

**Suomen Kromatografiaseuran,
Åbo Akademin ja Nesteen
Syysseminaari 2015**

**“Biomassan jalostus ja analytiikka –
haasteet ja tulevaisuuden näkymät”**

12-13.11.2015

Naantalin kylpylä, Naantali

NESTE



Johan Gadolin
Process Chemistry Centre

SISÄLLYSLUETTELO

OHJELMA	4
PLENARY LUENNOT	6
Evolution of analytical techniques for extractives.....	6
Cellulose aging and yellowing - analysis and structure of chromophores and molecular mechanisms of their formation	7
SPONSORIESITYKSET	8
Multidimensional chromatography Ion Mobility Quadrupole Time-of Flight Mass Spectrometry – reveal greater details by maximizing peak capacity.....	8
Käytännön vinkkejä ionikromatografialaitteen käyttäjille	9
Biopoltto- ja bioraaka-aineiden valmistuksessa käytettävien hiivapohjaisten entsyymien analysointi LC-MS/MS-menetelmällä	9
Target- or non-target analysis where are we today?.....	9
Modern technology and innovation in ion chromatography and discrete analyzers	10
APC (Advanced Polymer Chromatography) - uusi tekniikka GPC/SEC- analytiikkaan	10
KUTSUTUT PUHUJAT	11
Understanding starch structure by using enzymatic hydrolysis combined with gel-permeation and anion-exchange chromatography.....	11
Kasvitanniinien LC-MS/MS-analysointi	12
Hemiselluloosien erotus ja epäpuhtauksien analytiikka	13
Mikrolevien lipidit: koostumus ja käyttö eri sovelluksissa	14
Polysakkaridien erotus ja karakterisointi kokoeksklusiokromatografialla (SEC) ja kenttävirtausfraktioinnilla (FFF).....	15
Biomassan kaasutuskaasun pääkomponenttien ja epäpuhtauksien analyysit ...	16
Ligniinianalytiikka ja sen haasteet.....	17
Uudet nestekromatografia- ja massaspektrometriapohjaiset menetelmät uusiutuvan dieselin raaka-aineiden analytiikassa	18
Integrated enzymatic, chromatographic, and mass spectrometric approaches unravel the molecular structure of chemically modified plant polysaccharides ..	19
POSTERIESITYKSET	20
Differentiation between the bio and fossil component in hydrogenated vegetable oil using direct liquid scintillation counting method.....	20
Näytteenkäsittelyn ja analyysin kehittäminen etanoliorganosolv-ligniinin katalyyttiseen depolymerointiin	21
Chemical fingerprinting of fast and slow pyrolysis oils with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry	22

Liquid phase furfural hydrotreatment to fuel component 2-methylfuran over 10% Ni/C catalyst.....	23
Study of a novel type of pressurized hot-water extracted lignin	25
Biomassanjalostus ja analytiikka	26
Isolation and activity of anabaenopeptins produced by Baltic Sea cyanobacteria	27
Endophytic fungi from Scots pine roots contain new compounds with potential pharmacological interest	28
Determination of short chain carboxylic acids in vegetable oils and fats using Ion Exclusion Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry	29
SEMINAARIN SPONSORIT	30

OHJELMA

Torstai 12.11

9.00-10.00 Ilmoittautuminen ja kahvi (jatkuu koko päivän/perjantaina tarvittaessa)

Session puheenjohtaja: Jussi Meriluoto (ÅA)

10.00-10.30 Avaus, sekä järjestäjien (ÅA, Neste, Kromatografiaseura) lyhyet esittelyt

10.30-11.00 Dosentti Eric Bertoft (ÅA), "Understanding starch structure by using enzymatic hydrolysis combined with gel-permeation and anion-exchange chromatography"

11.00-11.30 Dosentti Chunlin Xu (ÅA), "Integrated enzymatic, chromatographic, and mass spectrometric approaches unravel the molecular structure of chemically-modified plant polysaccharides"

11.30-12.00 Dr. Leena Pitkänen (HY), "Polysakkaridien erotus ja karakterisointi kokoekskluusiokromatografialla (SEC) ja kenttävirtausfraktioidinnilla (FFF)"

12.00-13.30 Lounas

Session puheenjohtaja: Stefan Willför (ÅA)

13.30-14.15 **Plenary luento, Prof. Thomas Rosenau (BOKU, Itävalta), "Cellulose aging and yellowing - analysis and structure of chromophores and molecular mechanisms of their formation"**

14.15-14.45 FL Jyrki Viidanoja (Neste Oil), "Uudet nestekromatografia- ja massaspektrometriapohjaiset menetelmät uusiutuvan dieselin raaka-aineiden analytiikassa"

14.45-15.30 Posterisitykset

15.30-16.00 Kahvitauko

16:00-16:15 Agilent Technologies Finland, "Multidimensional chromatography Ion Mobility Quadrupole Time-of Flight Mass Spectrometry – reveal greater details by maximizing peak capacity"

16:15-16:30 Ordior, "Biopoltto- ja bioraaka-aineiden valmistuksessa käytettävien hiivapohjaisten entsyymien analysointi LC-MS/MS-menetelmällä"

16:30-16:45 Metrohm Nordic, "Käytännön vinkkejä ionikromatografialaitteen käyttäjille"

16.45-17.45 Posterisessio ja viinitarjoilu

17.45- Kromatografiaseura ry:n syyskokous

17.45-20.00 Kylpylä/vapaa aikaa

20.00- Illallinen

Perjantai 13.11

Session puheenjohtaja: Leif Kronberg (ÅA)

- 9.00-9.10 **Åbo Akademin tervehdys, Luonnontieteiden ja tekniikan tiedekunnan dekaani Tapio Salmi**
- 9.10-9.40 Dosentti Anna-Maija Lampi (HY), "Mikrolevien lipidit: koostumus ja käyttö eri sovelluksissa"
- 9.40-10.10 Dr. Matti Reinikainen (VTT), "Biomassan kaasutuskaasun pääkomponenttien ja epäpuhtauksien analyysit"
- 10.10-10.25 Tauko
- 10.25-11.10 **Plenary luento, Prof. Emeritus Bjarne Holmbom, "GC (uuteaine)analytiikan evoluutio", ruotsiksi**
- 11.10-11.40 Kahvitauko
- 11.40-12.10 Dosentti Tarja Tamminen (VTT), "Ligniinianalytiikka ja sen haasteet"
- 12.10-12.40 Dr. Risto Korpinen (Luonnonvarakeskus), "Hemiselluloosien erotus ja epäpuhtauksien analytiikka"
- 12.40-13.40 Lounas

Session puheenjohtaja: Stefan Willför (ÅA)

- 13.40-14.10 Dr. Maarit Karonen (TY), "Kasvitanniinien LC-MS/MS-analysointi"
- 14:10-14:25 Waters Finland, "APC (Advanced Polymer Chromatography) - uusi tekniikka GPC/SEC-analytiikkaan"
- 14:25-14:40 Thermo Scientific, "Modern technology and innovation in ion chromatography and discrete analyzers"
- 14:40-14:55 PerkinElmer Finland Oy, "Target- or non-target analysis where are we today?"
- 14.55- Päätössanat ja kahvia

PLENARY LUENNOT

Evolution of analytical techniques for extractives

Prof.em. Bjarne Holmbom
Åbo Akademi
bjarne.holmbom@abo.fi

Extractives are components in biomass that are non-structural, i.e. are not contributing to the physical structure of the cell walls. In a broad definition they include all other components than polysaccharides, lignin, proteins and part of the tannins. Extractives play a key role in the life of plants, including trees. Technical recovery and utilization of extractives has been practiced through the ages, and still today provides great opportunities for high-value biomass refining.

Extractives mainly comprise a myriad of compounds, most of them with low molar mass. The first step in the analysis of extractives is extraction with appropriate solvents. Consecutive extraction with a non-polar solvent followed by a polar solvent gives separate fractions of lipids and waxes, and more polar phenolic extractives, respectively. Further fractionation of extracts can be made by TLC or column chromatography, if needed. High resolution chromatography, such as GC with capillary columns, revolutionized the analysis of extractives in the early 1970's, in particular by the combination with MS enabling convenient identification of the components.

GC-MS automation and data handling has developed dramatically since that time. Group analysis of lipophilic extractives has become possible with short-column GC or by HPLC-SEC. High-pressure extraction techniques such as the ASE has facilitated the extraction and fractionation. Solid-phase micro-extraction (SPME) introduced in the 1990's is a convenient technique especially for extraction and concentration of components from gas phase. HPLC in combination with MS has developed much during the last decade and is especially suited for selective analysis of extractives and their metabolites in biological matrices. XPS and ToF-SIMS enables surface-specific analysis and surface mapping of extractives.

Accurate, reliable quantitative analysis of extractives demands calibrations with appropriate reference compound mixtures. There is also still a need to develop less laborious automated analytical procedures. Complete extraction from wood or pulps is also still a challenge in some cases.

Cellulose aging and yellowing - analysis and structure of chromophores and molecular mechanisms of their formation

Prof. Thomas Rosenau
BOKU University Vienna, Christian-Doppler-Laboratory "Advanced Cellulose Chemistry and Analytics", Muthgasse 18, A – 1190 Vienna, AUSTRIA
thomas.rosenau@boku.ac.at

The CRI ("chromophore release and identification") procedure has been developed as the first generally applicable method for isolation and identification of residual chromophores in/on cellulosic materials, which are responsible for brightness losses ("yellowing"), being the most evident aging effect of cellulosic materials. Difficulties in isolation and exact structural characterization of the chromophores have so far mainly been caused by the extremely low concentrations of these colored compounds, which are in the ppm-ppb range. The CRI-technique has been successfully applied to native celluloses (cellulose I allomorph: pulps, cotton, bacterial cellulose), regenerated cellulose products (cellulose II allomorph: fibers such as Lyocell or rayon, mercerized cellulose), and cellulose derivatives (carboxymethyl cellulose, cellulose triacetate, cellulose 2.5 acetate), providing well-defined chromophoric structures in all cases.

Chromophores in bleached pulps are either primary or secondary chromophores. The structures of the former are largely comparable independent of the respective cellulosic product since they are made up of carbohydrates and their degradation/oxidation products under different degradation / recondensation conditions. The three key chromophore classes – and thus the main sources of color – are hydroxy-[1,4]benzoquinones, hydroxy-[1,4]naphthoquinones, and 2-hydroxyacetophenones. These compounds are much more resistant towards conventional bleaching than other (mostly quinoid) chromophores due to their exceptionally strong resonance stabilization, so that they are consistently found as the residual chromophores "surviving" bleaching. Secondary chromophores involve process chemicals in their formation: for instance N-heterocycles found in Lyocell material or thiophenols in viscose (rayon). Based on the knowledge of the exact chromophore structure of the residual / remaining chromophores it was possible to optimize bleaching sequences and to target even higher brightness and brightness stability.

In the first part, the chromophore isolation approach (CRI method) and the structures of the chromophores isolated from different cellulosic materials will be briefly recalled. In the second part, in-depth mechanistic studies on chromophore formation and formation pathways are presented, e.g. with regard to the roles of polysaccharidic carbonyls and carboxyls in chromophore formation. While carbonyls are strongly chromogenic, carboxyls are not chromogenic themselves, but promote the formation of chromophores from carbonyl-containing precursors. Already a single "oxidized spot" – one carbonyl in an anhydroglucose unit (AGU) – is sufficient to generate exactly the chromophores found in the pulps. The whole formation pathway from this oxidized AGU to the final chromophore can now be proven by complete analytical data including X-ray structures. Isotopic labeling studies (¹³C) in combination with NMR techniques confirmed that such oxidized moieties are degraded into reactive C2- and C3-units, which upon re-condensation form the chromophores. A third part addresses chromophore formation from hexenuronic acids (HexA).

The molecular mechanisms of cellulose/pulp aging are discussed, highlighting also means to reduce or prevent such processes from the beginning, and ways to counteract them (bleaching).

SPONSORSHIP



Multidimensional chromatography Ion Mobility Quadrupole Time-of Flight Mass Spectrometry – reveal greater details by maximizing peak capacity

Peter Abrahamsson¹ George Stafford², Jens Trafkowski³

¹Agilent Technologies, Life Science and Chemical Analysis, Sweden

²Agilent Technologies R&D, Santa Clara, US

³Agilent Technologies R&D, Waldbronn, Germany

E-mail: peter.abrahamsson@agilent.com

Introduction

We have probably all heard someone say that because the number of labs with high resolution mass spectrometry (HRMS) is increasing, less and less chromatography will be required ahead of detection. For the non-chromatographers out there, that might even sound quite tempting. However, in reality, it's a statement that does not really make much sense: if all components of a sample are injected into the ion source at the same time and if a large percentage of those compounds are ionized, then – in a complex sample like Chinese herbs – several thousands of radical cations will be formed. In an atmospheric-pressure ion source, such as ESI or APCI, all of these resulting radical cations can react or interact, each encountering approximately 20,000 collisions from the point of ionization to the entrance of the MS. The result is potential ion suppression and/or formation of artefacts. The solution – also for HRMS - is to put effort into the separation and maximizing the total peak capacity. By combining multidimensional chromatography with ion mobility the peak capacity can be increased by a factor of 3 or more [1]. In addition the ion mobility will be able to separate true isomers and clean up the mass spectra for increased confidence in identification [3]. In this presentation the combination of multidimensional chromatography, ion mobility quadrupole time-of-flight mass spectrometry will be presented.

Materials and methods

Various samples and matrices have been injected in an Agilent 1290 Infinity LCxLC and detected utilizing an Agilent 6560 IM-QToF. Data has been acquired and processed using Agilent MassHunter software (acquisition, qualitative and quantitative analysis) and multivariate analysis has been performed using Agilent Mass Profiler Professional.

Results

The most important findings will be discussed in the presentations.

References

1. Li, D., Schmitz, O.J., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013), 6511-6517.
2. Dwivedi, P., Schultz, A.J., Hill Jr., H.H., *Int. J. Mass Spectrom.* 298 (2010), 78-90.
3. Laphorn, C., Pullen, F., Chowdhry, B.Z., *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013), 43-71.



Käytännön vinkkejä ionikromatografialaitteen käyttäjille

Metrohm

Mitä asioita on hyvä ottaa huomioon, jotta ionikromatografialaitteesi toimii luotettavasti. Miten toimia silloin, jos mitään asioita ei ottanutkaan huomioon?

ORDIOR

Biopoltto- ja bioraaka-aineiden valmistuksessa käytettävien hiivapohjaisten entsyymien analysointi LC-MS/MS-menetelmällä

Ordior

Biopolttoaineiden ja bioraaka-aineiden tuotannon/saannon tehostaminen on mahdollista muokkaamalla käytettävää hiivakantaa vastaamaan käyttötarkoitusta. Hiivan geneettinen rakenne määrittää sen toimintaa, ja muokkaamalla geenien ekspressiota voidaan jalostaa kanta, joka soveltuu kulloinkin kyseessä olevaan prosessiin. Hiivan metabolian avulla saadaan prosessista haluttuja tuotteita, ja tutkimalla & muokkaamalla erilaisten hiivojen metabolista aktiivisuutta (entsyymejä) saadaan prosessia tehostettua. Kohdennettu proteomiikka, jossa kvantitoidaan trypsiinidigestoituja peptidejä LC-QqQ-MS-menetelmällä, on osoittautunut sopivaksi tekniikaksi määrittää entsyymitasoja (hiiva-)soluista. Tärkeitä aineenvaihduntareittejä soluille ovat anaerobisen energian saamiseksi glykolyysi, aerobinen TCA-kierto, sokeriaineenvaihdunnallinen pentoosi-fosfaattikierto ja proteiinisynteesiin liittyvät aminohapot. Näiden aineenvaihduntareittien entsyymien (yli 200) trypsiinidigestoidut peptidit (n. 500) voidaan kvantitoida MRM-menetelmää käyttäen (n. 3500 MRM-siirtymää) nestekromatografialla liitettynä nopeaan kolmoiskvadrupolimassaspektrometriin.



Target- or non-target analysis where are we today?

Jan Nordin
PerkinElmer, Nordic

For more than an decade there has been a lot of focus on LC and UPLC often in combination with MS and mainly with ESI ionization. A lot of attention has also been focused to Mass Accuracy but still GC/MS with EI is one of the most used techniques for analysis of unknown compounds mainly because of available commercial libraries. But how could we handle known and unknown compounds today. A short description of this world from our perspective will be described.



Modern technology and innovation in ion chromatography and discrete analyzers

Jan Stehlin
Thermo Fisher Scientific

In this presentation we will highlight recent innovations in both automated chromatographic and spectrometric ion analysis. Miniaturization in Ion Chromatography, known as Capillary IC, Reagent Free Ion Chromatography, and advances in column selectivity will be discussed, as well as alternative strategies using automated photometric ion analysis, as realized in our Discrete Analyzers. The different user relevant topics will be highlighted describing selected applications from various analytical market segments.



APC (Advanced Polymer Chromatography) - uusi tekniikka GPC/SEC-analytiikkaan

Liisa Kanner
Key Account Manager, Waters Finland

Perinteisten GPC/SEC-tekniikoiden ongelmia ovat huono resoluutio sekä pitkät analyysiajat ja tästä johtuva liuottimien runsas kulutus. APC (Advanced Polymer Chromatography) on teknologia, joka perustuu pienipartikkelisiin kolonneihin sekä niihin sopivaan kromatografialaitteistoon.

Tällä tekniikalla saadaan analyysiaika lyhennettyä murto-osaan verrattuna perinteiseen GPC/SEC-tekniikkaan. Resoluutio paranee pienempien partikkelien ansiosta ja näin analyysistä saatava informaatio on huomattavasti kattavampaa. APC-tekniikka auttaa myös kestäväen kehityksen tavoitteiden saavuttamisessa vähäisemmän liuotinkulutuksen ansiosta.

KUTSUTUT PUHUJAT

Understanding starch structure by using enzymatic hydrolysis combined with gel-permeation and anion-exchange chromatography

Eric Bertoft
Åbo Akademi University
eric.bertoft@abo.fi

Starch is the major reserve carbohydrate source in plants and is used in diverse applications, e.g. food, paper manufacture and biodegradable plastics. It is produced as semi-crystalline granules in diverse tissues, such as the endosperm of seeds, in roots, tubers and rhizomes. The granules consist almost entirely of the two polyglucans amylose and amylopectin, of which the latter is the major, extensively branched component. Despite its basically very simple chemical composition of α -(1,4)-linked glucose residues combined into comparatively short chains connected through α -(1,6)-linkages, the structure of amylopectin remains a subject of debate. The challenge in the structural research is to understand how the chains are combined into the final macromolecule and how they contribute to the discrete amorphous and crystalline structures found inside the starch granule. Among the most important tools that are available to study starch structure are enzymes that specifically attacks different parts of the amylopectin molecule. Among these, certain types of endo-acting α -amylases have been used to isolate clusters of chains from the macromolecule. The smallest branched units are, however, building blocks that have been isolated from the clusters. These units can be further analyzed for their composition of chains by hydrolysis with so-called debranching enzymes that specifically attacks the (1,6)-linkages. The products of the diverse hydrolytic enzymes can be analyzed in great detail by gel-permeation chromatography (GPC), or alternatively size-exclusion chromatography (SEC), and high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC). An advantage of using traditional GPC is that the small, branched building blocks can be isolated quantitatively into diverse size-groups for further investigations of their structural details. GPC have also been used for separation of amylopectin and amylose and the fractions can e.g. be analyzed for their iodine-staining properties. The results obtained so far suggest a modified model of the amylopectin structure known as the building block backbone model, as opposed to the traditional tree-like cluster model.

Kasvitanniinien LC-MS/MS-analysointi

Maarit Karonen

Luonnonyhdistekemian tutkimusryhmä, Orgaanisen kemian ja kemiallisen biologian laboratorio,
Turun yliopisto
maarit.karonen@utu.fi

Kasvien tanniinit ovat polyfenolisia yhdisteitä, jotka voidaan jakaa kolmeen pääryhmään: hydrolysoituvat tanniinit, proantosyanidiinit (syn. kondensoituneet tanniinit) ja florotanniinit. Kasvitanniineilla on useita erilaisia bioaktiivisuuksia; ne toimivat muun muassa kasvien puolustusyhdisteinä ja omaavat erilaisia terveyttä edistäviä vaikutuksia. Tanniinien rakenteet voivat olla hyvin kompleksisia, mikä tuo omat haasteensa niiden analytiikkaan. Erityisesti oligo- ja polymeeristen proantosyanidiinien kromatografinen erottaminen on vaikeaa. Nestekromatografia soveltuu kuitenkin hyvin tanniinianalyysiin. Jopa LC-DAD-menetelmällä voidaan luotettavasti analysoida tanniinit, jos ne ovat pääyhdisteitä näytteessä ja niiden erottuminen toisistaan on riittävää. Tyypillisimmin käytetään käänteisfaasikromatografiaa ja fenyylipiloneja. Hydrofiiliseen vuorovaikutukseen perustuva kromatografia soveltuu erityisesti oligo- ja polymeerisille proantosyanidiineille. Mikäli tanniinit eivät ole pääyhdisteitä tai ne eluoituvat yhdessä muiden yhdisteiden kanssa, analyysien spesifisyyttä voidaan parantaa massaspektrometrian avulla. Ionisaatiotekniikkana on useimmiten negatiivinen sähkösumutusionisaatio, jolloin tanniinit muodostavat useasti varautuneita ioneja, varsinkin molekyylipainon kasvaessa. Tanniinit voidaan luotettavasti tunnistaa käyttämällä korkean resoluution massaspektrometriaa, esimerkiksi kvadrupoli-lentoaika-analysointia. Yleensä jo yhdisteiden UV-, MS- ja MS/MS-spektrit sekä retentiojärjestys riittävät niiden karakterisointiin. Uusien yhdisteiden rakenne on toki varmennettava NMR- ja CD-spektroskopian avulla. Kvantitatiiviseen analyysiin soveltuu parhaiten kolmoiskvadrupoli ja useamman reaktion seuraamiseen perustuva menetelmä (MRM, multiple reaction monitoring). Tällöin tanniinit voidaan kvantitoida riittävällä herkkyydellä ja spesifisyydellä. Käytetty menetelmä voi olla yhdistelmä- tai ryhmäspesifinen. Nykyaikaiset UHPLC-menetelmät mahdollistavat jopa 200–300 fenolisen yhdisteen analysoimisen alle 10 minuutissa. Aina ei kuitenkaan ole mahdollista määrittää näytteen yksityiskohtaista tanniinikoostumusta. Tällöin moderneilla menetelmillä voidaan määrittää näytteistä niin sanottu tanniinisormenjälki, jonka avulla näytteitä voidaan luokitella ja selvittää, mikä osa sormenjäljestä vaikuttaa kuhunkin havaittuun bioaktiivisuuteen.

Hemiselluloosien erotus ja epäpuhtauksien analytiikka

TkT Risto Korpinen
Luonnonvarakeskus
risto.korpinen@luke.fi

Puubiomassan kolme makromolekyylistä pääkomponenttia ovat selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini. Näistä kolmesta vain selluloosaa on hyödynnetty teollisessa mittakaavassa esimerkiksi sulfaattiselluloosan valmistuksessa. Paineistettu kuumavesiuutto on luontoa säästävä erotusmenetelmä, jolla voidaan uutaa biomassasta hemiselluloosaa. Uutossa puubiomassaa käsitellään korkeassa lämpötilassa ja paineessa. Käytetty liuotin on puhdas vesi. Tällä menetelmällä puuaineksen sisältämä hemiselluloosa saadaan erotetuksi monosokereina tai polymeereinä. Riippuen prosessiparametreista myös muita aineita erottuu uutteeseen. Näitä ovat puubiomassan sisältämät epäorgaaniset yhdisteet, uuteaineet, ligniinifragmentit, pektiini, tärkkelys ja erilaiset hapot. Lisäksi monosokerit voivat reagoida edelleen esim. furfuraaliksi tai hydroksimetyylifurfuraaliksi (HMF). Kromatografisin menetelmin, esim. kaasukromatografi yhdistettynä liekki-ionisaatiodetektoriin, pystytään määrittämään hemiselluloosauutteen mono-, oligo- ja polysakkaridipitoisuudet. Uuteaineet ja ligniinifragmentit voidaan määrittää metyyli-tert-butyylieetteri (MTBE) uutteesta käyttäen kaasukromatografia ja massaspektrometriä. Hapot, furfuraali ja HMF voidaan määrittää nestekromatografian ja diodirividetektorin yhdistelmällä. Epäorgaaniset yhdisteet voidaan määrittää ionikromatografilla ja sopivalla detektorilla.

Mikrolevien lipidit: koostumus ja käyttö eri sovelluksissa

Dos. Anna-Maija Lampi
Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Helsingin yliopisto
anna-maija.lampi@helsinki.fi

Mikrolevien käyttöä uusiutuvana biomassana on tutkittu runsaasti viime vuosina moniin eri tarkoituksiin kuten soveltuvuutta bioenergiaksi ja kemianteollisuuden raaka-aineeksi. Rehu- ja elintarvikesektorit ovat kiinnostuneita mikrolevistä lähinnä niiden suuren proteiinipitoisuuden ja energia-arvon takia. Mikrolevien hyödyntämistä voisi kuitenkin tehostaa eristämällä näistä arvokkaita komponentteja kuten vitamiineja ja lipidejä tai käyttämällä sellaisten mikrolevälajien biomassaa, jotka sisältävät näitä arvokkaita komponentteja poikkeuksellisen runsaasti.

Mikrolevillä voi tuottaa myös erilaisia lipidejä: lähinnä triasyyliglyseroleista (TAG) koostuvaa öljyä, monitydyttymättömiä rasvahappoja (PUFA), poolisia lipidejä kuten fosfolipidejä (PL) sekä keltapunaisia karotenoideja (Car), steroleja (Ste) ja rasvaliukoisia vitamiineja kuten tokoferoleja (Toc). Eri lipidiluokilla on erilaiset toiminnalliset ominaisuudet, minkä takia on tärkeää tuntea eristettävän lipidimassa kemiallinen koostumus, jotta tuotetta voitaisiin hyödyntää tarkoituksenmukaisesti. Yksi arvokas lipidiluokka on n-3-sarjan PUFA:t, joille on runsaasti tarvetta erityisesti kalankasvatuksessa sekä myös muussa rehukäytössä ja ravintolisävalmisteissa. Helsingin yliopiston Lahden ja Helsingin toimipisteiden, VTT:n, intialaistutkimuslaitoksen ja yrityskumppaneiden kanssa toteutettavassa Tekesin rahoittamassa ALGOMEG-hankkeessa tutkitaan mahdollisuuksia hyödyntää mikrolevien tuottamia n-3-sarjan PUFA:ia ja Car:ja. Tässä esityksessä käyn läpi menetelmiä, joilla on tutkittu mikrolevien lipidikoostumuksia ja joita tässä hankkeessa on käytetty.

Mikrolevien lipidien uuttoon on käytetty useita tekniikoita. Tässä työssä sovellettiin tekniikkaa, jossa liuotinuuttoa tehostettiin suurella paineella, ns. Accelerated Solvent Extraction (ASE) -laitteistolla. Uutto oli tehokasta, toistettavaa eikä se aiheuttanut herkästi tuhoutuvien lipidien hävikkejä. ASE:lla on mahdollista uuttaa näytteistä lipidejä fraktioivasti uuttoluottimia ja -olosuhteita vaihtaen, esim. haluttaessa eristää ensin öljymäiset neutraalit lipidit ja myöhemmin amfifiiliset kompleksilipidit.

Hankkeen kannalta keskeisimmät määritykset ovat uutteen rasvahappo- ja Car-koostumukset. Rasvahappokoostumukset määritetään perinteisesti kaasukromatografisesti liekki-ionisaatiodetektorilla (GC-FID) ja yhdisteiden tunnistuksessa käytetään myös massaspektrometriaa (MS). Car-koostumukset määritetään nestekromatografisesti eri detektorein. Mikäli lipidit olisi tarkoitus hyödyntää eristettävällä öljyllä, lipidien tulisi olla lähinnä TAG:eina. Toisaalta mikrolevien PL:ä voisi hyödyntää emulgaattoreina. Näin ollen uutteen olisikin hyvä määrittää myös lipidiluokakoostumukset, jonka voi tehdä esim. ohutkerroskromatografisesti (TLC) ja nestekromatografisesti esim. valonsirontadetektorilla (HPLC-ELSD). Yksittäisistä lipidiluokista kiinnostavia ovat myös Ste:t ja Toc:t, joiden koostumukset voidaan määrittää GC-FID/MS:lla ja HPLC:lla.

Mikrolevien lipidikoostumusten määrittämisessä voidaan käyttää perinteisiä lipidien tutkimusmenetelmiä, joista valitaan ne, jotka soveltuvat herkästi tuhoutuvien lipidien tutkimiseen. Mielenkiintoiseksi mikrolevien tutkimisen tekee se, millaisia määrityksiä erilaisten tuotesovellusten tueksi on tarpeen tehdä.

Polysakkaridien erotus ja karakterisointi kokoeksklusiokromatografialla (SEC) ja kenttävirtausfraktioinnilla (FFF)

Dos. Leena Pitkänen
Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos, Helsingin yliopisto
leena.m.pitkanen@helsinki.fi

Moolimassajakauma on yksi tärkeimmistä (bio)polymeerien ominaisuuksiin vaikuttavista tekijöistä. Tietoa moolimassajakaumasta saadaan erotusmenetelmien kuten kokoeksklusiokromatografian (SEC) tai kenttävirtausfraktioinnin (FFF) avulla. Analyyseissä käytetyistä detektoreista riippuen SEC ja FFF analyyseistä voidaan saada myös tietoa molekyylien koosta ja muodosta. Kun laitteistoon on liitetty staattinen valonsirontadetektor ja konsentraatiodetektor (esim. taitekerroindetektor), voidaan polymeerin moolimassa ja molekyylikoko määrittää jokaiselle eluoituvalle fraktiolla ”absoluuttisesti” ilman kalibrointiyhdisteitä. Biomassasta eristettyjen polysakkaridien moolimassa- ja kokojakauman analysoiminen on kuitenkin haastavampaa kuin synteettisten polymeerien. Näytteen puhtaus, huono liukoisuus, aggregoituminen ja mahdollinen adsorptio kolonniin (SEC) tai membraaniin (FFF) hankaloittavat polysakkaridianalysejä. Tässä esityksessä käydään läpi SEC ja FFF tekniikoiden perusteita sekä pohdiskellaan niiden etuja ja haasteita polysakkaridianalytiikassa.

Biomassan kaasutuskaasun pääkomponenttien ja epäpuhtauksien analyysit

TkT Matti Reinikainen
Teknologian Tutkimuskeskus VTT Oy
matti.reinikainen@vtt.fi

Biomassan kaasutuskaasu on erittäin monipuolinen lähtöaine energian, nestemäisten polttoaineiden ja kemikaalien tuotannossa. Haluttujen komponenttien lisäksi kaasutuskaasussa on mukana aina myös monia sivutuotteita ja epäpuhtauksia, joiden pitoisuustasot vaihtelevat suuresti. Kattava kaasuanalytiikka onkin haastava tehtävä, joka on sovitettava kunkin sovelluksen vaatimusten mukaisesti.

Kaasutuskaasun pääkomponentit ovat vety, hiilimonoksidi, hiilidioksidi, vesi ja ilmakaasutuksen tapauksessa typpi. Erityisen tyypillisiä epäpuhtauksia biomassan kaasutuskaasulle ovat tervat. Tervat ovat aromaattisia bentseeniä raskaampia hiilivetyjä ja fenolisia yhdisteitä, jotka ovat peräisin biomassan ligniinistä. Biomassa kaasutetaan tyypillisesti leijukerrostekniikalla melko matalassa lämpötilassa, jolloin tervojen terminen hajoaminen on epätäydellistä. Lisäksi kaasu sisältää aina rikkiyhdisteitä (H_2S , COS, orgaaniset rikkiyhdisteet), tyypiyhdisteitä (NH_3 , HCN), klooria (HCl) ja raskasmetalleja.

Kaasun puhtausvaatimukset vaihtelevat suuresti kaasun käyttötarkoituksen mukaan. Laatuvaatimukset kiristyvät merkittävästi siirryttäessä kattilasovelluksista kaasumoottoreihin ja erityisesti nestemäisten polttoaineiden ja kemikaalien raaka-aineen tuottamiseen. Kaasutuskaasusta voidaan tehokkaan puhdistusprosessin avulla valmistaa synteetikaasua, jota käytetään raaka-aineena mm. metanolin ja Fischer-Tropsch -hiilivetyjen (diesel, bensiini) valmistuksessa. Synteeseissä käytettävät katalyytit ovat tyypillisesti siirtymämetallikatalyyttejä, jotka myrkyttävät herkästi pienistäkin epäpuhtausmääristä. Kaasuanalytiikan on siten ääritapauksessa pystyttävä kattamaan erittäin laaja konsentraatioalue pääkomponenttien kymmenistä prosenteista aina katalyyttimyrkkyjen ppb-tasolle saakka.

Esityksessä käydään läpi sekä pääkomponenttien että epäpuhtauksien määrittämisessä käytettäviä kromatografisia menetelmiä. Perinteisesti määrittäminen on tehty off-line -tekniikoilla, mutta viime aikoina käyttöön on otettu enenevästi myös on-line -menetelmiä, joilla analyysin nopeus ja luotettavuus ovat merkittävästi aiempaa parempia. Laimentavan näytteenoton käyttö on mahdollistanut myös likaisten kaasujen on-line-analytiikan.

Tyypillisiä analyysimenetelmiä kaasutuskaasulle ovat mikrokaasukromatografia ja kaasukromatografia eri detektoreilla (FID, TCD, PID, PD-HID). Myös muita käytössä olevia menetelmiä esitellään lyhyesti.

Ligniiniaanalytiikka ja sen haasteet

Tarja Tamminen
VTT
tarja.tamminen@vtt.fi

Ligniini on yksi kasvien pääkomponenteista. Biomassan käsittelyprosesseissa ligniini erottuu usein sivutuotefraktiona, joka on potentiaalinen biopohjaisten materiaalien ja kemikaalien raaka-aine. Ligniinisivuvirroilla on kuitenkin myös huomattava energiasisältö, minkä vuoksi uusien ligniinipohjaisten sovellusten pitää olla arvoltaan korkeampia kuin niiden käyttö prosessin energialähteenä. Tällä hetkellä on käynnissä paljon tutkimusta taloudellisesti kannattavien prosessien kehittämiseksi.

Merkittäviä ligniinisivuvirtoja syntyy etenkin sellunkeiton sivutuotteena (mustalipeä ja siitä mahdollisesti erotettu ligniini) ja kasvavassa määrin toisen sukupolven biojalostamoissa, joissa hyödynnetään lignoselluloosatyyppisiä biomassoja sokerin ja siitä edelleen jalostettavien tuotteiden raaka-aineena. Käytettävät raaka-aineet voivat puun ohella olla etenkin uudentyypisissä prosesseissa hyvinkin vaihtelevia maatalouden sivuvirtoja tai muita ruohovartisista kasveja. Sekä prosessi että käytetty raaka-aine vaikuttavat ligniinin rakenteeseen ja ominaisuuksiin, mikä tuo ligniinitutkimukseen haastetta. Ligniinin monimutkainen rakenne on toinen tutkimusta vaikeuttava tekijä. Natiiviligniinin rakenteet eri kasveissa pystytään melko hyvällä tarkkuudella määrittämään, mutta teknisissä ligniineissä tapahtuneita prosessien aiheuttamia muutoksia on hankala selvittää yksityiskohtaisesti. Käytettävissä olevat analyysimenetelmät tähtäävätkin osittain ligniinin hyödynnettävyyteen liittyvien ominaisuuksien kartoittamiseen. Tässä suhteessa oleellisia asioita ovat ligniinin puhtaus (ei-ligniinikomponenttien kvantitointi), funktionaalisten ryhmien määrät, moolimassajakauma sekä termiset ominaisuudet. Sen sijaa ligniinin perusyksiköiden välisten sidostyyppien tarkka analyysi tekisistä ligniineistä on haastavaa.

Ligniinin karakterisointi edellä kuvattujen periaatteitten mukaisesti vaatii useita tekniikoita. Näytteen koostumus voidaan määrittää standardimenetelmillä, mutta yksityiskohtainen analyysi vaatii erikoismenetelmiä. NMR:ää voidaan käyttää ligniiniaanalytiikassa monin tavoin. 2D HSQC tekniikka on erityisen sopiva natiivityyppisten sidosten määrittämiseen. ³¹P NMR yhdistettynä derivointiin antaa tietoa erityyppisten hydroksyyliyhdyntien määristä. Moolimassajakauman määrittämiseen on käytettävissä useita SEC-menetelmiä joko alkalissa tai liuotimessa. Termisiä ominaisuuksia voidaan arvioida kalorimetrisesti DSC:llä. Tärkein tällä menetelmällä saatu tieto on ligniinin lasisiirtymälämpötila. Ligniinin termistä kestävyyttä määritetään termogravimetrisesti. Ligniinin rakennetta voidaan analysoida myös menetelmillä, joissa polymeerinen rakenne hajotetaan esim. hapettavasti tai termisesti monomeereiksi, joiden kautta voidaan arvioida polymeerisen ligniinin osarakenteita. Näissä menetelmissä monomeerit tunnistetaan ja kvantifioidaan tyypillisesti GC/MS-tekniikalla. Tällaisia hajottavia menetelmiä ovat mm pyrolyysi-GC/MS, hapettava hajotus sekä tioasidolyysi ja DFRC (Derivatization Followed by Reductive Cleavage).

Uudet nestekromatografia- ja massaspektrometriapohjaiset menetelmät uusiutuvan dieselin raaka-aineiden analytiikassa

Jyrki Viidanoja
Neste Oil
jyrki.viidanoja@neste.com

Nestepolttoaineiden orgaaninen analytiikka on perinteisesti perustunut suhteellisen yksinkertaisiin kaasu- ja nestekromatografisiin menetelmiin. Massaspektrometriaa on sovellettu ensisijaisesti näytteiden komponenttien identifioimiseen. Kun erilaisia sivuvirtoja, jätteitä, tähteitä sekä leväöljyä on alettu tutkia uusiutuvan dieselin raaka-aineina, näytematriiseista on tullut niin monimutkaisia ja vaihtelevia, että perinteiset analyysitekniikat eivät enää ole riittäviä näytteiden orgaanisten komponenttien karakterisoimiseksi. Perinteisten menetelmien rinnalle tarvitaan edistyneempiä, spesifisempiä menetelmiä.

Nestekromatografiaan ja ilmankehäpaineionisaatioon perustuvien tekniikoiden vahvuutena on se että menetelmät tarjoavat tapoja määrittää näytteiden rasva- eli lipidikomponentit ilman analyyttien rakenteen muokkaamista (hydrolysointi, derivatisointi). Myös poolisten, huonosti haihtuvien, labiilien lipidien määrittäminen, sekä oligomeerien määrittäminen on mahdollista. Tämä tukee uusiutuvan dieselin valmistusprosessin eri vaiheiden kehitystä. Kaasukromatografiset menetelmät tarjoavat toimivan tavan lipidien rasvahappojakaumien määrittämiseen. Uusiutuvan NEXBTL –dieselin valmistuksessa lipidien esterisidokset katkeavat ja rasvahappojakauma antaa monissa tilanteissa kohtuullisen hyvän ennusteen lopputuotteen koostumuksesta.

Kokoerotteisen nestekromatografiset tekniikat tarjoavat yksinkertaisen tavan öljypohjaisen näytteen lipidikoostumuksen karkeaan jaotteluun prosenttitasolla. Kun tämä yhdistetään näytteen komponenttien fraktioimiseen poolisuuden mukaan, pystytään näytteiden monet lipidiluokat määrittämään usein kohtuullisella varmuudella ja kattavuudella. Kun lisäksi sovelletaan kohdennettuja (targeted) massaspektrometrisia menetelmiä, saadaan usein melko varma ja kattava kuva sekä lipidi- että luokkatasolla.

Nesteellä kehitettyjen kohdennettujen massaspektrometrinen menetelmien vahvuutena on niiden spesifisyyden lisäksi laaja mittausalue, sekä stabiili-isotooppileimattuja tai homologisia sisäisiä standardeja soveltaen myös menetelmien kvantitatiivisuus. Riippuen analyyttien luonteesta ja määrästä näytteessä, tarvitaan kaksi tai kolme analyyttistä dimensiota komponenttien riittävän luotettavaan määrittämiseen. Näistä dimensioista yksi on usein kromatografinen. Vaihtoehtoisesti on mahdollista soveltaa myös monivaiheisia (tandem), puhtaasti massaspektrometrisiä suorasyöttömenetelmiä (ns. shotgun lipidomics), mikäli analyytit ovat näytteiden pääkomponentteja ja luonteeltaan riittävän monimutkaisia.

Integrated enzymatic, chromatographic, and mass spectrometric approaches unravel the molecular structure of chemically modified plant polysaccharides

Docent Chunlin Xu
Åbo Akademi University, Åbo, Finland
chunlin.xu@abo.fi

Biorefinery has recently attracted a lot of attention to dealing with biomass-based energy, materials and chemicals. Plant polysaccharides are the most abundant natural materials in the world. Our research has been focused on development of value-added polymeric materials from plant polysaccharides such as, spruce galactoglucomannan, tamarind galactoxyloglucan, and guar galactomannan. The challenges have lied on the structure analysis of the polysaccharides and their functionalized derivatives due to their heterogeneity and complexity. Mass spectrometry is a powerful technique to obtain identification and structural information on compounds present in complex mixture due to its advantages, i.e. requirement of small amount of sample, high sensitivity, and short preparation and operation time. Assisted with enzymes to digest the plant cell wall polysaccharides to their oligomers, high-throughput matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) screening methods are enabled.

Here, I will introduce an advanced technological platform to unravel the molecular structure of chemically modified plant polysaccharides by integrating enzymatic, chromatographic, and mass spectrometric approaches. A number of case studies on applying MALDI-TOF MS and ESI-MS for characterization of tamarind xyloglucan and spruce galactoglucomannan and their functionalized derivatives after treatment by xyloglucan-specific endoglucanase and endo-1,4 β -mannanase, respectively, will also be discussed. An ESI-MS/MS method is under development for more detailed structural analysis of cationized polysaccharides, which also will be presented. Mass spectrometry in combination with specific enzyme digestion has proved to be a very sensitive, fast, and powerful tool for screening of the complex structure of cell wall polysaccharides and their derivatives to provide detailed substitution information in combination with enzyme digestion, especially when conventional characterizing techniques, i.e. NMR spectroscopy, are facing challenges. Semi-quantitative information about the substitution pattern of these derivatives can also be obtained from this powerful approach.

POSTERIESITYKSET

Differentiation between the bio and fossil component in hydrogenated vegetable oil using direct liquid scintillation counting method

Hanna Aromaa^{1,2}, Tiina Riekkola¹, Toni Laurila¹

¹Neste Corporation, Technology Center, Porvoo, Finland

²University of Helsinki, Laboratory of Radiochemistry, Finland

toni.laurila@neste.com

A novel direct liquid scintillation counting (LSC) method has been applied to the differentiation of the bio and fossil component in hydrogenated vegetable oils (HVOs). Current LSC methods used for determining the amount of bio component in oils first convert the carbon contained in the sample into carbon dioxide (CO₂) by combustion. The resulting CO₂ is then either trapped and mixed with a liquid scintillation cocktail followed by an LSC analysis or benzene is synthesized from the CO₂ and analysed with the LSC instrument. Here we present the results obtained by directly mixing HVO samples with the liquid scintillation cocktail and then analysing the mixture for the carbon-14 isotopes by using a state-of-the-art LSC analyser. The results are compared with reference results obtained using accelerator mass spectrometer (AMS) method.

Current analytical methods employing carbon-14 isotope dating for differentiating the bio and fossil component in fuels are rather complex. The advantages of the direct LSC method include minimal sample pre-treatment and straightforward analytical procedure. The novel direct liquid scintillation counting method is conceptually straightforward and requires minimal sample pretreatment and therefore has good future potential to replace existing methods.

Näytteenkäsittelyn ja analyysin kehittäminen etanoliorganosolv-ligniinin katalyyttiseen depolymerointiin

K. Johanna Hakonen, Heidi Meriö-Talvio, Reetta Karinen ja Juha Lehtonen
Aalto-yliopisto, Helsinki, Suomi
johanna.hakonen@aalto.fi

Biotalouslignini on merkittävä lähde aromaattisille kemikaaleille ja polttoaineille. Katalyyssiä pidetään avainteknologiana sen jatkojalostuksessa [1] katalyyttisen hydrauksen ollessa lupaavin menetelmä fenolien tuottamiseen ligniinistä [2]. Tässä tutkimuksessa selvitetään olosuhteiden ja eri jalometallikatalyyttien vaikutusta ligniinin hajotukseen vedyn läsnä ollessa. Liuottimena käytetään etanolia, joka toimii myös vedyn luovuttajana (solvolyyysi) ja molekylaarisen vedyn tavoin estää ligniinin polymeroitumista uudelleen [3]. Etanolipohjainen organosolv-lignini valittiin lähtöaineeksi, koska se on rikitöntä ja molekyyli­massaltaan pientä [4]. Tutkimuksemme kuuluu oleellisena osana tuoteseoksen käsittelyn ja analysoinnin kehittäminen. Reaktiossa osa ligniinistä hajoaa kaasumaisiksi ja osa nestemäisiksi tai etanoliliukoisiksi yhdisteiksi. Lisäksi osa polymeroituu uudelleen kiinteäksi fraktioksi. Haasteita analyysin tuo syntyvien yhdisteiden suuri määrä, huono liukoisuus analyysimenetelmissä käytettyihin liuottimiin ja osin huono haihtuvuus GC-analyy­seissä.

Ligniinin depolymerointi suoritettiin 100 ml panosreaktorissa, jossa on sekoittimen mukana pyörivä katalyyttikori. Reaktoriin panostettiin 1 g Fraunhofer-ligniiniä, 100 mg kiinteää katalyyttiä, 50 ml etanolia ja 10–50 bar vetyä, ja se kuumennettiin 200–400 °C:een. Reaktioaikaa tutkittiin pelkästä lämmityksestä kolmeen tuntiin. Jäähdytyksen jälkeen kaasufaasista otettiin näyte, jonka jälkeen reaktioseos otettiin talteen. Seos suodatettiin alipaineessa, jolloin saadaan etanoliliukoinen ja etanoliin liukenematon fraktio. Kiinteä osa uutettiin tetrahydrofuraanilla, jolloin saadaan THF-liukoinen ja -liukenematon fraktio.

Lähtöaineligniinin koostumus analysoitiin pyrolyysi-GC/MS:lla. Ligniinin, etanoli- ja THF-liukoisten fraktioiden molekyyli­massajakauma selvitettiin GPC-menetelmällä HPLC/VWD-laitteella. Monoaromaatit tunnistettiin GC/MS:lla ja tulosten tulkinnassa käytettiin standardeja, NIST-tietokantaa ja kirjallisuutta [5]. Oligomeerien tunnistukseen ollaan ottamassa käyttöön uutta LC/MS/MS-laitetta. Kaasunäytteet analysoitiin kvantitatiivisesti GC/TCD-FID-laitteistolla. Lisäksi analysoitiin ligniinin ja tuotteiden alkuainekoostumus alkuaineanalysointilaitteella ja tuotteen vesipitoisuus Karl-Fischer-titrauksella. Haasteena on pienten yhdisteiden ja haluttujen monoaromaattien haihtuminen reaktioseoksen suodatuksessa sekä etanolin ja veden haihdutuksessa, jolloin ei voida laskea massatasetta eikä ligniinin konversiota monoaromaateiksi. Haihtumattomien monoaromaattien määrää arvioitiin GC/MS- ja GPC-tulosten avulla. Katalyyttien on havaittu parantavan hajoamistuotteiden laatua sekä niiden välillä on havaittu eroja fraktioiden määrissä ja fenolien sivuketjuissa.

Lähteet

1. Bozell, J. J., Holladay, J. E., Johnson, D., White, J. F., *Top Value Added Candidates from Biomass, Volume II: Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin; Pacific Northwest National Laboratory: Richland, WA, 2007.*
2. Dorrestijn E., Laarhoven, L.J.J., Arends, I.W.C.E., Mulder, P., *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 54 (2000), 153-192.
3. Huang, X., Korányi, T.I., Boot, M.D., Hensen, E.J.M., *Green Chem.* (2015) (Ahead of Printing).
4. Sannigrahi, P., Ragauskas, A. J., Miller, S. J., *Energy Fuels* 24 (2010), 683-689.
5. Faix, O., Meier, D., and Fortmann, I., *Holz Roh- Werkst.* 48 (1990), 281–285.

Chemical fingerprinting of fast and slow pyrolysis oils with Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

Marko Mäkinen

Department of Chemistry, University of Eastern Finland, Joensuu, Finland
marko.makinen@uef.fi

During the last few years, high-resolution mass spectrometry (HRMS) has been increasingly used in the analysis of pyrolysis oils produced from woody biomass and from various other feedstocks. HRMS has been found to be especially useful in non-targeted fingerprinting of pyrolysis oils' "heavy ends", i.e. the non-volatile and thermally labile species like fatty acids, pyrolytic lignin, and different anhydrosugars. In this presentation our results on HRMS analysis of various types of pyrolysis oils is reviewed and discussed.

The measurements were performed with 12-T Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) instrument equipped with ESI and APPI ionization sources. The results indicated that both fast and slow pyrolysis oils were much more complex than presumed earlier. Both oils contained compounds that were impossible to analyze with GC-MS since they are non-volatile or thermally labile. Since the most oxygen-containing compounds in pyrolysis oils are acidic, negative-ion ESI is typically employed. The majority of compounds detected with negative ESI were oxygen-containing species having oxygen number spanning around 1-15. Interestingly, positive-ion APPI also ionized oxygen-containing species but based on the double bond equivalencies and carbon numbers it targeted completely different compounds. The compounds from APPI had higher aromaticity and higher molecular weight on average as compared to the compounds from ESI. Thus, ESI and APPI are complementary enabling more complete fingerprinting of pyrolysis oils.

Liquid phase furfural hydrotreatment to fuel component 2-methylfuran over 10% Ni/C catalyst

Salla Jaatinen¹, Reetta Karinen, Juha Lehtonen

¹ Aalto University, Department of Biotechnology and Chemical Technology, Helsinki, Finland
salla.jaatinen@aalto.fi

Introduction

Due to the constantly increasing energy demand and environmental pollution the need for bio-based chemicals and fuels is expanding. Valuable end product 2-methylfuran (MF) can be produced from bio-based platform chemical furfural. This component has excellent properties as gasoline blending component including high research octane number (131), low solubility to water (7g/l) and high energy density. [1, 2] Traditionally CuCr catalysts have been applied in furfural hydrotreatment reactions but new environmental regulations prevent the use of catalysts based on chromium. Various transition metal catalysts have been studied for the reaction but insufficient activities and selectivities to MF have been achieved in the studies. [1-3] This study examines liquid phase furfural hydrotreatment to fuel component MF over 10% nickel catalyst, applying activated carbon as a support.

Experimental

Catalysts in this study were prepared with incipient wetness impregnation method on activated carbon support. Reduction of catalyst was performed in situ at 250 °C under 40 bar hydrogen pressure for one hour. Furfural hydrotreatment was performed batchwise in an Autoclave Engineers 50 ml Mini-reactor at 230 °C with 2-propanol as a solvent. Liquid samples were taken during the experiment at 0, 15, 30, 60, 120 and 300 minutes. Gas phase sample was taken after the experiment to a devacuated gas "bomb" as the reactor had cooled down to a room temperature.

Liquid samples were analyzed with a GC-FID (Agilent 6890) with Zebron ZB-Wax Plus (60m x 0.25 mm x 0.25 µm) column. The temperature program was from 40 °C to 100 °C with heating rate of 5 °C/min and from 100 °C to 230 °C with heating rate of 20 °C/min. 1 µl sample was injected in split mode using 50:1 split ratio and column flow of 2 ml/min. Injector and detector temperatures were set at 230 °C and 250 °C, respectively and helium was used as a carrier gas in the analysis. For quantitative analysis of components an internal standard (2-butanol) was applied. For identification of unknown components a similar column and method were used in GC-MS (Agilent 7890-5975). Mass spectra were recorded in electron impact ionization at 70 eV. Analyzing of gas samples was performed with a GC-FID/TCD (Agilent 6890) containing gas pneumatics. Permanent gases were analyzed with TCD using two columns HP-PLOT/Q (30x0.53 mm x 40 µm) and HP Molesieve (30 x 0.53 mm x 25 mm) using argon as a carrier gas. Hydrocarbons were analyzed with FID using HP-AL/KCL column (50 x 0.32 mm x 8 mm) and helium as a carrier gas.

Results and discussion

The catalyst tested in furfural hydrotreatment to 2-methylfuran was 10 % Ni/C. To obtain optimal process conditions the effect of temperature, pressure and metal content on yields of desired end product, MF were tested.

Three different temperatures were tested: 180, 200 and 230°C. It was discovered that the increase of temperature increases the yield of MF. The highest yield of MF was 49 % and it was achieved after two hours of batch experiment. In order to discover the effect of pressure, three different hydrogen cold pressures were tested: 20, 30 and 40 bar. On the basis of experiments it was observed that the product distribution changes as pressure changes. It was discovered that higher pressure promoted MF yield. The effect of metal content on MF yield was tested with three different metal contents: 2, 5 and 10 %. The results showed that with higher metal content also the yield of MF increased.

Furfural hydrotreatment to 2-methylfuran is not straight forward as the reaction scheme is extremely complex. Many side products by competitive and consecutive reactions can be formed during the experiments and this was also noticed as samples were analyzed. The most common side products in the reactions include tetrahydrofurfuryl alcohol (THFA), furan, 2-methyltetrahydrofuran (MTHF), 2-pentanone, acetone and 2-furanmethanol acetate. In addition to common side products many unknown components were produced. In Figure 1 furfural and product concentrations are presented as a function of time for the catalyst in optimal process conditions.

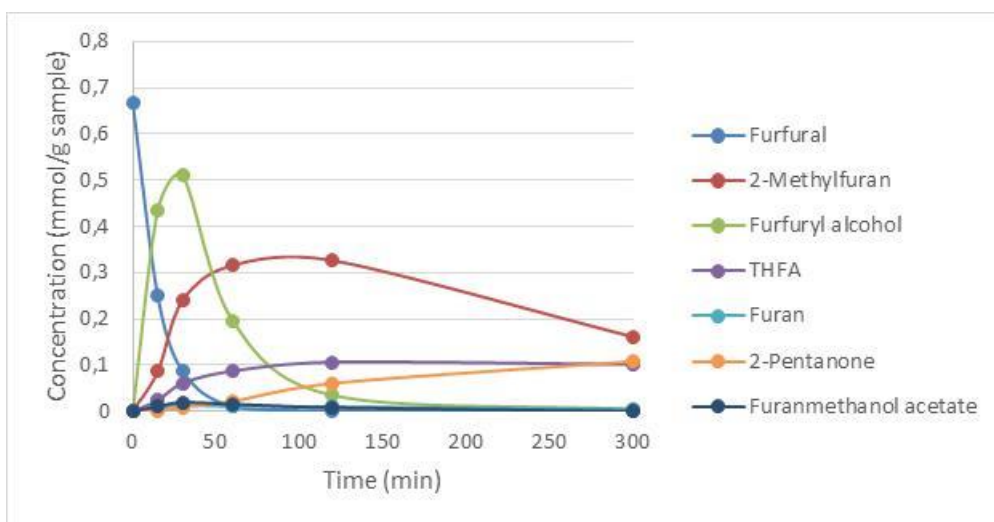


Figure 1. Product distribution with 10 % Ni/C at 230 °C and 40 bar H₂.

In conclusion, the results indicate that the optimal process conditions for nickel catalyst for production of potential fuel component 2-methylfuran are: 230 °C, 40 bar H₂ pressure and metal content 10 %. Our results indicate that very promising yield of MF can be obtained with nickel on carbon support. Further tuning of the investigated catalyst is expected to further improve the performance.

References

1. Yan, K., Chen, A., *Fuel* 114 (2014), 114, 101-108.
2. Scholz, D., Aellig, C., Hermans, I., *ChemSusChem* 7 (2014), 268-275.
3. Rao, R.S., Baker, T.K., Vannice, M.A., *Catalysis Letters* 60 (1999), 51-57.

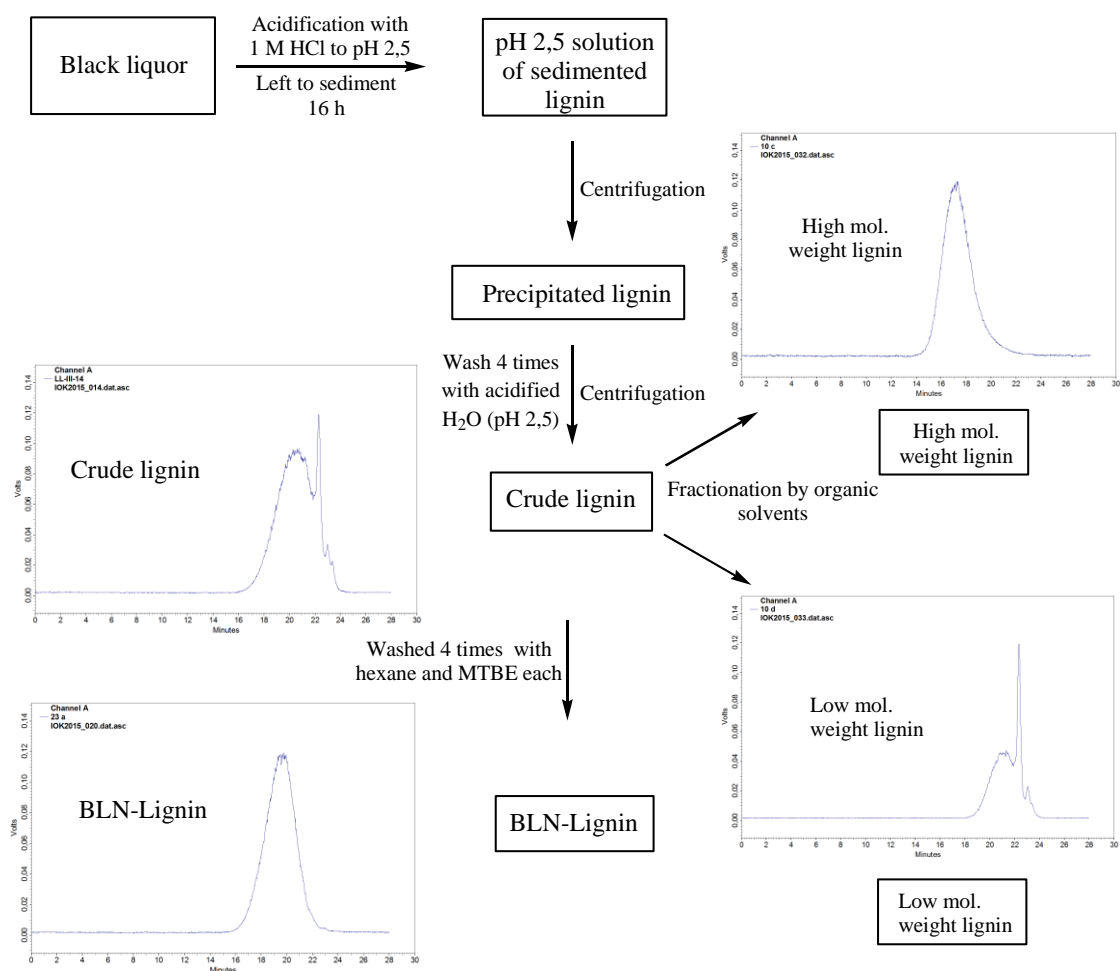
Acknowledgements

The work has been funded by Tekes, The Finnish Funding Agency for Innovations.

Study of a novel type of pressurized hot-water extracted lignin

Lucas Lagerquist, Patrik Eklund
Johan Gadolin Process Chemistry Centre (PCC), Laboratory of Organic Chemistry, Åbo Akademi University, Åbo, Finland
lucas.lagerquist@abo.fi

In this poster presentation we present our work on precipitation, purification and analysis of a novel type of pressurized hot-water extracted lignin (BLN-lignin). The new fractionation technology developed by BLN-Woods Ltd yields high purity cellulose and hemicellulose, as such it was also of interest to study the structure of the lignin, from the process. Initial studies were focused on developing a practical method of obtaining and washing the lignin from the black liquor. The possibilities of fractionation by organic solvents were also studied. Low weight molecules, such as extractives and monolignols, were analyzed with GC-MS and short column GC. The carbohydrate content of the black liquor, filtrate and lignin was measured by methanolysis. The different lignin fractions were analyzed with HPSEC, with both DMSO and THF as solvents, to determine purity and molecular mass distribution. NMR-spectroscopy was used to characterize the lignin, mainly by ^{13}C NMR and 2D-NMR techniques.



Biomassanjalostus ja analytiikka

Joni Lehto

Soveltavan kemian osasto, Kemian laitos, Jyväskylän yliopisto

joni.t.lehto@jyu.fi

Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella toteutetaan neljän tutkimuksellisen vahvuusalueen toimintakulttuuria, jotka kuvastavat laitoksella jo toimivien tutkimusryhmien osaamista sekä mahdollisia uusia tutkimuksellisia aluevaltauksia ja joiden avulla tutkimus- sekä opetus-ympäristöä kehitetään edelleen. Näistä alueella ”uusiutuvat luonnonvarat ja elinympäristön kemia” tehdään selkeästi biotuotealaan kuuluvaa tutkimusta, jonka puitteissa toimii pää-asiassa vuonna 1993 toimintansa aloittanut soveltavan kemian osasto. Osaston nykyinen toiminta liittyy yhteiskunnallisesti merkittäviin toimialoihin, kuten metsäteollisuuteen, kemian-teollisuuteen, ympäristökemiaan ja analytiikkaan, uusiutuvan energian eri muotoihin sekä biomassan monipuoliseen muuhun hyödyntämiseen. Monet tutkimuksellisesti mielenkiintoiset kohteet käsittävät lähinnä erilaisten teollisuusprosessien kehittämistä. Pääosa tutkimuksesta tehdään opinnäyte- ja projektitöinä tiiviissä yhteistyössä teollisuuden ja tutkimuslaitosten kanssa, jolloin aiheet liittyvät sekä laboratoriomittaan perustutkimukseen että tätä suuremman skaalan sovellustutkimukseen. Yhteistyötä on tehty kymmenien kotimaisten ja monien ulkomaalaisten toimijoiden kanssa. Osaston perustamisesta lähtien on toistaiseksi valmistunut yli 200 maisterin tutkintoa ja noin 60 jatkotutkintoa.

Lähemmin tarkasteltuna soveltavan kemian osaston opetus- ja tutkimuskohteina ovat kuitutuotantoon liittyvää puunjalostusta käsittelevien aihekokonaisuuksien (raaka-aineet, kuitudutus, valkaisu sekä sivutuote- ja paperikemia) ohella monipuoliset kemialliseen biomassanjalostukseen (raaka-aineina puu ja ruohot sekä maatalousjätteet) liittyvät hankkeet. Osaston voidaan siten katsoa toimineen globaalien biotalouden alueella koko toimintansa ajan. Lisäksi tutkimusta tehdään ympäristökemian, luonnonainekemian, polymeerien tietokonepohjaisen mallintamisen ja uusiutuvan energian tuotantoon liittyvillä aihealueilla. Bioenergian tuotantoon tähtäävän toiminnan painopistealueet muodostuvat tyypillisesti sekä kiinteiden polttoaineiden koostumusselvityksistä että toisaalta biomassapohjaisiin polttonesteisiin ja sulfaattiteollisuuden mustalipeään kohdistuvista tutkimuksista. Keskeisimpien avainalueiden keihäänkärkinä ovat puukemia ja sitä hyödyntävä syvällinen analyysiosaaminen sekä kyseistä osaamista hyvin tukeva monipuolinen ja varsin uudenaikainen laitekanta. Kaikissa tapauksissa yleisenä päämääränä on kuitenkin pyrkiä kehittämään ympäristöystävällisiä prosesseja, jotka hyödyntävät kokonaisvaltaisesti entistä tehokkaammin erityyppisiä biomassavarantoja puunjalostus- ja kemianteollisuuden sekä toisaalta energiatuotannon tarpeisiin.

Isolation and activity of anabaenopeptins produced by Baltic Sea cyanobacteria

Lisa Spoof¹, Agata Błaszczuk², Jussi Meriluoto¹, Marta Cegłowska², Hanna Mazur-Marzec²

¹Biochemistry, Faculty of Science and Engineering, Åbo Akademi University, Turku, Finland

²Department of Marine Biotechnology, University of Gdańsk, Gdynia, Poland

lisa.spoof@abo.fi

Cyanobacteria (blue-green algae) constitute an underexploited source of bioactive substances which could have e.g. pharmaceutical or nutraceutical use. While the Baltic Sea cyanobacterium *Nodularia spumigena* is mostly considered a nuisance species because of the extensive blooms and production of the strong hepatotoxin and tumour promoter nodularin, the biomass also contains other interesting and potentially useful molecules.

Anabaenopeptins, cyanobacterial peptides, were isolated by reversed-phase preparative HPLC from an extract of Baltic Sea cyanobacterial material composed of *Nodularia spumigena* (50%), *Aphanizomenon flos-aquae* (40%) and *Dolichospermum spp.* (10%). Nine previously known and five new anabaenopeptins were isolated, and their structures were resolved by MS/MS studies. Three additional novel APs were detected by LC-MS/MS but could not be isolated in pure form. The activity of the peptides against carboxypeptidase A, protein phosphatase 1, chymotrypsin, trypsin and thrombin was tested *in vitro*. All isolated anabaenopeptins inhibited carboxypeptidase A (with the exception of one variant) and protein phosphatase 1.

This study was financially supported by a grant from Svenska Litteratursällskapet i Finland (LS), EU-FP7 project MAREX (LS, JM & HMM) and the National Science Centre in Poland (project NCN2013/0518/B/NZ8/01222; HMM).

Endophytic fungi from Scots pine roots contain new compounds with potential pharmacological interest

Jenni Tienaho^{1,2}, M. Karp², R. Franzén², J. Martin³, O. Genilloud³, T. Sarjala¹

¹ Natural Resources Institute Finland (Luke), Parkano, Finland

² Department of Chemistry and Bioengineering, Tampere University of Technology (TUT), Tampere, Finland

³ Fundación MEDINA, Granada, Spain
jenni.tienaho@tut.fi

Endophytic fungi isolated from the roots of Scots pine (*Pinus sylvestris*) growing on Finnish peatland forest were examined for their bioactive properties. According to nucleotide sequence of ITS region the selected fungal isolates in the tests were *Acephala applanata* (A), *Phialocephala fortinii* (R) and *Humicolopsis cephalosporioides* (S16). These isolates were selected according to earlier results which showed antioxidative and antimicrobial activity in the tests executed with bacterial biosensors *E.coli* DPD2511 and *E.coli* DPD2794 at the Tampere University of Technology. When the extracts were tested for their ability to prevent the cell damaging action of rotenone, which damages the mitochondria cell membrane and has been shown to simulate the action of Parkinson's disease, the results showed that the extract of *A.applanata* showed promising activity.

This fungal extracts were then fractioned using a HPLC Shimadzu Prominence system and the bioactivities of these fractions were tested with the same biosensors as well as hydrogen peroxide scavenging microplate test. We found that 4 of the fractions from *A. applanata* fungus extract showed activity in the biosensor tests and the components of these fractions were identified in Fundación MEDINA, Spain with LC-MS analysis performed with Agilent (Santa Clara, CA) 1200 liquid chromatography system with Bruker maXis HR-QTOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) coupled to the LC system. Because the original activity was found in water extracts (not in acetone), the extract also contains primary metabolites such as arginine, mannitol and adenosine. These metabolites are common in all fungi including those showing no bioactive effects. This emphasizes the importance to elucidate the unknown components which were observed in the bioactive fractions. These unknown components include for example C₁₄H₂₆O₁₀ which was not found in the dictionary of natural products (DNP) as produced by fungi but appears to be a vegetable constituent in the form of gluco- or galactopyranoside.

The hydrogen peroxide scavenging test showed antioxidative activity in 3 out of 4 of the fractions of *A. applanata* tested in Fundación MEDINA. However, we found that arginine does not show activity in the scavenging test and therefore we are about to test arginine and mannitol with the biosensors as well. This is because these 3 fractions were shown to contain arginine which can also have antioxidative properties but something else must explain the activity in the hydrogen peroxide scavenging test as the arginine itself is not active.

The identification of the bioactive fractions from *P. fortinii* (9 active fractions) and *H. cephalosporioides* (6 active fractions) extracts is still in progress.

Determination of short chain carboxylic acids in vegetable oils and fats using Ion Exclusion Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Jyrki Viidanoja
Neste Oil Corporation, Finland
jyrki.viidanoja@neste.com

A new method for quantification of short chain C1-C6 carboxylic acids in vegetable oils and fats by employing Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) has been developed. The method requires minor sample preparation and applies non-conventional Electrospray Ionization (ESI) liquid phase chemistry. Samples are first dissolved in chloroform and then extracted using water that has been spiked with stable isotope labeled internal standards that are used for signal normalization and absolute quantification of selected acids. The analytes are separated using Ion Exclusion Chromatography (IEC) and detected with Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) as deprotonated molecules. Prior to ionization the eluent that contains hydrochloric acid is modified post-column to ensure good ionization efficiency of the analytes. The averaged within run precision and between run precision were generally lower than 8 %. The accuracy was between 85 and 115 % for most of the analytes. The Lower Limit of Quantification (LLOQ) ranged from 0.006 to 7 mg/kg. It is shown that this method offers good selectivity in cases where UV detection fails to produce reliable results.

References

Viidanoja J., *Chromatogr. A* 1383 (2015), 96-103.

SEMINAARIN SPONSORIT



ORDIOR



norlab

