

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

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

12-13.11.2015

Naantalin kylpylä, Naantali

NESTE



SISÄLLYSLUETTELO

PLENARY LUENNOT	3
GC (uuteaine)analytiikan evoluutio	3
Cellulose aging and yellowing - analysis and structure of chromophores and molecular mechanisms of their formation”	3
KUTSUTUT PUHUJAT	4
Understanding starch structure by using enzymatic hydrolysis combined with gel-permeation and anion-exchange chromatography.....	4
Kasvitanniinien LC-MS/MS-analysointi	5
Hemiselluloosien erotus ja epäpuhtauksien analytiikka.....	6
Polysakkaridien erotus ja karakterisointi kokoeksklusiokromatografialla (SEC) ja kenttävirtausfraktioinnilla (FFF).....	7
Biomassan kaasutuskaasun pääkomponenttien ja epäpuhtauksien analyysit	8
Ligniinianalytiikka ja sen haasteet.....	9
Uudet nestekromatografia- ja massaspektrometriapohjaiset menetelmät uusiutuvan dieselin raaka-aineiden analytiikassa.....	10
Integrated enzymatic, chromatographic, and mass spectrometric approaches unravel the molecular structure of chemically modified plant polysaccharides	11
Mikrolevien lipidit: koostumus ja käyttö eri sovelluksissa.....	11

PLENARY LUENNOT

GC (uuteaine)analytiikan evoluutio

Prof.em. Bjarne Holmbom
Åbo Akademi

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

Prof. Thomas Rosenau
BOKU, Austria

KUTSUTUT PUHUJAT

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

Eric Bertoft
Åbo Akademi University

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 eluotuvat 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 kvadrupolilentoaika-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

Puubiomassan kolme makromolekyylistä pääkomponenttia ovat selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini. Näistä kolmesta vain selluloosaa on hyödynnetty teollisessa mittakaavassa esimerkiksi sulfaattiselluloosan valmistuksessa. Paineistettu kuumavesiuutto on luontoa säästävää erotusmenetelmää, jolla voidaan uutata 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-butyylietteri (MTBE) uutteesta käyttäen kaasukromatografia ja massaspektrometriä. Hapot, furfuraali ja HMF voidaan määrittää nestekromatografian ja diodirividetektorin yhdistelmällä. Epäorgaaniset yhdisteet voidaan määrittää ionikromatografilla ja sopivalla detektorilla.

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

Dos. Leena Pitkänen

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 valonsirontadetektori ja konsentraatiodetektori (esim. taitekerroindetektori), 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 polysakkaridianalyysyjä. 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 ilma-kaasutuksen 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 (H₂S, COS, orgaaniset rikkiyhdisteet), typpiyhdisteitä (NH₃, 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.

Ligniinianalytiikka ja sen haasteet

Tarja Tamminen
VTT

Ligniini on yksi kasvien pääkomponenteista. Biomassan käsittelyprosesseissa ligniini erottuu usein sivutuotefraktionä, 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 sijaan 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 ligniinianalytiikassa 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

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

Dosentti Chunlin Xu
Åbo Akademi

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.

Mikrolevien lipidit: koostumus ja käyttö eri sovelluksissa

Dosentti Anna-Maija Lampi
Helsingin Yliopisto