vähenemään nopeasti jo 14 viikon jälkeen. Kuiva-ainesaanto välitukin näytteissä 23 viikon varastoinnin jälkeen oli enää noin puolet nollanäytteen saannosta.



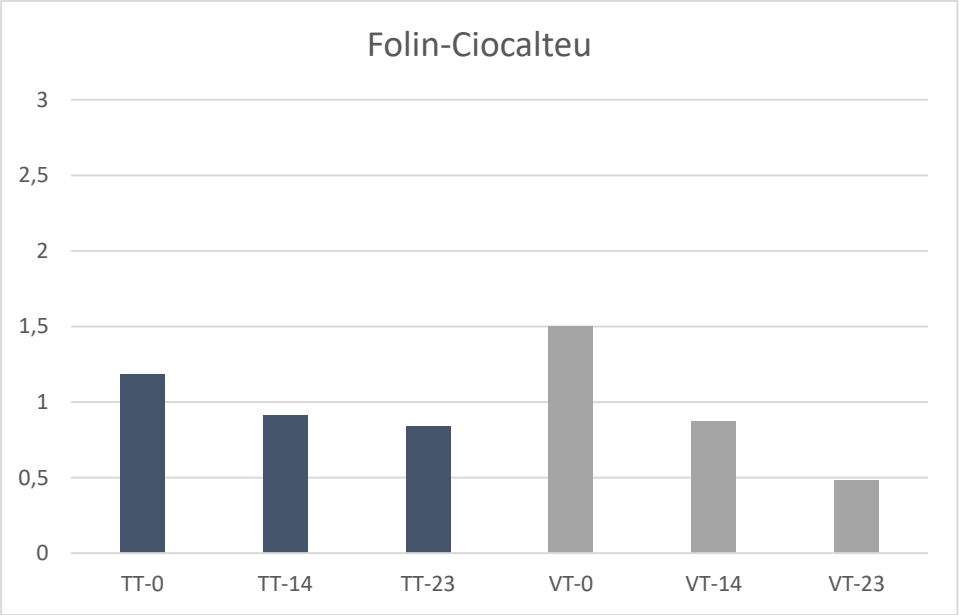

Kuva 57. Kuiva-ainesaannot varastointikokeen uutoissa

UV-aktiivisia komponentteja eli aromaattisia ja konjugoituneita yhdisteitä tarkasteltaessa nähtiin, että uutosaanto oli jälleen aluksi korkeampi välitukissa kuin tyvitukissa. Kuva 58 osoittaa, että molemmissa näytepaikoissa saanto väheni varastoinnin seurauksena. Saannon aleneminen oli suurempaa välitukin näytteissä. Näytteestä, jota oli varastoitu 23 viikkoa, saatiin enää noin 30 % UV-aktiivisten yhdisteiden saannosta verrattuna tuoreeseen näytteeseen.



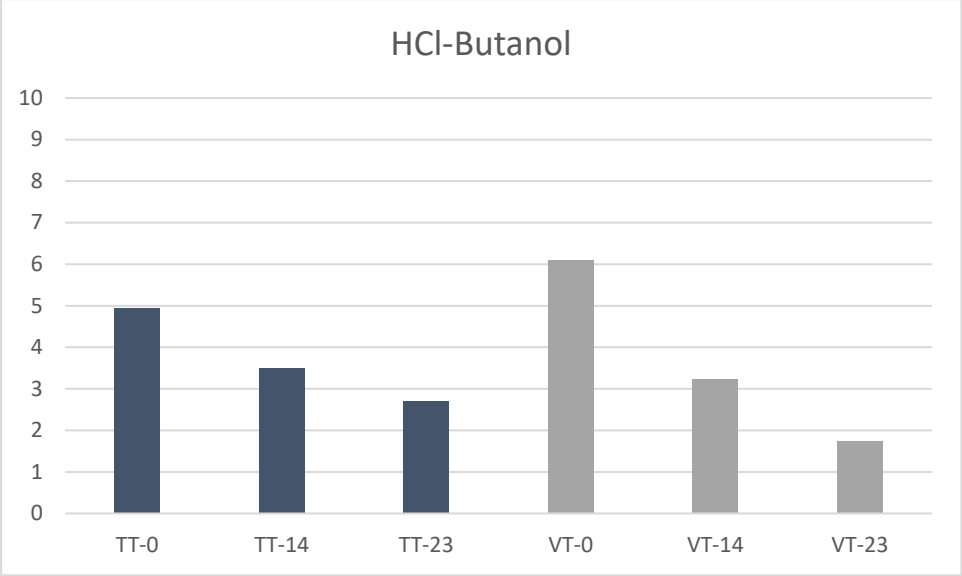

Kuva 58. UV-aktiivisten aineiden pitoisuudet.

Fenolisia yhdisteitä on tuoreissa näytteissä enemmän niitäkin välitukissa kuin tyvitukissa. Kuva 59 voidaan havaita samanlainen saannon väheneminen myös fenolisten yhdisteiden kohdalla kuin aiemmin kuiva-ainesaannon ja kaikkien UV-aktiivisten yhdisteiden kohdalla. Välitukkinäytteestä 23 viikon varastoinnin jälkeen saatiin uutettua noin 70 % vähemmän fenolisia yhdisteitä kuin tuoreesta näytteestä. Tyvitukissa alenema oli pienempi, mutta selkeästi havaittava, noin 30 %.




Kuva 59. Fenolisten aineiden pitoisuudet.

Kondensoituneet tanniinit käyttäytyivät varastointikokeen näytteiden uutteissa samoin kuin muutkin tutkitut komponentit. Välitukissa pitoisuus oli aluksi huomattavasti korkeampi kuin tyvitukissa mutta varastoinnin aikana pitoisuus nopeasti putosi noin 30 %:iin alkuperäisestä, mikä nähtiin hyvin Kuva 60. Tyvitukissa pitoisuuden väheneminen varastoinnin aikana oli maltillisempaa mutta 23 viikon jälkeen kondensoituneita tanniineja saatiin uutettua noin puolet vähemmän kuin aluksi.




Kuva 60. Kondensoituneiden tanniinien pitoisuudet.

# 12 YHTEENVETO

Tässä pro gradu -tutkielmassa pyrittiin matemaattisen mallin avulla tutkimaan uuttoajan ja lämpötilan vaikutusta tanniinien kuumavesiuuttoon kuusenkuorista ja löytämään optimaaliset uutto-olosuhteet. Uutto-olosuhteiden optimointi tehtiin vastepintamallia hyväksi käyttäen ja sen todettiin olevan erinomaisen työkalu tällaisiin monimuuttujakokeisiin. Mallinnuksen avulla saatiin visualisoitua eri parametrien vaikutus uuttosaantoon, sekä yksittäin, että eri parametrien yhteisvaikutuksena.

Mallinnettava koesuunnittelu oli kahden muuttujan vastepintamenetelmä, jossa pyrittiin optimoimaan vasteet aika- ja lämpötila-alueen sekä partikkelikoon muodostamalla alueella, jonka sisällä kaikki testiuutto-olosuhteet mitattiin. Vasteina olivat uuttosaanto mitattuna kolmella eri UV/Vis -spektroskopiaan perustuvalla menetelmällä. Folin-Ciocalteu -määrityksellä analysoitiin hydrolysoituvien tanniinien pitoisuuksia, hapan butanoli -määrityksen avulla kondensoituneiden tanniinien pitoisuuksia ja UV-280 nm -menetelmällä saatiin tutkittua kaikkien UV-aktiivisten yhdisteiden uuttumista. Näiden lisäksi kokonaisuuttosaantoa pyrittiin analysoimaan kuiva-ainesaannon avulla.

Toisessa vaiheessa työtä koesuunnittelu uusittiin samassa aika- ja lämpötila-alueessa vakioidulla partikkelikoolla ja kategorisena muuttujana tutkittiin erilaisten kuivausmenetelmien vaikutusta. Uunikuivauksen ja kylmäkuivauksen vaikutusta analysoitiin vertaamalla saantoa kuivaamattomana pakastettuun verrokkiin. Ensimmäisen mallinnuksen

suurempia saantoja antavaksi todetun pienemmän partikkelikoon uutteista mitattiin HPLC -menetelmällä myös proantosyanidiinipitoisuudet.

Vastepintamenetelmän ansiosta mitatuista uuttosaannoista voitiin tilastollisen mallin avulla ennustaa saanto sellaisissakin uutto-olosuhteissa, joita ei ollut mitattu. Vakioiduissa uutto-olosuhteissa, joissa muunneltiin eri tekijöitä kontrolloidusti ja mitattiin näiden muutosten vaikutusta, huomattiin, että lämpötilalla oli lähes poikkeuksetta suurempi vaikutus uuttosaantoon kuin uuttoajalla. Tietyn pitoisuuden saavutettuaan uutteeseen ei enää siirry merkittäviä määriä lisää uutettavia molekyylejä, vaikka uuttoa jatkettaisiin vielä pidempään.

Lämpötilan todettiin parantavan uuton kokonaissaantoa, ja mallinnettavalla alueella useissa tilanteissa, kokonaisuuttosaanto jatkoi kasvamistaan aina lämpötilan ylärajalle asti. Tämä ei HPLC-mittausten mukaan kuitenkaan tarkoittanut, että itse tanniinien saanto olisi parantunut. Kuumavesiuutossa uuttuu useita muitakin yhdisteitä tanniinien lisäksi, näissä mittauksissa niistä näkyvät ainakin useat yksinkertaiset sokerit. Näiden sokereiden ja muiden polymeroituneiden hiilihydraattien uuttolämpötilan maksimi on todennäköisesti jokin muu kuin tanniineilla, joten kokonaisuuttosaanto voi hyvinkin nousta, vaikka tanniinien määrä uutteessa ei enää muuttuisikaan.

Uuttoon eli massansiirtoon vaikuttavat useat eri tekijät, joten tämän työn tulokset pätevät vain tässä työssä mitattuihin ja mallinnettuihin uutto-olosuhteisiin. Jos jotain olosuhteista muutetaan, kuten uuttosolun kokoa, nesteen suhdetta kuiva-aineeseen tai vaikkapa painetta, niin muuttuvat myös optimiolosuhteet ajan ja lämpötilan suhteen. Uuton saanto ja kinetiikka ovat riippuvaisia käytetyistä olosuhteista, ja jossain vaiheessa optimaalisissa olosuhteissa se osa molekyyleistä, joka uuttuu, on jo siirtynyt uutteeseen, eikä uuton jatkaminen enää lisää niiden määrää uutteessa merkittävissä määrin.

FC- ja hapan butanoli- menetelmillä analysoitujen hydrolysoituvien ja kondensoituneiden tanniinien pitoisuuksien vastepinnat eivät muuttuneet yhtä paljon kuin ajan- ja lämpötilan vaihteluiden suhteen kuin kokonaisuuttosaanto. Mallinnuksen tulosten tulkinta viittaa siihen, että ajan- ja lämpötilan muutokset eivät selittäneet yhtä suurta osaa saannon vaihtelusta näillä menetelmillä, kuin kokonaisuuttosaannon, jota mitattiin UV 280 nm -menetelmän ja kuiva-ainesaannon avulla. Tämä voi tarkoittaa, että tanniinien uuton optimoimiseksi tulisi muuttaa muitakin uuttoparametrejä kuin vain aikaa- ja lämpötilaa. Pienempi partikkelikoko toi hyvin yksiselitteisesti paremman saannon kaikilla mitatuilla vasteilla kuin suurempi partikkelikoko. Kuivausmenetelmällä ei ollut merkittäviä vaikutuksia eri mitattuihin vasteisiin.

Työssä arvioitiin myös varastoinnin vaikutusta tanniinien pitoisuuteen kaadetun tukkipuun kuoressa. Välitukissa oli tuoreena suuremmat pitoisuudet uuteaineita kuin tyvitukin kuoressa mutta 23 viikon varastoinnin jälkeen tyvitukissa oli jäljellä korkeampia pitoisuuksia. Toisin sanoen välitukisst uuteaineita hävisi varastoinnin aikana enemmän kuin tyvitukista. Pitoisuuksien väheneminen tuli ilmi kaikilla mitatuilla arvoilla eli varastoinnin aikana kuoresta väheni niin kondensoituneita kuin hydrolysoituviakin tanniineja sekä muita UV-aktiivisia yhdisteitä ja väheneminen näkyi myös kuiva-ainesaannossa.

Tanniinien kuumavesiuuttoa kuusenkuoresta tullaan testaamaan myöhemmässä vaiheessa pilottitehdasmittakaavassa. Uuttoastiassa on tällöin eri tilavuus, paine sekä nesteen ja kiinteän aineen uuttosuhde, joten optimiuuttoaika ja oletettavasti myös lämpötila voivat olla hyvin erilaiset kuin tässä työssä. Tämän työn pohjalta voidaan kuitenkin olettaa, että myös suuremmille uuttoastioille on olemassa optimiolosuhde ajan ja lämpötilan suhteen, jossa saadaan uutettua maksimaalinen määrä tanniineja samalla välttyen muiden polymeroituneiden hiilihydraattien ja yksinkertaisten sokereiden uuttumiselta.

# 13 KIRJALLISUUSVIITELUETTELO


1. Kärkkäinen, M., *Puutiede*, Sallisen Kustannus Oy, Sotkamo, 1985.

2. Eskelinen, J., Harrastajanahkurin opas, http://www.datafun.fi/nahkuri/index.html (4.3.2019).

3. Harkin, J. M. ja Rowe, J. W., Bark and its possible uses, *USDA Forest Service*, **1969**.

4. GLOBAL FOREST PRODUCTS 2016, FAO, 2017.

5. Feng, S.; Yuan, Z.; Cheng, S.; Leitch, M. ja Xu, C., Valorization of bark for chemicals and materials: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews, Elsevier*, **2013**, *26*, 560-578.

6. Shirmohammadli, Y.; Efhamisisi, D. ja Pizzi, A., Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review, *Industrial Crops and Products*, **2018**, *126*, 316-332.

7. Shiklomanov, I. A., World Water Resources - A New appraisal and assessment for the 21st century, https://wayback.archive-it.org/10611/20160821220508/http://webworld.unesco.org/water/ihp/publications/waterway/webpc/world_water_resources.html (5.5.2019).

8. Kalela, A. ja Väänänen, H., *Pohjolan luonnonkasvit*, 1 painos, Werner Söderström Osakeyhtiö, Porvoo, 1958.

9. Fagernäs, Z., *Biogeography of Norway spruce (Picea abies (L.) Karst.): Insights from a genome-wide study*, Umeå University, Faculty of Science and Technology, Uumaja, Ruotsi, 2017.

10. Lampinen, R. ja Lahti, T., Kasviatlas 2017, http://koivu.luomus.fi/kasviatlas/maps.php?taxon=40139&year=2017 (25.3.2019).

11. Hämet-Ahti, L.; Palmén, A.; Alanko, P. ja Tigerstedt, P. M. A., *Suomen puu- ja pensaskasvio*, 2 painos, Dendrologian Seura - Dendrologiska Sällskapet r.y., Helsinki, 1992.

12. Torvelainen, J., Hakkuukertymä ja puuston poistuma [verkkojulkaisu]., http://www.stat.fi/til/hapup/index.html (3.4.2019).

13. Pyykkö, M., *Kasvianatomia*, 3. painos, Gaudeamus, Hämeenlinna, 1980.

14. Reece, J. B.; Urry, L. A.; Cain, M. L.; Wasserman, S. A.; Minorsky, P. V. ja Jackson, R. B., *Campbell Biology*, 9. painos, Pearson Education, San Francisco, USA, 2011.

15. Jääskeläinen, A. ja Sundqvist, H., *Puun rakenne ja kemia*, Otatieto Oy, Helsinki, 2007.

16. Forest Refine, 2012-2014 : efficient forest biomass supply chain management for biorefineries : synthesis report, 2014, 20 s.

17. Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H. ja Bohn, A., Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angewandte Chemie International Edition*, **2005**, *44*(22), 3358-3393.

18. M. Tutt ja J.Olt, Suitability of various plant species for bioethanol production, *Agronomy Research*, **2011**(1), 261-267.

19. Alén, R., Structure and chemical composition of wood. Kirjassa: Stenius, P. (toim.), *Forest Products Chemistry*, Finnish Paper Engineers' Association, Jyväskylä, 2000, ss. 11-57.

20. Scheller, H. V. ja Ulvskov, P., Hemicelluloses, *Annual Review of Plant Biology*, **2010**, *61*, 263-289.

21. Gibson, L. J., The hierarchical structure and mechanics of plant materials, *Journal of the Royal Society, Interface*, **2012**, *9*(76), 2749-2766.

22. Freudenberg, K., Lignin: Its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols, *Science*, **1965**, *148*, 595-600.

23. Glennie, D. W. ja McCarthy, J. L., Chemistry of lignin. Kirjassa: Libby, C. E. (toim.), *Pulp and Paper Science and Technology*, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1962, ss. 82-107.

24. Kuhad, R. C. ja Singh, A., *Lignocellulose biotechnology: Future prospects.*, I.K. International Pvt Ltd., New Delhi, Intia, 2007.

25. Hurter, A. M., Utilization of annual plants and agricultural residues for the production pulp and paper, *Pulping Conference TAPPI*, **1988**, *1*, 139-160.

26. Freudenberg, K., Analytical and biochemical background of a constitutional scheme of lignin. Kirjassa: Marton, J. (toim.), *Lignin Structure and Reactions*, American Chemical Society, Washington D.C., USA, 1966, ss. 1-21.

27. Boerjan, W.; Ralph, J. ja Baucher, R., Lignin biosynthesis, *Annual Review of Plant Biology*, **2003**, *54*, 159-166.

28. Dolgonosov, B. M. ja Gubernatorova, T. N., Modeling the biodegradation of multicomponent organic matter in an aquatic environment: 2. analysis of the structural organization of lignin, *Water Resources*, **2010**, *37*(3), 320-331.

29. Preedy, V. R., *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013.

30. Sjöström, E. ja Alén, R., *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*, Springer-Verlag, Berliini, Saksa, 1999.

31. Staines, H. M. ja Krishna, S., Treatment and Prevention of Malaria : Antimalarial Drug Chemistry, Action and Use, 2011, 45.

32. Hagerman, A. E., Tannin Handbook, www.users.muohio.edu/hagermae/ (04.04.2018).

33. Bate-Smith, E. C. ja Swain, T., Flavonoid compounds, *Comparative Biochemistry*, **1962**, *3*, 705-809.

34. Haslam, E., *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*, University of Cambridge Oriental Publications, Cambridge, 1989.

35. Alén, R., *Kokoelma orgaanisia yhdisteitä - Ominaisuudet ja käyttökohteet*, 1. painos, Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, 2009.

36. García-Niño, W. R. ja Zazueta, C., Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection, *Pharmacological Research*, **2015**, *97*, 48-103.

37. Vieno, N. ja Pelto-Huikko, A., Vesikoulu - Tietopaketti juomavedestä ja sen valmistuksesta Suomessa, *Vesikoulu*, 2009.

38. Bratby, J., *Coagulation and Flocculation in Water and Wastewater Treatment*, 3. painos, IWA Publishing, Lontoo, UK, 2016.

39. Brandt, M. J.; Johnson, K. M.; Elphinston, A. J. ja Ratnayaka Don, D., *Twort's Water Supply*, 7. painos, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 2007.

40. Duan, J. ja Gregory, J., Coagulation by hydrolysing metal salts, *Advances in Colloid and Interface Science*, **2002**, *100 - 102*, 475-502.

41. Renault, F.; Sancey, B.; Badot, P. M. ja Crini, G., Chitosan for coagulation/flocculation processes - an eco-friendly approach, *European Polymer Journal*, **2009**, *45*, 1337-1348.

42. Pan, J.; Huang, C. H.; Chen, S. H. ja Chung, Y., Evaluation of a modified chitosan biopolymer for coagulation of colloidal particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **1999**, *147*, 359-364.

43. Mwangi, I.; Ngila, J.; Ndungu, P. ja Msagati, T., Method development for the determination of diallyldimethylammonium chloride at trace levels by epoxidation process, *Water, Air and Soil Pollution*, **2013**, *224*(9), 1-9.

44. Xiong, B.; Loss, R. D.; Shields, D.; Pawlik, T.; Hochreiter, R.; Zydney, A. L. ja Kumar, M., Polyacrylamide degradation and its implications in environmental systems, *Nature Partner Journals Clean Water*, **2018**, *1*(1), 1-9.

45. Rahman, M.; Rana, M.; Nasreen, Z.; Hossain, M. M. ja Sharmin, A., Treatment of reactive dye containing textile wastewater using microwave assisted synthesized poly(diallyldimethylammonium chloride), *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, **2018**, *41*(2), 165-174.

46. Zeng, T.; Pignatello, J. J.; Li, R. J. ja Mitch, W. A., Synthesis and application of a quaternary phosphonium polymer coagulant to avoid N-nitrosamine formation, *Environmental Science & Technology*, **2014**, *48*(22), 13392-13401.

47. Lalov, I. G.; Guerginov, I. I.; Krysteva, M. A. ja Fartsov, K., Treatment of waste water from distilleries with chitosan, *Water Research*, **2000**, *34*(5), 1503-1506.

48. Colangelo, D.; Torchio, F.; De Faveri, D. M. ja Lambri, M., The use of chitosan as alternative to bentonite for wine fining: Effects on heat-stability, proteins, organic acids, colour, and volatile compounds in an aromatic white wine, *Food Chemistry,* **2018**, *264*, 301-309.

49. Kyzas, G. Z. ja Bikiaris, D. N., Recent modifications of chitosan for adsorption applications: A critical and systematic review, *Marine Drugs,* **2015**, *13*(1), 312-337.

50. Peniche, C.; Argüelles-Monal, W. ja Goycoolea, F. M., Chitin and chitosan: Major sources, properties and applications. Kirjassa: Belgacem, M. N. ja Gandini, A. (toim.), *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, Elsevier Science, Hollanti, 2008, ss. 517-542.

51. Muzzarelli, R. A. A., Chitin. Kirjassa: Aspinall, G. O. (toim.), *The polysaccharides*, Academic Press, New York, USA, 1983, ss. 417-450.

52. Luo, Y. ja Wang, Q., Recent advances of chitosan
and its derivatives for novel
applications in food science, *Journal of Food Processing & Beverages,* **2013**, *1*(1), 1-13.

53. Shahidi, F.; Arachchi, J. K. V. ja Yeon, Y., Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science & Technology,* **1999**, *10*(2), 37-51.

54. Chung, T. W.; Lu, Y. F.; Wang, S. S.; Lin, Y. S. ja Chu, S. H., Growth of human endothelial cells on photochemically grafted gly-arg-gly-asp (GRGD) chitosans. *Biomaterials,* **2002**, *23*(24), 4803-4809.

55. Onsøyen, E. ja Skaugrud, O., Metal recovery using chitosan, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology,* **1990**, *49*(4), 395-404.

56. Mohanasrinivasan, V.; Mishra, M.; Palival, J. S.; Singh, S. K.; Selvarajan, E.; Suganthi, V. ja Devi, S., Studies on heavy metal removal efficiency and antibacterial activity of chitosan prepared from shrimp shell waste, *3 Biotech,* **2014**, *4*(2), 167-175.

57. Wei, Y.; Cheng, F. ja Zheng, H., Synthesis and flocculating properties of cationic starch derivatives, *Carbohydrate Polymers,* **2008**, *74*(3), 673-679.

58. Thomas, D. J. ja Atwell, W. A., *Starches*, American Association of Cereal Chemists, Minnesota, USA, 1999.

59. Teh, C. Y.; Wu, T. Y. ja Juan, J. C., Optimization of agro-industrial wastewater treatment using unmodified rice starch as a natural coagulant, *Industrial Crops & Products,* **2014**, *56*, 17-26.

60. Costa, J. M., Metal recovery using tannin resin: An alternative for the treatment of electronic waste, *International Journal of Environmental Sciences & Natural Resources,* **2019**, *17*(3).

61. Zhan, X. M. ja Xhao, X., Mechanism of lead adsorption from aqueous solutions using an adsorbent synthesized from natural condensed tannin, *Water Research,* **2003**, *37*, 3905-3912.

62. Nakano, Y.; Takeshita, K. ja Tsutsumi, T., Adsorption mechanism of hexavalent chromium by redox within condensed-tannin gel, *Water Research*, **2001**, *35*(2), 496-500.

63. Kim, Y. H. ja Nakano, Y., Adsorption mechanism of palladium by redox within condensed-tannin gel, *Water Research*, **2005**, *39*(7), 1324-1330.

64. Palma, G.; Freer, J. ja Baeza, J., Removal of metal ions by modified pinus radiata bark and tannins from water solutions, *Water Research*, **2003**, *37*(20), 4974-4980.

65. Sánchez-Martín, J.; Beltrán, J. ja Pizarro-Rebollo, A., Cationic tannins: New and effective coagulant flocculants agents. Kirjassa: Maradona, E. M. ja Valdez, C. J. (toim.), *Handbook of Wastewater Treatment: Biological Methods, Technology and Environmental Impact*, Nova Science Publishers, 2013, ss. 221-247.

66. Beltrán-Heredia, J. ja Sánchez-Martín, J., Municipal wastewater treatment by modified tannin flocculant agent, *Desalination*, **2009**, *249*(1), 353-358.

67. Hameed, Y. T.; Idris, A.; Hussain, S. A. ja Abdullah, N., A tannin-based agent for coagulation and flocculation of municipal wastewater: Chemical composition, performance assessment compared to polyaluminum chloride, and application in a pilot plant, *Journal of Environmental Management*, **2016**, *184*(Pt 3), 494-503.

68. Yin, C., Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment, *Process Biochemistry*, **2010**, *45*(9), 1437-1444.

69. Bianchi, S.; Kroslakova, I.; Janzon, R.; Mayer, I.; Saake, B. ja Pichelin, F., Characterization of condensed tannins and carbohydrates in hot water bark extracts of european softwood species, *Phytochemistry*, **2015**, *120*, 56-61.

70. Hennion, M., Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1999**, *856*(1-2), 3-54.

71. Brown, R. C. ja Wang, K., Extraction of value-added chemicals from bio-oil products. Kirjassa: Brown, R. C. ja Wang, K. (toim.), *Fast Pyrolysis of Biomass: Advances in Science and Technology*, The Royal Society of Chemistry, Croydon, UK, 2017, ss. 190-191.

72. Dutta, B. K., *Principles of Mass Transfer and Separation Processes*, 3. painos, PHI Learning Private Limited, New Delhi, Intia, 2009.

73. Richter, B. E.; Jones, B. A.; Ezzell, J. L. ja Porter, N. L., Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, *Analytical Chemistry*, **1996**, *68*(6), 1033-1039.

74. Efthymiopoulos, I.; Hellier, P.; Ladommatos, N.; Eveleigh, A. ja Mills-Lamptey, B., Factors affecting the efficiency of pressurized solvent extraction of oil from spent coffee grounds, *Detritus*, **2019**, *8*, 1-9.

75. Jablonský, M.; Vernarecová, M.; Ház, A.; Dubinyová, L.; Škulcová, A.; Sladková, A. ja Šurina, I., Extraction of phenolic and lipophilic compounds from spruce (*picea abies*) bark using accelerated solvent extraction by ethanol, *Wood Research*, **2015**(60), 583-590.

76. Jaarinen, S. ja Niiranen, J., *Laboratorion analyysitekniikka*, 5. - 6. painos, Edita Prima Oy, Helsinki, 2008.

77. McMurry, J., *Fundamentals of Organic Chemistry*, 5. painos, Thomson-Brooks/Cole, 2003.

78. Skoog, D. A. ja Leary, J. J., *Principles of Instrumental Analysis*, 4. painos, Sauders College Publishing, 1992.

79. Suominen, I. ja Ollikka, P., *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*, 3. painos, Opetushallitus, Helsinki, 2006.

80. Sanchez-Rangel, J. C.; Benavides, J. ja Heredia, B., The FolinCiocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination, *Analytical methods*, **2013**, *5*(21), 5990-5999.

81. Denis, W., On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *The Journal of Biological Chemistry*, **1912**, *12*, 239-243.

82. Folin, O. ja Ciocalteu, V., On tyrosine and tryptophane determinations in proteins, *Journal of Biological Chemistry*, **1927**, *73*, 627-650.

83. Khoddami, A.; Wilkes, M. A. ja Roberts, T. H., Techniques for analysis of plant phenolic compounds, *Molecules*, **2013**, *18*(2), 2328-2375.

84. Karjalainen, T., Koesuunnittelu - Tehokas prosessin sekä datankeräys- ja analysointimenetelmä, http://www.qk-karjalainen.fi/fi/artikkelit/koesuunnittelu-tehokas-prosessin-sekae-datankeraeys-ja-analysoin/ (18.11.2018).

85. Box, G. E. B. ja Wilson, K. B., On the experimental attainment of optimum conditions, *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, **1951**, *13*, 1-45.

86. Myréen, B., *Prosessimallin rakentaminen ja koesuunnittelu*, Insinöörijärjestön koulutuskeskus, Helsinki, 1975.

87. Tahir, P. M.; Halip, J. A. ja Lee, S. H., Tannin-based bioresin as adhesive. Kirjassa: Ariffin, H.; Sapuan, S. M. ja Hassan, M. A. (toim.), *Lignocellulose for Future Bioeconomy*, Elsevier, 2019, ss. 115-117.

88. Makino, R.; Ohara, S. ja Hashida, K., Efficient extraction of polyphenolics from the bark of tropical tree species, *Journal of Tropical Forest Science*, **2009**, *21*(1), 45-49.

89. Brosse, N. ja Pizzi, A. P., Tannins for wood adhesives,foams and composites: Preparation, characterization, and testing. Kirjassa: He, Z. (toim.), *Bio-based Wood Adhesives: Preparation, Characterization, and Testing*, CRC Press, New Orleans, USA, 2016, ss. 197-220.

**LIITE 1**

Date : 14.5.2018 Time : 13:27:08

CALIBRATION

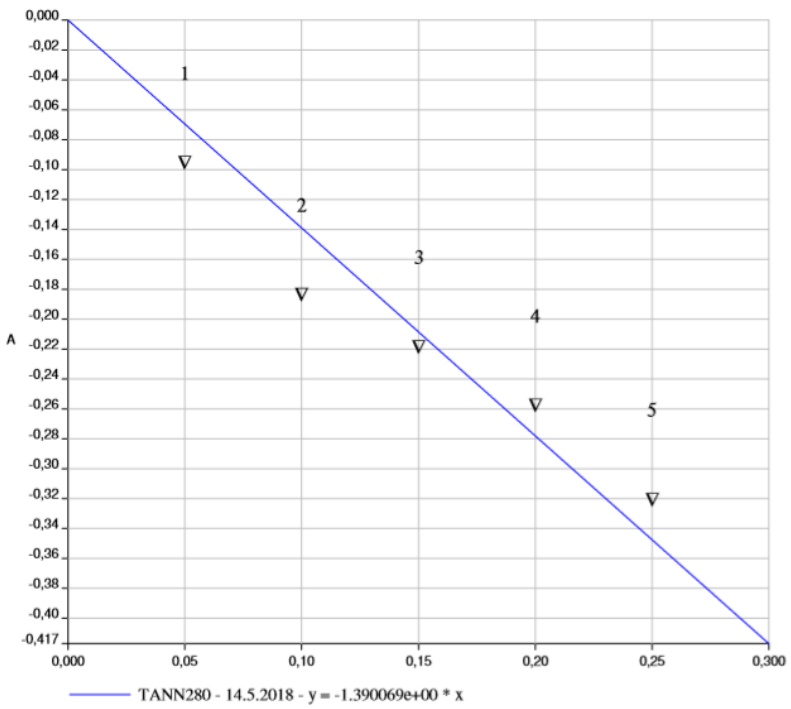
Date: 14.5.2018 Time: 12:50:07
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 101N1062101
Method: TANN280
Ordinate mode: Single wavelength
Baseline: No correction ( 0,00 0,00 )
Analyst:

| Wavelength(s) | | Sample ID | Concentration | Ord. value | Comment |
|---|---|---|---|---|---|
| 280,0 | 0,0 | tann280.A01 | 0,0500 | -0,099 | |
| 280,0 | 0,0 | tann280.A02 | 0,1000 | -0,188 | |
| 280,0 | 0,0 | tann280.A03 | 0,1500 | -0,223 | |
| 280,0 | 0,0 | tann280.A04 | 0,2000 | -0,262 | |
| 280,0 | 0,0 | tann280.A05 | 0,2500 | -0,325 | |

Equation: y = -1.390069e+00 * x

Residual error: 0,032807
Correlation coefficient: 0,920924

Date: 14.5.2018 Time: 13:29:40



**LIITE 2**

Date : 15.5.2018 Time : 14:35:08

CALIBRATION

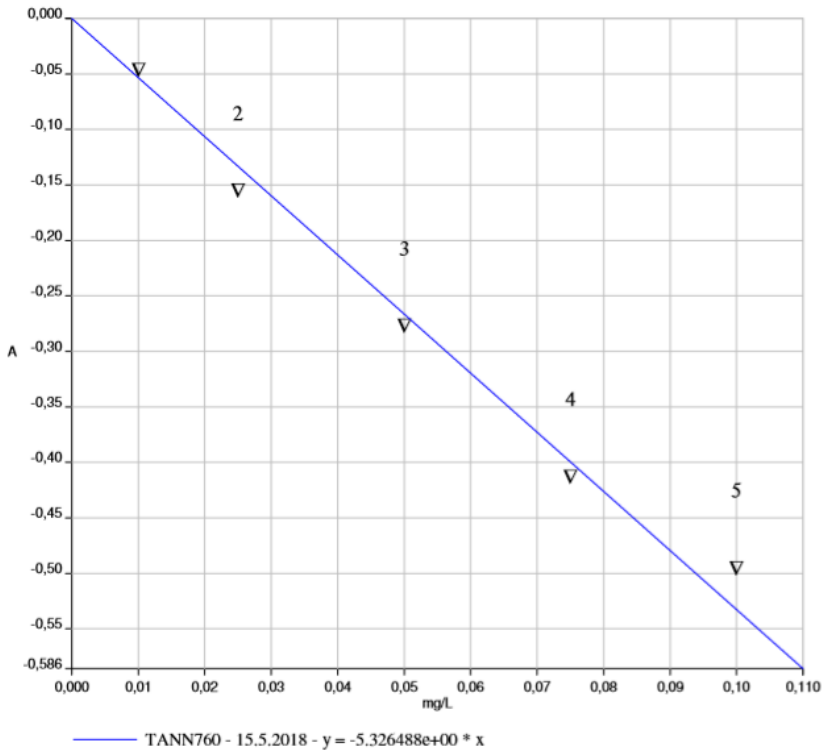
Date: 15.5.2018 Time: 14:13:24
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 101N1062101
Method: TANN760
Ordinate mode: Single wavelength
Baseline: No correction ( 0,00 0,00 )
Analyst:

| Wavelength(s) | | Sample ID | Concentration | | Ord. value | Comment |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 760,0 | 0,0 | Tann760.A01 | 0,0100 | mg/L | -0,053 | |
| 760,0 | 0,0 | Tann760.A02 | 0,0250 | mg/L | -0,161 | |
| 760,0 | 0,0 | Tann760.A03 | 0,0500 | mg/L | -0,283 | |
| 760,0 | 0,0 | Tann760.A04 | 0,0750 | mg/L | -0,419 | |
| 760,0 | 0,0 | Tann760.A05 | 0,1000 | mg/L | -0,501 | |

Equation: y = -5.326488e+00 * x

Residual error: 0,024861
Correlation coefficient: 0,990736

Date: 15.5.2018 Time: 14:35:20



**LIITE 3**

Date : 14.5.2018 Time : 17:12:59

CALIBRATION

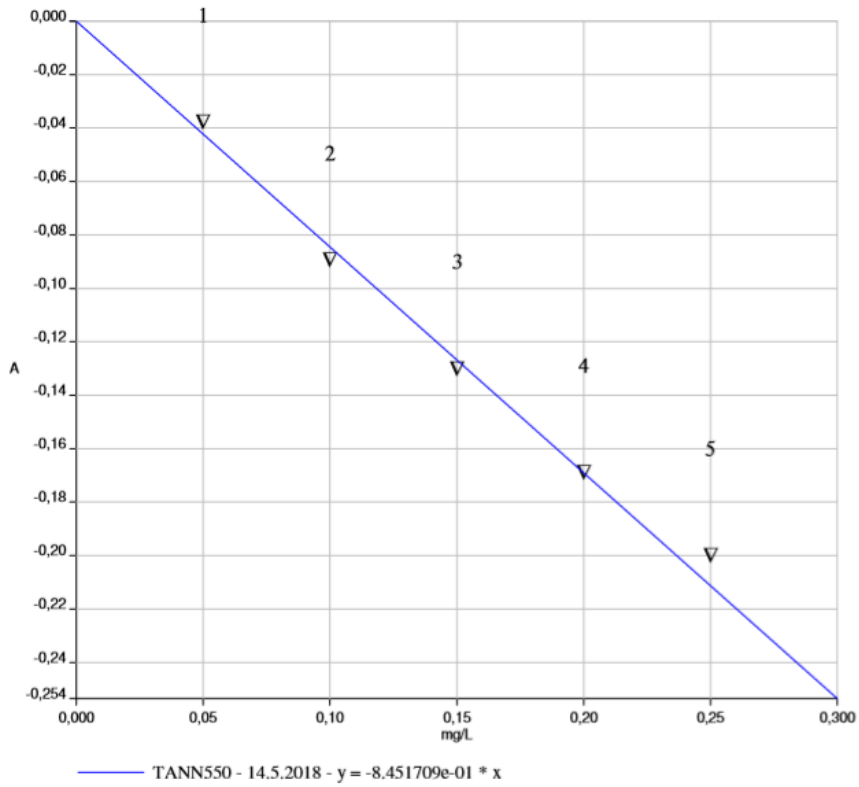
Date: 14.5.2018 Time: 16:45:06
Instrument: PerkinElmer Lambda 35 Serial No: 101N1062101
Method: TANN550
Ordinate mode: Single wavelength
Baseline: No correction ( 0,00 0,00 )
Analyst:

| Wavelength(s) | | Sample ID | Concentration | | Ord. value | Comment |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 550,0 | 0,0 | tann550.A01 | 0,0500 | mg/L | -0,040 | |
| 550,0 | 0,0 | tann550.A02 | 0,1000 | mg/L | -0,092 | |
| 550,0 | 0,0 | tann550.A03 | 0,1500 | mg/L | -0,132 | |
| 550,0 | 0,0 | tann550.A04 | 0,2000 | mg/L | -0,171 | |
| 550,0 | 0,0 | tann550.A05 | 0,2500 | mg/L | -0,202 | |

Equation: y = -8.451709e-01 * x

Residual error: 0,006699
Correlation coefficient: 0,994527

Date: 14.5.2018 Time: 17:13:09



**LIITE 4**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 1

**Response: UV280**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 4,8300 | 11 | 0,4392 | 73,91 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 0,1382 | 1 | 0,1382 | 23,25 | < 0.0001 | |
| **B-TEMPERATURE** | 3,8100 | 1 | 3,8100 | 641,11 | < 0.0001 | |
| **C-PARTICLE** | 0,1322 | 1 | 0,1322 | 22,24 | < 0.0001 | |
| **AB** | 0,0250 | 1 | 0,0250 | 4,20 | 0,0492 | |
| **AC** | 0,0077 | 1 | 0,0077 | 1,29 | 0,2647 | |
| **BC** | 0,0001 | 1 | 0,0001 | 0,0185 | 0,8928 | |
| **$A^2$** | 0,0821 | 1 | 0,0821 | 13,81 | 0,0008 | |
| **$B^2$** | 0,0117 | 1 | 0,0117 | 1,97 | 0,1702 | |
| **ABC** | 0,0082 | 1 | 0,0082 | 1,39 | 0,2483 | |
| **$A^2C$** | 0,0177 | 1 | 0,0177 | 2,97 | 0,0949 | |
| **$B^2C$** | 0,0009 | 1 | 0,0009 | 0,1444 | 0,7066 | |
| **RESIDUAL** | 0,1783 | 30 | 0,0059 | | | |
| **LACK OF FIT** | 0,0514 | 6 | 0,0086 | 1,62 | 0,1843 | not significant |
| **PURE ERROR** | 0,1268 | 24 | 0,0053 | | | |
| **COR TOTAL** | 5,01 | 41 | | | | |

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 73,91 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C, AB, $A^2$ are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 1,62 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 18,43% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good - we want the model to fit.

## Fit Statistics - UV280

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,0771 | **$R^2$** | 0,9644 |
| **Mean** | 3,00 | **Adjusted $R^2$** | 0,9514 |
| **C.V. %** | 2,57 | **Predicted $R^2$** | 0,9290 |
| | | **Adeq Precision** | 28,6395 |

The **Predicted $R^2$** of 0,9290 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,9514; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 28,640 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

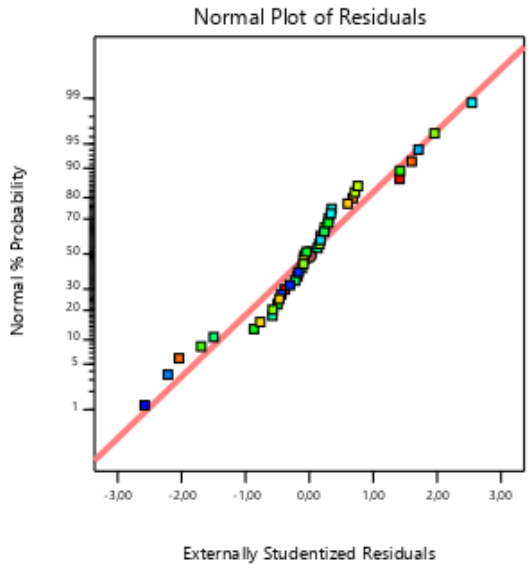
## Diagnostics: Normal Plot of Residuals - UV280

**Design-Expert® Software**

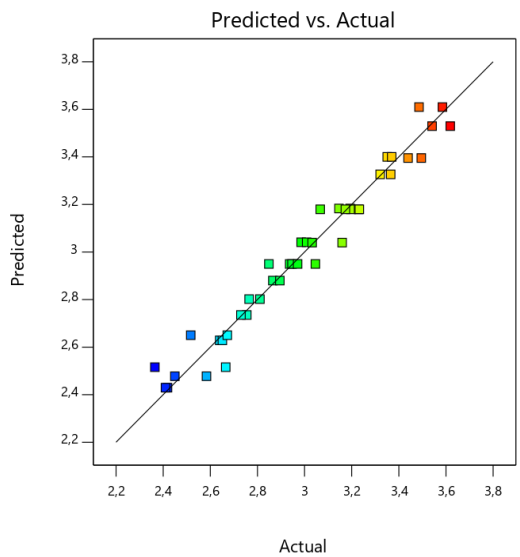
**UV280**

Color points by value of UV280:

2,36464 3,61825




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – UV280



**LIITE 5**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 1

**Response: Folin-Ciocalteu**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 0,4073 | 11 | 0,0370 | 12,54 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 0,0004 | 1 | 0,0004 | 0,1305 | 0,7206 | |
| **B-TEMPERATURE** | 0,2670 | 1 | 0,2670 | 90,42 | < 0.0001 | |
| **C-PARTICLE** | 0,0034 | 1 | 0,0034 | 1,16 | 0,2908 | |
| **AB** | 0,0059 | 1 | 0,0059 | 2,01 | 0,1673 | |
| **AC** | 0,0023 | 1 | 0,0023 | 0,7882 | 0,3819 | |
| **BC** | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 0,0843 | 0,7736 | |
| **$A^2$** | 0,0309 | 1 | 0,0309 | 10,46 | 0,0030 | |
| **$B^2$** | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 0,0760 | 0,7848 | |
| **ABC** | 0,0007 | 1 | 0,0007 | 0,2333 | 0,6327 | |
| **$A^2C$** | 0,0087 | 1 | 0,0087 | 2,95 | 0,0968 | |
| **$B^2C$** | 0,0031 | 1 | 0,0031 | 1,04 | 0,3153 | |
| **RESIDUAL** | 0,0856 | 29 | 0,0030 | | | |
| **LACK OF FIT** | 0,0198 | 6 | 0,0033 | 1,15 | 0,3644 | not significant |
| **PURE ERROR** | 0,0658 | 23 | 0,0029 | | | |
| **COR TOTAL** | 0,4929 | 40 | | | | |

These rows were ignored for this analysis: 20

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 12,54 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case B, $A^2$ are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 1,15 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 36,44% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics – Folin-Ciocalteu

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,0543 | **$R^2$** | 0,8263 |
| **Mean** | 1,01 | **Adjusted $R^2$** | 0,7604 |
| **C.V. %** | 5,40 | **Predicted $R^2$** | 0,6501 |
| | | **Adeq Precision** | 12,8616 |

The **Predicted $R^2$** of 0,6501 is in reasonable agreement with the Adjusted $R^2$ of 0,7604; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 12,862 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

## Diagnostics: Normal Plot of Residuals – Folin-Ciocalteu

**Design-Expert® Software**

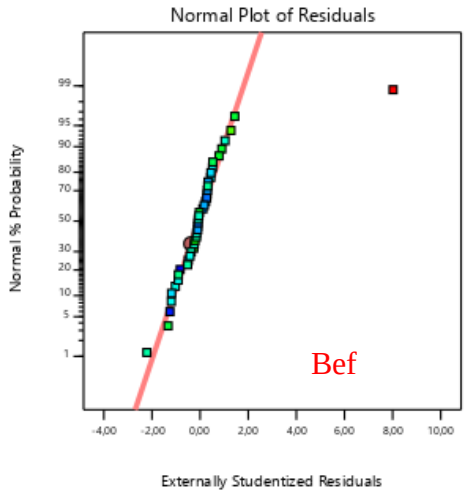
**FC**

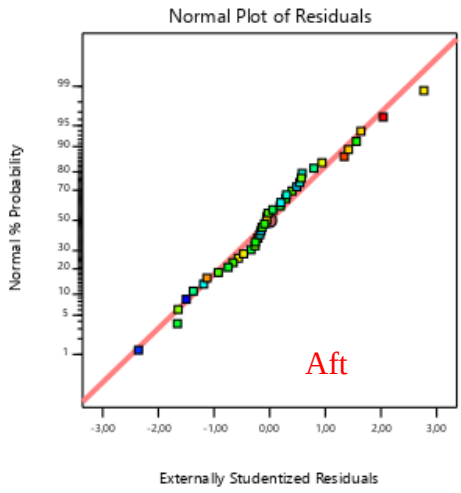
Color points by value of FC:

0,765459 1,22607

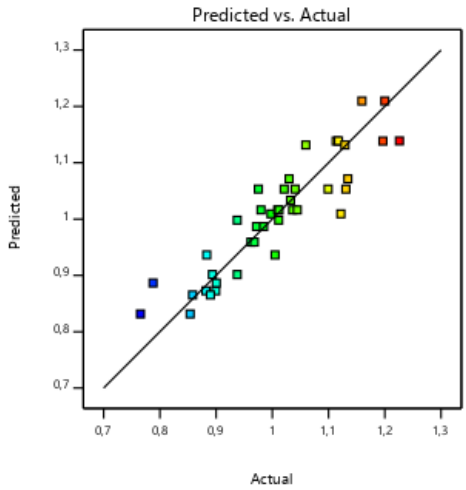
Excluded:

Std # 10 Run # 20
X: 1,55907
Y: 1,19777




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – Folin-Ciocalteu



**LIITE 6**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 1

**Response: Hapan butanoli**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 21,79 | 3 | 7,26 | 20,36 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 0,3194 | 1 | 0,3194 | 0,8953 | 0,3500 | |
| **B-TEMPERATURE** | 16,84 | 1 | 16,84 | 47,22 | < 0.0001 | |
| **C-PARTICLE** | 4,63 | 1 | 4,63 | 12,97 | 0,0009 | |
| **RESIDUAL** | 13,56 | 38 | 0,3567 | | | |
| **LACK OF FIT** | 4,66 | 14 | 0,3332 | 0,8994 | 0,5702 | not significant |
| **PURE ERROR** | 8,89 | 24 | 0,3705 | | | |
| **COR TOTAL** | 35,35 | 41 | | | | |

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III - Partial**

The **Model F-value** of 20,36 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case B, C are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 0,90 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 57,02% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics – Hapan butanoli

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,5973 | **$R^2$** | 0,6165 |
| **Mean** | 5,7 | **Adjusted $R^2$** | 0,5862 |
| **C.V. %** | 10,48 | **Predicted $R^2$** | 0,5264 |
| | | **Adeq Precision** | 14,7348 |

The **Predicted $R^2$** of 0,5264 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,5862; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 14,735 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

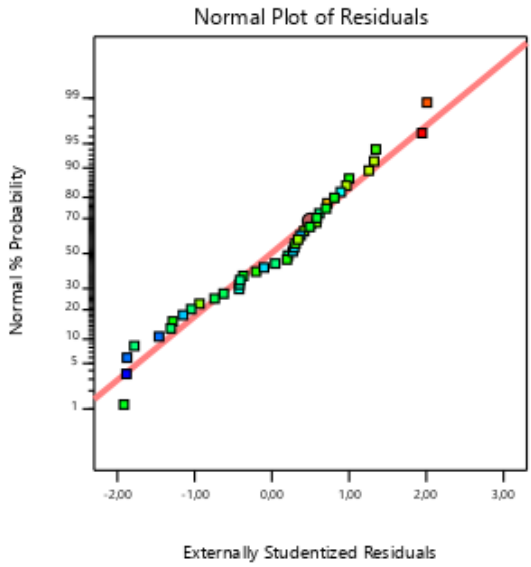
## Diagnostics: Normal Plot of Residuals – Hapan butanoli

**Design-Expert® Software**

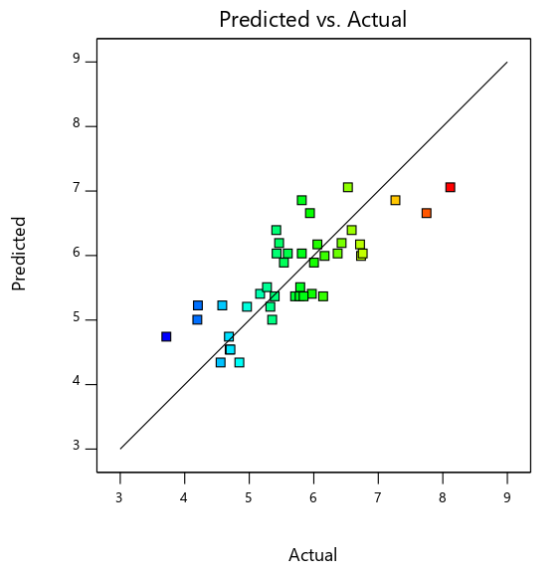
**Hapan But**

Color points by value of Hapan But:

3,71539 8,11587




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – Hapan butanoli



**LIITE 7**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 1

**Response: Kuiva-ainesaanto**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 142,24 | 11 | 12,93 | 35,73 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 11,87 | 1 | 11,87 | 32,79 | < 0.0001 | |
| **B-TEMPERATURE** | 92,44 | 1 | 92,44 | 255,44 | < 0.0001 | |
| **C-PARTICLE** | 6,76 | 1 | 6,76 | 18,68 | 0,0002 | |
| **AB** | 0,4092 | 1 | 0,4092 | 1,13 | 0,2964 | |
| **AC** | 0,0369 | 1 | 0,0369 | 0,1020 | 0,7517 | |
| **BC** | 0,1678 | 1 | 0,1678 | 0,4637 | 0,5013 | |
| **$A^2$** | 1,93 | 1 | 1,93 | 5,32 | 0,0284 | |
| **$B^2$** | 1,16 | 1 | 1,16 | 3,21 | 0,0834 | |
| **ABC** | 0,1125 | 1 | 0,1125 | 0,3109 | 0,5814 | |
| **$A^2C$** | 0,5170 | 1 | 0,5170 | 1,43 | 0,2417 | |
| **$B^2C$** | 0,3746 | 1 | 0,3746 | 1,04 | 0,3174 | |
| **RESIDUAL** | 10,50 | 29 | 0,3619 | | | |
| **LACK OF FIT** | 2,52 | 6 | 0,4201 | 1,21 | 0,3361 | not significant |
| **PURE ERROR** | 7,97 | 23 | 0,3467 | | | |
| **COR TOTAL** | 152,73 | 40 | | | | |

These rows were ignored for this analysis: 41

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type III – Partial**

The **Model F-value** of 35,73 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C, $A^2$ are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 1,21 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 33,61% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics – Kuiva-ainesaanto

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,6016 | **$R^2$** | 0,9313 |
| **Mean** | 21,12 | **Adjusted $R^2$** | 0,9052 |
| **C.V. %** | 2,85 | **Predicted $R^2$** | 0,8506 |
| | | **Adeq Precision** | 20,2523 |

The **Predicted $R^2$** of 0,8506 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,9052; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 20,252 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

## Diagnostics: Normal Plot of Residuals – Kuiva-ainesaanto

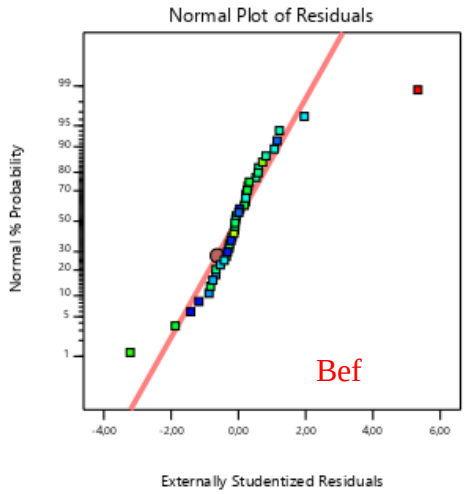
**Design-Expert® Software**

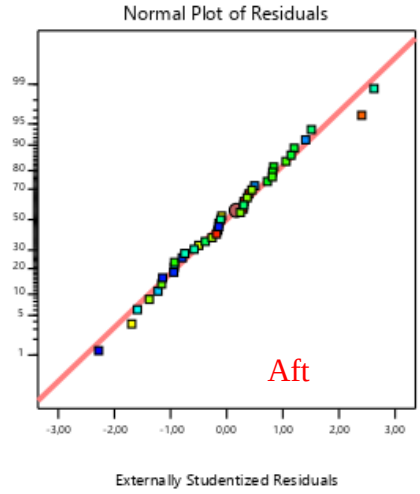
**Extraction Yield**

Color points by value of Extraction Yield:

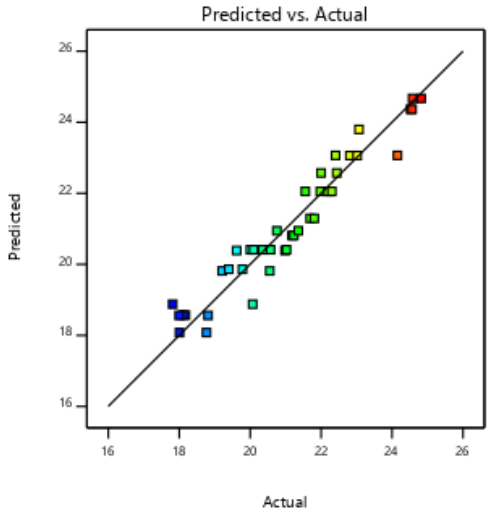
17,816 24,8212

Excluded: 41




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – Kuiva-ainesaanto



**LIITE 8**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 2

**Response: UV280**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 5,91 | 4 | 1,48 | 14,5 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 0,6207 | 1 | 0,6207 | 6,09 | 0,02 | |
| **B-TEMPERATURE** | 4,56 | 1 | 4,56 | 44,74 | < 0.0001 | |
| **C-DRYING** | 0,7302 | 2 | 0,3651 | 3,58 | 0,0412 | |
| **RESIDUAL** | 2,85 | 28 | 0,1019 | | | |
| **LACK OF FIT** | 2,23 | 22 | 0,1015 | 0,9834 | 0,5599 | not significant |
| **PURE ERROR** | 0,6195 | 6 | 0,1032 | | | |
| **COR TOTAL** | 8,76 | 32 | | | | |

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type II – Classical**

The **Model F-value** of 14,50 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, C are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 0,98 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 55,99% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics - UV280

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,3192 | **$R^2$** | 0,6744 |
| **Mean** | 2,45 | **Adjusted $R^2$** | 0,6279 |
| **C.V. %** | 13,03 | **Predicted $R^2$** | 0,5468 |
| | | **Adeq Precision** | 12,8525 |

The **Predicted $R^2$** of 0,5468 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,6279; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 12,852 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

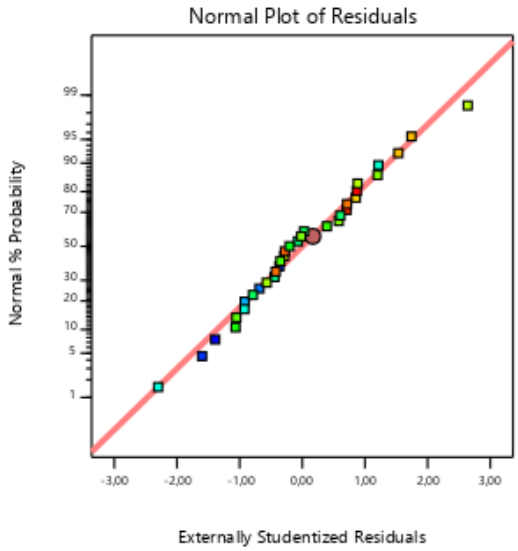
## Diagnostics: Normal Plot of Residuals - UV280

**Design-Expert® Software**

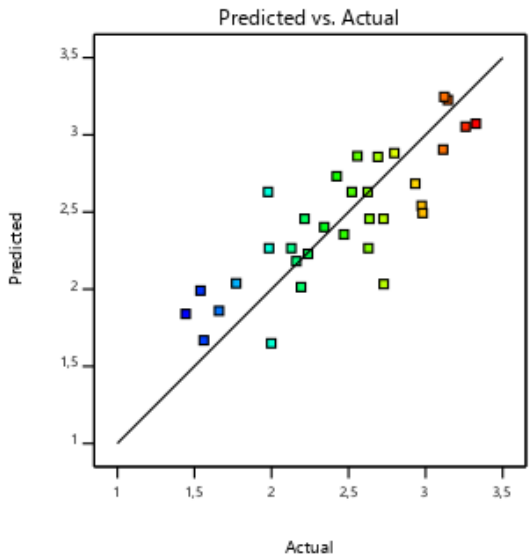
**UV280**

Color points by value of UV280:

1,4438 3,32627




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – UV280



**LIITE 9**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 2

**Response: Folin-Ciocalteu**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 0,2676 | 11 | 0,0243 | 111,22 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 0,0132 | 1 | 0,0132 | 60,44 | < 0.0001 | |
| **B-TEMPERATURE** | 0,2391 | 1 | 0,2391 | 1092,8 | < 0.0001 | |
| **C-DRYING** | 0,0002 | 2 | 0,0001 | 0,4185 | 0,6637 | |
| **AB** | 0,0005 | 1 | 0,0005 | 2,420 | 0,1356 | |
| **AC** | 0,0004 | 2 | 0,0002 | 0,997 | 0,3866 | |
| **BC** | 0,0010 | 2 | 0,0005 | 2,370 | 0,1196 | |
| **$A^2$** | 0,0048 | 1 | 0,0048 | 22,11 | 0,0001 | |
| **$B^2$** | 0,0006 | 1 | 0,0006 | 2,88 | 0,1051 | |
| **RESIDUAL** | 0,0044 | 20 | 0,0002 | | | |
| **LACK OF FIT** | 0,0029 | 14 | 0,0002 | 0,8081 | 0,6547 | not significant |
| **PURE ERROR** | 0,0015 | 6 | 0,0003 | | | |
| **COR TOTAL** | 0,272 | 31 | | | | |

These rows were ignored for this analysis: 31

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type II – Classical**

The **Model F-value** of 111,22 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B, $A^2$ are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 0,81 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 65,47% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics – Folin-Ciocalteu

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,0148 | **$R^2$** | 0,9839 |
| **Mean** | 0,6536 | **Adjusted $R^2$** | 0,9751 |
| **C.V. %** | 2,26 | **Predicted $R^2$** | 0,9590 |
| | | **Adeq Precision** | 33,6013 |

The **Predicted $R^2$** of 0,9590 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,9751; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 33,6013 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

## Diagnostics: Normal Plot of Residuals – Folin-Ciocalteu

**Design-Expert® Software**

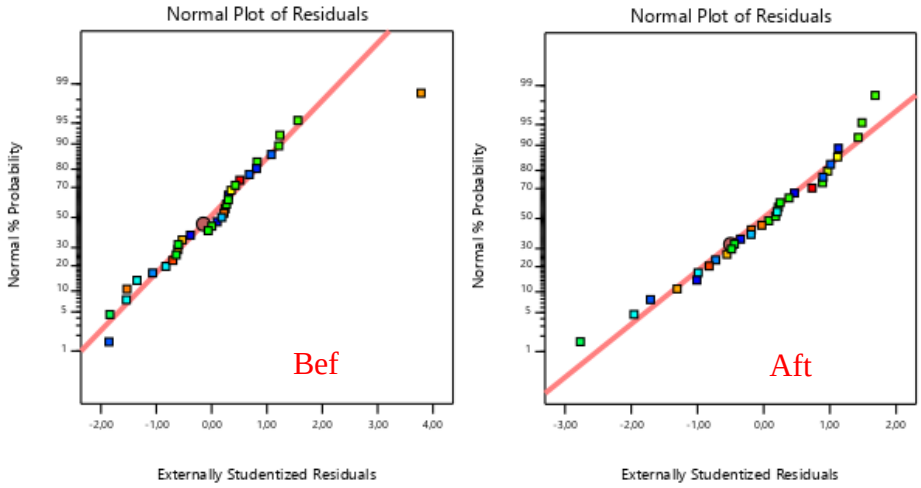
**FC**

Color points by value of FC:

0,514697 0,821995

Excluded:

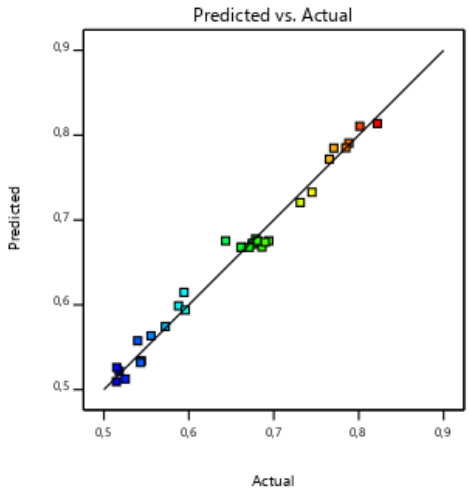
Std # 25 Run # 31
X: 0,775343
Y: 0,733284




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – Folin-Ciocalteu

Excluded:

Std # 25 Run # 31
X: 0,775343
Y: 0,733284



**LIITE 10**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 2

**Response: Hapan butanoli**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 2,17 | 4 | 0,5428 | 19,8 | < 0.0001 | significant |
| **A-TIME** | 0,0181 | 1 | 0,0181 | 0,6596 | 0,4235 | |
| **B-TEMPERATURE** | 2,12 | 1 | 2,12 | 77,46 | < 0.0001 | |
| **C-DRYING** | 0,03 | 2 | 0,015 | 0,5475 | 0,5844 | |
| **RESIDUAL** | 0,7675 | 28 | 0,0274 | | | |
| **LACK OF FIT** | 0,5191 | 22 | 0,0236 | 0,5701 | 0,8444 | not significant |
| **PURE ERROR** | 0,2483 | 6 | 0,0414 | | | |
| **COR TOTAL** | 2,94 | 32 | | | | |

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type II - Classical**

The **Model F-value** of 19,80 implies the model is significant. There is only a 0,01% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case B is a significant model term. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 0,57 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 84,44% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics – Hapan butanoli

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,1656 | **$R^2$** | 0,7388 |
| **Mean** | 1,73 | **Adjusted $R^2$** | 0,7015 |
| **C.V. %** | 9,59 | **Predicted $R^2$** | 0,6455 |
| | | **Adeq Precision** | 14,1465 |

The **Predicted $R^2$** of 0,6455 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,7015; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 14,147 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

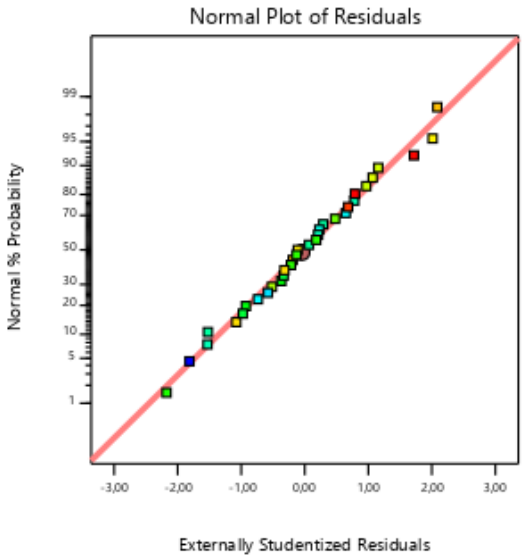
## Diagnostics: Normal Plot of Residuals – Hapan butanoli

**Design-Expert® Software**

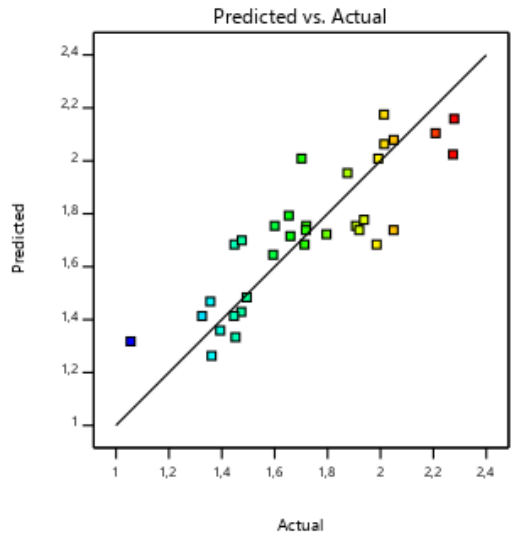
**HCl-But**

Color points by value of HCl-But:

1,05539 2,27864




## Model Graphs: Predicted vs. Actual – Hapan butanoli



**LIITE 11**

## ANOVA for Reduced Cubic model – Model 2

**Response: Kuiva-ainesaanto**

| SOURCE | SUM OF SQUARES | DF | MEAN SQUARE | F-VALUE | P-VALUE | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **MODEL** | 0,0148 | 4 | 0,0037 | 7,82 | 0,0002 | significant |
| **A-TIME** | 0,0045 | 1 | 0,0045 | 9,58 | 0,0044 | |
| **B-TEMPERATURE** | 0,0092 | 1 | 0,0092 | 19,51 | 0,0001 | |
| **C-DRYING** | 0,001 | 2 | 0,0005 | 1,1 | 0,3464 | |
| **RESIDUAL** | 0,0132 | 28 | 0,0005 | | | |
| **LACK OF FIT** | 0,0079 | 22 | 0,0004 | 0,4099 | 0,9417 | not significant |
| **PURE ERROR** | 0,0053 | 6 | 0,0009 | | | |
| **COR TOTAL** | 0,028 | 32 | | | | |

Factor coding is **Coded**.
Sum of squares is **Type II – Classical**

The **Model F-value** of 7,82 implies the model is significant. There is only a 0,02% chance that an F-value this large could occur due to noise.

**P-values** less than 0,0500 indicate model terms are significant. In this case A, B are significant model terms. Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant. If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

The **Lack of Fit F-value** of 0,41 implies the Lack of Fit is not significant relative to the pure error. There is a 94,17% chance that a Lack of Fit F-value this large could occur due to noise. Non-significant lack of fit is good -- we want the model to fit.

## Fit Statistics – Kuiva-ainesaanto

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Std. Dev.** | 0,0217 | **$R^2$** | 0,5278 |
| **Mean** | 0,1788 | **Adjusted $R^2$** | 0,4603 |
| **C.V. %** | 12,15 | **Predicted $R^2$** | 0,3634 |
| | | **Adeq Precision** | 9,4767 |

The **Predicted $R^2$** of 0,3634 is in reasonable agreement with the **Adjusted $R^2$** of 0,4603; i.e. the difference is less than 0.2.

**Adeq Precision** measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Ratio of 9,477 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

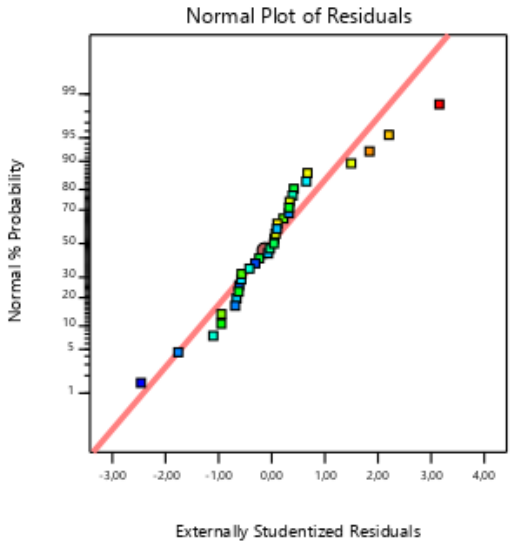
## Diagnostics: Normal Plot of Residuals – Kuiva-ainesaanto

**Design-Expert® Software**

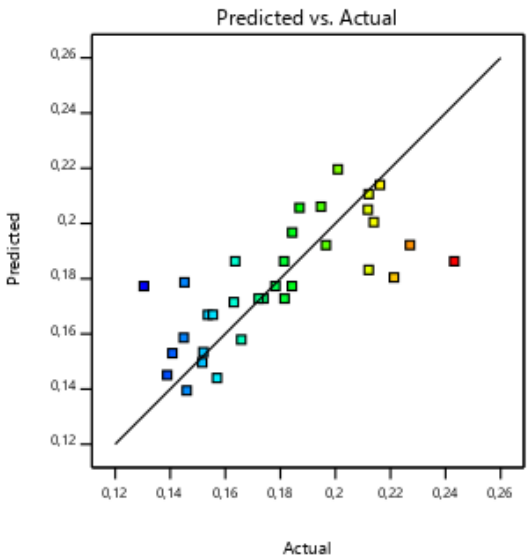
**Extraction Yield**

Color points by value of Extraction Yield:

0,13043 0,24316



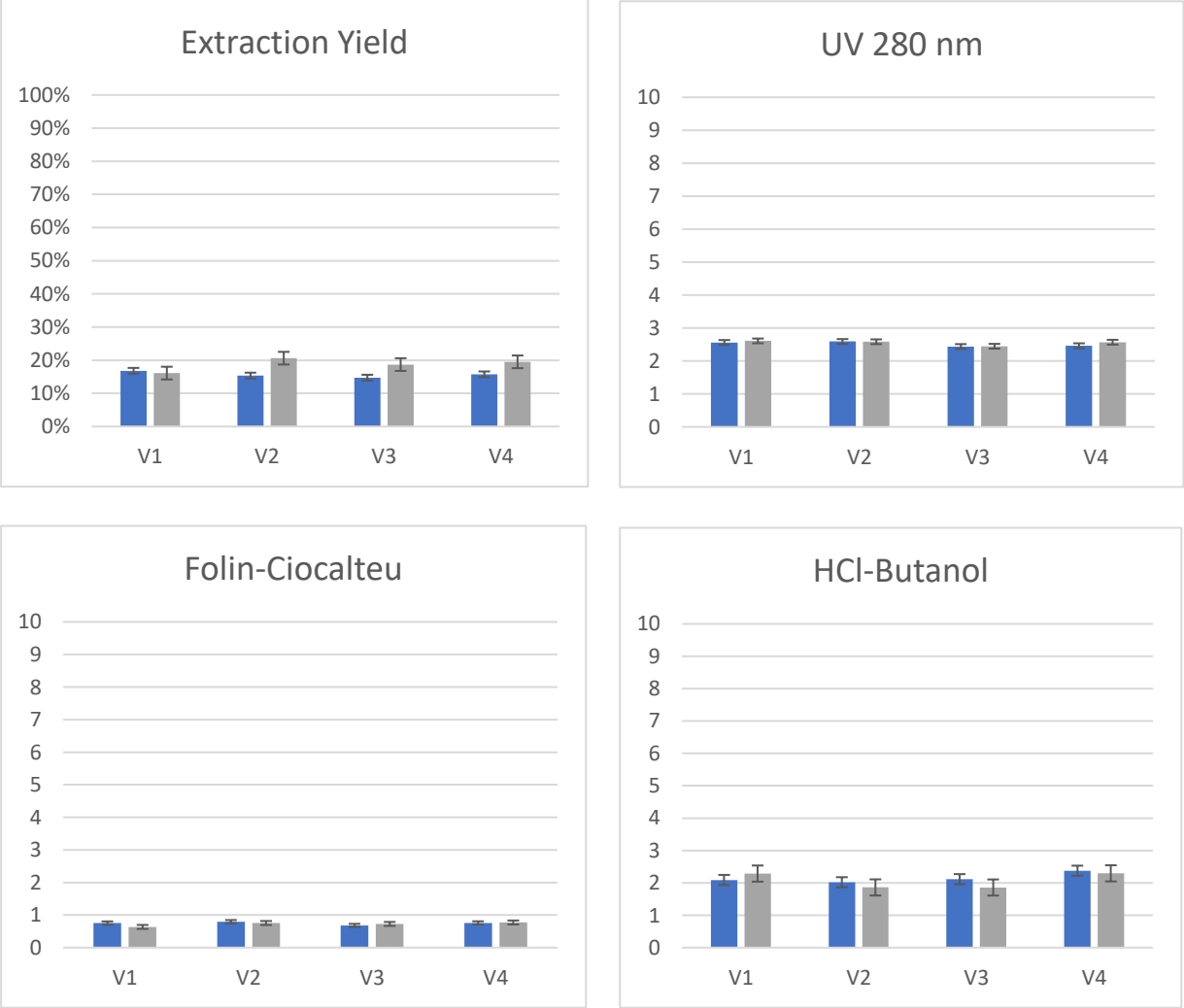

## Model Graphs: Predicted vs. Actual – Kuiva-ainesaanto



**LIITE 12**

Malli 2:n validointiuuttojen tulosten keskiarvo ja selitettävien muuttujien 95 %:n ennusteväli

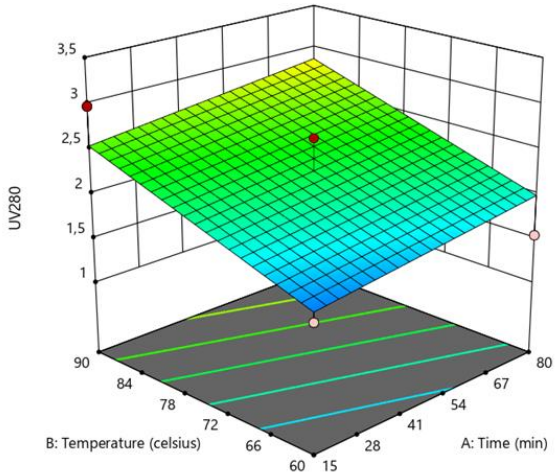
| Vaste | Ennustettu keskiarvo | Ennustettu mediaani | Keskihajonta | n | Ennustettu keskivirhe | 95% PI alaraja | Data keskiarvo | 95% PI yläraja |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| UV280 nm | 3,0532 | 3,0532 | 0,3192 | 4 | 0,2079 | 2,6273 | **2,5529** | 3,4791 |
| FC | 0,7848 | 0,7848 | 0,0148 | 4 | 0,0123 | 0,7591 | **0,7230** | 0,8105 |
| Hapan but. | 2,0087 | 2,0087 | 0,1656 | 4 | 0,1078 | 1,7878 | 2,0746 | 2,2296 |
| Saanto-% | 0,2061 | 0,2061 | 0,0217 | 4 | 0,0141 | 0,1771 | 0,1873 | 0,2351 |



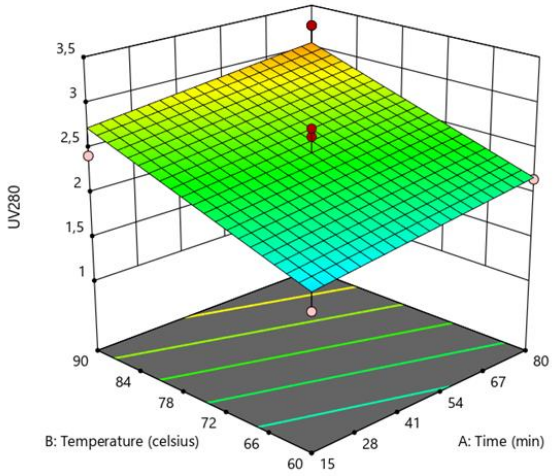

Malli 2:n saanto-%:n, UV 280 nm-, FC ja hapan butanoli -menetelmien varmennusuuttojen rinnakkaismäritysten pitoisuuksien vertailu (sininen = frozen, harmaa = refridgerated).

**LIITE 13**

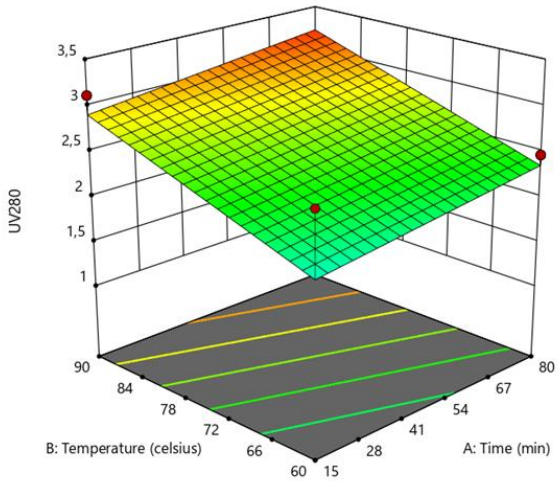
Malli 2:n UV 280 nm -menetelmän vastepinnat ajan ja lämpötilan suhteen jokaiselle käytetylle kuivausmenetelmälle.




Kylmäkuivattu




Pakastettu ilman kuivausta




Uunikuivattu