

Hiilihydraateista bioteknisesti valmistettavat merkittävät teollisuuskemikaalit

Pro gradu -tutkielma

Taru Laakso

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Soveltavan kemian osasto

18.11.2010

Tiivistelmä

Tässä pro gradu -tutkielmassa tarkasteltiin bioteknisesti valmistettavia teollisia kemikaaleja. Tutkimukseen valitut kemikaalit jaoteltiin sekä hiilimääränsä (C_2 - C_6 -kemikaalit) että kemiallisen rakenteensa (alkoholit, hapot ja muut yhdisteet) mukaisesti ryhmiin. Alaryhmistä valittiin muutama merkittävä kemikaali, joiden tuotantoa tarkasteltiin yksityiskohtaisesti. Kyseisiä kemikaaleja olivat etanoli, etikkahappo, glyseroli, maitohappo, asetonit ja butanoli sekä meripihka-, itakoni- ja sitruunahappo.

Huoli öljylähteiden ehtymisestä ja ilmastonmuutoksesta on herättänyt kiinnostuksen biotekniikkaa kohtaan, koska sen avulla kemikaaleja voidaan valmistaa uusiutuvista lähteistä, kuten puusta ja maatalouden jätteistä, fossiilisten lähteiden sijaan. Biotekniikassa, jota ovat mikrobinen transformaatio, entsyymaattinen synteesi ja fermentointi, voidaan käyttää hyväksi useita erilaisia mikro-organismeja, kuten hiivoja (esim. *Saccharomyces*), sieniä (esim. *Aspergillus*) ja bakteereja (esim. *Clostridia*). Kemikaalien valmistus fermentoinnilla voidaan myös suorittaa useilla eri tavoilla, kuten pohja-, pinta- ja panosfermentoinnilla. Useiden kemikaalien bioteknisessä valmistuksessa ongelmana ovat kuitenkin suuret tuotantokustannukset, jotka johtuvat pääosin tuotteen kalliista talteenotosta ja puhdistuksesta. Tuotannon kustannuksia voidaan vähentää pyrkimällä käyttämään entistä halvempia raaka-ainesubstraatteja sekä kehittämällä uusia talteenotto- ja puhdistustekniikoita tai toisaalta mikro-organismeja, jotka sietävät entistä paremmin kemikaalin korkeita pitoisuuksia.

Esipuhe

Tämä pro gradu -tutkielma on tehty Jyväskylän yliopiston soveltavan kemian osastolla kesän ja syksyn 2010 aikana. Työ on osa Teknologian kehittämiskeskuksen (Tekes) ”Biojalostamo sellutehdas” -projektia (BiSe), jonka rahoittajina ovat Tekes, Andritz Oy, Honeywell Oy, Finex Oy, Stora Enso Oyj, Sunila Oy sekä UPM-Kymmene Oyj. BiSe-projektin tavoitteena on synnyttää käyttökelpoista tietoa biojalostamokonseptien kehittämisestä, taloudellisuudesta ja uusista mahdollisuuksista.

Tutkielman aineisto kerättiin alan kirjallisuudesta sekä internetissä julkaistuista alan lehdistä SciFinder Scholar- ja ISI Web of Science -tietokantojen avulla. Hakusanoina käytettiin ensisijaisesti sanoja biomass, carbohydrate, fermentation, chemical, product ja biotechnology.

Haluan esittää kiitokset työni ohjaajina ja tarkastajina toimineille TkT Raimo Alénille sekä FT Jarmo Louhelaiselle, jotka antoivat minulle tämän tutkielman aiheen. Lisäksi haluan kiittää soveltavan kemian henkilökuntaa mukavasta työilmapiiristä sekä perhettäni ja ystäviäni tuesta tutkielmaa kirjoittaessani.

Sisällysluettelo

| | |
|---|-----|
| Tiivistelmä..... | i |
| Esipuhe | ii |
| Sisällysluettelo..... | iii |
| Käytetyt lyhenteet..... | iv |
| 1 Johdanto..... | 1 |
| 2 Bioteknologia..... | 2 |
| 3 Kaksihiiliset C ₂ -kemikaalit..... | 2 |
| 3.1 Etanoli..... | 2 |
| 3.2 Etikkahappo | 6 |
| 4 Kolmehiiliset C ₃ -kemikaalit | 8 |
| 4.1. Glyseroli | 8 |
| 4.2 Maitohappo..... | 10 |
| 4.3 Muut kemikaalit..... | 13 |
| 5 Neljähiiliset C ₄ - kemikaalit | 16 |
| 5.1 Butanoli | 16 |
| 5.2 Meripihkahappo..... | 19 |
| 6 Viisihiiliset C ₅ -kemikaalit | 22 |
| 7 Kuusihiiliset C ₆ -kemikaalit..... | 25 |
| 8 Yhteenveto..... | 27 |
| 9 Kirjallisuusviiteluettelo | 30 |

Käytetyt lyhenteet

| | |
|------|--|
| AA | Etikkahappo |
| ADP | Adenosiinidifosfaatti |
| ATP | Adenosiinitrifosfaatti |
| CoA | KoentsyymiA |
| ED | Entner–Doudoroff |
| EM | Embden–Meyerhof |
| HPLC | Korkean erotuskyvyn nestekromatografia |
| LA | Maitohappo |
| NAD | Nikotiiniamidiadeniinidinukleotidi |
| Pi | Ortofosfaatti |
| Sp. | Suku (monikko Spp.) |
| SSF | Samanaikainen hydrolyysi ja fermentointi |
| TCA | Trikarboksyylihappo |
| THF | Tetrahydrofuraani |
| TPP | Tiamiinipyrofosfaatti |

1 Johdanto

Kiinnostus bioteknologiaan on vaihdellut merkittävästi viimeisen vuosisadan aikana. Uusiutuvia lähteitä käytettiin 1800-luvulla ruoan lisäksi käytännöllisissä sovelluksissa, mutta vuosisadan vaihteessa tilanne kuitenkin muuttui täydellisesti, kun kivihielestä tuli tärkein raaka-aine koksen, ammoniakkin, tervan ja kaasun tuotannossa /1/. Ensimmäisen maailmansodan aikaan hielestä hydrattiin nestemäisiä hiilivetytypolttoaineita ja orgaanisia kemikaaleja /2/. Petrokemian teollisuus alkoi varsinaisesti vuonna 1917, kun propyleeniä alettiin käyttää isopropyylialkoholin valmistuksessa suoralla hydraatiolla. Myöhemmin alettiin tuottaa mm. alifaattisia kemikaaleja öljy- ja maakaasuteollisuuden lähteistä sekä metanolia synteetisikaasusta. Lisäksi synteetisikaasua alettiin konvertoida katalyyttisesti alifaattisiksi hiilivetytypolttoaineiksi ja kemikaaleiksi, ja lopulta öljyteollisuus ulottui myös aromaattien tuotantoon.

Riippuvuus fossiilisista polttoaineista tiedostettiin kuitenkin selvästi 1970-luvun öljykriisiin, jolloin alettiin tutkia biomassaan perustuvia teknologioita /1/. Tästä seurasi se, että uusiutuvista raaka-aineista tuli suosittuja ja öljykriisin seurauksena maissa, kuten Brasiliassa ja Yhdysvalloissa, aloitettiin kansallisia etanoliohjelmia, joilla korvattiin osa fossiilisista polttoaineista. Öljyn hinta kuitenkin laski jälleen 1980-luvulla, jolloin biomassaan perustuvien teknologioiden kehittäminen hidastui. Nykyään raakaöljyn hinta on jälleen noussut, mikä on herättänyt uuden kiinnostuksen kehittää vaihtoehtoisia polttoaineita ja kemikaaleja fossiilisiin lähteisiin perustuvien polttoaineiden ja kemikaalien tilalle /3/. Lisäksi kiinnostus uusiutuvia lähteitä käyttäviin tekniikoihin on kasvanut ilmastonmuutoksen hillitsemiseksi asetettujen tavoitteiden sekä uhkaavan öljypulan vuoksi /3,4/.

Raakaöljyn ilmeisimpänä vaihtoehtona pidetään kasvibiomassaa, joka koostuu pääasiassa hiilihydraateista, ligniinistä sekä kasviöljyistä ja proteiineista /5/. Biomassalla yleisesti tarkoitetaan uusiutuvia luonnonvaroja eli kaikkia eloperäisiä aineita, joihin on yhteyttämässä sitoutunut auringon energiaa /4/. Biomassana voidaan käyttää esimerkiksi puuta, viljakasveja, eläinten lantaa, kotitalouksien biojätteitä sekä puhdistamolietettä. Bioteknologian avulla biomassasta saadaan hajotettua ainesosiksi, joita voidaan hyödyntää uusien tuotteiden, kuten biohajoavien materiaalien, kemikaalien ja polttoaineiden, valmistuksessa. Biomassan biotekninen käsittely tuottaa myös sähköä ja lämpöä.

Tämän pro gradu -tutkielman tarkoituksena oli tutkia hiilihydraateista bioteknisesti valmistettavia teollisia kemikaaleja. Nämä kemikaalit voivat tulevaisuudessa korvata fossiilisiin läh-

teisiin perustuvia kemikaaleja, jos niiden valmistusreitit saadaan kilpailukykyisiksi uusiutumattomista lähteistä perustuviin synteeseireitteihin verrattuna. Tutkimukseen valitut kemikaalit jaoteltiin ensin hiilen määrän (C₂-C₆-kemikaalit) perusteella, minkä jälkeen kemikaalit jaoteltiin vielä alkoholeiksi, hapoiksi ja mahdollisesti muiksi kemikaaleiksi. Alaryhmistä valittiin lähempään tarkasteluun bioteknisesti valmistettavia merkittäviä kemikaaleja, joiden tuotantotapoja esiteltiin yksityiskohtaisesti. Lisäksi tarkasteltiin kemikaalien valmistukseen liittyviä ongelmia sekä kemikaaleista johdettuja tuotteita.

2 Bioteknologia

Bioteknologia, johon kuuluu fermentointi, mikrobinen transformaatio ja entsyymaattinen synteesi, on tekniikkaa, jossa hyödynnetään eliöiden elintoimintoja, soluja, solujen osia tai solussa esiintyvien molekyylien toimintoja /6,7/. Modernissa bioteknologiassa yhdistellään monia erilaisia biologisia menetelmiä, joilla pyritään manipuloimaan eläviä soluja /8/. Bioteknologia tarjoaa uuden tavan valmistaa teollisia kemikaaleja uusiutuvista hiilihydraateista, kuten kasvien glukoosista, sakkaroosista ja ksyloosista. Mikro-organismien tiedetään tuottavan luonnollisesti useita kaupallisesti tärkeitä kemikaaleja, kuten alkoholeja (etanoli ja butanoli), orgaanisia happoja (etikka-, voi-, sitruuna- ja maitohappo), aminohappoja (lysiini, fenyylialaniini ja tyrosiini), lääkkeitä (penisilliini ja tetrasykliini) tai jopa polymeereja (polyhydroksibutyraatti).

3 Kaksihiiliset C₂-kemikaalit

3.1 Etanoli

Etanolia CH₃CH₂OH tuotetaan polttoaineeksi suuressa mittakaavassa Brasiliassa, Yhdysvalloissa sekä tietyissä Euroopan maissa /9/. Sakkaroosista saatava etanoli ja muut biopolttoaineet ovat suurina kiinnostuksen kohteina myös maissa, jotka pyrkivät vähentämään riippuvuuttaan tuontiöljystä, heikentämään öljyn hinnan vaihteluita sekä minimoimaan kasvihuonekaasupäästöjä /8/. Seuraavien kahdenkymmenen vuoden aikana etanolin uskotaankin olevan yksi hallitsevista uusiutuvista biopolttoaineista liikennesektorilla /9/. Polttoaineen lisäksi etanoli on myös useiden kemikaalien raaka-aine ja sitä käytetään liuottimena sekä lääkkeiden, muovien, lakkojen sekä räjähdysaineiden valmistuksessa /10/.

Etanolin fermentointi on biologinen prosessi, jossa orgaaninen materiaali konvertoidaan ensin mikro-organismien avulla yksinkertaisimmiksi yhdisteiksi, kuten sokereiksi /11/. Konver-

sion jälkeen käymiskykyiset yhdisteet fermentoidaan mikro-organismeilla tuottamaan etanolia ja hiilidioksidia, ja etanoli otetaan talteen tislamalla /1,11/. Koko etanolin fermentointiprosessin aikana esiintyy pääasiassa kahta mikro-organismia /11/. Niistä toiset konvertoivat käymiskykyiset substraatit etanoliksi ja toiset tuottavat entsyymejä katalysoimaan kemiallisia reaktioita, jotka hydrolysoivat monimutkaisia substraatteja yksinkertaisimmiksi yhdisteiksi. Etanolin fermentoinnissa voidaan käyttää useita uusiutuvia lähteitä, kuten babassua, maniokia, lehtipuuhaketta, heraa sekä mikrolevän entsyymattista hydrolysaattia /12,13/.

Yleisin etanolin fermentoinnissa käytetty mikrobi on ollut hiiva *Saccharomyces cerevisiae* /11/. Perinteisesti etanolin fermentointi perustuu joko sakkaroosin konversioon sokeriruo'osta ja -juurikkaasta tai glukoosin konversioon maissin tai viljakasvin tärkkelyksen hydrolysaateista hiivan *S. cerevisiae* avulla /1,14/. Konversiossa yksi glukoosimolekyyli hajoaa kahdeksi hiilidioksidimolekyyliksi ja kahdeksi etanolimolekyyliksi /1/. Kuten monet mikro-organismit, *S. cerevisiae* metabolisoi glukoosin käyttäen Embden–Meyerhof-reittiä (EM-reitti) /11/. Jos fermentoinnissa käytetään sen sijaan *Zymomonas*-mikro-organismia, se metabolisoi glukoosin anaerobisesti EM-reitin tai glykolyysin sijasta Entner–Doudoroff-reitin (ED-reitti) avulla. ED-reitti tuottaa vain puolet adenosiinitrifosfaattia (ATP) moolista glukoosia EM-reittiin verrattuna. Tämän seurauksena *Zymomonas*-mikro-organismi tuottaa vähemmän biomassaa kuin hiiva ja fermentointituotteisiin ohjautuu enemmän hiiltä. Lisäksi seurauksena alhaisesta ATP-saannosta *Zymomonas*-mikro-organismi säilyttää korkean glukoosivirtauksen läpi ED-reitin.

Mikro-organismilla *Zymomonas mobilis* on monia hyviä ominaisuuksia biokatalyyttinä toimimiseen etanolin tuotannossa /11,14/. Kyseinen mikro-organismi sietää korkeita pitoisuuksia etanolia, sillä on suurempi etanolisaanto ja korkeampi spesifinen etanolituottavuus kuin *Saccharomyces*-suvun hiivalla, minkä lisäksi sillä on yksinkertaiset ravintotarpeet /11/. *Zymomonas mobilis* ei kuitenkaan sovi kaikille biomassaraaka-aineille, sillä se fermentoi vain glukoosia, fruktoosia ja sakkaroosia. Vaikka mikro-organismilla *Zymomonas mobilis* onkin monia hyviä puolia biokatalyyttinä toimimiseen etanolin tuotannossa, teollisuudessa käytetään kuitenkin mieluiten hiivaa *S. cerevisiae* sen vastustuskyvystä johtuen.

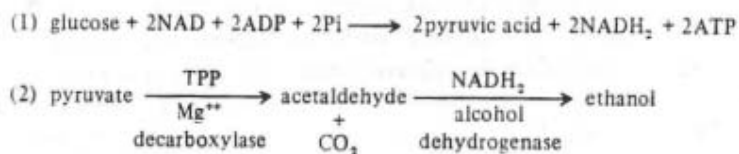
Myös muunneltua bakteeria *Escherichia coli* voidaan käyttää etanolin tuotannossa /11/. Kyseisen bakteerin hyviä puolia biokatalyyttinä toimimiseen etanolin tuotannossa on se, että se fermentoi monia sokereita, sillä ei ole rajoituksia monimutkaisia kasvutekijöitä kohtaan ja lisäksi sitä on käytetty aiemmin teollisuudessa. Bakteerin *Escherichia coli* huonoja puolia ovat

yleiset käsitykset sen vaarallisuudesta sekä kapea ja neutraali pH-kasvuväli. Lisäksi sen viljelmät ovat vastustuskyvyttömämpiä verrattuna hiivan viljelmiin.

Selluloosan biotransformaatio etanoliksi voidaan tehdä myös useiden anaerobisten termofiilisten bakteerien avulla, kuten *Clostridium thermocellum*, sekä joidenkin rihmamaisten sienien, kuten *Monilia* sp., *Neurospora crassa*, *Neurospora* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Trichoderma viride* ja *Paecilomyces* sp., avulla /11,12/. Fermentointiprosessit, jotka hyödyntävät näitä mikro-organismeja, ovat kuitenkin hyvin hitaita ja niiden saannot ovat alhaisia, mikä luultavimmin johtuu mikro-organismien alhaisesta vastustuskyvystä korkeammilla etyylialkoholikonsentraatioilla /11/. Toinen prosessin huono puoli on useiden sivutuotteiden, kuten etikka- ja maitohapon, muodostuminen. Lisäksi etanolin tuotannossa on tutkittu jatkuvatoimista fermentointia, jossa substraattina käytetään joko tärkkelyspitoista materiaalia tai melassia /12/. Jatkuvatoimisen fermentoinnin etuna on se, että kyseinen käyminen lisää konversiota, pienentää käymislaitteiston kuutiometristä tilavuutta ja lisäksi laitteisto on yksinkertaisempi perinteiseen käymislaitteistoon verrattuna.

Mikro-organismit tuottavat hyvin erilaisia määriä etanolia riippuen käytetystä metaboliareitistä /12/. Seuraavaksi esitellään neljä eri metaboliareittiä, joita mikro-organismit käyttävät etanolin tuotannossa.

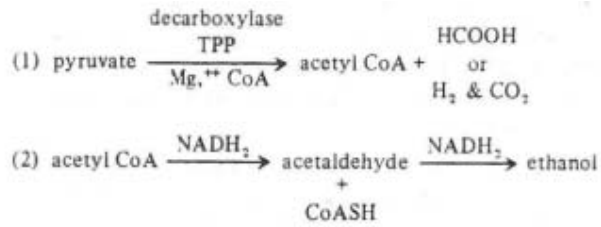
1. Glykolyysi



Kuva 1. Glukoosin konversio etanoliksi glykolyysillä /12/.

Glykolyysissä glukoosi konvertoidaan pyruvaatin ja asetaldehydinin kautta periaatteessa kvantitatiivisesti etanoliksi ja hiilidioksidiksi /12/. Parhaiten tätä reittiä hyödyntävät hiivat, mutta on olemassa myös bakteereja, jotka fermentoivat glukoosin lähes kvantitatiivisesti etanoliksi hiivan glykolyysiä muistuttavalla tavalla.

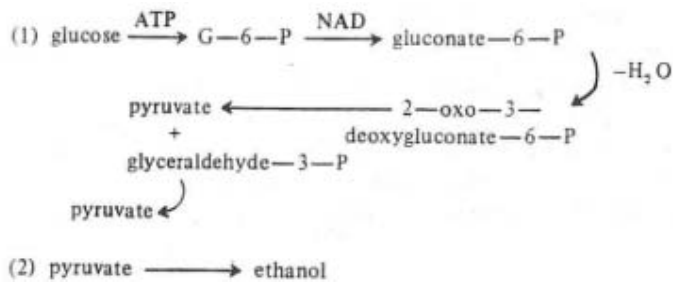
2. Etanolin tuotanto rikkiptoisella reaktiolla



Kuva 2. Etanolin valmistus /12/.

Reaktiossa bakteerit *Clostridia*- ja *Enterobacteriaceae* katkaisevat pyruvaatin asetyylikoent-syymiA:ksi, joka sen jälkeen pelkistyy asetalddehydiksi ja etanoliksi /12/. Vedyn tuotanto on estettävä reaktiossa, jotta glukoosin kvantitatiivinen konversio etanoliksi olisi mahdollinen.

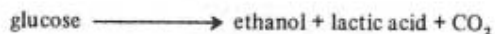
3. Entner–Doudoroff-reitti



Kuva 3. Etanolin valmistus glukoosista Entner–Doudoroff-reitillä /12/.

Mikro-organismien *Zymomonas* käymistasapaino ED-reitillä on samanlainen kuin hiivoilla, mutta reitti tuottaa vain puolet energiasaannosta /12/. Tämän vuoksi *Zymomonas* tuottaa siis vähemmän biomassaa kuin hiiva ja käymistuotteisiin ohjautuu enemmän hiiltä /11/.

4. Heterolaktinen fermentointi



Kuva 4. Glukoosin heterolaktinen fermentointi etanoliksi /12/.

Heterolaktisessa fermentoinnissa heterolaktiset mikro-organismit pystyvät fermentoimaan glukoosin laktaatiksi ja etanoliksi ksyuloosi-5-fosfaatin kautta, joka lohkeaa tuottaen asetyy-

lifosfaattia ja glyseraldehydi-3-fosfaattia /12/. Jälkimmäinen yhdiste muuttuu pyruvaatiksi, minkä jälkeen se pelkistyy maitohapoksi. Asetyylifosfaatti pelkistyy etanoliksi käyttäen hyödyksi pelkistysenergiaa, jota muodostuu glukoosin konversiossa ksyluloosi-5-fosfaatiksi.

Vaikka etanolia voidaan tuottaa useilla eri tavoilla, sen tuotantoa on vielä tutkittava biomassan immobilisaation, samanaikaisen hydrolyysin ja fermentoinnin (SSF) sekä sokerien konversion osalta /11/. Lisätutkimusta tarvitaan myös käymisteknologiassa, joka konvertoisi glukoosin lisäksi ksyloosin etanoliksi. Lisäksi käymiskuluja on vähennettävä esimerkiksi pienentämällä joko raaka-ainekuluja tai sellulaasientsyymien kuluja.

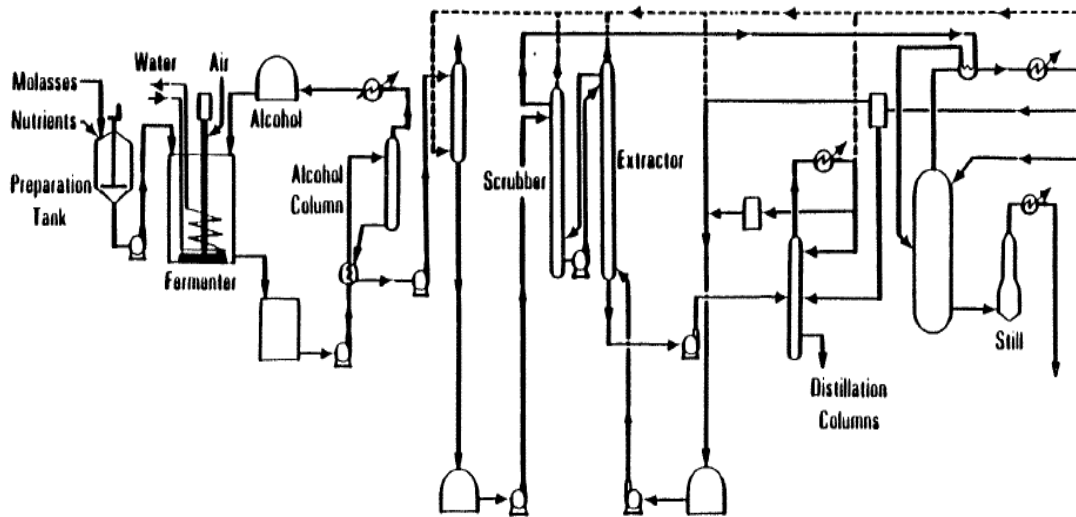
Etanolin johdannaisia ovat mm. etikkahappo, etikkahappoanhydridi, etyyliasetaatti sekä aetaldehydi /1/.

3.2 Etikkahappo

Etikkahappo CH_3COOH on tärkeä orgaaninen kemikaali, jota käytetään laajalti elintarvike-, lääke- ja tekstiiliteollisuudessa /15,16/. Etikkahappo on lisäksi tärkeä komponentti monien kemikaalien, kuten vinyylisetaatin, selluloosa-asetaatien sekä etikkahappoestereiden, synteesissä /16/. Etikkahappoa käytetään myös kalsium-magnesium-asetaatien tuotannossa, jota käytetään liukkauden torjunta-aineena /15/.

Etikkahappoa tuottavia bakteereita on paljon. Esimerkiksi bakteerit *Ruminococcus flavefaciens* ja *Methanobacterium ruminant* tuottavat yhdessä asetaattia /12/. Lisäksi anaerobisen bakteerisuvun *Acetobacterium woodii* -lajin tyypit fermentoivat fruktoosia, glukoosia, laktaattia, glyseraattia ja formaattia etikkahapoksi. Käymisessä vety hapettuu ja hiilidioksidi pelkistetään etikkahapoksi. Myös *Acetogenium kivui* -mikro-organismi fermentoi etikkahappoa samalla tavalla kuin *Acetobacterium woodii* /1/. *Bacillus*-bakteeri taas tuottaa sekä etikkahappoa että etanolia useilla laimennusasteilla /12/. Myös monet sellulolyttiset, mesofiiliset ja anaerobiset *Clostridium*-suvun mikro-organismit, kuten *C. lentocellum* SG6, konvertoivat biomassan suoraan etikkahapoksi /16/.

Etikkahappoa voidaan tuottaa biomassasta fermentoinnilla useilla eri menetelmillä /17/. Etikkahapon perinteinen tuotantoprosessi pohjafermentoinnilla tapahtuu kuvan 5 mukaisesti.



Kuva 5. Melassin perinteinen fermentointi etikkahapoksi /17/.

Aerobisessa pohjafermentoinnissa (kuva 5) melassia, ravinteita ja etanolia (1 %) käytetään käymisen aloittamiseksi /17/. Prosessissa etanolin väkevyys pidetään lähellä arvoa 1 %, kunnes etikkahapon väkevyys lähenee arvoa 10–11 %. Käymisen jälkeen uuttoliuotinten ja etikkahapon seos otetaan talteen tislamalla. Energiaintensiivinen tislausvaihe on menetelmän suurin haittapuoli, koska se lisää merkittävästi etikkahapon tuotantokustannuksia.

Etikkahappoa voidaan tuottaa myös anaerobisella hiivakäymisellä /17/. Fermentoinnissa tuotetaan ensin etanolia perusfermentoinnilla, minkä jälkeen etanoli hapetetaan asetaldehydiksi. Seuraavaksi happirikastettu ilma ja asetaldehydi syötetään reaktoriin, jossa ne läpikäyvät kolmevaiheisen ketjureaktion muodostaen lopulta etikkahappoa. Prosessi on tehokas ja siinä muodostuu hyvin vähän sivutuotteita. Etikkahappoa voidaan tuottaa anaerobisella hiivakäymisellä myös siten, että hiivakäymistä seuraa aerobinen bakteerikäyminen. Etikkahappoa tuotetaan pieniä määriä myös biopolymeerien anaerobisella bakteeriaalisella homofermentoinnilla. Lisäksi on olemassa anaerobinen bakteeriaalinen heterofermentointi, jossa tuotetaan samanaikaisesti etanolia ja muita happoja. Hiilihydraattien heterofermentointi sisältää kuitenkin monia puhdistusongelmia, sillä prosessissa syntyy etikkahapon lisäksi muita orgaanisia yhdisteitä, jotka lisäksi alentavat etikkahapon saantoa. Etikkahappoa on mahdollista tuottaa myös sellulolyyttisillä anaeroobeilla sekä sekaviljelmäfermentoinnilla.

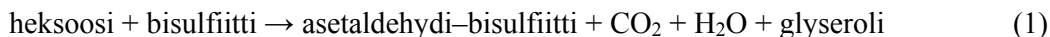
4 Kolmehiiliset C₃-kemikaalit

4.1. Glyseroli

Yksinkertainen alkoholi, glyseroli HOCH₂CHOHCH₂OH, on myrkytön ja biohajoava yhdiste, jota esiintyy kaikkien kasvien sekä eläinrasvojen ja öljyjen aineosana /1,18,19/. Glyserolia ei kuitenkaan löydetä vapaassa muodossaan, vaan rasvahappoestereiden aineosana /1/. Glyserolilla on monia käyttötarkoituksia kosmetiikka-, maali-, auto-, elintarvike-, tupakka-, lääke-, massa-, paperi-, nahka- ja tekstiiliteollisuudessa /18/. Glyserolin mahdollisuuksia lähtökemikaalina on myös tutkittu ja se soveltuu raaka-aineeksi monien kemikaalien, kuten 1,3-propanidiolin ja dihydroksiasetonin, tuotantoon /18,19/.

Glyserolia voidaan tuottaa mm. hiivakäymisellä, joka tapahtuu pH-arvossa ≤ 6 /12,17/. Käymisen aikana glyserolin muodostuminen ei kuitenkaan tarjoa energiaa eikä rakennusyksikköjä hiivasolulle ja lisäksi fermentoinnissa muodostuu vain hyvin pieniä määriä glyserolia /12/. Jos kasvuympäristöön lisätään kuitenkin sulfiittia, glyserolin muodostuminen moninkertaistuu. Glyserolin muodostumiseen kuuluu kaksi hapetusvaihetta ja prosessin hapetus-pelkistystasapaino saavutetaan kahden glyserolisyksikön muodostuessa /12,17/. Solun hapetus-pelkistys-tasapainon ja glyserolin muodostumisen välillä on itse asiassa suora korrelaatio. Kun hiiva metabolisoi glukoosia aerobisissa olosuhteissa, glyserolia ei muodostu /17/. Kyseisissä olosuhteissa hengitysketju toimii ja siirtää elektroneja hapelle ilman NADH₂-ylimäärää /12,17/. Ylimääräinen NADH₂ hapettuu glyserolin muodostuessa aiheuttaen soluun hapetus-pelkistystasapainon /17/.

Glyserolia voidaan tuottaa myös monosakkarideista *Saccharomyces cerevisiae* -mikro-organismilla seuraavan reaktion mukaisesti /19/:



Reaktiossa akkumuloitunut NADH hapettuu, koska dihydroksiasetonifosfaatti pelkistyy glyseroli-3-fosfaatiksi /19/. Ohjaavina aineina käytetään erilaisia suoloja, kuten natriumsulfaattia, -sulfiittia ja -bisulfiittia sekä ammonium- ja magnesium/kalsiumsulfiittia. Toinen tapa, jolla tuotetaan glyserolia *S. cerevisiae* -mikro-organismilla, tapahtuu pH-arvossa ≤ 7 seuraavan reaktion mukaan:



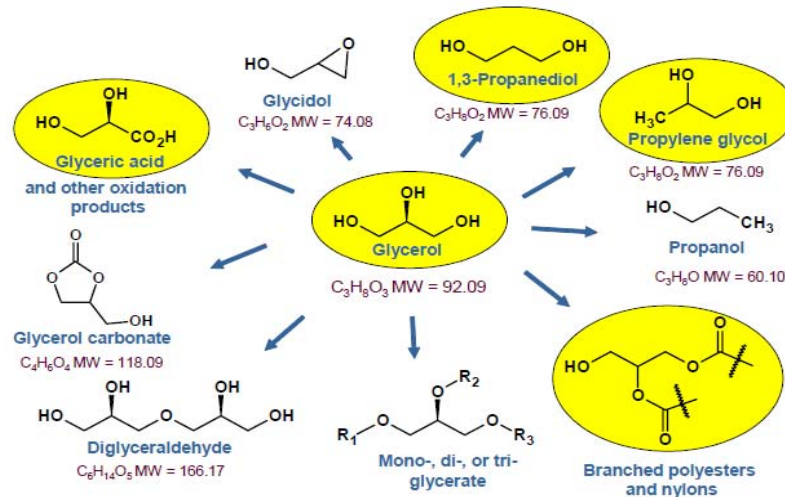
Reaktio 2 tapahtuu samanaikaisesti normaalin alkoholifermentoinnin kanssa /19/. Etikkahappoa muodostuu asetaldehydistä, koska aldehydihydrogenaasi, jonka optimaalinen pH on 8,75, aktiivisuus on kasvanut. Tämä hapetus muodostaa NADH-molekyylin, joka vaatii uudelleenhapetuksen, jotta hapetus-pelkistystasapaino muodostuisi soluun. Kun happea ei ole läsnä, tämä tapahtuu dihydroksiasetonifosfaatin pelkistämällä glyseroli-3-fosfaatiksi ja sen jälkeen glyseroliksi. Natriumkarbonaatti tai magnesiumkarbonaatti/hydroksidi ovat yleisiä alkalisessa hiivaprosessissa käytettyjä ohjaavia aineita.

Glyserolia tuotetaan myös osmotoleranteilla hiivalajeilla, jotka tuottavat glyserolia hyvällä saannolla /19/. Glyserolia tuottavat osmotolerantit hiivalajit kuuluvat *Candida*-, *Debaryomyces*-, *Hansenula*-, *Pichia*-, *Saccharomyces*-, *Schizosaccharomyces*-, *Torulaspora*- ja *Zygosaccharomyces*-lajeihin. Glyserolin tuotannossa osmotoleranteilla lajeilla on monia etuja verrattuna prosesseihin, jotka perustuvat alkaliin ja sulfiittiin. Esimerkiksi solun kasvu ja käyminen vaativat mieluummin aerobisia kuin anaerobisia tai happirajoitettuja olosuhteita, eikä tuotannossa tarvita ohjaavia aineita tai osmoottisia liuennete aineita. Lisäksi osmotoleranteilla lajeilla voidaan käyttää merkittävästi korkeampia sokeriväkevyksiä, jolloin glyserolin muodostumisnopeus ja saanto paranevat. Osmotolerantit lajit mahdollistavat myös yksinkertaisemman prosessiteknologian käytön, jolloin muodostuu vähemmän saasteita.

Glyserolia tuottavat aiemmin mainittujen mikro-organismien lisäksi vihreät *Dunaliella tertiolecta*- ja *Dunaliella bardawil* -levälajit ympäristössä, jossa NaCl-pitoisuus on korkea /1,19/. Lupaavia bakteereita glyserolin tuotannossa ovat myös *Lactobacillus lycopersici* ja *Bacillus subtilis* /19/.

Vaikka glyserolin tuotanto *S. cerevisiae* -mikro-organismeilla on suhteellisen yksinkertaista, tuotannon tekniset ongelmat ovat kuitenkin rajoittaneet glyserolin kaupallisia sovelluksia /19/. Ongelmana tuotannossa on suhteellisen alhainen glyserolisaanto, muodostuneiden sivutuotteiden, kuten etanolin, asetaldehydin ja etikkahapon, suuri määrä sekä sulfiitin ja muiden ohjaavien aineiden suuren määrän tarve käymisen aikana. Lisäksi glyserolin alhainen tuottavuus ja alhainen väkevyys käymisliemessä tekevät glyserolin talteenotosta kalliin ja tehottoman.

Glyserolin yksinkertaisia johdannaisia ovat esimerkiksi glyserolitriasettaatti, glyserolistearaatti ja glyseroliolaatti, joita tuotetaan kemiallisella katalyyysillä /18/. Muita glyserolin johdannaisia on esitetty kuvassa 6.



Kuva 6. Glycerolin mahdollisia johdannaisia /18/.

4.2 Maitohappo

Anaerobisen käymistuotteen, maitohapon $CH_3CHOHCO_2H$, kaupallinen tuotanto alkoi 1800-luvun lopulla, minkä vuoksi sitä pidetään yhtenä ensimmäisistä bioteknologisista prosesseista, joka tehtiin hallituissa olosuhteissa /6,20/. Maitohappo esiintyy kahdessa optisesti aktiivisessa isomeerisessä muodossaan (L(+) ja D(-)), ja se on bifunktionaalinen yhdiste, jossa esiintyy sekä hydroksyyli- että karboksyyli-ryhmä /21/. Maitohappo on yleisimmin esiintyvä hydroksikarboksyylihappo, jota käytetään elintarvike-, lääke-, tekstiili-, nahka- ja kemianteollisuuden sovelluksissa ja se voidaan konvertoida hyödyllisiksi tuotteiksi useilla eri tavoilla kemiallisesti /21–23/. Maitohapon käyttöä monomeerinä on myös tutkittu mm. biohajoavien polymeerien synteesissä /1,21/.

Kaupallisissa L-maitohapon tuotantoprosesseissa heteromaitohapporeitillä käytetään homolaktisia organismeja, kuten organismeja *Lactobacillus delbrückii*, *L. bulgaricus* ja *L. leichmannii*, lukuun ottamatta organismeja *Rhizopus oryzae* /20,22/. Muita maitohapon tuotannossa käytettyjä maitohappobakteereita ovat *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* ja *L. casei* /22/. Myös sienilajit, kuten *Mucor* ja *Monilia*, tuottavat maitohappoa. Seuraavassa taulukossa on esitetty lisäksi joitakin muita maitohapon tuotannossa käytettyjä mikroorganismeja ja niiden ominaisuuksia /20/.

Taulukko 1. Maitohapon tuotannossa käytettyjä mikro-organismeja ja niiden ominaisuuksia /20/.

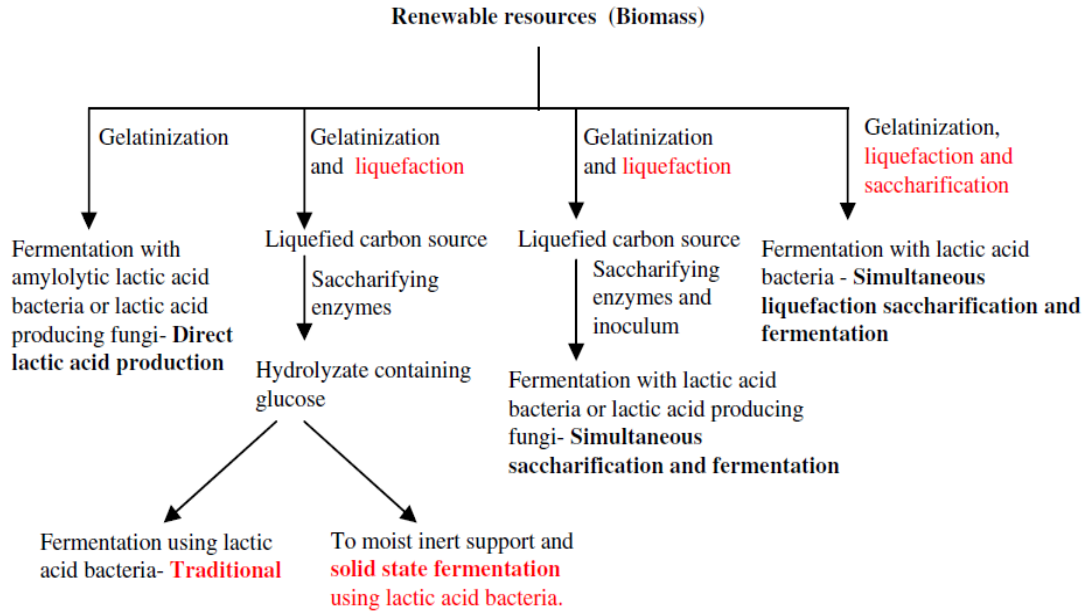
| Name of strain | Favorable carbon source | Temperature, °C | Major products | Isomer |
|------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------------|---------|
| <i>L. delbrückii</i> | glucose, galactose | 50—53 | lactic acid | DL- |
| <i>L. bulgaricus</i> | glucose | 45—55 | lactic acid | DL- |
| <i>L. thermophilus</i> | glucose | 50—60 | lactic acid | DL- |
| <i>L. leichmannii</i> | glucose | 28—32 | LA/AA=1:1 | D- |
| <i>L. casei</i> | lactose | 28—32 | lactic acid | L- |
| <i>L. fermenti</i> | glucose, lactose | 35—40 | LA/AA/CO ₂ =1:1:1 | DL- |
| <i>S. thermophilus</i> | glucose, lactose | 45—55 | lactic acid | DL- |
| <i>S. lactis</i> | glucose, lactose | 28—32 | lactic acid | L- |
| <i>S. faecalis</i> | glucose, maltose | 28—32 | lactic acid | L- |
| <i>Pediococcus</i> | glucose, maltose | 25—32 | lactic acid | DL-, L- |
| <i>Leuconostoc</i> | glucose, sucrose | 21—25 | lactic acid | D- |
| <i>Bifidobacterium</i> | glucose | 35—45 | LA/AA=2:3 | L- |
| <i>Rhizopus oryzae</i> | glucose | 25—35 | lactic acid | L- |

Note: LA—lactic acid; AA—acetic acid.

Maitohapon mikrobialisessa tuotannossa käytettävä hiililähde voi olla puhtaassa muodossa oleva sokeri, kuten glukoosi, sakkaroosi ja laktoosi, tai sokeria sisältävä materiaali, kuten mellassi, vehnä, sokeriruokobagassi ja maniokkibagassi /22/. Myös tärkkelysmateriaalit perunasta, tapiokasta, vehnästä, ohrasta ja porkkanasta toimivat hiililähteinä maitohapon tuotannossa.

Maitohapon teollinen tuotanto perustuu puhtaan sokerin, kuten glukoosin tai sakkaroosin, konversioon hapettomissa olosuhteissa esimerkiksi bakteerisuvun *Lactobacillus* avulla lämpötilassa 40–45 °C /1/. Fermentoinnissa yhdestä moolista glukoosia saadaan melkein kaksi moolia maitohappoa. Vaikka maitohappokäyminen on anaerobinen prosessi, siitä vastuussa olevat bakteerit ovat kuitenkin mikroaerofiilisiä /14/.

Maitohappoa voidaan tuottaa fermentoinnilla myös sokeria sisältävistä hydrolysaateista sekä yksivaiheisella tärkkelyksen konversiolla /22/. Lisäksi maitohappoa voidaan tuottaa selluloosajätteen suoralla konversiolla amylolyyttisellä maitohappoa tuottavalla mikro-organismilla, ja samanaikaisella hydrolyysillä ja fermentoinnilla (SSF) lisäämällä entsyymit ja inokulaattiyhtä aikaa. Seuraavassa kuvassa on esitetty erilaisia maitohapon käymisprosesseja uusiutuvista raaka-aineista.



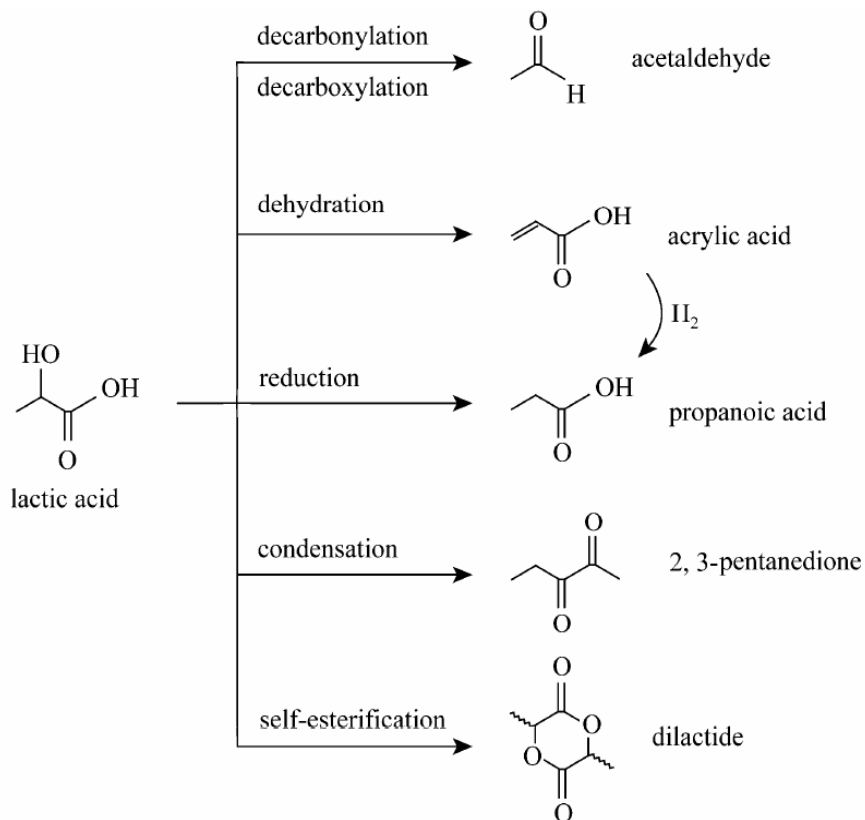
Kuva 7. Erilaisia maitohapon käymisprosesseja /22/.

Maitohapon fermentointi on mahdollista jakaa homo- ja heterokäymiseen /20/. Homofermentoinnissa muodostuu yksi tuote, kuten maitohappo, kun taas heterofermentoinnissa muodostuu useita tuotteita, kuten etanolia, diasetyyliä, formaattia tai etikkahappoa /22/.

Merkittävä vaihe maitohapon tuotannossa on sen talteenotto käymisliemestä /21/. Maitohapon perinteinen talteenotto, johon kuuluu saostamista, kromatografisia vaiheita ja/tai tislusvaiheita, on kuitenkin edelleen kaukana ideaalista prosessista, sillä erotus- ja puhdistusvaiheet ovat noin 50 % maitohapon tuotantokuluista /1,21/. Haittapuolena maitohapon tuotannossa on myös reaktorin alhainen tuottavuus sekä prosessin haitallisuus ympäristölle, sillä prosessissa kulutetaan rikkihappoa ja tuotetaan suuria määriä kalsiumsulfaattia /21/. Viime aikoina on kuitenkin kehitetty membraaniin perustuvia erotus- ja puhdistusmenetelmiä erityisesti mikro- ja ultrasuodatuksessa sekä elektrodialyysissä /1,21/. Uusien menetelmien kustannukset ovat perinteisiä menetelmiä alhaisempia, eivätkä ne aiheuta ympäristöongelmia perinteiseen erotus- ja puhdistusmenetelmään verrattuna /21/. Maitohapon taloudellisuutta voidaan parantaa laajentamalla substraattivalikoimaa ja lisäämällä maitohappotoleranssia /1/. Lisäksi on kehitetty uusia käymistekniikoita, joita ovat samanaikainen hydrolyysi ja fermentointi (SSF), termofiilinen fermentointi *Bacillus stearothermophilus* -mikro-organismilla sekä jatkuvatoiminen fermentointi. Vaikka maitohapon talteenotossa ja puhdistuksessa on siis vielä parannettavaa, sen bioteknisellä tuotannolla on kuitenkin monia etuja kemialliseen syntee-

siin verrattuna /22/. Kyseisiä etuja ovat esimerkiksi substraatin alhainen hinta, alhaiset tuotto-
lämpötilat ja alhainen energiankulutus.

Maitohapon johdannaisia ovat mm. etyyliesterit, joilla voidaan korvata vaarallisia liuottimia,
kuten tietyissä teollisissa sovelluksissa käytettäviä kloorattuja hiilivetyliuottimia /1/. Muita
maitohaposta tuotettuja kemikaaleja on esitetty kuvassa 8.



Kuva 8. Tärkeitä maitohaposta johdettuja kemikaaleja /20/.

4.3 Muut kemikaalit

Asetonin CH_3COCH_3 käyttökohteita ovat teollisuusliuottimet, kuten hartsit, lakat, öljyt, ras-
vat ja kolloidit /24/. Lisäksi asetonia käytetään metakryylihapon, metyyylimetakrylaatin, etik-
kahapon sekä kloro-, jodo- ja bromoformin tai räjähteiden valmistukseen. Myös maali-, lak-
ka-, kumi-, muovi- ja valokuvausteollisuus käyttävät asetonia.

Asetonia tuotettiin ensimmäisen maailmansodan aikana Weizmann-prosessilla tärkkelysma-
teriaalista organismilla *Clostridium acetobutylicum* /12,14/. Kyseiset bakteerit ovat sauva-
maisissa ja täysin anaerobisissa ja niitä on eristetty mm. maaperästä, lannasta, hernekasvien juu-

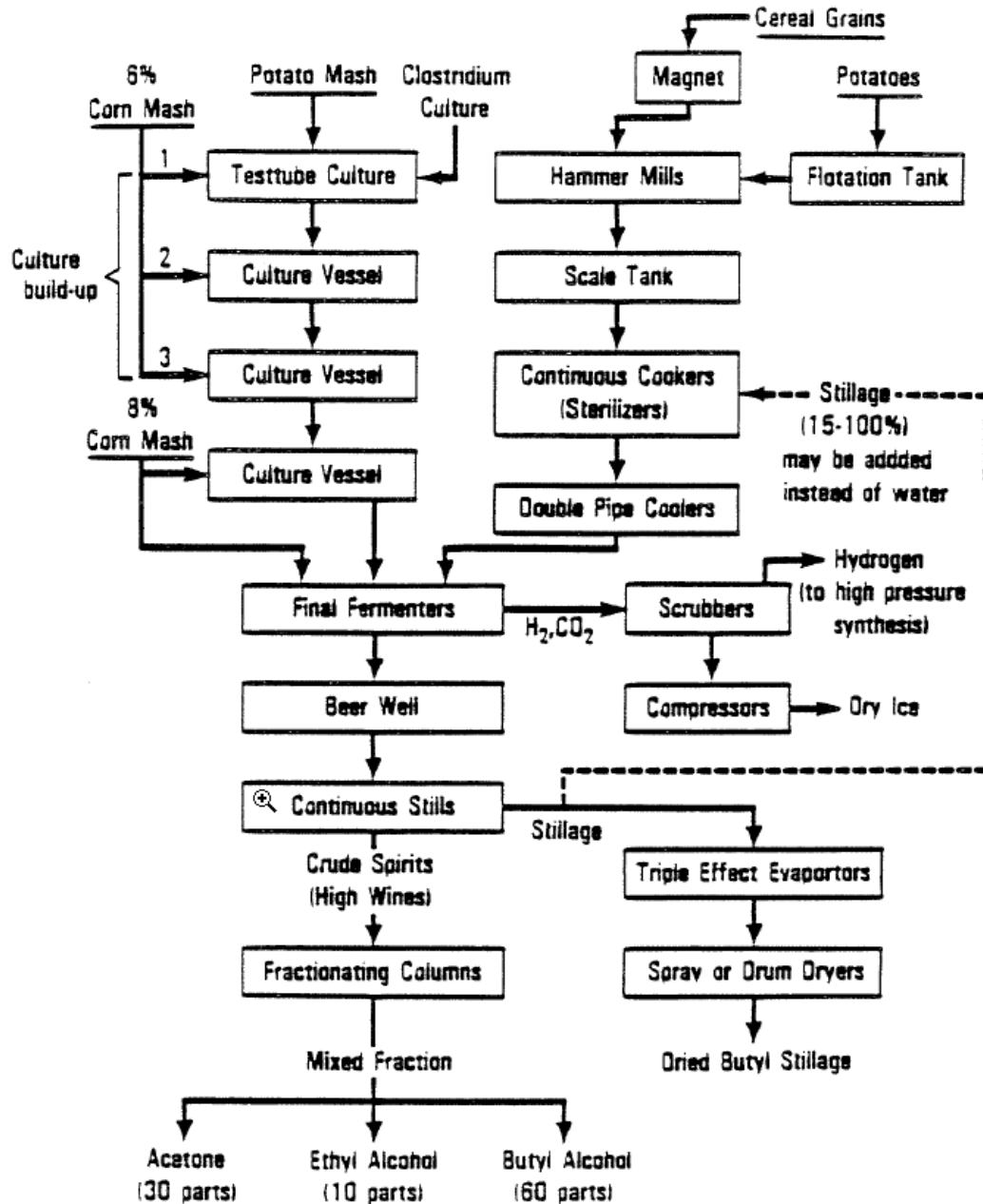
rista, viljakasveista, mädäntyneistä puista, maissin varsista, jätevesistä ja jokien pohjamudasta /14,17/. Weizmann-prosessin ensimmäisessä vaiheessa butyyri- ja etikkahappo akkumuloituvat aiheuttaen pH:n alenemisen arvoon 4,5 /12/. Toisessa vaiheessa hapot hyödynnetään butanoliksi ja asetoniksi, mitä seuraa pH-arvon nousu. Myös pieni määrä etanolia muodostuu käymisen aikana. Fermentoinnin lopussa solumassa ja muu suspendoitunut aines poistetaan sentrifugoimalla ja myydään rehuna /25/.

Lisäksi asetonia ja butanolia voidaan tuottaa peräkkäisillä fermentoinneilla *C. acetobutylicum*- ja *Kluyveromyces fragilis* -mikro-organismien sekaviljelmällä /14/. Myös *Bacilli*- ja muilla *Clostridia*-lajeilla voidaan valmistaa asetonia /17/. Seuraavassa taulukossa on esitetty asetonin ja butanolin tuotannossa käytettyjä sakkarolyyttisiä lajeja ja niiden substraatteja.

Taulukko 2. Asetonin ja butanolin fermentoinnissa käytettyjä bakteereita /17/

| Bacteria | Sugar source | Nitrogen added | Other addition |
|--|---------------------------|--|---|
| <i>Bacillus butacone</i> | Blackstrap molasses | Animal and vegetable protein | — |
| | Beet molasses | Complex nitrogen | — |
| <i>B. saccharobutylicum</i> | Invert molasses | — | CaCO ₃ |
| <i>B. tetryl</i> | Invert molasses | NH ₃ | — |
| <i>Clostridium acmylosaccharo-butypropylicum</i> | Invert molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ | CaCO ₃ , P ₂ O ₅ |
| <i>Cl. celerifactor</i> | Invert molasses | NH ₃ | CaCO ₃ |
| <i>Cl. granulobacter-acetobutylicum</i> | Molasses | Ammonium salts | Corn gluten, CaCO ₃ |
| <i>Cl. madisonii</i> | Cuban blackstrap molasses | NH ₄ OH, (NH ₄) ₂ SO ₄ | CaCO ₃ |
| | Blackstrap molasses | NH ₃ | — |
| <i>Cl. propyl butylicum</i> | Invert molasses | NH ₃ , (NH ₄) ₂ SO ₄ | CaCO ₃ , CaCO ₃ , K ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ |
| <i>Cl. saccharoacetobutylicum</i> | Cane molasses | Degraded protein | — |
| | Louisiana molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ | CaCO ₃ |
| | Cuban molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ | Gluten meal |
| | Invert molasses | NH ₃ | — |
| | Blackstrap molasses | NH ₃ | — |
| | Molasses | NH ₃ | — |
| <i>Cl. saccharobutylicum</i> | Blackstrap molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ | Corn gluten |
| <i>Cl. saccharobutylicum-liquefaciens</i> | Blackstrap molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ | CaCO ₃ , P ₂ O ₅ |
| | Cuban molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ | CaCO ₃ , P ₂ O ₅ |
| | Molasses | NH ₃ | — |
| <i>Cl. saccharoacetyoperbutylicum</i> | Invert molasses | (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ OH | CaCO ₃ , P ₂ O ₅ |
| <i>Cl. saccharobutylicum</i> | Blackstrap molasses | — | CaCO ₃ |
| <i>Cl. invertacetobutylicum</i> | Louisiana molasses | Ammonium salts | Alkalies |
| <i>Cl. saccharobutyl-isopropyl-acetonicum</i> | Invert molasses | Degraded protein | — |
| <i>Cl. viscifaciens</i> | Invert molasses | — | CaCO ₃ |

Tärkkelyksen tai sokerin asetoni-butanoli-fermentointi tapahtuu kuvan 9 mukaisesti /17/.



Kuva 9. Tärkkelyksen tai sokerin käyminen asetoniksi ja butanoliksi /17/.

Kun asetonia fermentoidaan tärkkelyksestä (kuva 9), *C. acetobutylicum* -mikro-organismeja kasvatetaan tärkkelys-tyyppi-viljelmässä ja hiililähteenä käytetään maissin tärkkelystä /17/. Anaerobisissa olosuhteissa 37 °C:n lämpötilassa tapahtuva käyminen kestää 48–72 tuntia. Fermentoinnin jälkeen uute pumpataan tislauskolonniin ja liuottimet otetaan myöhemmin talteen fraktioinnilla. Käymisen päätuotteita ovat asetoni, butanoli, etanoli, hiilidioksidi, vety ja

riboflaviinia sisältävä rehu. Tislauksesta saatu jäte voidaan käyttää eläimen ruoaksi. Kun asetonia valmistetaan sokerista, käyminen tapahtuu samalla tavalla kuin tärkkelyksestä, mutta *Clostridium*-itiöitä haudotaan perunaglukoosikasvuympäristössä, joka siirretään melassin sekaan.

5 Neljähiiliset C₄-kemikaalit

5.1 Butanoli

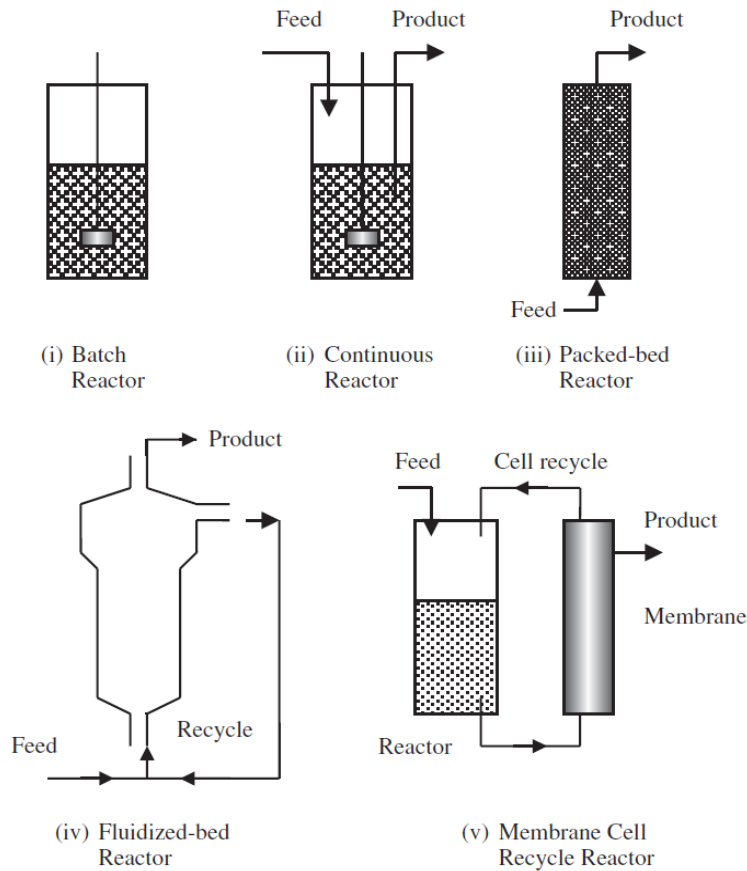
Butanolilla CH₃CH₂CH₂CH₂OH on monia kiinnostavia ominaisuuksia, joita ei tavata muilla käymispohjaisilla polttoaineilla, kuten etanolilla /26/. Esimerkiksi butanolin energiasisältö on 30 % suurempi kuin etanolilla ja lisäksi sen energiasisältö on lähempänä bensiinin energiasisältöä. Butanoli ei myöskään ole herkkä kosteudelle, se on etanoliin verrattuna vähemmän haihtuva ja sitä vähemmän vaarallisempi käsitellä. Lisäksi butanoli ei syty helposti ja sitä voidaan sekoittaa bensiiniin kaikissa suhteissa. Butanolia käytetään mm. liuottimena, kemianteollisuuden välituotteena, jäätyminenestoaineena, aromiaineena sekä uuttoliuottimena /27/.

Butanolia voidaan tuottaa fermentoinnilla samoilla tavoilla kuin asetonia eli Weizmann-prosessilla, *Clostridium acetobutylicum* -bakteerilla tärkkelyksestä, *Clostridia*- ja *Bacilli*-lajeilla sokereista sekä peräkkäisillä fermentoinneilla *C. acetobutylicum*- ja *Kluyveromyces fragilis* -mikro-organismien sekaviljelmällä /12,14,17,26/. Weizmann-prosessissa butanolia muodostuu pH-arvon nousun jälkeen, kun voihappo tai butyryylikoentsyymiA pelkistyy alkoholiksi /12/. Lisäksi butanolia voidaan tuottaa mm. *C. butylicum*-, *C. aurantibutyrium*- ja *C. tetanomorphum* -lajeilla /26/.

Butanolin tuotannossa yleisesti käytettyjä substraatteja ovat hirssi, vehnä, riisi, tapioka, soijamelassi, peruna, maniokki sekä maa-artisokka /26/. Viime aikoina substraatteina on käytetty myös puutarhajätettä, maissikuitua ja vehnän olkea /25/.

Butanolin perinteinen valmistus pohjautuu panosprosessiin, jossa tuote otetaan talteen tislamalla /26/. Käymisessä substraattina käytetään yleensä melassia, maissitärkkelystä, glukoosia tai herapermeaattia ja se kestää kokonaisuudessaan 36–72 tuntia. Panosprosessin asetoni-butanoli- tai butanolituottavuus on kuitenkin alhaista johtuen osittain butanolin myrkyllisyydestä viljelmälle sekä osittain seisokkiajasta, johon kuuluu täyttö, sterilisointi ja reaktorin

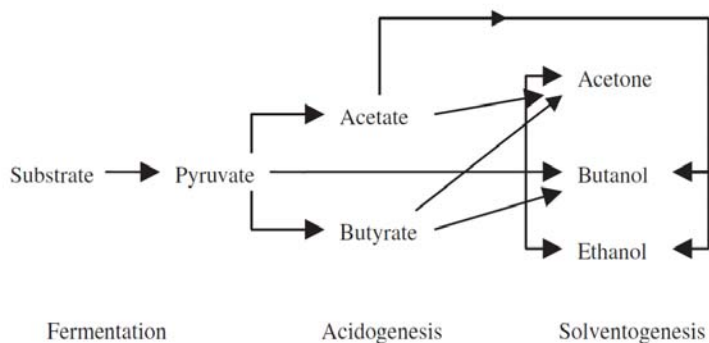
puhdistus. Panosfermentori ja eräitä muita butanolin käymisessä käytettyjä reaktoreita on esitetty kuvassa 10.



Kuva 10. Butanolin tuotannossa käytettyjä reaktorisysteemejä /26/.

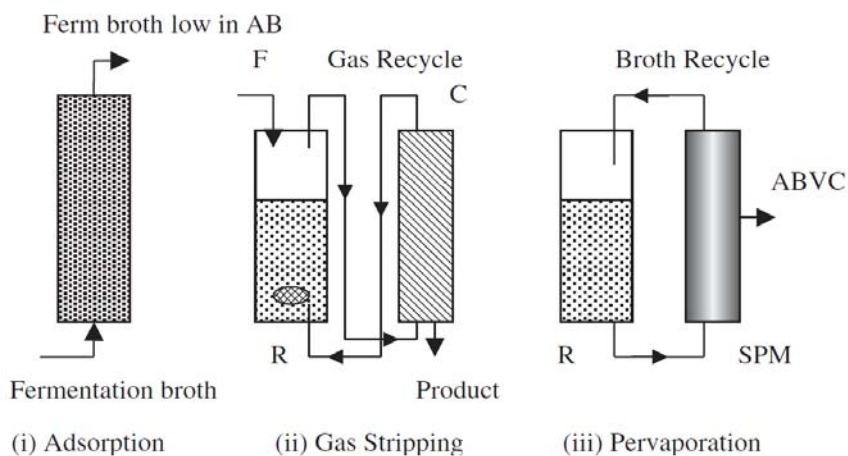
Anaerobiset bakteerit, kuten liuottimia muodostavat *Clostridia*-bakteerit, pystyvät konvertoimaan monia erilaisia hiililähteitä (glukoosi, galaktoosi, sellobioosi, mannoosi, ksyloosi ja arabinoosi) polttoaineiksi ja kemikaaleiksi, kuten butanoliksi, asetoniksi ja etanoliksi /25,26/. Liuottimia muodostavilla *Clostridia*-bakteereilla on sakkarylyttisiä ominaisuuksia ja niiltä puuttuu sellulaasin aktiivisuuteen tarvittava eksoglukanaasi-entsyymi /28/. Butanolia on tuotettu mm. *Clostridium beijerinckii* BA101 -mikro-organismilla maatalouden jätteistä sekä *Clostridium acetobutylicum* -mikro-organismilla /25,26/. *C. beijerinckii* BA101 -mikro-organismi tuottaa butanolia eniten, kun hiililähteenä on sellobioosi ja vähiten, kun hiililähteenä on galaktoosi /25/. Liuottimia muodostavien mikro-organismien metaboliassa tapahtuu sarja biokemiallisia reaktioita, joissa polysakkaridit sekä heksoosi- ja pentoosisokerit konvertoidaan pyruvaatiksi, ATP:ksi ja NADH:ksi /26/. *C. acetobutylicum* ja *C. beijerinckii* hyödyntävät pyruvaattia läpikäymään kaksivaiheisen fermentoinnin, jossa tuotetaan eksponentiaalisen kasvuvaiheen aikana välituotteita, kuten aseaattia ja butyraattia. Välituotteet assimi-

loituvat uudelleen myöhäisen eksponentiaalisen ja stationaarisen vaiheen aikana tuottaen asetonia ja butanolia. Kuvassa 11 on esitetty butanolin fermentointiprosessi.



Kuva 11. Butanolin fermentointi /26/.

Butanoli on myrkyllistä fermentoiville mikro-organismeille, mikä aiheuttaa butanolin alhaisen väkevyyden käymisliemessä /25,26/. Tämän lisäksi butanolin energiaintensiivinen talteenotto laimeista liuoksista tulee kalliiksi, minkä vuoksi on tutkittu vaihtoehtoisia menetelmiä biobutanolin fermentoinnille ja talteenotolle. Butanolin talteenottotekniikoita ovat adsorptio, kaasustrippaus, ioninesteet, neste-neste-utto ja pervaporaatio /25/. Kuvassa 12 on esitetty butanolin talteenottotekniikoita.



Kuva 12. Butanolin talteenottotekniikoita /26/.

On myös kehitetty systeemi, jossa tapahtuu samanaikaisesti sekä butanolin tuottaminen että poisto käymisliemestä /25/. Muita mahdollisuuksia parantaa butanolin käymistä ja talteenottoa on kehittää lajeja, jotka sietävät korkeampia butanoli- ja sokeriväkevyyksiä ja jotka tuot-

tavat enemmän butanolia /26/. Jotta butanolia voitaisiin tuottaa kilpailukykyisesti, on identifioidava ja evaluoitava taloudellisempia substraatteja, kuten maatalouden jätteitä ja energia-kasveja (maissin kuitu, vehnän, ohran ja riisin olki sekä norsuheinät).

5.2 Meripihkahappo

Meripihkahappo $\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ on trikarboksyylihappokierron (TCA-sykli) välituote ja yksi anaerobisen aineenvaihdunnan lopputuotteista, minkä vuoksi sitä syntetisoituu lähes kaikissa mikrobien, kasvien ja eläinten soluissa /29,30/. Tätä dikarboksyylihappoa tuotetaan mikrobikäymisellä elintarvike- ja lääketeollisuuden sekä maatalousalan käyttöön /1,29/. Meripihkahapolla on myös potentiaalisia käyttökohteita tekstiileissä, muoveissa, hartseissa ja pesuaineissa /1/. Lisäksi meripihkahappo on monien teollisesti tärkeiden kemikaalien, kuten adipiinihapon, 1,4-butaanidiolin, tetrahydrofuraanin, *N*-metyylipyrrolidinonin, 2-pyrrolidinonin, sukkinatissuolujen sekä γ -butyrolaktonin, prekursori /1,29/. Samoin meripihkahappoa käytetään biohajoavien polymeerien sekä useiden vihreiden liuottimien syn-teeseissä /29/.

Useita erilaisia meripihkahappoa tuottavia mikro-organismeja on seulottu ja tutkittu erilaisista hiililähteistä /29/. Eniten tutkittuja ovat mikrobit *Anaerobiospirillum succiniciproducens*- ja *Actinobacillus succinogenes*, sillä ne tuottavat suhteellisen paljon meripihkahappoa /18,29–31/. Lisäksi on kehitetty rekombinantteja *Escherichia coli* -lajeja, jotka pystyvät lisäämään meripihkahapon tuotantoa aerobisissa ja anaerobisissa olosuhteissa /18,29,32/. Biologisia tuotantoprosesseja taas on pyritty kehittämään *Aspergillus niger*-, *Aspergillus fumigatus*-, *Byssochlamys nivea*-, *Lentinus degener*-, *Paecilomyces varioti*- ja *Penicillium viniferum* -sienille sekä *Saccharomyces cerevisiae* -hiivalle, jotka tuottavat meripihkahappoa metabolisena sivutuotteena anaerobisissa ja/tai aerobisissa olosuhteissa /29,30/. Myös muutamit grampositiiviset bakteerit, kuten *Corynebacterium glutamicum* ja *Enterococcus faecalis*, ovat olleet tutkimuksen kohteina meripihkahapon tuottajina. Lisäksi mm. naudan pötsistä eristetty *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E -mikro-organismi tuottaa meripihkahappoa /29/.

Meripihkahappoa tuottava *Actinobacillus succinogenes* -organismi on fakultatiivinen, anaerobinen, liikkumaton, pleomorfinen ja gramnegatiivinen sauva- tai joskus myös rihmamainen bakteeri /29/. Anaerobisissa olosuhteissa *A. succinogenes* tuottaa suhteellisen paljon meripihkahappoa erilaisista hiililähteistä, kuten sellobioosista, fruktoosista, glukoosista, laktoosista,

maltoosista, sorbitolista, sakkaroosista tai salisiinista fosfoenolipyruvaatin karboksylaatiolla. Yksi *A. succinogenes* -bakteerin hyvistä puolista on se, että se sietää korkeita glukoosiväkevyyksiä hyvin. Song ja Lee /29/ ovat tutkineet *A. succinogenes* 130Z -lajin sekä sen muunneltujen muotojen mahdollisuutta tuottaa meripihkahappoa kaupalliseen tuotantoon. Tutkimuksessa panoskäyminen tehtiin hiivauutetta ja maissilietettä sisältävässä fermentorissa ja pH-arvon laskun hillitsijänä käytettiin magnesiumkarbonaattia. Fermentoinnin sivutuotteina syntyi etikka-, muurahais-, propioni- ja voi-happoa. Tutkimuksessa havaittiin lajien tuottavan suuria määriä meripihkahappoa ja tutkitut lajit sietivät meripihkahappoa paremmin kuin mikään muu aiemmin esitellyistä meripihkahapon tuottajista.

Meripihkahappoa päätuotteenaan fosfoenolipyruvaatin karboksylaatiolla tuottava *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E on fakultatiivinen, mesofiilinen, liikkumaton ja kapnofiilinen gramnegatiivinen bakteeri /29/. Käymisen, joka tapahtuu 100 % hiilidioksidiolosuhteissa pH-arvon ollessa 6,0–7,5, muita tuotteita ovat etikka- ja muurahais-happo. Kyseinen bakteeri käyttää meripihkahappoa tehokkaasti ja taloudellisesti herapohjaisessa kasvuympäristössä, joka sisältää hiivauutteen sijaan maissilientä. *M. succiniciproducens* pystyy hyödyntämään useita hiililähteitä, erityisesti ksyloosia, jolloin raaka-ainekulut pienentyvät, koska fermentoinnissa voidaan käyttää käsittelemätöntä puun hydrolysaattia. Vaikka *M. succiniciproducens* -bakteeria voitaisiin käyttää meripihkahapon kustannustehokkaassa tuotannossa uusiutuvista lähteistä, käymisen ratkaisemattomana ongelmana ovat kuitenkin muodostuvat happoseokset.

Anaerobinen, liikkumaton gramnegatiivinen bakteeri *Anaerobiospirillum succiniciproducens* taas tuottaa fosfoenolipyruvaatin karboksylaatiolla pääfermentointituotteinaan meripihkahappoa ja etikkahappoa sekä pieniä määriä etanolia ja maitohappoa hyvin anaerobisissa olosuhteissa /29/. *A. succiniciproducens* pystyy hyödyntämään hiililähteinä tehokkaasti glukoosia, glyserolia, sakkaroosia, maltoosia, laktoosia ja fruktoosia ja se tuottaa meripihkahappoa enemmän, jos hiilen lähteenä on glukoosin sijaan glyseroli. Meripihkahappoa on mahdollista tuottaa *A. succiniciproducens* -bakteerilla kustannustehokkaasti käyttämällä käsittelemätöntä heraa, puun hydrolysaattia ja maissilietettä, jotka ovat paljon halvempia kuin jalostetut hiilihydraatit ja hiivauutteet. Sekä solun kasvuun että meripihkahapon tuotantoon vaikuttavia merkittäviä tekijöitä *A. succiniciproducens* -bakteerilla ovat hiilidioksiditaso, viljelmän pH, ulkoinen elektronilähde ja kasvuympäristön komponentit.

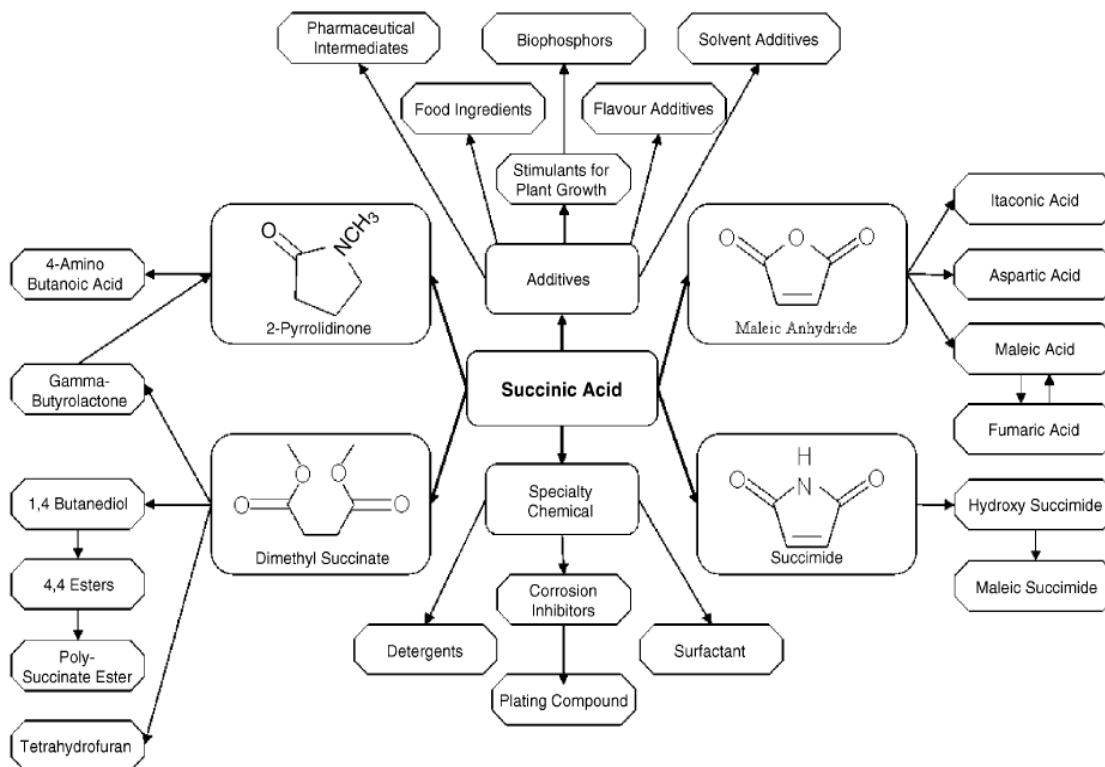
Escherichia coli -mikro-organismi fermentoi anaerobisissa olosuhteissa glukoosin etanoliksi, muurahais-, etikka- ja maitohapoksi sekä vain vähäisessä määrin meripihkahapoksi /29/. *E. coli* -mikro-organismien tiedetään hyödyntävän kuutta reittiä muodostaakseen meripihkahappoa ja on kehitetty monia metabolisia tekniikoita, joilla meripihkahapon tuotantoa *E. coli* -mikro-organismeilla voitaisiin parantaa. Sovelluksiin kuuluu mm. meripihkahapporeitin kanssa kilpailevien reaktioon osallistuvien entsyymien inaktivointi, meripihkahapporeitin kuuluvien entsyymien laajentaminen ja heterologisia entsyymejä katalysoivien reaktioiden käyttöönotto meripihkahapon muodostumisen lisäämiseksi. Esim. rekombinantti *Escherichia coli* ATCC 202021 konvertoi maissisokerin meripihkahapoksi kaksivaiheisella menetelmällä /1/. Prosessin ensimmäisessä vaiheessa tapahtuu kasvu aerobisissa olosuhteissa ja toisessa vaiheessa, joka on tuotannon päävaihe, glukoosi konvertoidaan anaerobisissa olosuhteissa pääasiassa meripihkahapoksi etikkahapon ja etanolin ollessa sivutuotteita.

Kun meripihkahappoa tuotetaan anaerobisella hiivakäymisellä, prosessin aikana muodostuu sukkiniaattia kahdella eri mekanismilla /12,17/. Toisessa mekanismissa sukkiniaattia muodostuu normaalin TCA-syklin hapettavan mekanismin kautta ja toisessa taas pelkistävän reitin kautta, jossa välituotteina muodostuu malaattia ja fumaraattia. Sukkinaatin muodostuminen on huomattavasti alhaisempaa hiivan anaerobisen kasvun aikana verrattuna hiivan metabolian käymisasteeseen. Pelkistyneiden nukleotidien taso kasvun aikana on alhaista, kun taas hiivan fermentointivaiheen aikana niiden taso nousee voimakkaasti. Kun nukleotiditaso on korkea fermentointivaiheen aikana, pyruvaatti metabolisoituu oksaaliasetaatiksi aktivoituneen pyruvaattikarboksylaasin kautta, jolloin TCA-sykli toimii aktiivisesti. TCA-syklin välituotteet akkumuloiduvat nyt sukkiniaattina ja ne eritetään ympäristöön. Kun tapahtuu sukkiniaatin muodostumista, esiintyy myös ylimäärin pelkistyneitä NADH_2 -ioneja. Tämä ylimääräinen NADH_2 hapettuu glyserolin muodostuessa muodostaen tasapainon solun hapetus-pelkistystilaan.

Meripihkahapon tuotannon ongelmana on sivutuotteiden muodostuminen. Ongelma voidaan kuitenkin ratkaista järkiperaisella metabolisella tekniikalla, joka perustuu systemaattiseen genomin laajuiseen analyysiin /29/. Meripihkahapon puhdistusmenetelmiä on monia, kuten elektrodialyysi, uutto ja happamoittaminen. Lisäksi on kehitetty puhdistusmenetelmä, jossa saostetaan sukkiniaattisuoloja.

Meripihkahappo on monipuolinen yhdiste, josta pystytään valmistamaan hyödyllisiä tuotteita erilaisten reaktioiden kautta /21/. Meripihkahappoon perustuvia potentiaalisia markkinatuot-

teita ovat 1,4-butaanidioli, tetrahydrofuraani (THF), γ -butyrolaktoni, *N*-metyylipyrrolidoni ja lineaariset alifaattiset esterit. Kuvassa 13 on esitetty meripihkahaposta syntetisoituja tuotteita ja kemikaaleja.



Kuva 13. Meripihkahaposta syntetisoituja kemikaaleja ja tuotteita /29/.

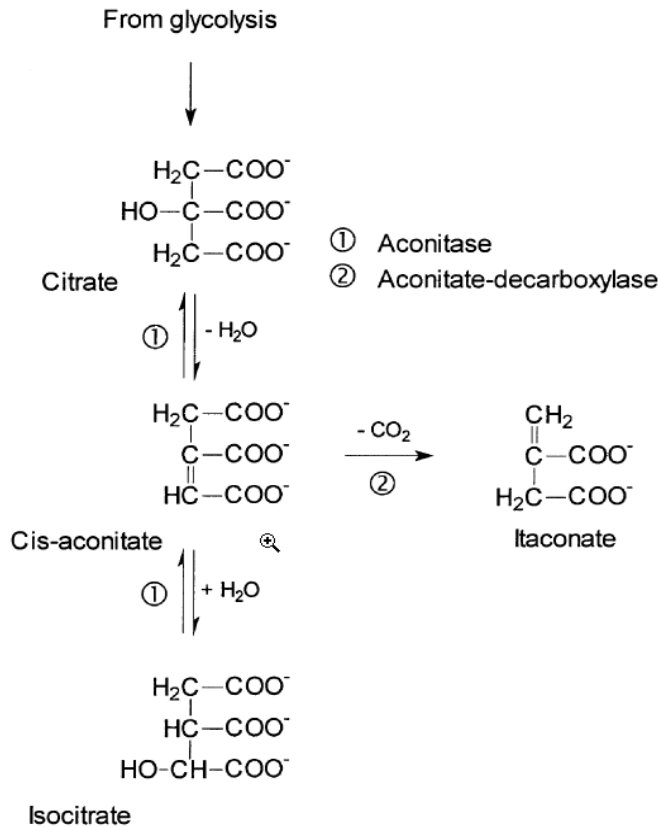
6 Viisihiiliset C₅-kemikaalit

Itakonihappo $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CO}_2\text{H})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ on tyydyttymätön, kiteinen ja suhteellisen myrkytön orgaaninen dikarboxyylihappo /18,21,33/. Ominaisuus, joka tekee itakonihaposta harvinaislaatuisen arvokkaan yhdisteen, on sen kahden karboxyyliyhdyntien ja metyleeniryhmän yhdistelmä /18,33/. Metyleeniryhmä voi osallistua polymerisaatioon ja synnyttää monia vapaita karboxyyliyhdyntiä sisältäviä polymeerejä, joilla on monia hyödyllisiä ominaisuuksia. Itakonihapon laajalle levinnyt käyttö polymeereissä ja *N*-substituoiduissa pyrrolidoneissa on lisännyt sen kysyntää, vaikka sen synteesi onkin epätaloudellista korkean substraattihinnan ja/tai suhteellisen alhaisen saannon vuoksi. Itakonihappo on myös potentiaalinen lähtökemikaali sekä hyödyke- että erikoiskemikaaleille /18/. Itakonihapon polymerisoituja metyyli-, etyyli- tai vinyylistereiteitä käytetään mm. muoveissa, liimoissa, elastomeereissä ja päällystykseissä /21/. Itakonihappoa käytetään myös komonomeerinä polyakrylonitriili- ja styreenibutaadieni-kopolymeereissä.

Itakoni happoa tuotetaan kaupallisessa mittakaavassa rihmamaisilla *Aspergillus itaconicus*- ja *Aspergillus terreus* -sienillä hiilihydraateista, kuten sakkaroosista, glukoosista ja ksyloosista /21,33–35/. Itakoni happoa voidaan tuottaa myös *Candida*-sukuun kuuluvalla hiivalla sekä rihmamaisilla *Ustilago zaeae*-, *Ustilago maydis*- sekä *Helicobasidium mompa* -sienillä /34,35/.

Itakoni hapon tuotannossa useimmin käytettyjä substraatteja ovat sokeriruo'on tai -juurikkaan melassi, jotka on voitu esikäsitellä ioninvaihdolla tai ferrosyanidilla, hydrolysoitu tärkkelys tai yksinkertaiset sokerit, kuten sakkaroosi ja glukoosi /35/. On myös tutkittu glyserolin, tärkkelyksen, melassin, maissisiirapin tai puun hydrolysaattien, sakkaroosin ja glyserolin seoksien sekä monien muiden yhdistelmien soveltuvuutta tähän tarkoitukseen. Paras itakoni-happosaanto saadaan, kun substraattina käytetään glukoosia tai sakkaroosia.

Itakoni hapon tuotanto sienillä tapahtuu pääasiassa glykolyysin ja TCA-kierron kautta /35/. Välituotteina prosessissa muodostuu sitruunahappoa ja akoniittihappoa, ja itakoni happoa muodostuu jälkimmäisestä entsymaattisesta dekarboksylaatiosta kuvan 14 mukaan.



Kuva 14. Itakoni hapon synteesi /35/.

Itakonihapon käyminen toimii optimaalisesti fosfaattirajoitetuissa kasvuolosuhteissa /35/. Käymisen aikana pH laskee, ja päätuotteena muodostuu itakonihappoa. Yleensä lämpötila pidetään 37 °C:ssa, mutta on myös tehty tutkimuksia, joissa optimaalista lämpötilaa nostetaan. Esimerkiksi mutageneesin jälkeen *A. terreus* -laji tuottaa itakonihappoa 40 °C:ssa viisinkertaisen määrän emolajiin verrattuna. Myös riittävä hapensaanti käymisessä on tärkeää, koska anaerobiset olosuhteet vahingoittavat biomassaa peruuttamattomasti. Itakonihapon tuotantoon vaikuttavat voimakkaasti myös useat kasvuympäristön komponentit, kuten rauta, mangaani, magnesium, kupari, sinkki, fosfori ja typpi. Tämä tarkoittaa sitä, että jos halutaan saada toistettavia korkeita tuottavuuksia, pitää substraatin laatua kontrolloida joko käyttämällä laadultaan puhdistettuja aloitusmateriaaleja tai esikäsittelemällä raaka-aine ennen käymistä tai sen aikana.

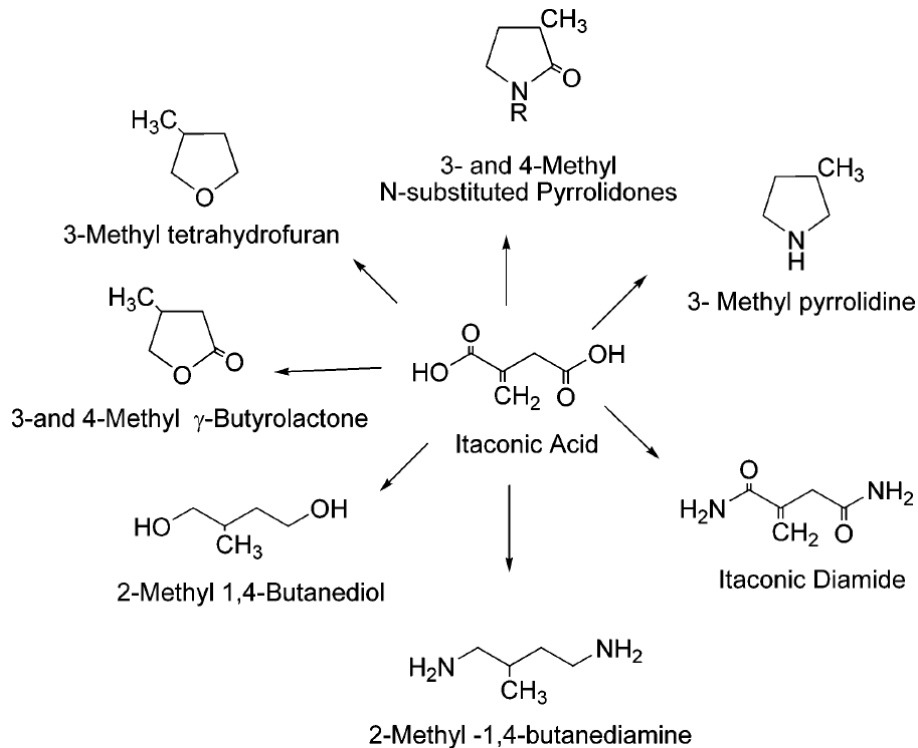
Itakonihappoa on tuotettu mm. esikäsitellyistä puutarhanviljelyjätteistä laboratoriossa *Aspergillus terreus* SKR10 -mikrobilla /33/. Puutarhanviljelyjäte koostui omena- ja banaanijätteestä sekä maissitärkkelyksestä. Mikrobeja kasvatettiin agar-kasvualustalla ja viljelmä siirrettiin glukoosia, ammoniumnitraattia, magnesium- ja kuparisulfaattia sekä kaliumdivetyfosfaattia sisältävään kasvuympäristöön. Kasvuympäristö taas istutettiin glukoosia tai hedelmä uutetta, ammoniumnitraattia sekä magnesium- ja kuparisulfaattia sisältävään tuotantoympäristöön, jossa sitä haudottiin kuuden päivän ajan 34 °C:ssa. Itakonihapon saantoa pyrittiin parantamaan erilaisilla mutageenisillä käsittelyillä, joita olivat *N*-metyyli-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidiini-, kolkisiini- ja natriumatsidikäsittelyt. Kyseisiä käsittelyjä käytettiin joko yksinään tai erilaisin kombinaatioin. Suurimmat itakonihapposaannot saatiin käsitellyillä mikrobilajeilla. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että maissitärkkelys ja hedelmäjätteet olivat potentiaalisia substraatteja itakonihapon fermentoinnissa.

Itakonihapon talteenotossa rihmasto ja muu kiinteä aines poistetaan suodattamalla /35/. Tarpeeksi happamissa olosuhteissa tehdyn haihdutuksen, jäädytyksen ja kiteytyksen jälkeen saadaan teollisuuteen kelpavaa itakonihappoa. Arvokkaampaa itakonihappoa saadaan, kun haihdutuksen kuuma höyry käsitellään aktiivihieillä ja suodatetaan. Kiteytyksen emoliuos voidaan sen jälkeen liuotinuuttaa tai käsitellä anionivaihdolla. Muita itakonihapon mahdollisia talteenottomenetelmiä ovat uudelleenkiteytys vedestä, liukenemattomien itakonihapposuolojen saostus, ultrasuodatus, käänteinen osmoosi, ioninvaihto ja elektrodialyysi.

Itakonihapon tuottavuutta voidaan parantaa bioteknologisilla menetelmillä, kuten immobilisaatiotekniikoilla, seulontaohjelmilla sekä geneettisillä tekniikoilla /35/. Lisäksi vaihtoehtois-

ten substraattien käyttö voisi alentaa tuotannon hintaa ja näin tarjota uusia markkinoita sekä lisätä itakonihiapon sovelluksia.

Itakonihiaposta johdettuja tuotteita ja välituotteita on esitetty kuvassa 15.



Kuva 15. Itakonihiaposta johdettuja tuotteita tai välituotteita /21/.

7 Kuusihäiliset C₆-kemikaalit

Sitruunahappo HO2CCH2C(OH)(CO2H)CH2CO2H on trikarboksyylihapo, joka sisältää kolme funktionaalista karboksyyliiryhmää /36/. Lisäksi se on TCA-kierron metabolinen päätuote ja sitä löytyy pieniä määriä lähes kaikista kasveista ja eläimistä. Sitruunahappo on tärkeä kaupallinen tuote, jota käytetään elintarvike- ja lääketeollisuudessa sekä muissa sovelluksissa esimerkiksi pehmittimenä, pesuaineena ja hioma-aineena /37,38/. Noin 99 % maailman sitruunahapon tuotannosta tapahtuu mikrobialisilla prosesseilla, jotka voidaan tehdä joko pinta- tai pohjaviljelmillä /36/. Sitruunahappo myydään joko vedettömänä tai monohydraattihappona.

Monet organismit, kuten *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. luchensis*, *A. phoenicus*, *A. wentii*, *A. saitoi*, *A. flavus*, *Absidia* sp., *Acremonium* sp., *Botrytis* sp., *Eupenicillium* sp., *Mucor piriformis*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium restrictum*, *Talaromyces* sp., *Trichoderma*

viride ja *Ustilina vulgaris*, akkumuloivat sitruunahappoa /36/. Näistä *A. niger* on sitruunahapon teollinen päätuottaja. Sienien ohella myös monet hiivat, erityisesti *Candida*-, *Hansenula*-, *Pichia*-, *Dearomyces*-, *Torula*-, *Torulopsis*-, *Kloekera*-, *Saccharomyces*-, *Zygosaccharomyces*- ja *Yarrowia*-sukuihin kuuluvat lajit tuottavat sitruunahappoa *n*-alkaaneista ja hiilihydraateista. Hiililähteinä sitruunahapon tuotannossa käytetään mm. sakkaroosia ja glukoosia, joista sakkaroosi on suositumpi. Teollisessa tuotannossa hiilen lähteenä käytetään usein glukoosisiirappia.

Sitruunahapon akkumuloitumiseen vaikuttaa voimakkaasti kasvuympäristön koostumus erityisesti pohjafermentoinnissa /36/. Sitruunahapon käymiseen vaikuttavat myös hiililähteen tyyppi ja väkevyys, typpi- ja fosfaattirajoitukset, pH, ilmastus, oligoelementtien väkevyys ja tuottavan mikro-organismien morfologia. Lisäksi tiettyjä ravinteita (sokerit, protonit ja happi) pitää olla ylimäärin, toisia (typpi ja fosfaatti) puolestaan rajoitettu määrä ja toisia (hivenmetallit ja erityisesti mangaanesi) taas normaalin määrän alapuolella.

Vandenbergh *et al.* /37/ ovat vertailleet sitruunahapon tuotantoa maniokkibagassista, kahvin kuoresta ja sokeriruokobagassista samanaikaisella hydrolyysillä ja käymisellä (SSF) *Aspergillus niger* -sienellä. Tutkimuksessa käytettiin NRRL 2001 -kantaa, sillä se tuotti kokeiden perusteella eniten sitruunahappoa. Fermentointi suoritettiin pystysuorassa fermentorissa, jonka pylväät sisälsivät valmistettua kasvuympäristöä. Fermentoinnin päätyttyä sitruunahappopitoisuudet analysoitiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (HPLC). Tutkimuksessa saatiin selville, että käytetyllä sienikannalla oli hyvä affiniteetti käytetyille substraateille. Sitruunahapon tuotanto oli suurinta, kun substraattina käytettiin maniokkibagassia ja pienintä, kun käytettiin kahvin kuorta. Maniokkibagassi tuotti sitruunahappoa tutkimuksen mukaan eniten luultavasti siksi, että se sisälsi mm. kalsiumia, fosforia, B₂-vitamiinia, tiamiinia sekä nikotiinihappoa, joita muut substraatit eivät sisältäneet.

Kumar *et al.* /39/ ovat myös tutkineet sitruunahapon tuotantoa *Aspergillus niger* -lajilla bagassissta, vehnäleseistä sekä melassista SSF-prosessilla. Tutkimuksessaan Kumar *et al.* /39/ optimoivat prosessin olosuhteita kasvualustan partikkelikoon, kosteuspitoisuuden, sokeritason ja metanolin väkevyyden osalta. Lisäksi Yigitoglu /40/ on tutkinut, miten metallijäämien laatu ja määrä, hiili- ja typpilähteet sekä oikeanlaiset ympäristöolosuhteet vaikuttavat sitruunahapon onnistuneeseen happofermentointiin.

Fermentoinnin jälkeen sitruunahappo otetaan talteen käymisliemestä ja puhdistetaan /17/. Sitruunahapon talteenoton ensimmäinen vaihe sisältää oksaalihapon saostuksen ja myöhemmän erotuksen rihmaston sisältävästä kasvuympäristöstä pyörivillä suodattimilla tai sentrifugeilla /36/. Tämän jälkeen sitruunahappo saostetaan pH-arvossa 7,2 70–90 °C:ssa ja otetaan talteen suodattamalla ja kuivaamalla. Jos tuotteesta halutaan puhtaampi, se liuotetaan rikkihappoon ja käsitellään esimerkiksi ioninvaihtohartsilla sekä kiteytetään vedettömänä sitruunahappona tai monohydraattina. Myös elektrodialyysi bipolaarisilla kalvoilla on yksi sitruunahapon talteenottomenetelmistä.

8 Yhteenveto

1970-luvun öljykriisin jälkeen kiinnostus bioteknologiaa kohtaan kasvoi öljyn kohonneen hinnan vuoksi. Kymmenisen vuotta myöhemmin öljyn hinta kuitenkin laski ja biomassaan perustuvien teknologioiden kehittäminen pysähtyi. 2000-luvulla biotekniikkaa on kuitenkin jälleen alettu kehittää erityisesti uhkaavan öljypulan, raakaöljyn hinnan nousun ja ilmastonmuutoksen hillitsemisen vuoksi. Esimerkiksi fossiilisiin lähteisiin perustuvia kemikaaleja on pyritty korvaamaan biomassasta, kuten puusta ja maatalousjätteistä, johdetuilla kemikaaleilla. Bioteknisesti valmistettavia merkittäviä kemikaaleja ovat etanoli, etikkahappo, glyseroli, maitohappo, aseton, butanoli, meripihka-, itakoni- ja sitruunahappo, joiden valmistusmenetelmiä on tässä tutkimuksessa tarkasteltu.

Kaksihiilisiä bioteknisesti valmistettuja kemikaaleja ovat mm. etanoli ja etikkahappo. Etanolia tuotetaan pääasiassa polttoaineeksi, ja sen bioteknisessä tuotannossa voidaan käyttää esimerkiksi hiivaa *Saccharomyces cerevisiae*. Hiivat voivat käyttää etanolin valmistuksessa EM- tai ED-reittiä, glykolyysiä, heterolaktista fermentointia tai reittiä, jossa etanolia tuotetaan rikkipitoisella reaktiolla. Etanolin käymisessä kuluja on kuitenkin pienennettävä esim. käyttämällä halvempia raaka-aineita ja sellulaasientsyymejä. Etanolin johdannaisia ovat mm. etikkahappo ja asetraldehydi. Etikkahappoa taas käytetään elintarvike-, lääke- ja tekstiiliteollisuudessa ja sitä voidaan tuottaa aerobisella pohjafermentoinnilla ja anaerobisella hiivakäymisellä. Etikkahappoa tuottavia mikro-organismeja ovat *Acetobacterium woodii* sekä *Bacillus*- ja *Clostridium*-lajit.

Kolmehiilisiä bioteknisesti valmistettavia kemikaaleja ovat esim. glyseroli, maitohappo ja aseton. Glyseroli on potentiaalinen lähtökemikaali, jota käytetään myös massa- ja paperiteollisuudessa. Glyserolia voidaan tuottaa hiivakäymisellä käyttämällä *Saccharomyces cere-*

visiae-mikro-organismia. Glyserolin tuotannossa ongelmana on kuitenkin alhainen saanto ja sivutuotteiden muodostuminen, minkä lisäksi glyserolin talteenotto käymisliemestä on kallista ja tehotonta. Glyserolin johdannaisia ovat glyserolitriasettaatti, 1,3-propaanidioli ja propa-noli. Maitohappoa taas käytetään elintarvike-, lääke- ja kemianteollisuuden sovelluksissa. Maitohapon tuotantoprosesseissa, kuten anaerobisessa käymisessä tai yksivaiheisessa tärkkelyksen konversiossa, käytetään yleensä *Lactobacillus delbrückii*-, *L. bulgaricus*- tai *Lactococcus helveticus* -bakteereita sekä *Mucor*- tai *Monilia*-lajin sieniä. Maitohapon tuotannossa ongelmana ovat kalliit erotus- ja puhdistusvaiheet, reaktorin alhainen tuottavuus ja prosessin haitallisuus ympäristölle. Asetonia käytetään teollisuusliuottimissa sekä metakryylihapon, etikkahapon ja räjähteiden valmistuksessa. Asetonia voidaan tuottaa tärkkelysmateriaalista Weizmann-prosessilla *Clostridium acetobutylicum* -organismia käyttäen.

Neljähiilisiä bioteknisesti valmistettavia teollisia kemikaaleja ovat esim. butanoli ja meripihkahappo. Butanolia käytetään liuottimena, välituotteena kemianteollisuudessa sekä uuttoliuottimena. Butanolia voidaan tuottaa samoilla tavoilla kuin asetonia, kuten Weizmann-prosessilla sekä perinteisellä panoskäymisellä. Ongelmana tuotannossa on butanolin alhainen konsentraatio käymisliemessä, minkä lisäksi butanolin talteenotto on energiaintensiivistä ja kallista. Meripihkahappoa taas käytetään tekstiileissä, muoveissa ja hartseissa, minkä lisäksi se on potentiaalinen lähtökemikaali sekä monien teollisesti tärkeiden kemikaalien prekursori. Meripihkahapon tuotannossa eniten tutkittuja mikro-organismeja ovat *Anaerobiospirillum succiniproducens* ja *Actinobacillus succinogenes*. Meripihkahapon tuotannon ongelmana on sivutuotteiden muodostuminen. Meripihkahaposta voidaan valmistaa 1,4-butaanidiolia, tetrahydrofuraania ja lineaarisia alifaattisia estereitä.

Viisihiilistä itakoni-happoa käytetään polymeereissä ja *N*-substituoiduissa pyrrolidoneissa, minkä lisäksi se on potentiaalinen lähtökemikaali sekä hyödyke- että erikoiskemikaaleille. Itakoni-happoa tuotetaan kaupallisessa mittakaavassa *Aspergillus itaconicus*- ja *Aspergillus terreus* -sienillä hiilihydraateista, ja tuotanto tapahtuu pääasiassa glykolyysin ja trikarboksyyli-happokierron kautta. Itakoni-happoa voidaan tuottaa myös *Candida*-sukuun kuuluvalla hii-valla. Itakoni-hapon tuottavuutta voidaan parantaa bioteknologisilla menetelmillä ja tuotannon hintaa voidaan alentaa vaihtoehtoisten substraattien käytöllä. Itakoni-hapon johdannaisia ovat esim. 3-metyylipyrrolidoni ja itakonidiamidi.

Kuusihiihlistä sitruunahappoa käytetään elintarvike- ja lääketieteellisyydessä. Noin 99 % maailman sitruunahappotuotannosta tapahtuu mikrobiallisilla prosesseilla, jotka voidaan tehdä jo-

ko pinta- tai pohjaviljelmillä. Monet hiivat ja sienet, kuten *Aspergillus niger*, *Absidia* sp., *Acremonium* sp. ja *Penicillium restrictum*, akkumuloivat sitruunahappoa, joista *A. niger* on sitruunahapon teollinen päätuottaja.

Monia kemikaaleja voidaan siis valmistaa erilaisilla bioteknisillä menetelmillä. Yleisiä kemikaalien valmistuksessa käytettyjä mikro-organismeja ovat *Saccharomyces*-, *Clostridia*-, *Candida*- ja *Aspergillus*-lajit. Tiettyjen kemikaalien tuotanto bioteknisesti on kuitenkin ongelmallista alhaisen saannon, reaktorin alhaisen tuottavuuden, kemikaalin hankalan talteenoton ja puhdistuksen sekä korkeiden tuotantokustannusten vuoksi. Näistä erityisesti korkeat tuotantokustannukset aiheuttavat sen, että kemikaaleja tuotetaan usein mieluummin fossiilisiin lähteisiin perustuvilla tekniikoilla kuin uusiutuviin lähteisiin perustuvilla bioteknisillä menetelmillä. Tämän vuoksi bioteknisten tuotantomenetelmien kustannukset on saatava alhaisemmiksi, jotta biotekniset valmistusreitit olisivat kilpailukykyisiä fossiilisiin lähteisiin perustuvien valmistusreittien kanssa. Kustannuksia onkin pyritty pienentämään ottamalla käyttöön vaihtoehtoisia, halvempia substraatteja ja raaka-aineita sekä kehittämällä uusia tuotteen talteenotto- ja puhdistustekniikoita. Lisäksi on kehitetty mikro-organismeja, jotka sietävät paremmin kemikaalin korkeita pitoisuuksia ja lisäävät kemikaalin saantoa. Tulevaisuudessa bioteknologiaan perustuvat menetelmät luultavasti lisääntyvät, sillä ne eivät kuluta maapallon rajallisia fossiilisia lähteitä ja lisäksi ne ovat ympäristölle ystävällisiä.

9 Kirjallisuusviiteluettelo

1. Danner, H. ja Braun R., Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass, *Chem. Soc. Rev.*, 28(1999)395–405.
2. Klass, D.L., *Biomass for Renewable Energy, Fuels, and Chemicals*, Academic Press, San Diego, 1998, s. 495–546.
3. Mamman, A.S., Lee, J.-M., Kim, Y.-C., Hwang Y.-K., Chang J.-S. ja Hwang J.-S., Furfural: Hemicellulose/xylose-derived biochemical, *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2(2008)438–454.
4. Anon., Mitä biomassa on?,
http://www.bioteknologia.info/etusivu/ymparisto/Biomassa/fi_FI/Mita_biomassa_on/,
(luettu 26.10.2010).
5. Marshall, A.-L. ja Alaimo, P.J., Useful products from complex starting materials: Common chemicals from biomass feedstocks, *Chem. Eur. J.*, 16(2010)4970–4980.
6. Wilke, D., Chemicals from biotechnology: Molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52(1999)135–145.
7. Anon., Biomassan jalostaminen,
http://www.bioteknologia.info/etusivu/ymparisto/Biomassa/fi_FI/Biomassan_jalostaminen/, (luettu 26.10.2010).
8. Burk, M.J., Sustainable production of industrial chemicals from sugars, *Int. Sugar J.*, 112(2010)30–35.
9. Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. ja Zacchi, G., Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today, *Trends in Biotechnol.*, 24(2006)549–556.
10. Anon., OVA-ohje: Etanoli, <http://www.ttl.fi/ova/etanoli.html#ots1/>, (luettu 26.10.2010).
11. Lin, Y. ja Tanaka, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69(2006)627–642.
12. Goldstein, I.S., *Organic Chemicals from Biomass*, CRC Press, Florida, USA, 1981, s. 18–43.
13. Phill, S., Nguyen, M.T. ja Sim, S.J., Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production, *Biores. Technol.*, 10(2010)5330–5336.
14. Erickson, L.E., Fung, D.Y.C. ja Tuitemwong, P., Anaerobic Fermentations. Kirjassa: Rehm, H.-J, Reed, G., Pühler, A. ja Stadler, P. (toim.), *Biotechnology: a Multi-Volume Comprehensive Treatise – Bioprocessing*, 2. painos, VCH, Weinheim, Saksa, 1993, s. 295–318.

15. Jin, F., Zhou, Z., Moriya, T., Kishida, H., Higashijima H. ja Enomoto, H., Controlling hydrothermal reaction pathways to improve acetic acid production from carbohydrate biomass, *Environ. Sci. Technol.*, 39(2005)1893–1902.
16. Ravinder, T., Ramesh, B., Seenayya, G. ja Reddy, G., Fermentative production of acetic acid from various pure and natural cellulosic materials by *Clostridium lentocellum* SG6, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 16(2000)507–512.
17. Detroy, R.W. ja St. Julian, G., Biomass conversion: fermentation chemicals and fuels, *Crit. Rev. Microbiol.*, 10(1983)203–228.
18. U.S. Department of Energy, Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume 1 – Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis gas, <http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>, (luettu 26.10.2010).
19. Wang, Z.-X., Zhuge, J., Fang, H. ja Prior, B.A., Glycerol production by microbial fermentation: A review, *Biotechnol. Advances*, 19(2001)201–223.
20. Xiaobo, X., Jianping, L. ja Peilin, C., Advances in the Research and Development of Acrylic Acid Production from Biomass, *Chinese J. Chem. Eng.*, 14(2006)419–427.
21. Corma, A., Iborra, S. ja Velty, A., Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals, *Chem. Rev.*, 107(2007)2411–2502.
22. John, R.P. ja Nampoothiri, K.M., Fermentative Production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74(2007)524–534.
23. Tay, A. ja Yang, S.-T., Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 80(2002)1–12.
24. Anon., OVA-ohje: Asetoni, <http://www.ttl.fi/ova/asetoni.html#ots1/>, (luettu 26.10.2010).
25. Ezeji, T.C., Qureshi, N. ja Blaschek, H.P., Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors, *Current Opinion in Biotechnol.*, 18(2007)220–227.
26. Qureshi, N. ja Ezeji, T.C., Butanol, ‘a superior biofuel’ production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology, *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 2(2008)319–330.
27. Anon., OVA-ohje: 1-Butanoli, <http://www.ttl.fi/ova/1-butanoli.html#ots1>, (luettu 26.10.2010).
28. Claassen, P.A.M., Budde, M.A.W. ja López-Contreras, A.M., Acetone, butanol and ethanol production from domestic organic waste by solventogenic Clostridia, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2(2000)39–44.

29. Song, H. ja Lee, S.Y., Production of succinic acid by bacterial fermentation, *Enzyme Microb. Technol.*, 39(2006)352–361.
30. Bechthold, I., Bretz, K., Kabasci, S., Kopitzky, R. ja Springer A., Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources, *Chem. Eng. Technol.*, 31(2008)647–654.
31. Zheng, P., Dong, J.-J., Sun, Z.-H., Ni, Y. ja Fang, L., Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*, *Biores. Technol.*, 100(2009)2425-2429.
32. Lennartsson, A., Production of Succinic Acid by *E. coli* from Mixtures of Glucose and Fructose, Pro gradu –tutkielma, Luleå University of Technology, Department of Chemical Engineering and Geosciences, Division of Biochemical and Chemical Engineering, 2005.
33. Reddy, C.S.K. ja Singh, R.P., Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR10, *Biores. Technol.*, 85(2002)69–71.
34. Tabuchi, T., Sugisawa, T., Ishidori, T., Nakahara, T. ja Sugiyama, J., Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *Candida*, *Agric. Biol. Chem.*, 45(1981)475–479.
35. Wilke, T. ja Vorlop, K.-D., Biotechnological production of itaconic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56(2001)289–295.
36. Max, B., Salgado, J.M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A. ja Domínguez, J.M., Biotechnological production of citric acid, *Brazilian J. Microbiol.*, 41(2010)862–875.
37. Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R., Pandey, A. ja Lebeault, J.-M., Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*, *Biores. Technol.*, 74(2000)175–178.
38. Nagasawa, T. ja Yamada, H., Microbial production of commodity chemicals, *Pure & Appl. Chem.*, 67(1995)1241–1256.
39. Kumar, D., Jain, V.K., Shanker, G. ja Srivastava, A., Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse, *Process Biochem.*, 38(2003)1731-1738.
40. Yigitoglu, M., Production of citric acid by fungi, *J. Islamic Academy of Sciences*, 5(1992)100–106.