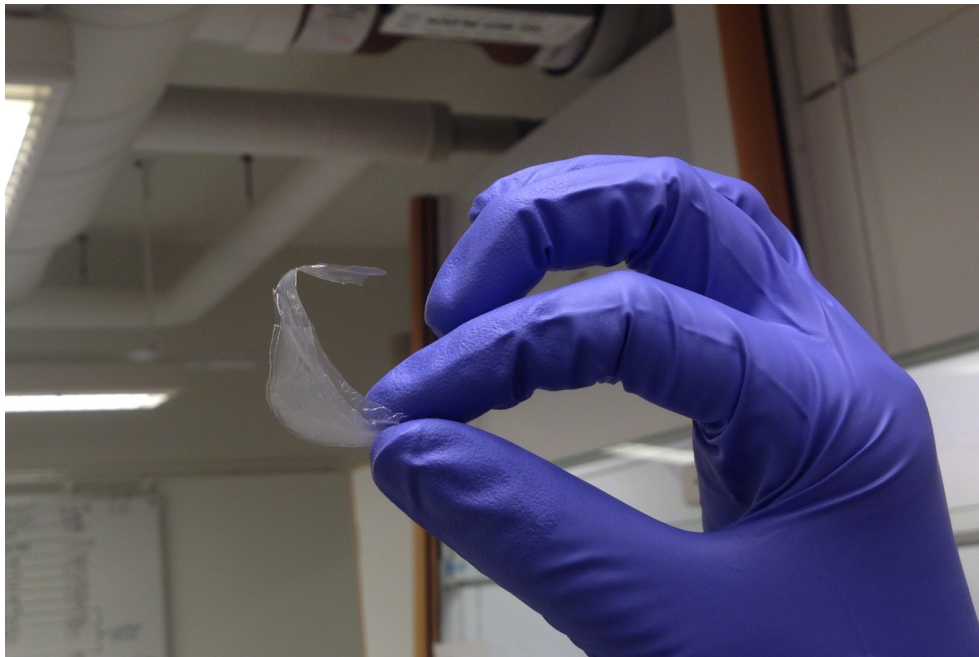


CHALMERS



Extraktion och kemisk modifiering av hemicellulosa

Britta Claesson
Jakob Obermüller
Lisa Sirén Gustafsson

Jacob Sjöstrand Dahlberg
David Sundberg
Alexander Sörensen

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Institutionen för Kemi- och Bioteknik
Handledare: Gunnar Westman
Göteborg, Sverige
Kandidatarbete 19 maj 2014

Tillkännagivelser

Vi vill tacka vår handledare Gunnar Westman som har hjälpt oss med mentorskap och kontakter. Vi vill också tacka doktoranderna på organisk kemi för deras tålmodiga assistans i att svara på frågor, låsa upp labbet och hämta kemikalier åt oss. Ett stort tack går också ut till företaget Kovalent AB, vars vakuumcentrifug effektiviserade den annars mycket långdragna rullindustningen. Sist men inte minst ett stort tack till Lyckeby Stärkelse AB som har försett oss med startmaterial.

Sammanfattning

I strävan mot ett hållbart samhälle ligger det intresse i att minska beroende av olja och andra fossila råvaror för att tillgodose behovet av energi, kemikalier och material. För att uppnå detta måste först och främst värdet i att undersöka förnyelsebara råvaror uppmärksammas. Ett biomaterial som har uppvisat intressanta egenskaper liknande de hos dagens oljebaserade produkter är hemicellulosa.

Syftet med projektet var att utarbeta en extraktionsprocess för hemicellulosa ur en utvald råvara samt att modifiera en del av den extraherade hemicellulosan. Under processen tillämpades en försöksplanering, så kallad faktorial design (2^3), för att skapa en modell över extraktionen. Tre parametrar i modellen optimerades varav två visade sig vara signifikanta.

Med hjälp av analysmetoderna IR och $^1\text{H-NMR}$ påvisades det att arabinoxylan extraherats från kornskal. Samma metoder visade också en viss förekomst av lignin kovalent bundet till arabinoxylan i det extraherade materialet. Med diskussion har det fastställts att närvaro av cellulosa i det erhållna materialet kunnat uteslutas. Vidare erhöles utbyten av hemicellulosa mellan 1.35 g och 2.23 g från ursprungliga 10 g startmaterial.

Den lyckade modifieringen av arabinoxylan som utfördes resulterade i ett annorlunda utseende och kemisk struktur. En kemisk modifiering innebär att det är möjligt att ändra fysikaliska egenskaper hos materialet och därmed utöka hemicellulosans användningsområden.

Abstract

In the quest towards a sustainable society it is in everyone's interest to reduce the dependence on oil and other fossil raw materials. To achieve this first of all attention must be given to the value in exploring renewable substitutes. A biomaterial that has shown interesting properties, similar to those of today's oil-based products, is hemicellulose.

The purpose of the project was to develop a method for extraction of hemicellulose from a selected raw material and to modify a portion of the extracted hemicellulose. The extraction process was performed under the influence of an experimental design, so called factorial design (2^3), to create a model over the extraction. Three parameters of the model were optimized, two of which proved to be significant.

With the use of the analytical methods IR and $^1\text{H-NMR}$, it was detected that arabinoxylan was successfully extracted from barley husks. With the same methods it was confirmed that some lignin, covalently bound to arabinoxylan, was present in the extracted material. With discussions it has been claimed that the presence of cellulose in the extracted material could be excluded. The extracted hemicellulose resulted in yields between 1.35 g and 2.23 g from initial 10 g starting material.

The successfully performed modification of arabinoxylan resulted in a material with different appearance and chemical structure. A chemical modification indicates that it is possible to change physical properties and expand the number of applications for hemicellulose.

Innehåll

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introduktion | 1 |
| 1.1 | Syfte | 1 |
| 1.2 | Avgränsningar | 2 |
| 2 | Teoretisk bakgrund | 2 |
| 2.1 | Biopolymerer i växter | 2 |
| 2.1.1 | Cellulosa | 2 |
| 2.1.2 | Lignin | 3 |
| 2.1.3 | Hemicellulosa | 3 |
| 2.2 | Kornskal | 3 |
| 2.3 | Extraktion av hemicellulosa | 4 |
| 2.4 | Modifiering av polysackarider | 4 |
| 2.5 | Försöksplanering | 5 |
| 2.5.1 | 2 ³ Faktorial Design | 5 |
| 2.5.2 | Effekter | 6 |
| 2.5.3 | Variansanalys | 6 |
| 2.5.4 | Tillägg av central- och axialpunkter | 7 |
| 2.5.5 | Regressionsmodellering | 9 |
| 2.6 | Analysmetoder | 10 |
| 2.6.1 | Infraröd spektroskopi | 10 |
| 2.6.2 | Kärnmagnetisk resonans | 11 |
| 3 | Materiel | 12 |
| 4 | Metod | 12 |
| 4.1 | Val av råvara | 12 |
| 4.2 | Extraktion ur malt kornskal | 12 |
| 4.2.1 | Försöksplanering för extraktion | 13 |
| 4.2.2 | Extraktionsförsök med optimala parametervärden | 14 |
| 4.3 | Modifiering av hemicellulosa | 14 |
| 5 | Resultat | 14 |
| 5.1 | Torrhaltsbestämning | 14 |
| 5.2 | Extraktion av hemicellulosa | 14 |
| 5.2.1 | Analys av extraktionsprover | 16 |
| 5.2.2 | Regressionsmodellering | 17 |
| 5.2.3 | Optimering | 19 |
| 5.3 | Modifiering | 19 |
| 6 | Diskussion | 22 |
| 6.1 | Karakterisering av extraherat material | 22 |
| 6.1.1 | Regressionsmodellering | 23 |
| 6.2 | Modifiering | 24 |
| 7 | Slutsats | 24 |
| 8 | Litteraturförteckning | 24 |
| 9 | Appendix | I |
| A | Beräkningar | I |
| A.1 | Torrviktsbestämning | I |
| A.2 | Beräkning av parametervärden vid faktorial- central- och axialpunkter | I |

| | |
|------------------------------------|----------|
| B Grafer | I |
| B.1 ^1H -NMR | I |
| B.2 ^{13}C -NMR | X |
| C MATLAB-algorithm | X |

1 Introduktion

Idag tillgodoses våra behov av energi, kemikalier och material till stor del av petroleum och naturgas. Framtida kostnader för att tillverka produkter av dessa fossila råvaror kommer att öka i och med att konkurrensen för den återstående oljan och naturgasen blir allt större. Dessutom har efterfrågan för mer miljövänliga alternativ tilltagit i och med ökad medvetenhet för miljö- och klimatpåverkan bland konsumenter och beslutsfattare. Denna utveckling har kraftigt ökat incitamenten för att utveckla ny miljövänlig produktion [1].

För att kunna övergå till ett mer hållbart samhälle måste människan bland annat ta bättre hand om råvaror och minska sitt avfall. En global trend som leder denna utveckling är övergången till biobaserade råvaror som kan tillgodose våra behov av energi, kemikalier och material på ett nytt och förnyelsebart vis [2].

Med nya tekniker och metoder öppnas möjligheten för fler förnyelsebara råvaror att ersätta petroleum i bland annat plaster och kompositer. Plastförpackningar är idag det främsta verktyget för att bevara våra livsmedels produktkvalitet och för att förlänga dess hållbarhet. Samtidigt är syntetiskt förpackningsavfall problematiskt ur flera avseenden, kanske främst ekologiskt. Av denna anledning undersöks lipider, proteiner och polysackarider intensivt som filmbildande material [3].

Genom att bättre hushålla med förnyelsebara råvaror i befintliga produktionsflöden skulle en stor miljövinst kunna uppnås. Ett exempel på detta är outnyttjad hemicellulosa som återfinns i stora kvantiteter i flertalet industrier med anknytning till skogs- och lantbruk, till exempel i sulfatmassabruk som idag bryter ner och förbränner hemicellulosa under produktion av pappersmassa [4]. Trots att hemicellulosa utgör 20-30 viktprocent av råvarans torrmasa separeras den från pappersmassan och bränns slutligen upp i processens sodapanna [5].

Hemicellulosa är en av de tre grupper polymeriska beståndsdelar som förekommer i cellväggen hos växter, där de två andra ämnena är lignin och cellulosa. Hur stor andel av växtmassan som utgörs av hemicellulosa beror på vilken del av växten som analyseras och vilken art den tillhör. Träd består typiskt av 20-35 viktprocent hemicellulosa [6] medan ettåriga växter har visats innehålla så mycket som 46 viktprocent, vilket gör hemicellulosa till en av de vanligast förekommande naturliga polymererna.

Extraherad hemicellulosa har en rad potentiella användningsområden. I sin polymeriska form har hemicellulosa bland annat visat lovande resultat för framtida användning inom packetering [7], läkemedelsfrisättning i tablettform [8] samt hydrogeler, det vill säga superabsorbenter [9]. Dessutom skulle hemicellulosa kunna bearbetas för att ersätta en betydande andel petroleumbaserade drivmedel och organiska baskemikalier [10], [11].

Många försök har gjorts för att extrahera hemicellulosa ur olika råvaror med olika metoder och volymer [4], [12], [13], [14]. Ofta påverkar extraktionen av hemicellulosa andra produkter som kan extraheras ur samma råvara. Särskilt svårt är det att extrahera hemicellulosa utan att påverka befintliga produkters kvalitet och kvantitet. I exempelvis pappersmassabruk skulle en extraktion av hemicellulosa skapa en konflikt mellan pappersmassans kvalitet och mängd återvunnen hemicellulosa. Dessa konflikter försvårar hemicellulosans utveckling inom befintliga industrier och då särskilt storskaliga sådana, som papper- och massaindustrin [11].

För att undvika särintressen har den här studien fokuserat på en råvara där extraktionen av hemicellulosa inte kommer i konflikt med andra befintliga intressen för råvarans användning. Med detta i åtanke har kornskal, som är en restprodukt från jordbruk med en hög halt hemicellulosa, använts som råvara.

1.1 Syfte

Syftet med projektet är att ur vald råvara extrahera polymerisk hemicellulosa. En modell ska tas fram som beskriver hur utbytet av hemicellulosa beror av utvalda parametrar i syfte att öka utbytet. En modifiering ska utföras för att förändra hemicellulosans egenskaper och tillämpningar. Extraktet ska karakteriseras med lämpliga metoder. Karakteriseringen ska bekräfta att hemicellulosa har extraherats, samt att modifieringen som utförts uppnått önskat resultat.

1.2 Avgränsningar

Valet av startmaterial begränsades till en råvara från lantbruks- eller skogsindustrin för att skapa ett resultat av intresse för svensk industri och forskning. Råvarans tillgänglighet i Sverige resulterar även i korta transportsträckor och därmed minskad miljöpåverkan.

Försöksdesignen som har använts är en 2^3 faktorial design. Antalet parametrar till försöksdesignen begränsades till tre stycken. Avgränsningen gällande antalet råvaror och parametrar var relevant eftersom ytterligare en råvara skulle innebära 18 nya experiment. Undersökning av ytterligare parametrar hade även det ökat antalet experiment avsevärt. Hade fler råvaror eller parametrar undersökts skulle det innebära ett betydligt större projekt än vad som hade rymts inom tidsramen.

Projektet syftade delvis till att undersöka vilka parametrar som är signifikanta för hemicellulosautbytet och utifrån detta bygga en regressionsmodell. Dock dras inga slutsatser gällande de kemiska och fysikaliska processer som ligger till grund för parametrarnas effekt. Denna avgränsning tar sin grund i att hemicellulosans sammansättning skiljer sig åt mellan råvaror och att råvaran vid projektformuleringen inte var bestämd. Detta tillsammans med att teoretiskt ingående litteratur på området är knapphändig gör att åtagandet bedömdes vara för stort.

Antalet modifieringar har begränsats till en. För att få en tydligare bild av potentialen hos modifierad hemicellulosa krävs betydligt fler modifieringar och djupare analys av hemicellulosans förvärvade egenskaper. Tid och utrustning har dock varit begränsande faktorer.

Karakterisering har främst utförts med IR-spektroskopi, $^1\text{H-NMR}$ och $^{13}\text{C-NMR}$. Fler analysmetoder hade gett en bättre förståelse för det extraherade materialet, dock har tillgänglighet och tid begränsat karakteriseringen till de ovan nämnda metoderna. Polymerstorleken har inte heller kunnat utvärderas då sådan utrustning inte varit tillgänglig.

Vidare har projektet inte studerat hur en eventuell uppskalning av extraktion samt modifiering skulle kunna utföras.

2 Teoretisk bakgrund

I följande avsnitt presenteras den teoretiska bakgrund som rapporten bygger på. Inledningsvis beskrivs de polymerer som bygger upp cellväggen hos växter. Vidare presenteras teori tillhörande kornskal, extraktion av hemicellulosa samt modifiering av polysackarider, följt av teori bakom försöksplanering samt analysmetoder.

2.1 Biopolymerer i växter

Växtceller är inneslutna av en cellvägg bestående av olika typer av polymerer. Polymertypernas struktur och mängd kan variera stort beroende på växtart, typ av vävnad, stadiet i utvecklingen och vilket vägglager som avses [15].

De vanligaste biopolymererna i växtceller är cellulosa, lignin och hemicellulosa, men det förekommer även andra ämnen så som pektiner, proteiner, fetter samt vatten [16]. Förhållandet mellan beståndsdelarna varierar mellan olika växttyper [17].

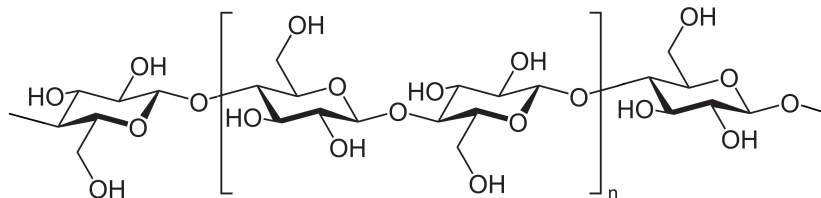
Polysackarider är kolhydrater som är allmänt förekommande i växtvärlden där de fyller olika funktioner, främst strukturgivning och energibevaring. På grund av deras funktionsbredd används polysackarider inte bara inom livsmedelsindustrin utan även inom ett flertal andra industrier [18].

2.1.1 Cellulosa

Cellulosa är den vanligast förekommande biopolymeren i växtceller där den utgör ungefär 40% av cellväggens torrsvikt. Dess huvudsakliga funktion är att ge växter stabilitet och styvhet [19].

Cellulosa är en väldefinierad grupp polysackarider som endast skiljer sig åt med avseende på polymeriseringsgrad och kristallinitet. Cellulosapolymerer är homogena, vilket innebär att hela polymeren är uppbyggd av likadana monomerer [20]. Polymerkedjorna består av långa kedjor av D-glukos som är ihopkopplade via β -1,4-bindningar, se Figur 1. Kedjorna kan förekomma

helt utsträckta, där varje glukosmolekyl är vinklad 180° mot nästa. Detta gör att de kan forma bindningar inom och mellan kedjorna, något som ger cellulosa dess stabiliserande egenskaper [21]. Cellulosa är olösligt i vatten och flertalet andra polära lösningsmedel på grund av de starkt verkande inter- och intramolekylära interaktionerna inom fibernätverket [18].



Figur 1: Två sammanlänkade D-glukosmonomerer som utgör den repetitiva enheten för cellulosa.

2.1.2 Lignin

Efter cellulosa anses lignin vara den vanligaste förekommande biopolymeren [22]. Andelen lignin i växtmaterial varierar mellan 18-35 viktprocent. I växter fungerar lignin framförallt som mekaniskt stöd genom att nätverk av ligninfibrer binder till cellväggarna och på så vis förankrar cellerna [23].

Lignin består av korta linjära enheter av fenypropen som tvärbinds genom länkar av glycerolaryleter. Monomererna i lignin ansluts via eter- och C-C-bindningar vilket ger upphov till en komplex tredimensionell struktur [22]. Lignin är en stor biopolymer som huvudsakligen består av starka ester- och fenylgrupper, vilket gör det svårslösligt i nästan alla lösningsmedel och komplicerar separation från övriga biopolymerer [24].

2.1.3 Hemicellulosa

Begreppet hemicellulosa myntades under sent 1800-tal för att särskilja en grupp polysackarider från cellulosa. Initialt antogs dessa vara strukturellt och kemiskt besläktade med cellulosa men det fastslogs senare att hemicellulosa är en grupp polysackarider med en sammansättning, struktur och biosyntes som skiljer sig från den hos cellulosa [16].

Hemicellulosa är till skillnad från cellulosa inte ett lika väldefinierat begrepp. Hemicellulosapolymerer är betydligt kortare än cellulosa och är heterogena, vilket innebär att polymerkedjorna byggs upp av en kombination av olika monomerer. Hemicellulosa binder till cellulosa med vätebindningar. Dessutom binder hemicellulosa kovalent till lignin genom esterbindningar till acetylenheter och hydroxikanelssyror [20].

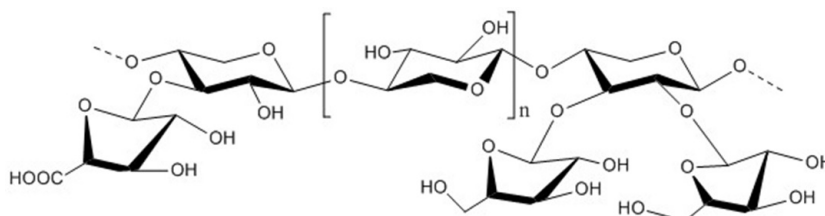
Hemicellulosa delas in i fyra övergripande grupper; xylaner, mannaner, "mixed linkage"- β -glukaner och xyloglukaner. Grupperna skiljer sig åt i vilka typer av sidokedjor de har och hur ofta dessa förekommer på ryggraden. Xylaner är den vanligaste typen av hemicellulosa framförallt i lövträd och ettåriga plantor, medan mannaner är vanligast i barrträd. "Mixed linkage"- β -glukaner förekommer marginellt i sädeslag och xyloglukaner återfinns i kärleväxter [25].

2.2 Kornskal

Korn är ett robust sädeslag som odlas vid olika årstider beroende på klimat. I Sverige odlas den främst på våren men kan i de södra delarna av landet även odlas på hösten [26]. Ungefär 13 viktprocent av kornet utgörs av dess skal, som i sin tur består av 30 viktprocent hemicellulosa. Skalet saknar näringsvärde för människan [27].

Den huvudsakliga hemicellulosan i kornskal är arabinoxylan, som strukturellt består av en linjär ryggrad av xylan med monomeriska förgreningar. De individuella sidoförgreningarna

består för det mesta av α -L-arabinofuranos men även 4-O-metyl- α -D-glukuronsyra förekommer. Dessa är sammanlänkade med O-glykosidbindningar till polymerens ryggrad, se Figur 2. På ryggraden av xylan förekommer även disackarid- och trisackaridrester bestående av 2-O-D-xylopyranosyl- α -L-arabinofuranos, eller små mängder av andra terminala rester, såsom galaktos eller glukos bunden till arabinofuranosylgrupper. Det förekommer även disackarid- och trisackaridrester bestående av 2-O-D-xylopyranosyl- α -L-arabinofuranos, eller små mängder av andra terminala rester, såsom galaktos eller glukos bundet till arabinofuranosylgrupper på ryggraden av xylan [28].



Figur 2: Struktur över arabinoxylan. Sammanlänkade enheter av xylos utgör ryggraden i polymeren och sidoförgreningarna består för det mesta av enkla arabinosenheter men även glukuronsyra förekommer.

2.3 Extraktion av hemicellulosa

I relation till de två andra stora grupperna av biopolymerer innefattas hemicellulosa av en betydande diversitet. Diversiteten i kombination med den historiska bristen på användningsområden har lett till bristande kunskap vad gäller separation- och extraktionsmoment. Metoder från litteraturkällor skiljer sig också avsevärt åt beroende på var informationen är hämtad. Kriterierna för renhet är heller inte likformiga [29].

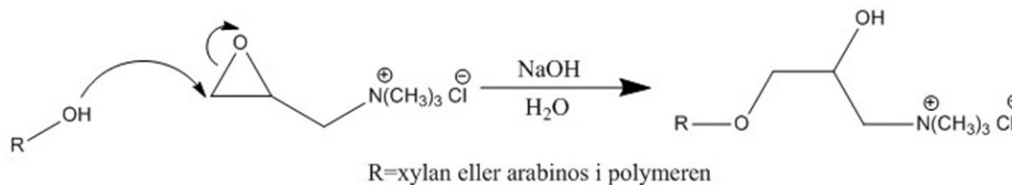
Vid extraktion av hemicellulosa ur växtceller finns det ett antal komponenter som hemicellulosan behöver separeras från. Dels behöver fetter i cellmembranet lösas upp, något som kan utföras genom en mild förbehandling med syra [7]. Dessutom behöver lignin avlägsnas. Det finns olika metoder för delignifiering, exempelvis genom behandling med natriumklorit. Natriumkloriten verkar genom att bryta ned lignin samt bindningar mellan lignin och kolhydrater. Delignifieringen sker ofta vid förhöjda temperaturer då det ökar reaktiviteten hos det delignifierande medlet [30]. När fetter och lignin avlägsnats extraheras hemicellulosa lämpligast med basiska medel [7]. Cellulosans kristallstruktur luckras upp och molekylerna sväller under alkaliska betingelser [31]. Kovalenta bindningar bryts endast upp i en mindre utsträckning och cellulosa förblir olösligt i vatten, till skillnad från många av hemicellulosorna [18]. Cellulosa kan därför avlägsnas från hemicellulosa genom filtrering.

2.4 Modifiering av polysackarider

För att utöka hemicellulosans användningsområden är det av stor vikt att kunna ändra dess egenskaper genom kemisk modifiering. Katjoniserad hemicellulosa har undersökts som potentiell tillsats i pappersmassaindustrin, som flockningsmedel, som jonbytare samtidigt som den har uppvisat antimikrobiella egenskaper [32].

Katjoniserade polysackarider är redan tillgängliga på marknaden, exempelvis katjoniserad stärkelse och cellulosa. Dessa används inom många industrier såsom pappers-, kemikalie-, mat-, kosmetika-, och läkemedelsindustri. Mängden användningsområden beror på deras unika egenskaper i kombination med låg kostnad, att de är biologiskt nedbrytbara och att de har låg toxicitet [32]. En vanlig katjoniseringsprocess kan ske genom att polymeren får reagera med ett katjoniskt reagens under alkaliska betingelser. Detta resulterar i en katjongrupp vid polymerens ryggrad genom förening av hydroxylgrupper [33].

I många fall används en epoxykemikalie, till exempel 2,3-epoxypropyltrimetylammoniumklorid (EPTMAC). I Figur 3 visas en generell katjonisering med EPTMAC. Tack vare den låga bindningsvinkeln för syre i epoxypropylgruppen är detta ämne reaktivt och lämpar sig för den här typen av modifiering [32].



Figur 3: Schematisk bild över reaktion mellan polysackarid och EPTMAC.

2.5 Försöksplanering

Syftet med en försöksplanering är att undersöka hur stor inverkan olika ingående parametrar har på resultatet av ett experiment. Inledningsvis väljs vilka parametrar som skall undersökas, och de tilldelas ett hög- och ett lågvärde var. Samma experiment upprepas sedan flera gånger, och varje iteration av experimentet har en unik kombination av hög- och lågvärden på parametrarna. Hur många gånger experimentet måste upprepas beror dels på hur många parametrar som ska undersökas och dels på vilken typ av försöksdesign som används. När experimenten utförts är det möjligt att fastslå vilka parametrar som har en signifikant effekt, samt att ställa upp en regressionsmodell som beskriver resultatet som en funktion av parametrarna.

2.5.1 2^3 Faktorial Design

Tabell 1: Generell designmatris för 2^3 Faktorial Design.

| Försök | I | A | B | C | Etikett |
|--------|---|---|---|---|---------|
| 1 | + | - | - | - | (1) |
| 2 | + | + | - | - | a |
| 3 | + | - | + | - | b |
| 4 | + | + | + | - | ab |
| 5 | + | - | - | + | c |
| 6 | + | + | - | + | ac |
| 7 | + | - | + | + | bc |
| 8 | + | + | + | + | abc |

I försöksdesignen 2^3 faktorial design utförs åtta grundläggande experiment för att undersöka tre parametrar A, B och C. Upplägget på dessa åtta experiment åskådliggörs schematiskt i Tabell 1. Den första parametern "I" är ett intercept nödvändigt för att passa in modellen i y-led. I designmatrisen betecknas en parameters högvärde av "+", och lågvärde av "-". Etiketten betecknar vilken parameter som har sitt högvärde i försöket. En enkel regressionsmodell kan utifrån denna design ställas upp på formen

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \epsilon \quad (1)$$

där y representerar mätresultatet, x_i representerar den kodade variabeln för parametern i i kolonn i i designmatrisen; exempelvis motsvarar x_1 här parameter A. Att variabeln är kodad innebär att den skalats till att anta ett lågvärde på -1 och ett högvärde på +1. Regressionskoefficienten β_i representerar effekten av variabel x_i [34]^a.

2.5.2 Effekter

Den genomsnittliga effekten av en parameter A, B eller C kan beräknas enligt

$$A = \frac{1}{4n}[a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc] \quad (2)$$

$$B = \frac{1}{4n}[b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac] \quad (3)$$

$$C = \frac{1}{4n}[c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab] \quad (4)$$

där n betecknar antalet replikationer av designen, a betecknar resultatvärdet av försök a , ab betecknar resultatvärdet av försök ab och så vidare. Effekten A definieras alltså som den genomsnittliga skillnaden i resultatvärde mellan de försök där A har ett hög- respektive lågvärde. På ett liknande sätt kan eventuella *interaktionseffekter* beräknas. En interaktion sker då effekten av en faktor beror av värdet på en annan faktor. Interaktionseffekten AB kan således definieras som den genomsnittliga skillnaden mellan effekten A vid de två olika värdena för B . Vidare kan interaktionseffekten ABC definieras som den genomsnittliga skillnaden mellan effekten AB vid de två olika värdena på C . Det är möjligt att utöka designmatrisen i Tabell 1 så att den innefattar interaktionseffekter, vilket kan ses i Tabell 2.

Tabell 2: Designmatris med interaktionseffekter.

| | I | A | B | AB | C | AC | BC | ABC |
|-----|---|---|---|----|---|----|----|-----|
| (1) | + | - | - | + | - | + | + | - |
| a | + | + | - | - | - | - | + | + |
| b | + | - | + | - | - | + | - | + |
| ab | + | + | + | + | - | - | - | - |
| c | + | - | - | + | + | - | - | + |
| ac | + | + | - | - | + | + | - | - |
| bc | + | - | + | - | + | - | + | - |
| abc | + | + | + | + | + | + | + | + |

Notera att tecknen för en interaktionseffekts kolonn beräknas som produkten av tecknen hos dess ingående huvudeffekter.

Det är nu möjligt att ställa upp en regressionsmodell som tar hänsyn även till interaktionseffekterna enligt Ekvation 5 [34]^a.

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{123}x_1x_2x_3 + \epsilon \quad (5)$$

2.5.3 Variansanalys

För att kunna ställa upp en modell som kan förutse resultatvärden måste först de effekter som faktiskt har en signifikant verkan identifieras. Detta görs med en *variansanalys*. Den totala variansen i en försöksserie beräknas med kvadratsumman över resultatvärdena enligt Ekvation 6

$$SS_T = \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \quad (6)$$

där \bar{y} är det sammanlagda genomsnittet för y [34]^b. För att beräkna variansen som de olika effekterna bidrar med behöver deras *kontraster* beräknas. I Ekvation 2, 3 och 4 kan kontrasterna ses som kvantiteterna inom hakparanteserna, och kontrasterna för interaktionseffekterna kan beräknas på samma sätt utifrån Tabell 2. Effekternas kvadratsummor beräknas enligt Ekvation 7, och således kan den generella ekvationen, 8, ställas upp, där den sista termen SS_E står för kvadratsumman av residualen.

$$SS = \frac{(\text{Kontrast})^2}{8n} \quad (7)$$

$$SS_T = SS_A + SS_B + SS_{AB} + SS_C + SS_{AC} + SS_{BC} + SS_{ABC} + SS_E \quad (8)$$

En överskådlig ANOVA-tabell (se Tabell 3) kan nu ställas upp för variansanalysen. ANOVA står för analysis of variance [34]^c. *Mean square (MS)* beräknas som kvadratsumman för ett element dividerat med dess frihetsgrader, och genom att jämföra *MS* för en effekt med *MS_E* (mean square för residualen) fås effektens variansbidrag relativt den naturliga variansen. Det resulterande *F₀*-värdet jämförs med ett tabellvärde F_{α, v_1, v_2} , där α betecknar signifikansgraden, $0 < \alpha < 1$, v_1 representerar antal frihetsgrader hos täljaren och v_2 är antal frihetsgrader hos nämnaren.

Tabell 3: ANOVA-tabell.

| Källa | Kvadratsumma | Frihetsgrader | Mean Sqare | F_0 |
|-------|--------------|---------------|------------|-----------------|
| A | SS_A | 1 | MS_A | MS_A/MS_E |
| B | SS_B | 1 | MS_B | MS_B/MS_E |
| C | SS_C | 1 | MS_C | MS_C/MS_E |
| AB | SS_{AB} | 1 | MS_{AB} | MS_{AB}/MS_E |
| AC | SS_{AC} | 1 | MS_{AC} | MS_{AC}/MS_E |
| BC | SS_{BC} | 1 | MS_{BC} | MS_{BC}/MS_E |
| ABC | SS_{ABC} | 1 | MS_{ABC} | MS_{ABC}/MS_E |
| Error | SS_E | $2^k(n-1)$ | MS_E | |
| Total | SS_T | $n2^k - 1$ | | |

Ett hypotestest för varje modell kan nu formuleras enligt

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_{123} = 0 \quad (9)$$

$$H_1 : \beta \neq 0 \text{ för minst ett } \beta \quad (10)$$

H_0 förkastas i det fall där $F_0 > F_{\alpha, v_1, v_2}$, och effekten inkluderas i regressionsmodellen. I de fall då $F_0 < F_{\alpha, v_1, v_2}$ kan inte H_0 med säkerhet förkastas, vilket är likvärdigt med att ingen effekt kan observeras, och dessa utesluts ur modellen [34]^{a, b}.

2.5.4 Tillägg av central- och axialpunkter

Regressionsmodellen som tas fram i Ekvation 5 kan inte beskriva ett förlopp som ökar kvadratisk med någon variabel. En generell sådan modell för ett sådant förlopp som beror av tre parametrar beskrivs i Ekvation 11.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i < j}^{j=3} \sum_{i=1} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \epsilon \quad (11)$$

där β_{ii} beskriver rent kvadratiska effekter. En effektiv metod för att undersöka huruvida förloppet som modelleras har kvadratiska effekter är att lägga till *centralpunkter* i försöksdesignen. Detta görs praktiskt genom att utföra n_C ytterligare experiment, där $3 \leq n_C$, med samtliga parametrar satta till sitt medelvärde, det vill säga mitt emellan hög- och lågvärdet med kodade koordinatvärden (0,0,0) för tre parametrar. \bar{y}_C betecknar genomsnittresultatet vid centralpunktmätningarna och \bar{y}_F betecknar genomsnittresultatet vid de åtta ursprungliga experimenten. Om $\bar{y}_C - \bar{y}_F \approx 0$ innebär det att centralpunkterna ligger nära planet som passerar genom faktorialpunkterna. En sådan situation karakteriserar en linjär process, där kurvaturen är liten och eventuella kvadratiska effekter således kan försummas. Att $|\bar{y}_C - \bar{y}_F| \gg 0$ antyder en betydlig kurvatur, vilket föreslår kvadratiska effekter. För att säkerställa statistiskt att kvadratisk kurvatur förekommer kan ett hypotestest likt det i Ekvation 9 och 10 utföras.

Det första steget är då att beräkna en kvadratsumma med en frihetsgrad för rent kvadratisk kurvatur, vilket görs enligt

$$SS_{Pure\ quadratic} = \frac{n_F n_C (\bar{y}_F - \bar{y}_C)^2}{n_F + n_C} \quad (12)$$

där n_F är antal faktorialpunkter, det vill säga försöken som föregår centralpunkterna. Eftersom centralpunkterna replikeras utan att några parametervärden förändras är de lämpliga att använda för att ge ett bra mått på den naturliga osäkerheten, MS_{PE} med frihetsgrader $n_C - 1$, där PE står för *Pure Error*. Denna kan beräknas enligt

$$MS_{PE} = \frac{SS_{PE}}{dF} = \frac{\sum_{Centralpunkter} (y_i - \bar{y}_C)^2}{n_C - 1} \quad (13)$$

$SS_{Pure\ quadratic} = MS_{Pure\ quadratic}$ kan infogas i ANOVA-tabellen (Tabell 3), och ett hypotestest likt det som utfördes i Ekvation 9 och Ekvation 10 kan formuleras enligt

$$H_0 : \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} = 0 \quad (14)$$

$$H_1 : \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} \neq 0 \quad (15)$$

genom att förkasta H_0 då $F_0 = \frac{MS_{Pure\ quadratic}}{MS_{PE}} > F_{\alpha,1,n_C-1}$ och således konstatera att kvadratiske effekter måste tas i åtanke.

En problematik uppstår vid formuleringen av en regressionsmodell med samtliga huvud-, interaktions- och kvadratiske effekter likt den som beskrivs i Ekvation 11, efter 8 faktorial- och n_C centralpunktmätningar. Modellen består av 11 odefinierade parametrar, men antalet unika experimentpunkter uppgår endast till 9. Det är i detta läge möjligt att utöka designen med 6 *axialpunkter*, placerade så att de kodade variablerna befinner sig vid avstånd $\sqrt{3}$ och $-\sqrt{3}$ från centralpunkterna. En schematisk tabell över de kodade parametervärdena för parameter A, B och C i en design med 8 faktorialpunkter, 4 centralpunkter och 6 axialpunkter redovisas i Tabell 4 [34]^d.

Tabell 4: Schematisk tabell för design med faktorial- central- och axialpunkter.

| Experiment | A | B | C |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | 1 | 1 | -1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | -1 | 1 | 1 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | $\sqrt{3}$ | 0 | 0 |
| 14 | $-\sqrt{3}$ | 0 | 0 |
| 15 | 0 | $\sqrt{3}$ | 0 |
| 16 | 0 | $-\sqrt{3}$ | 0 |
| 17 | 0 | 0 | $\sqrt{3}$ |
| 18 | 0 | 0 | $-\sqrt{3}$ |

2.5.5 Regressionsmodellering

Det är möjligt att skriva om den regressionsmodell som presenterades i Ekvation 11 på linjär form. Ett godtyckligt exempel på hur en sådan omskrivning sker visas nedan

$$\begin{aligned} y &= \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \epsilon \\ &= \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_5 x_5 + \epsilon \end{aligned} \quad (16)$$

där $\beta_3 = \beta_{12}$, $x_3 = x_1 x_2$ och så vidare. Denna omskrivning gör det möjligt att ställa upp uttrycket

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\epsilon} \quad (17)$$

där:

$$\mathbf{y} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix}, \mathbf{X} = \begin{pmatrix} 1 & x_{1,1} & \cdots & x_{1,k} \\ 1 & x_{2,1} & \cdots & x_{2,k} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{n,1} & \cdots & x_{n,k} \end{pmatrix}, \boldsymbol{\beta} = \begin{pmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_n \end{pmatrix}, \boldsymbol{\epsilon} = \begin{pmatrix} \epsilon_1 \\ \epsilon_2 \\ \vdots \\ \epsilon_n \end{pmatrix}$$

Notera här att \mathbf{X} baseras på den designmatris som valts (jämför med Tabell 2), och att y_i är mätvärdet för parametervärden $x_{i,1}, x_{i,2}, \dots, x_{i,k}$. Det är möjligt att skatta på $\boldsymbol{\beta}$ enligt

$$\hat{\boldsymbol{\beta}} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}'\mathbf{y} \quad (18)$$

och därmed bygga en regressionsmodell enligt:

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\hat{\boldsymbol{\beta}} \quad (19)$$

En variansanalys på regressionsmodellen och dess ingående komponenter beräknas på ett liknande sätt som i kapitel 2.5.3, där skillnaden är att kvadratsummorna beräknas med linjär algebra. Ett uttryck för SS_E kan ställas upp som

$$SS_E = \mathbf{y}'\mathbf{y} - \hat{\boldsymbol{\beta}}'\mathbf{X}'\mathbf{y} \quad (20)$$

vilket härleds ur att residualen för regressionsmodellen ges av

$$\mathbf{e} = \mathbf{y} - \hat{\mathbf{y}} \quad (21)$$

SS_T kan skrivas som:

$$SS_T = \mathbf{y}'\mathbf{y} - \frac{\left(\sum_{i=1}^n y_i\right)^2}{n} \quad (22)$$

SS_R , det vill säga kvadratsumman av residualen, kan ställas upp enligt

$$\begin{aligned} SS_E &= SS_T - SS_R \\ SS_R &= SS_T - SS_E \end{aligned} \quad (23)$$

och en ANOVA-tabell kan ställas upp enligt Tabell 5

där k betecknar antalet β borträknat β_0 . Genom att testa F_0 mot $F_{\alpha,k,n-k-1}$ beräknas hypoteserna

$$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \cdots = \beta_k = 0 \quad (24)$$

$$H_1 : \beta_j \neq 0 \text{ för åtminstone ett } j \quad (25)$$

Tabell 5: ANOVA-tabell för regressionen.

| Källa | Kvadratsumma | Frihetsgrader | Mean Square | F_0 |
|------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
| Regression | SS_R | k | MS_R | MS_R/MS_E |
| Error | SS_E | $n - k - 1$ | MS_E | |
| Total | SS_T | $n - 1$ | | |

Hypotestester på enskilda regressionskoefficienter är nödvändiga för att kunna utesluta de parametrar som är insignifikanta. De hypoteser som ska testas är då

$$H_0 : \beta_j = 0 \quad (26)$$

$$H_1 : \beta_j \neq 0 \quad (27)$$

I det fall H_0 inte kan förkastas utesluts parameter x_j ur modellen. Teststatistikan som används är

$$t_0 = \frac{\hat{\beta}_j}{\sqrt{\sigma^2 \hat{C}_{jj}}} \quad (28)$$

där en skattning av standardavvikelsen, betecknad $\hat{\sigma}^2$, beräknas enligt

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{SS_E}{n - p} \quad (29)$$

där $p = k + 1$. C_{jj} i Ekvation 28 är diagonalelementet i $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ som korresponderar mot $\hat{\beta}_j$. Vi kan förkasta nollhypotesen i Ekvation 27 i det fall $|t_0| > t_{\alpha/2, n-k-1}$.

Ett mått på hur bra modellen passar, R_{adj}^2 , kan beräknas enligt

$$R_{adj}^2 = 1 - \frac{SS_E/(n - p)}{SS_T/(n - 1)} \quad (30)$$

där $0 < R_{adj}^2 < 1$ [34]^e.

2.6 Analysmetoder

Två vanliga analysmetoder inom biopolymerisk analys är infraröd (IR) spektroskopi samt kärnmagnetisk resonans, på engelska "Nuclear Magnetic Resonance" (NMR), som används för att karakterisera och identifiera molekylär sammansättning. IR används främst för att identifiera funktionella grupper medan NMR ger information om kolväteskelett när det kommer till uppbyggnad och struktur.

2.6.1 Infraröd spektroskopi

IR är en analysmetod som används för att identifiera olika typer av funktionella grupper i organiska material. I denna metod utnyttjas det faktum att olika bindningar mellan atomer har olika vibrationsfrekvens. Infraröd strålning har en våglängd på runt 1000 nm vilket motsvarar ca 3×10^{14} Hz vilket är ungefär samma frekvens vid vilken molekyler vibrerar. Frekvensen i en bindning är beroende av massan hos molekylens atomer samt bindningens styvhet. En molekyl med lätta atomer och en stel bindning har en högre vibrationsfrekvens och absorptions sker därför vid en högre energi än hos en molekyl med tyngre atomer och mindre stela bindningar. Då en infraröd stråle passerar genom provet och strålens frekvens överensstämmer med frekvensen hos en viss bindning absorberas energi. I detta skede minskar intensiteten av strålningen som når detektorn, vilket avbildas på ett IR- spektrum. På detta vis kan kovalenta bindningar och funktionella grupper i ett ämne identifieras. Det är dock svårt att säga något om ett ämnes

molekylstruktur med denna analysmetod och ofta kompletteras IR-spektroskopi med NMR för att identifiera molekylstrukturer [35]^a, [36]^a.

Några av de karakteristiska bindningar och funktionella grupper som förväntas ge utslag i ett IR-spektrum av arabinoxylan visas i Tabell 6, medan några av de funktionella grupper som skiljer lignin från övriga ämnen visas i Tabell 7. Cellulosa förväntas ge utslag vid samma frekvenser som arabinoxylan, något som försvårar särskiljande av polymererna med enbart ett IR-spektrum.

Tabell 6: Vågta till några av de bindningar och funktionella grupper som återfinns i arabinoxylan [37], [38]^a.

| Område cm^{-1} | Bindning | Intensitet | Föreningar i arabinoxylan |
|-------------------------|----------|----------------------|---|
| 3600-3100 | O-H | Medium | Koordinerat vatten |
| 3550-3500 | O-H | Medium | Fri OH, karboxylsyror (låg koncentration) |
| 3550-3450 | O-H | Varierande och skarp | Intermolekylärt bundna OH (dimer) |
| 3400-3225 | O-H | Stark och bred | Intermolekylärt bundna OH (polymerisk) |
| 3000-2815 | C-H | Svag till stark | Olika kolvätebindningar |
| 1720-1700 | C=O | Stark | Karboxylsyror |
| 1440-1395 | C-O | Svag | Karboxylsyror |
| 1240-1070 | C-O-C | Svag | C-O Etrar |
| 1200-1000 | C-OH | Svag | Alkoholer |

Tabell 7: Vågta till några av de bindningar och funktionella grupper som återfinns i lignin [37], [38]^a.

| Område cm^{-1} | Binding | Intensitet | Föreningar i lignin |
|-------------------------|---------|-------------------|--|
| 3100-3000 | C-H | Svag till medium | CH i aromater |
| 2835-2815 | C-H | Stark | CH i metylethers (O-CH ₃) |
| 1625-1585 | C=C | Stark till medium | Aromatiska/konjugerade bindningar i bensen |
| 720-600 | O-H | Svag | Fenoler |

2.6.2 Kärnmagnetisk resonans

NMR är en analysmetod som används för att få information om molekylen struktur, det vill säga kol-väte-uppbyggnaden och dess skelett. Tekniken kan användas för alla atomslag som uppvisar kärnmagnetisk resonans. Karakteristiskt för dessa typer av atomkärnor är ett ojämnt antal neutroner och/eller ett ojämnt antal protoner. Beroende på elektrondensiteten runt atomkärnor får de spinn med olika frekvenser då de utsätts för ett starkt magnetfält. I ett NMR-spektrum visas signalerna från dessa frekvenser som toppar. Vidare kan atomer ha flera olika spintillstånd. Vätekärnan, som endast har två spintillstånd, är enklast att beskriva. När kärnan utsätts för ett starkt magnetfält kommer dessa två spinn att ordna sig antingen parallellt till fältet eller anti-parallellt. Detta kommer att ge upphov till två energinivåer som vidare resulterar i att spektrumets toppar splittras beroende på hur många väten som sitter på närliggande atomer. Små molekyler som inte innehåller flera typer av vätekonfigurationer ger ett sådant utslag i spektrumet att topparna ofta är välseparerade och relativt enkla att tolka. För biopolymerer däremot finns det många väten i molekylen som ger näst intill identiska utslag på grund av identisk konfiguration. Följden blir ett spektrum med många överlappande signaler och komplikationer vid fastställandet av polymerens exakta struktur. Vanligtvis kan det endast konstateras att den innehåller eller saknar olika typer av molekylfragment, vilket i hemicellulosans fall skulle vara olika kolhydrater [35]^b.

I ett ¹H-NMR-spektrum visas toppar för arabinoxylan vid 5.2-5.4 ppm och för xyloser vid 4.4-4.7 ppm [39]. Vid 4.5 ppm och vid 5.2 ppm går det även att återfinna glukostoppar, det vill säga cellulosa-fragment [40]. Slutligen visar sig aromatringer vid 7 ppm, något som är utmärkande för lignin [36]^b.

För att få mer detaljerad information gällande struktur kan HSQC-NMR tillämpas. HSQC-NMR ger ett 2D-spektrum där ^1H - och ^{13}C -NMR korrelerar [38]^b. Vid katjonisering av polysackarider går det att tyda att kovalent bunden EPTMAC ger en signal i ett HSQC-spektrum vid (3.1;85) ppm [40].

3 Materiel

Hemicellulosa extraherades ur kornskal som levererades i mald form från företaget Lyckeby Culinar AB, Kristianstad. Torrhalten bestämdes med hjälp av en IR-ugn, IR-35 Denver Instruments, vid 160 °C. IR-analys genomfördes med Perkin Elmer Spectrum One instrument med frekvenser mellan 500-4000 cm^{-1} . Tabletterna till IR-analysen pressades med 0.3 g kaliumbromid och 0.002 g av materialet som skulle analyseras. NMR utfördes på ett Varian 400 System med frekvenserna 400 MHz för protondetektion och 100 MHz för koldetektion. ^1H -NMR genomfördes med ett frekvensomfång på 6410 Hz (16ppm), pulsvinkel 45°, temperatur 25 °C och med åtta genomförda pulser per prov. Som referenspunkt sattes vattensignalen till 4.8 ppm. ^{13}C -NMR genomfördes med ett frekvensomfång på 25000 Hz (250 ppm), pulsvinkel 45°, temperatur 25 °C och med 1024 pulser per prov.

Samtliga centrifugeringar under extraktionsprocessen utfördes med Thermo Scientific Heraeus Megafuge 40. Skakbadet som använts är en OLS200, Grant. En viraduk av nylonfiber med porstorlek 5 μm användes vid filtrering av proverna. Dialysslangar som använts var Spectra/Por 2 membrane, MWCO: 12-14,000, spectrum laboratoris inc. Vakuumentrifugeringen utfördes med *The Genevac RocketTM Evaporation System*.

Kemikalier som har använts genomgående utgörs av 12.1 M saltsyra från Sigma Aldrich som späddes till 0.05 M, 98% natriumhydroxid från Eka Nobel som späddes till 4 M och 1 M, natriumborhydrid (NaBH_4) från Sigma Aldrich, 80% natriumklorit från Sigma Aldrich och 100% ättiksyra från Sigma Aldrich. Vid modifieringen användes EPTMAC från Fluka.

4 Metod

Följande avsnitt beskriver inledningsvis hur råvara valts ut. Vidare presenteras metod för extraktion, där även försöksplaneringens upplägg beskrivs närmare. Avslutningsvis beskrivs hur modifieringen utförts.

4.1 Val av råvara

Vid val av råvara betraktades aspekter som tillgänglighet, miljöpåverkan och nyttogörande. Efter omfattande litteraturstudier valdes kornskal vilket är en restprodukt från jordbruksindustrin. Kornskal har idag få användningsområden och att använda det för storskalig framtagning av hemicellulosa riskerar inte att konkurrera med andra industrier. Exempelvis riskeras inte delar av livsmedelsindustrin att utkonkurreras, då kornskal inte innehar något näringsvärde för människan. Utöver detta är kornskal en lokal restprodukt, vilket minimerar transportsträckor vid en eventuell industriell uppskalning av extraktionen.

4.2 Extraktion ur malt kornskal

Metoden för extraktionen är baserad på en artikel av Höije.A et al. [7], där anpassningar gjorts till befintlig utrustning samt den utformade försöksplanen. En schematisk bild över extraktionen kan ses i Figur 4.

10 g malt kornskal á 18 satsar vägdes upp i rundkolvar och 100 ml 0,05 M HCl tillsattes till vardera rundkolv. Proverna fick stå förslutna på omrörning under 16 timmar. Därefter centrifugerades proverna under 15 minuter, 4300 rpm. Fiberpelleten sparades och tvättades med 500 ml avjonat vatten genom en viraduk med hjälp av vakuumentrifugering. De tvättade fibrerna löstes sedan i 100 ml avjonat vatten. pH kontrollerades i vardera prov, varpå det titrerades till ett på förhand bestämt värde (se Tabell 8) med hjälp av ättiksyra och NaOH.

När pH justerats tillsattes NaClO_2 (se Tabell 8) och kolvarna sattes på värmeplatta under omrörning med en given temperatur (se Tabell 8). Efter två timmar fick proverna svalna till rumstemperatur. Därefter centrifugerades proverna var för sig, fiberpelleten sparades och tvättades med 500 ml avjonat vatten på samma sätt som efter den föregående centrifugeringen. En lösning med 99.5 massprocent 1 M NaOH och 0.5 massprocent NaBH_4 förbereddes. Vid varje enskilt försök tillsattes sedan 100 ml av denna lösning till fibrerna. Proverna sattes i ett rumstempererat skakbad under 16 timmar och titrerades därefter till pH 7 med hjälp av 12.1 M HCl och 4 M NaOH.

De neutraliserade proverna sattes på dialys till dess att en jämviktskonduktivitet på 12-20 $\mu\text{S m}^{-1}$ uppnåts. Produkten efter dialys tvättades ytligt med 50 ml avjonat vatten genom en viraduk och genomflödet indunstades med hjälp av en vakuumcentrifug. Det torkade materialet vägdes och utbytet beräknades.



Figur 4: Schematisk bild över extraktionsmetoden.

4.2.1 Försöksplanering för extraktion

De tre parametrar som valts att variera i extraktionsprotokollet var pH-värde i steg 2, mängd natriumklorit i steg 3a samt temperatur i steg 3b (se Figur 4).

18 extraktionsförsök utfördes. Tabell 8 beskriver vilka värden de variabla parametrarna hade vid varje försök samt ordningen i vilken de utfördes.

Tabell 8: Experimentella värden för försöksplaneringsparametrarna.

| Experiment | pH | $m \text{ NaClO}_2(\text{g})$ | $T(^{\circ}\text{C})$ |
|------------|-----|-------------------------------|-----------------------|
| 1 | 4.5 | 2.60 | 82.0 |
| 2 | 3.5 | 2.60 | 82.0 |
| 3 | 4.5 | 1.80 | 82.0 |
| 4 | 3.5 | 1.80 | 82.0 |
| 5 | 4.5 | 2.60 | 68.0 |
| 6 | 3.5 | 2.60 | 68.0 |
| 7 | 4.5 | 1.80 | 68.0 |
| 8 | 3.5 | 1.80 | 68.0 |
| 9 | 4.0 | 2.20 | 75.0 |
| 10 | 4.0 | 2.20 | 75.0 |
| 11 | 4.0 | 2.20 | 75.0 |
| 12 | 4.0 | 2.20 | 75.0 |
| 13 | 4.9 | 2.20 | 75.0 |
| 14 | 3.1 | 2.20 | 75.0 |
| 15 | 4.0 | 2.89 | 75.0 |
| 16 | 4.0 | 1.51 | 75.0 |
| 17 | 4.0 | 2.20 | 87.1 |
| 18 | 4.0 | 2.20 | 62.9 |

När samtliga prover var färdiga användes mätvärdena för att ställa upp en regressionsmodell i MATLAB. Algoritmen som användes finns tillgänglig i Appendix C. Huvudeffekter, interaktionseffekter och kvadratiska effekter beräknades. Genom att eliminera de effekter som inte uppvisat signifikans kunde en regressionsmodell ställas upp.

4.2.2 Extraktionsförsök med optimala parametervärden

Efter fastställandet av optimala parametervärden utfördes fem extraktioner baserade på dessa, där pH-värdet i steg 2 i Figur 4 sattes till 3.1 och mängd NaClO_2 i steg 3a i Figur 4 sattes till 3.02 g.

Dessa prover utgick från 20 g våtvikt malt kornskal vardera och utfördes enligt ordinarie extraktionsprotokoll med övriga kemikalievolymer fördubblade. Industning av proverna skedde med hjälp av rullindunstning följt av ugnstorkning i 80°C under 16 timmar.

4.3 Modifiering av hemicellulosa

Modifieringen utgick från ett protokoll framtaget av Bigand V. et al. [33]. Hemicellulosa från prov 4, 6, 8, 14 och 18 (se Tabell 8) löstes i avjonat vatten till en koncentration på 45.5 g l^{-1} . 44 ml av lösningen värmdes under 20 minuter, 41°C . 10 ml 1.66 M NaOH adderades och lösningen sattes på omrörning vid 41°C under ytterligare 20 minuter. Därefter adderades 9.85 g EPTMAC och lösningen fick stå under rådande förhållanden i fem timmar till.

Lösningen fick svalna till rumstemperatur, varpå dess pH titrerades till 5 med HCl. 150 ml etanol tillsattes sedan droppvis för att fälla ut den modifierade hemicellulosan. Lösningen filtrerades och tvättades med etanol, filterkakan torkades i ugn under 24 timmar, 80°C .

5 Resultat

I följande avsnitt presenteras resultat från torrhaltsbestämning, extraktion och modifiering samt resultat från IR- och NMR-analyser.

5.1 Torrhaltsbestämning

I de 18 försök som ingick i försöksplaneringen extraherades hemicellulosa från 10 g malt kornskal. Torrvikten på startmaterialet för varje sådant försök beräknades till 8.813 g utifrån den genomsnittliga torrhalten som bestämdes till 88.13 massprocent.

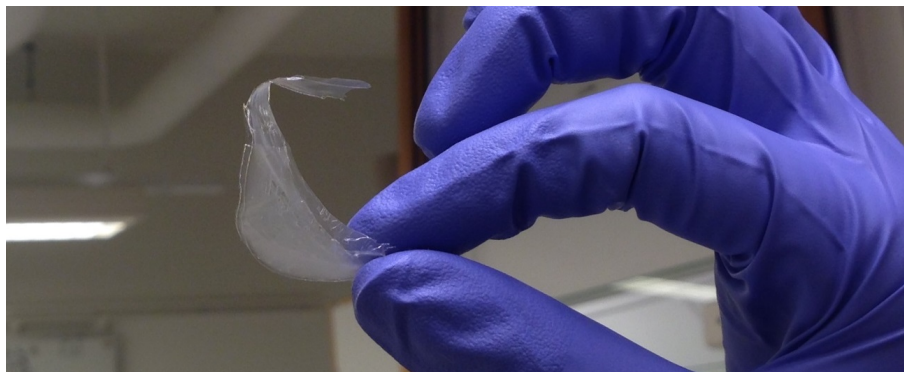
5.2 Extraktion av hemicellulosa

Tabell 9 presenterar den erhållna massan för samtliga prover förutom prov 12, då inget beräknat utbyte kunnat erhållas från detta. Massan presenteras som den totala massan efter vakuumcentrifugeringen angiven i gram. Utbytet som anges i tabellen ges av kvoten mellan det extraherade materialets massa och den ursprungliga torrviktsmassan.

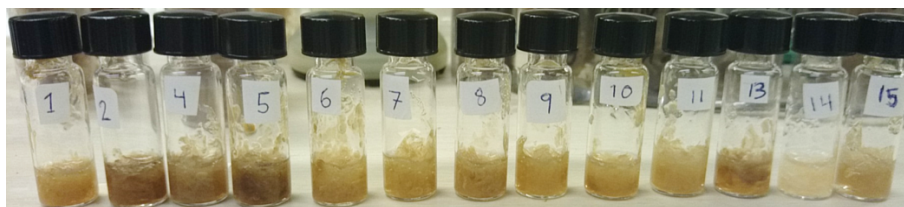
Tabell 9: Resultat från försöksplaneringsprov.

| Experiment | Extraherad hemicellulosa (g) | Utbyte (%) |
|------------|------------------------------|------------|
| 1 | 1.79 | 20.3 |
| 2 | 1.80 | 20.4 |
| 3 | 2.09 | 23.7 |
| 4 | 1.60 | 18.2 |
| 5 | 2.04 | 23.1 |
| 6 | 1.75 | 19.9 |
| 7 | 1.82 | 20.7 |
| 8 | 1.70 | 19.3 |
| 9 | 1.68 | 19.1 |
| 10 | 1.58 | 17.9 |
| 11 | 1.50 | 17.0 |
| 12 | N/A | N/A |
| 13 | 1.35 | 15.3 |
| 14 | 2.14 | 24.3 |
| 15 | 1.75 | 19.9 |
| 16 | 2.23 | 25.3 |
| 17 | 1.50 | 17.0 |
| 18 | 1.80 | 20.4 |
| Genomsnitt | 1.77 | 20.1 |

Ur samtliga avslutade extraktionsförsök erhöles ett filmbildande material med plastliknande egenskaper, se Figur 5. Färgen på materialet varierade mellan en ljus gul nyans och en mörkare brun nyans, se Figur 6. Samtliga prover var lösliga i vatten.



Figur 5: Extraherad och torkat material med filmbildande egenskaper.



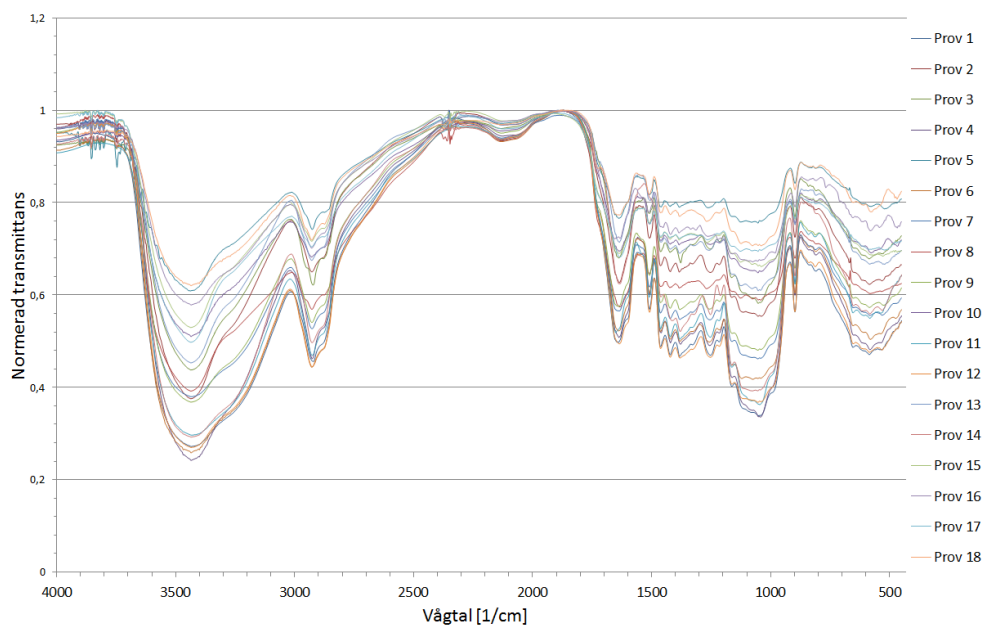
Figur 6: Skillnad i nyans mellan extraherade prover som är lösta i deuteriumoxid innan analys med $^1\text{H-NMR}$.

5.2.1 Analys av extraktionsprover

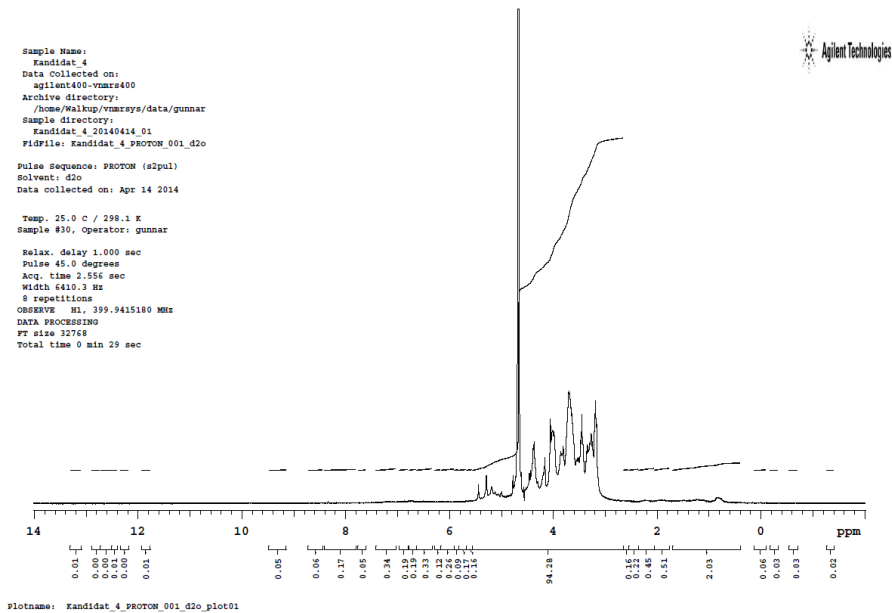
I Figur 7 visas en graf över samtliga provers normerade IR-spektrum. De är normerade genom att transmittansvärdena för varje prov delats med det högsta transmittansvärdet i mätserien. Samtliga prover i försöksserien har toppar vid samma vågtal, och följer en tydlig trend.

Samtliga IR-spektrum visar en bred topp vid området $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ något som indikerar en blandning av O-H bindningar samt koordinerat vatten. En mindre bred topp mellan vågtalet $2925\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ tyder på olika C-H bindningar i materialet. En stark topp vid 1630 liknar bäst de utslag som konjugerade C-C-bindningar i bensenringar uppvisar. Den utbredda toppen vid $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ talar för C-O bindningar som alkoholer och etrar ger utslag till (se Tabeller 6 och 7).

I Figur 8 visas ett NMR-spektrum från prov 4. Då samtliga NMR-spektra visar samma toppar exemplifieras ett utvalt spektrum, varav spektrumen från prov 1-3 och 5-18 exkluderat 12 visas under bilaga B.1. I spektrumet går det att urskilja en tydlig topp vid $4.6\text{-}4.8\text{ ppm}$. Dessa toppar visar ändgrupperna på xylan. Två toppar vid $5.2\text{-}5.4\text{ ppm}$ visar på att provet innehåller arabinoxylan. Då ingen synlig topp erhållits vid 7 ppm tyder detta på att det ej finns lignin i provet.



Figur 7: Normerade IR-spektrum för samtliga prover i försöksplaneringen.



Figur 8: NMR-spektrum över extraherad hemicellulosa från prov 4.

5.2.2 Regressionsmodellering

Mängden extraherad material (se Tabell 9) användes tillsammans med parametervärdena i Tabell 8 för att erhålla följande modell:

$$m_{Hemicellulosa} = 6.96305 - 0.3226pH - 3.45675m_{NaClO_2} + 0.745m_{NaClO_2}^2 \quad (31)$$

Ekvation 31 beskriver det signifikanta sambandet mellan parametervärden och utbyte. Beräkningarna i Ekvation 32 visar att parametervärdena har en signifikansgrad på 95%, och Ekvation 34 visar att modellen är signifikant till 99%.

$$\begin{aligned} |t_0| - t_{0.95,13} : \beta_0 &= 32.8253 \\ \beta_1 &= 2.2853 \\ \beta_2 &= 0.0277 \\ \beta_{22} &= 1.2771 \end{aligned} \quad (32)$$

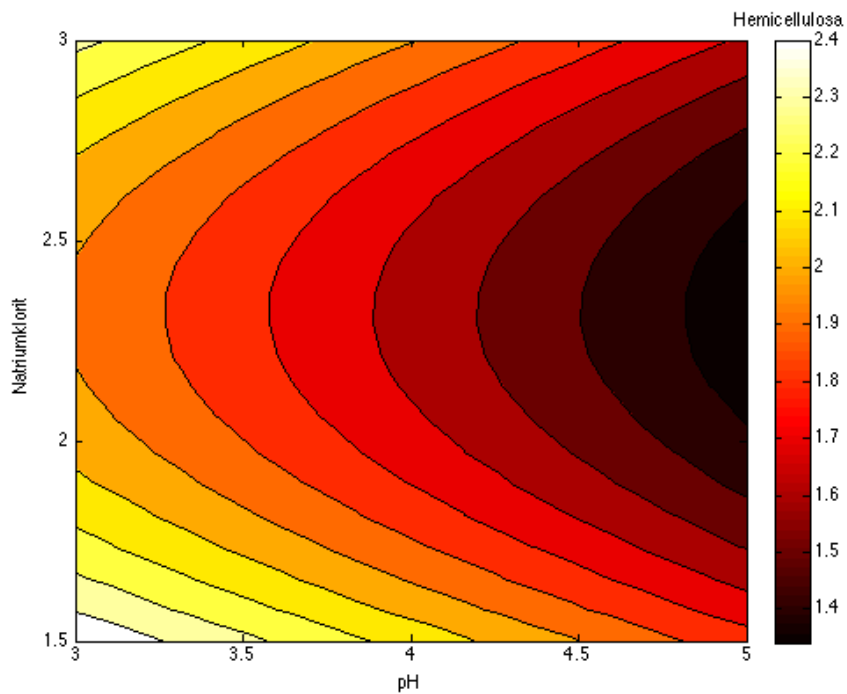
$$\begin{aligned} R^2 &= 0.6903 \\ R_{adj}^2 &= 0.6189 \end{aligned} \quad (33)$$

$$F_0(modell) - F_{0.99,3,13} = 3.9202 \quad (34)$$

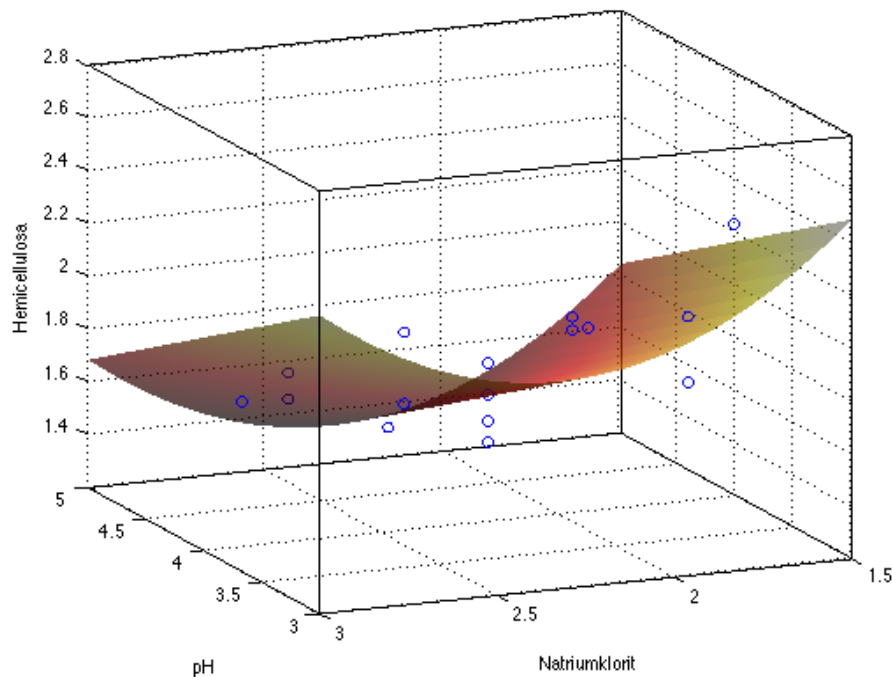
Temperaturen visade sig vara insignifikant vilket kan styrkas om parametern återinförs i MATLAB-koden i Appendix C. Statistiska testresultat redovisas i Ekvation 32, 33 och 34. Statistiska beräkningar samt regressionsmodellering gjordes i MATLAB, algoritmen som användes finns tillgänglig i Appendix C.

I Figur 9 visualiseras Ekvation 31 som en konturgraf. Utbytet material når ett maximalt värde vid pH 3.1 och 1.5 g NaClO₂. I Figur 10 visas samma funktion som en tredimensionell

yta där kvadratiska effekter av NaClO_2 syns tydligt. Figuren redogör också för resultaten efter de 18 utförda extraktionsförsöken. Värden på pH och mängden NaClO_2 för samtliga punkter visas i Tabell 8. Mängd extraherat material för varje punkt redovisas i Tabell 9.



Figur 9: Konturgraf över den ej kodade regressionsmodellen. Ytan beskrivs av Ekvation 31. "Natriumklorit" åsyftar dess massa i gram och "Hemicellulosa" syftar på extraherat material i gram.



Figur 10: Regressionsyta med extraktionsresultat. Ytan beskrivs av Ekvation 31 och extraktionsresultaten visas individuellt som blå cirklar. "Natriumklorit" åsyftar dess massa i gram och "Hemicellulosa" åsyftar extraherat material i gram.

5.2.3 Optimering

Tabell 10 visar massan extraherat material från de prover som ämnade att verifiera modellen. Det teoretiska maximala värdet enligt modellen var 4.87 g per 20 g startmaterial. Det genomsnittliga värdet uppnådde 86% av det förväntade värdet. Torrvikten för samtliga optimumprover var 17.63 g. Utbytet som anges i tabellen är kvoten mellan materialets massa och torrviktsmassa på proverna. Resultaten för Opt1 och Opt2 förkastades då de bedömdes inte vara tillförlitliga.

Tabell 10: Resultat från optimeringstest.

| Prov | Extraherad hemicellulosa (g) | Utbyte (%) |
|------------|------------------------------|------------|
| Opt1 | N/A | N/A |
| Opt2 | N/A | N/A |
| Opt3 | 3.93 | 22.3 |
| Opt4 | 3.98 | 22.6 |
| Opt5 | 4.64 | 26.3 |
| Genomsnitt | 4.18 | 23.7 |

5.3 Modifiering

Vid modifieringen erhöles ett ljust pulveraktigt material som till skillnad från ursprungsmaterialet inte var filmbildande (se Figur 11). NMR-spektrum för materialet visas i Figur 12. Precis som i de omodifierade proverna syns tydliga toppar vid 4.6-4.8 ppm vilket tyder på att provet innehåller xyloser. De två mindre topparna runt 5-5.4 ppm indikerar särskilt förekomsten av

arabinoxylan. Ett utslag som ej finns i något av de omodifierade provernas NMR-spektrum är den topp som är synlig vid 3.2 ppm.

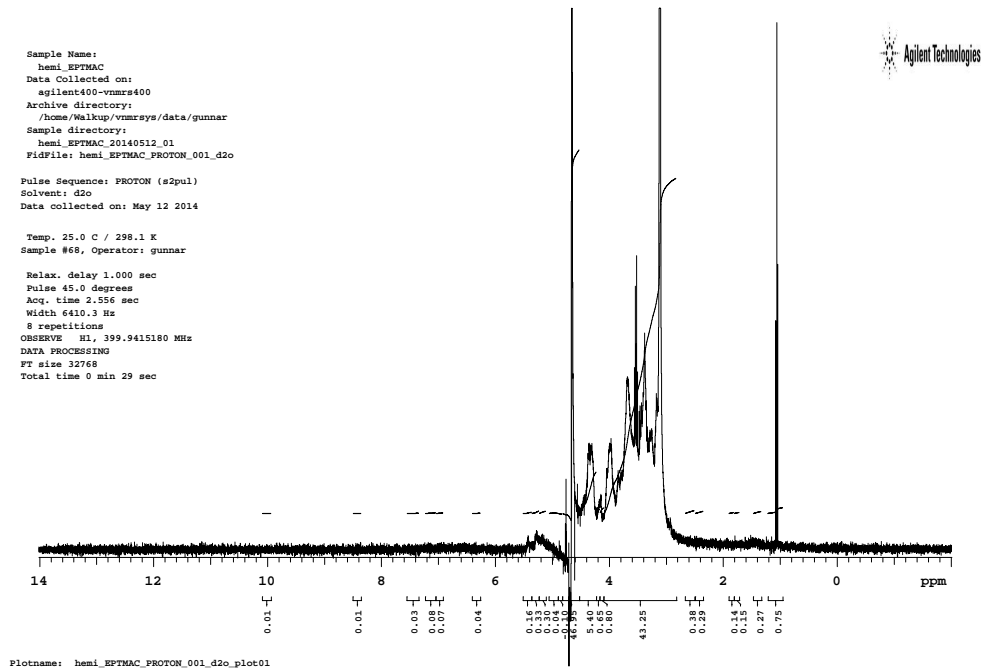


Figur 11: Det icke filmbildande modifierade materialet.

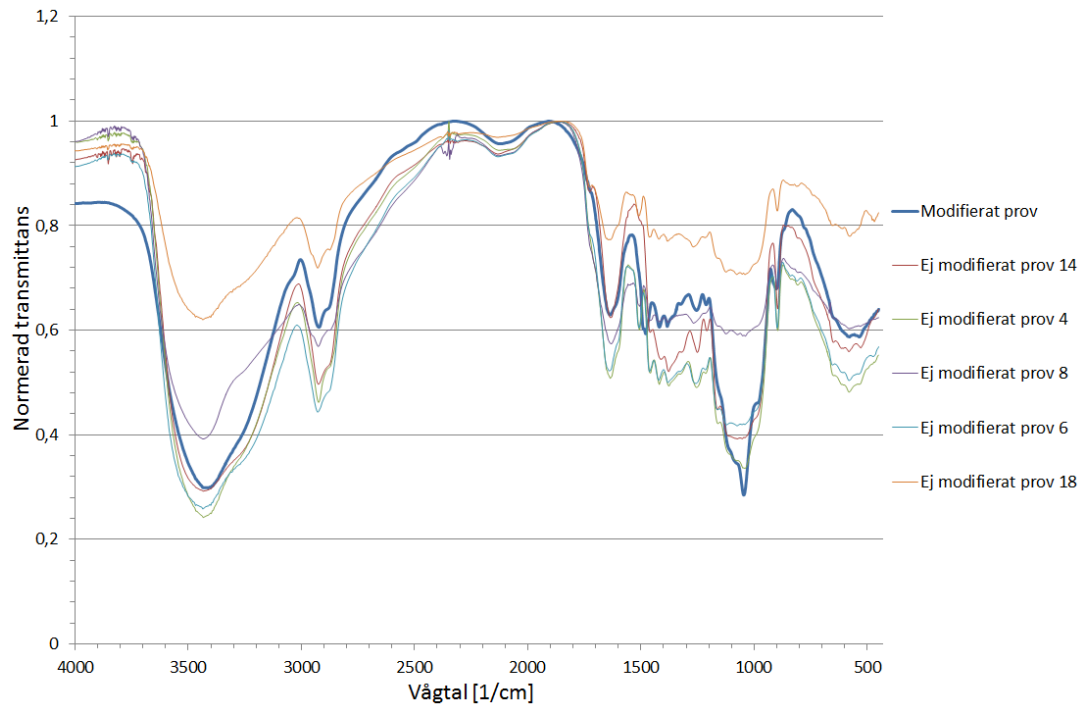
I Figur 13 visas ett normerat IR-spektrum över det modifierade provet samt de enskilda omodifierade proverna innan de blandades och modifierades. Här går det ej att urskilja några större skillnader i topparna före gentemot efter modifieringen skett.

HSQC-NMR-spektrumet i Figur 14 visar en topp vid (3.1; 85) som påvisar att det finns kovalent bundet EPTMAC.

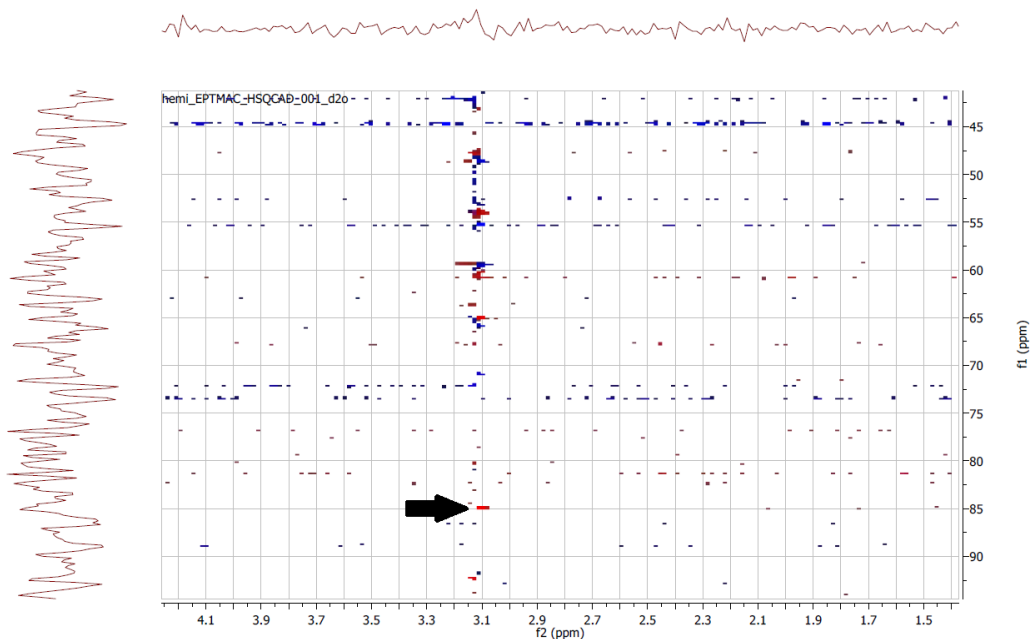
Det utfördes även en analys med ^{13}C -NMR, men det gick inte att urskilja något av värde ur den (se Figur 31 i Appendix B.2).



Figur 12: NMR-spektrum över modifierat arabinosylian.



Figur 13: Normerat IR-spektrum för modifierat arabinosylian och ursprungsprover.



Figur 14: HSQC-spektrum över modifierad hemicellulosa, där pilen markerar den relevanta toppen.

6 Diskussion

I följande avsnitt diskuteras resultaten som presenterats under avsnitt 5.

6.1 Karakterisering av extraherat material

Hemicelluloser är heterogena polymerer med varierande längd och många förgreningar, vilket kan komma att påverkas av extraktionsförhållanden. Trots detta går det ut ur IR-spektrumet i Figur 7 urskilja en tydlig trend mellan de 18 försöken vilket visar att samtliga prover har liknande sammansättning. Den varierande transmittansen som skiljer proverna i grafen kan förklaras av skillnader i homogenitet i de tabletter som skapades till IR-analyserna.

Arabinoxylan och cellulosa innehåller olika O-H-bindningar i form av alkoholer vilka förväntas ge utslag i ett IR-spektrum. Dessa kommer att koordinera vatten runt arabinoxylan och cellulosa. Det koordinerade vattnet tillsammans med OH-grupperna bundna till polymererna kan förklara de breda utslagen vid $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$, se Figur 7 samt Tabell 6.

Utslaget vid $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ påvisar flertalet olika C-H-bindningar. Väteatomer bundet till kol är närvarande i både cellulosa, lignin och hemicellulosa, vilket gör det svårt att dra slutsatser från detta utslag.

Enligt Tabell 7 skulle närvaro av aromatiska C-C-bindningar ge ett måttligt till kraftigt utslag vid $1625\text{-}1585\text{ cm}^{-1}$. Utslag vid 1630 cm^{-1} i Figur 7 kan förklaras med C-C-bindningar i bensen, vilket är en förening som kännetecknar lignin. Det är däremot svårt att säga något om ligninets kvantitet i proverna från ett IR-spektrum.

Utslaget mellan vågtalen $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ är något vagt i vissa prover, men skulle kunna beskrivas av C-O-bindningar i olika eterformationer och alkoholer som finns närvarande i både arabinoxylan och cellulosa.

Sammanfattningsvis går det inte att utesluta närvaron av lignin med hjälp av IR-spektroskopi, då C-C-bindningar som ger utslag för lignin påvisats. Vidare går det heller inte att utesluta närvaron av cellulosa genom IR-spektroskopi, då utslag som indikerar bindningar typiska för cellulosa och arabinoxylan sammanfaller.

Analys med $^1\text{H-NMR}$ (se Figur 8) visar en tydlig topp vid 4.7 ppm, samt två toppar mellan 5.2-5.4 ppm. Topparna vid 5.2-5.4 ppm påvisar närvaro av arabinoxylan och toppen vid 4.7 ppm indikerar xylos. Xylosmonomerer ska ha avlägsnats i dialysen och det är därför troligt att det är ändgrupper i polymeren hos arabinoxylan som syns. Att ändgrupperna syns tydligt på NMR-spektrumet indikerar att polymererna är relativt korta. En viss nedbrytning av polymererna är oundviklig under delignifiering och extraktion.

Lignin består till stor del av aromatgrupper och skulle resultera i en tydlig topp vid 7 ppm. Dock erhålls ej dessa karakteristiska toppar i spektrumet, vilket motsäger resultaten från IR-spektroskopin. Aromaternas frånvaro från $^1\text{H-NMR}$ kan förklaras i att ligninet i det extraherade materialet, likt arabinoxylan, återfinns i stora aggregat eller polymerer. Detta skulle kunna skapa mycket utbredda toppar vid 7 ppm, vilket kan ses i vissa $^1\text{H-NMR}$ -spektrum.

Under förbehandling med HCl och delignifiering med natriumklorit avlägsnades det mesta av fetterna samt lignin närvarande i kornskalen. I extraktionssteget löstes arabinoxylan i natriumhydroxid och olösligt material filtrerades bort. Den fasta fasen bestod främst utav cellulosa men kan även ha innehållit andra hydrofoba ämnen, såsom lignin-aggregat bundet till cellulosa. Endast lignin och cellulosa som har gjorts vattenlösligt under extraktionssteget kan ha följt med filtratet. Cellulosa är endast vattenlösligt då dess polymerer har reducerats till mycket kort längd. Cellulosa är motståndskraftigt mot behandling av NaOH och det är därför mindre troligt att den ska ha fragmenterats. Skulle små fragment av nedbruten cellulosa trots detta bildats vid NaOH-behandling bör dessa försvunnit med osmos under dialysen då korta sackarider kunnat passera fritt över dialysmembranet.

Stora lignin-aggregat närvarande i det extraherade materialet är i sig själva inte vattenlösliga. Dess vattenlöslighet hade kunnat förklaras av kovalenta bindningar till arabinoxylan. Eftersom syftet var att erhålla arabinoxylan med hög polymeriseringsgrad har milda extraktionsbetingelser valts, vilket förklarar att kovalent bunden lignin kan återfinnas i viss mån i extraktionsmaterialet. Detta stämmer även överens med den bruna färgen på de extraherade proverna som varierar i nyans (se Figur 6).

En ytterligare lättillgänglig metod för att fastställa kompositionen i produkten skulle vara att göra en kolhydratanalys. Detta kunde inte genomföras på grund av tidsbrist. Med hjälp av kolhydratsanalys hade halten glukos, xylos och arabinos kunnat fastställas. Ur den informatinen hade det kunnat avgöras hur mycket cellulosa relativt hemicellulosa som återfunnits i det extraherade materialet. Samtligt material som extraherats visade på filmbildande tendenser. Dock har utvärdering av filmernas egenskaper inte rymts inom tidsramarna för detta projekt.

6.1.1 Regressionsmodellering

Modellen som framtogs (se Ekvation 31 samt Figur 9 och och 10) visade att pH och mängd NaClO_2 var signifikanta för utbytet av hemicellulosa. Inom området som undersöktes visade sig utbytet vara som lägst då mängden NaClO_2 antog sitt centralpunktsvärde. När mängden NaClO_2 avvek från centralpunkten ökade utbytet. Det maximala utbytet över det intervall som undersöktes erhöles vid det lägsta undersökta värdet för NaClO_2 , vilket är positivt då det innebär att mer hemicellulosa extraheras när en minskad mängd NaClO_2 används.

Eftersom NaClO_2 är den kemikalie som används för att avlägsna lignin måste frågan ställas huruvida det ökade utbytet för låga mängder NaClO_2 beror på ligninrester i produkten. Dock kunde ingen korrelation hittas mellan mängd NaClO_2 tillsatt under delignifiering och färg på proverna (se Figur 6).

Experiment 16 (se Figur 8) fick ett väldigt högt utbyte. Det höga utbytet i kombination med att detta försök var det som hade enskilt lägst mängd NaClO_2 i försöksserien gjorde att det hade hög inverkan på modellens kurvatur i NaClO_2 -riktning. Det finns inte någon anledning till att anta att detta resultat är missvisande och bör ha uteslutits vid modelleringen. Därför hade det varit lämpligt att upprepa detta försök för att se om det höga utbytet kan återskapas.

Temperaturen visade sig vara insignifikant i modellen. Hade spannet mellan temperaturens hög- och lågvärden ökat tillräckligt hade en effekt kunnat ses, då temperatur och reaktivitet är universellt korrelerade.

Regressionsmodellen i Figur 9 förutspår ett högt utbyte när både NaClO_2 och pH antar sina lägsta undersökta värden. Samtliga försök som utfördes i denna punkt (se Tabell 10) hade högre utbyte än det genomsnittliga utbytet för de 18 tidigare extraktionerna (se Tabell 9). Att höga utbyten kunde återskapas talar för modellens trovärdighet.

6.2 Modifiering

Modifieringsförsöket med EPTMAC resulterade i en produkt av pulverliknande karaktär istället för det omodifierade materialets filmbildande tendenser. $^1\text{H-NMR}$ -spektrumet i Figur 12 visade en tydlig topp vid 3.2 ppm som inte återfanns hos den omodifierade hemicellulosa. Denna topp är typisk för trimetylammoniumgruppen; en grupp som inte är naturligt förekommande i arabinoxylan men som finns i katjoniseringsreagenset.

För att fastslå att reagenset bundit kovalent till hemicellulosa utfördes en analys med HSQC-NMR. I spektrumet i Figur 14 syns en topp vid (3.1; 85). Denna topp är karakteristisk för kovalent bunden EPTMAC.

Det går inte att utifrån IR-analys dra några slutsatser gällande modifieringen, detta kan förklaras av att den tillagda gruppen maskeras av befintliga grupper (se Figur 13).

Den nya NMR-toppen vid 3.2 ppm tillsammans med de synbart förändrade materialegenskaperna talar för att modifieringen var framgångsrik. Att det är möjligt att katjonisera arabinoxylan utökar dess potentiella användningsområden avsevärt eftersom katjoniserade polysackarider idag används inom en rad olika industrier.

7 Slutsats

Samtliga extraktionsförsök resulterade i olika massutbyten av material med liknande sammansättning. Materialet som extraherades från kornskal innehöll polymerisk arabinoxylan med en viss mängd lignin bundet till sig. Kvarstoden av lignin i materialet beror sannolikt på de milda extraktionsbetingelserna som krävdes för att förhindra nedbrytning av arabinoxylan. Det samlade materialet som extraherades visade på filmbildande tendenser. Dock har utvärdering av filmernas egenskaper inte rymts inom detta projekt.

En statistiskt säkerställd modell har skapats för extraktion av arabinoxylan från kornskal. Modellen skapades genom att variera tre parametrar. Två av dessa visade sig vara signifikanta inom det intervall de varierades. Temperatur var den parametern som visade sig vara insignifikant, vilket orsakades av att den inte varierades över ett tillräckligt stort intervall. Genom att återskapa optimala förhållanden med prover i större skala har modellens trovärdighet stärkts.

Den del av projektet som syftat till att kemiskt modifiera hemicellulosa har lyckats. Arabinoxylan modifierades med EPTMAC vilket kunde bevisas med hjälp av HSQC-NMR-analys, där nya kovalenta bindningar påvisades. Det är vidare tydligt från så väl $^1\text{H-NMR}$ som den synliga, makroskopiska förändringen att modifiering har skett.

8 Litteraturförteckning

- [1] V. Mittal, *Renewable Polymers: Synthesis, Processing, and Technology*, Wiley - Scrivener; 2012, s. 1.
- [2] R.A. Sheldon, "Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art", *Green Chemistry*, vol. 16, ss. 950-963, 2014.
- [3] C. Peroval et.al, "Modified arabinoxylan-based films: Grafting of functional acrylates by oxygen plasma and electron beam irradiation", *Journal of Membrane Science*, vol. 233, ss. 129-139, 2004.
- [4] J. Hua, C. Qingqing, G. Jianhong, Z. Yang, "Efficient extraction and characterization of polymeric hemicelluloses from hybrid poplar", *Carbohydrate Polymers*, vol. 101, ss. 1005-1012, 2014.

- [5] K. Leppänen, P. Spetz, A. Pranovich, K. Hartonen, V. Kitunen, H. Ilvesniemi, "Pressurized hot water extraction of Norway spruce hemicelluloses using a flow-through system", *Wood Science and Technology*, vol. 45, ss. 223-236, 2011.
- [6] C. Lew, "Adding Value Prior to Pulping: Bioproducts from Hemicellulose", *Global Perspectives on Sustainable Forest Management*, ss. 225-246, 2012.
- [7] A. Höije, M. Gröndahl, P. Tömmeraas, "Isolation and Characterization of physiochemical and material properties of arabinoxylans from barley husk", *Carbohydrate Polymers*, ss. 266-275, 2005.
- [8] A.M. Karaaslan, M.A. Tshabalala, G. Buschle-Diller, "Wood hemicellulose/chitosan-based semiinterpenetrating network hydrogels: mechanical, swelling and controlled drug release properties", *BioResources*, vol. 19, ss. 1036-1054, 2010.
- [9] A.C. Albertsson, M. Söderqvist Lindblad, E. Ranucci, M. Laus, E Giani, "Biodegradable Polymers from Renewable Sources: Rheological Characterization of Hemicellulose-Based Hydrogels", *Biomacromolecules*, vol. 6, ss. 684-690, 2005.
- [10] J. Lundgren, J. Helmerius, "Integration of a hemicellulose extraction process into a biomass based heat and power plant", *Proceedings of ECOS 2009: 22nd International Conference on Efficiency, Cost, Optimization, Simulation and Environmental Impact of Energy Systems*, 2009.
- [11] P.F. Vena, M.P. García-Aparicio, M. Brienzo, J.F. Görgens, T. Rypstra, "Effect of Alkaline Hemicellulose Extraction on Kraft Pulp Fibers from *Eucalyptus Grandis*", *Journal of Wood Chemistry and Technology*, vol. 33, ss. 157-173, 2013.
- [12] C.S. Badal, "Hemicellulose bioconversion", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, ss. 279-291, 2003.
- [13] M.H. Thomsen, A. Thygesen, A.B. Thomsen, "Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis", *Bioresource Technology*, vol. 99, ss. 4221-4228, 2008.
- [14] F. Peng, P. Peng, F. Xu, R.C. Sun, "Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses", *Biotechnology Advances*, vol. 30, ss. 879-903, 2012.
- [15] M. Pauly et.al, "Hemicellulose biosynthesis", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, ss. 627-628, 2013.
- [16] A.M. Stepan, "Bioplastics from Biomass - Acetylation of Xylans with Green Chemistry", *Chalmers university of Technology*, s. 9, 2013.
- [17] A.G.J. Voragen, G.J. Coenen, R.P. Verhoef, H.A. Schols, "Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls", *Struct Chem*, vol. 20, ss. 263-275, 2009.
- [18] A.G. Cunha, A. Gandini, "Turning polysaccharides into hydrophobic materials: a critical review. Part 1 Cellulose", *Cellulose*, vol. 17, ss. 875-889, 2010.
- [19] D.P. Delmer, Y Amor, "Cellulose Biosynthesis", *The Plant Cell*, Vol. 7, ss. 987-1000, 1995.
- [20] R.C. Sun, X.F. Sun, J. Tomkinson, *Hemicelluloses and Their Derivatives*, Washington DC: American Chemical Society; 2003, ss. 2-22. [Internet] Tillgänglig på: ACS Publications
- [21] C.K. Mathews, K.E. Van Holde, D.R. Appling, S.J. Anthony-Cahill, *Biochemistry 4:th edition*, Upper Saddle River, New Jersey, USA: Pearson Canada Inc.; 2013: ss. 332-333.

- [22] A. Awal, M. Sain, "Characterization of Soda Hardwood Lignin and the Formation of Lignin Fibers by Melt Spinning", Centre for Biocomposites and Biomaterials Processing, s. 2765, 2013.
- [23] R.S. Rohella, N. Sahoo, V. Chakravortty, "Lignin Macromolecule", Regional Research Laboratory Bhubaneswar, Department of Chemistry Utkal University Bhubaneswar, ss. 60-61, 1997.
- [24] A.L. Horvath, "Solubility of Structurally Complicated Materials", The Journal of Physical Chemistry, vol. 35, nr. 1, s. 77-92, 2006.
- [25] A. Edringerová, Z. Hromádková, T. Heinze, "Hemicellulose", Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. 186 ss. 4-5, 2005.
- [26] "Korn", *Lantmännen*, Citerad: 2014-05-09, [Internet], Tillgänglig på: <http://lantmannen.se/aktiviteter/Sadesslaget/Artiklar/Korn/>
- [27] H. Krawczyk, T. Persson, A. Andersson, A.S. Jönsson, "Isolation of hemicelluloses from barley husks", Food and Bioproducts Processing, Vol. 86, s. 31, 2008.
- [28] A.A. Roos, T. Persson, H. Krawczyk, Zacchi G, Stålbrand H, "Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks", Bioresource Technology, vol. 100, s. 763, 2009.
- [29] A.G. Norman, "CXCVIII. The Hemicelluloses III. extraction and preparation", Biochem J, vol. 31, ss. 1579-1585, 1937.
- [30] D.N-S. Hon, N. Shiraishi, *Wood and cellulosic chemistry, 2:a upplagan*, New York: Marcel Dekker Inc; 2001, ss. 443-450.
- [31] Y. Wang, "cellulose fiber dissolution in sodium hydroxide solution at low temperature: dissolution kinetics and solubility improvement", Georgia Institute of Technology, 2008.
- [32] H.J. Prado, M.C. Matulewicz, "Cationization of polysaccharides: A path to greener derivatives with many industrial applications", European Polymer Journal, vol. 52, ss 53-75, 2014.
- [33] V. Bigand, C. Pinel, D. Da Silva Perez, F. Rataboul, P. Huber, M Petit-Conil, "Cationisation of galactomannan and xylan hemicelluloses", Carbohydrate Polymers, Vol. 85, ss. 138-148, 2011.
- [34] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments, 8:e internationella upplagan*, Hoboken: John Wiley & Sons; 2009, a) s. 241-248 b) s. 25-59 c) s. 254-255 d) s. 285-289 e) s. 449-466.
- [35] P. Atkins, L. Jones, *Chemical Principles: The Quest for Insight, 5:e upplagan*, New York : W.H.Freeman and Company; 2010, a) ss. 90-91 b) s. 791.
- [36] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, New York : Oxford University Press; 2001, a) ss. 65-72 b) s. 251.
- [37] United States of America. National Bureau of Standards. "Infrared Spectroscopy of Carbohydrates: A Review of the Literature", Washington DC: Department of Commerce, 1968.
- [38] J. B. Lambert, H. F. Shurvell, D. A. Lightner, R.G. Cooks, *Organic Structural Spectroscopy*, New Jersey: Prentice-Hall; 1998, a) ss. 188-199 b) ss. 131-133
- [39] S. Bengtsson, P. Åman, "Isolation and Chemical Characterization of Water-soluble Arabinoxylans in Rye Grain, Carbohydrate polymers", vol 12, ss. 267-277, 1990.
- [40] H. de la Motte , G. Westman , "Regioselective cationization of cellulosic materials using an efficient solvent-minimizing spray-technique", Cellulose, vol 19, ss. 1677-1688, 2012.

9 Appendix

A Beräkningar

A.1 Torrviktsbestämning

Torrvikten på startmaterialet för samtliga prov beräknades enligt Ekvation 35:

$$\text{torrvikt} = \text{våtvikt} * \text{torrhetshalt} \quad (35)$$

Utifrån Ekvation 35 beräknades torrvikten för de 18 prover som ingick i faktorialdesignen enligt Ekvation 36, och torrvikten för de fem optimeringsproverna enligt Ekvation 37. Värdet på torrhetshalten är 88.13%.

$$8.813\text{g} = 10\text{g} * 0.8813 \quad (36)$$

$$17.626\text{g} = 20\text{g} * 0.8813 \quad (37)$$

A.2 Beräkning av parametervärden vid faktorial- central- och axialpunkter

$$\xi_{Ci} = \frac{\xi_{i+} + \xi_{i-}}{2} \quad (38)$$

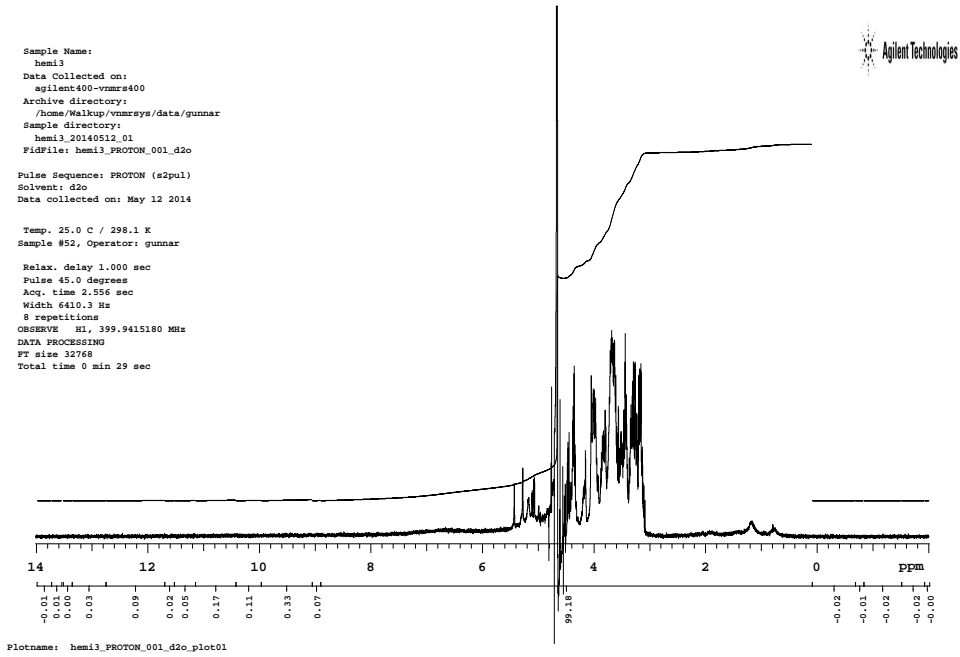
$$\xi_i = \xi_{Ci} \pm w_i \sqrt{3} \quad (39)$$

Ekvation 38 beskriver hur värdet för en parameter i i centralpunkten beräknas som medelvärdet av dess faktorialvärden ξ_{i+} och ξ_{i-} .

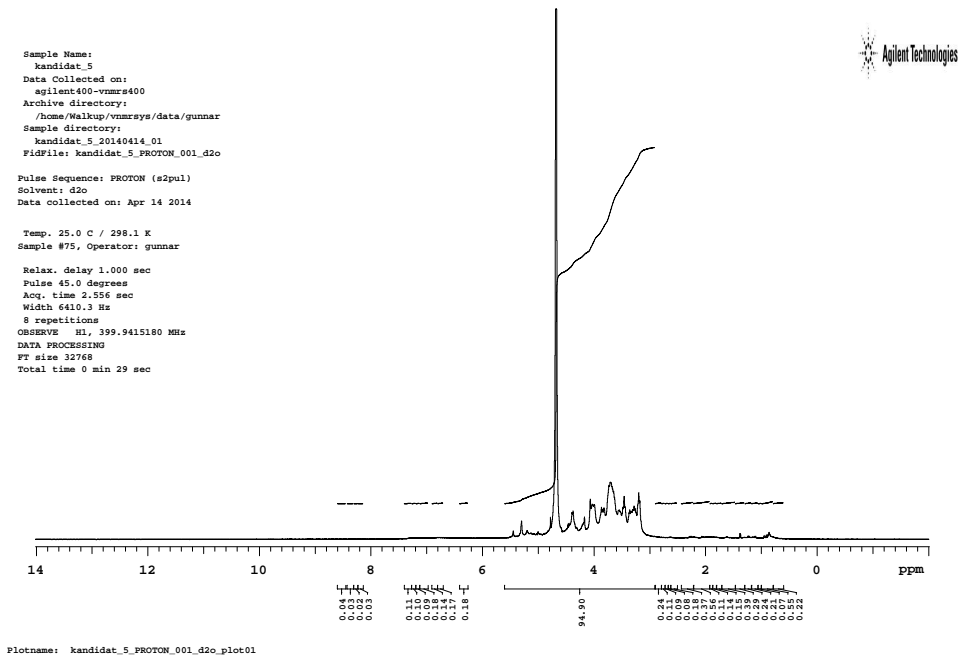
Ekvation 39 beskriver hur värdet för en parameter A i dess höga och låga axialpunkter beräknas, där $w_i = \xi_{Ci} - \xi_{i-} = \xi_{i+} - \xi_{Ci}$.

B Grafer

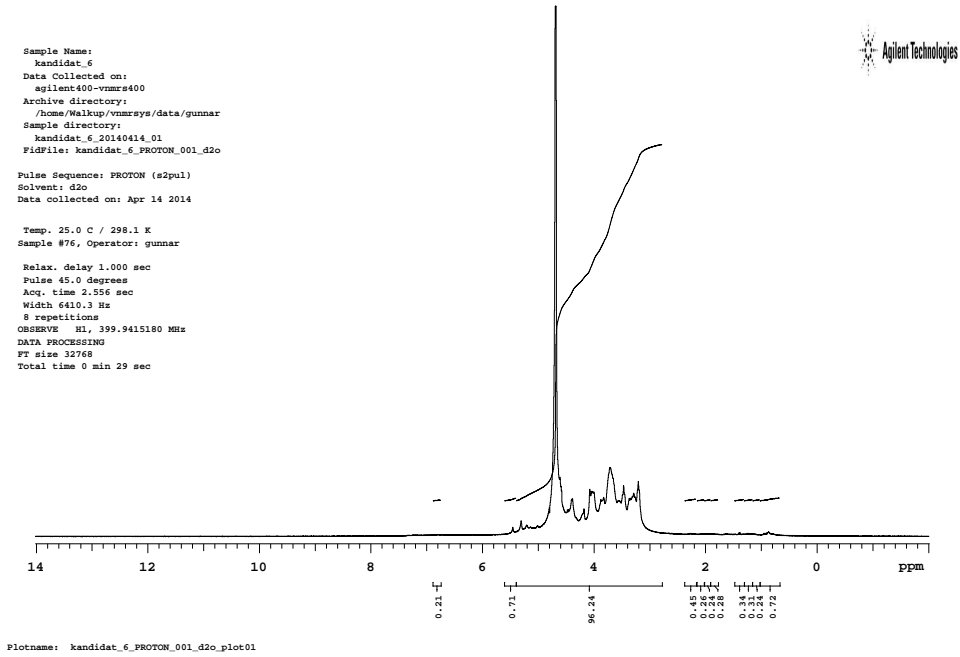
B.1 $^1\text{H-NMR}$



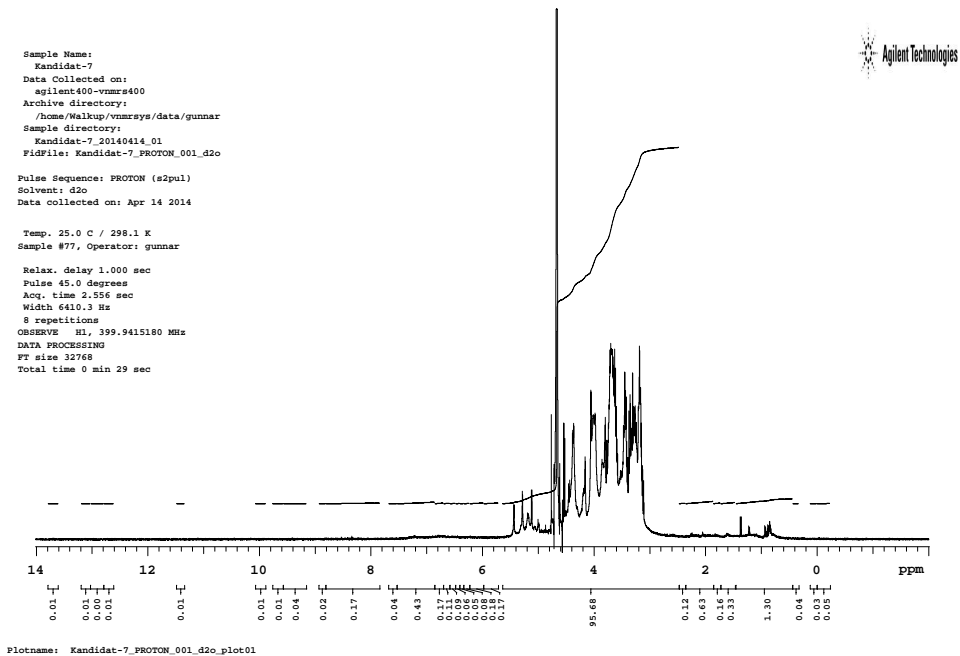
Figur 17: ^1H -NMR-spektrum för prov 3.



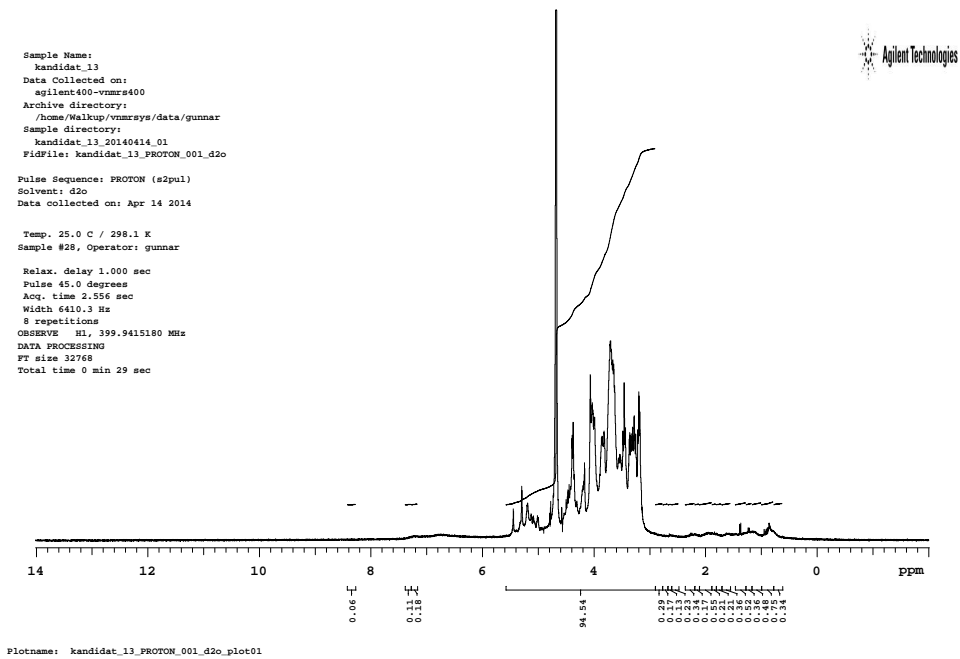
Figur 18: ^1H -NMR-spektrum för prov 5.



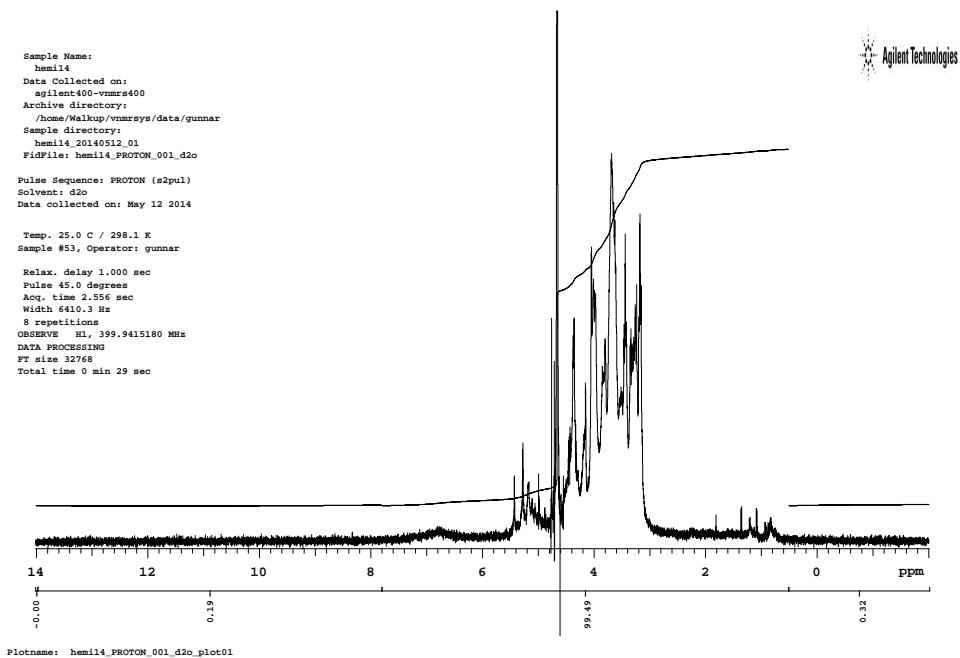
Figur 19: ^1H -NMR-spektrum för prov 6.



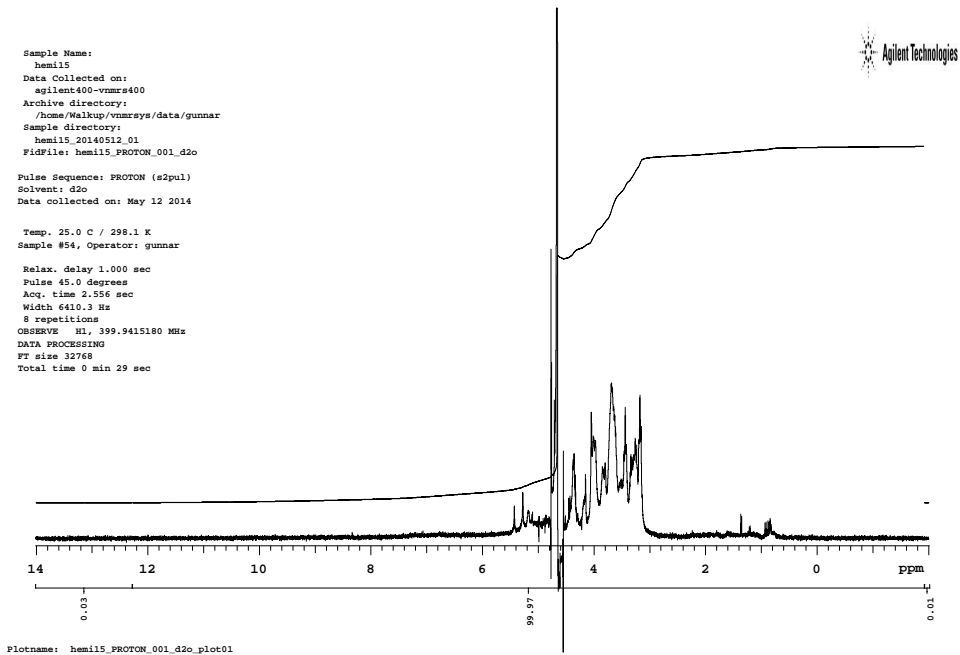
Figur 20: ^1H -NMR-spektrum för prov 7.



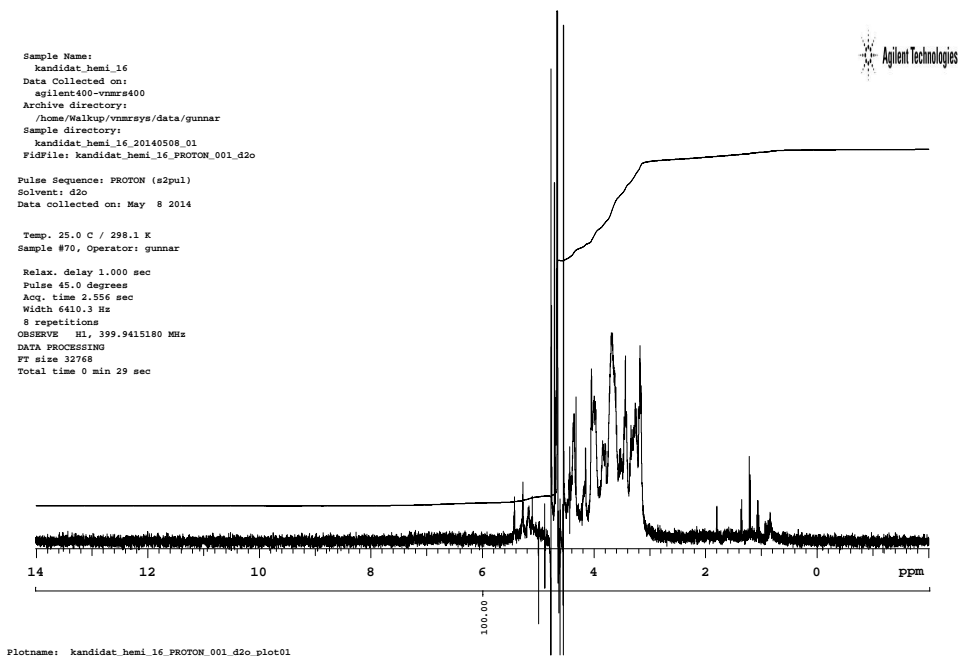
Figur 25: ^1H -NMR-spektrum för prov 13.



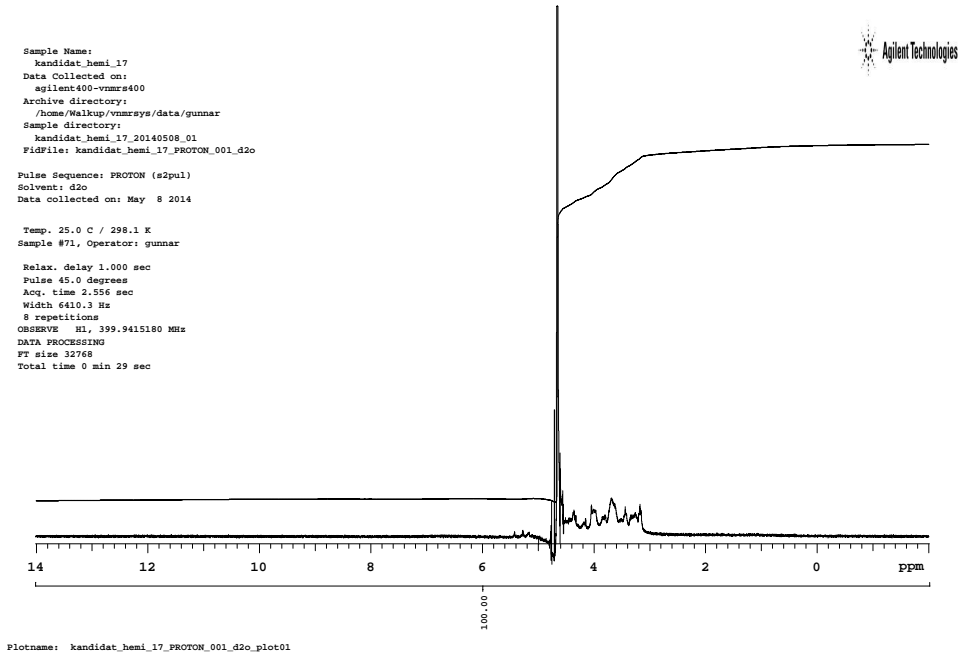
Figur 26: ^1H -NMR-spektrum för prov 14.



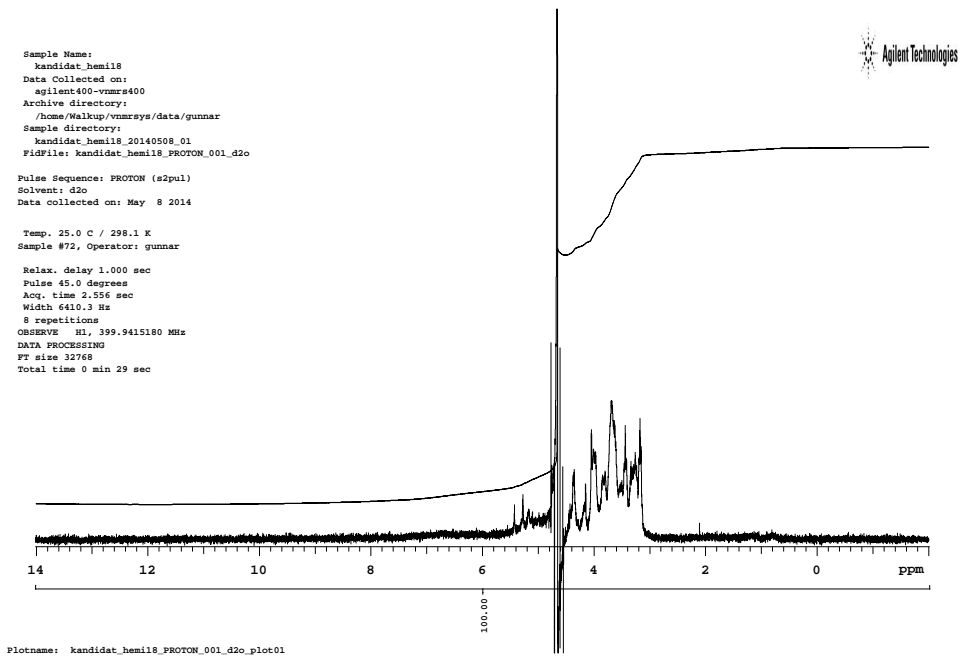
Figur 27: ^1H -NMR-spektrum för prov 15.



Figur 28: ^1H -NMR-spektrum för prov 16.

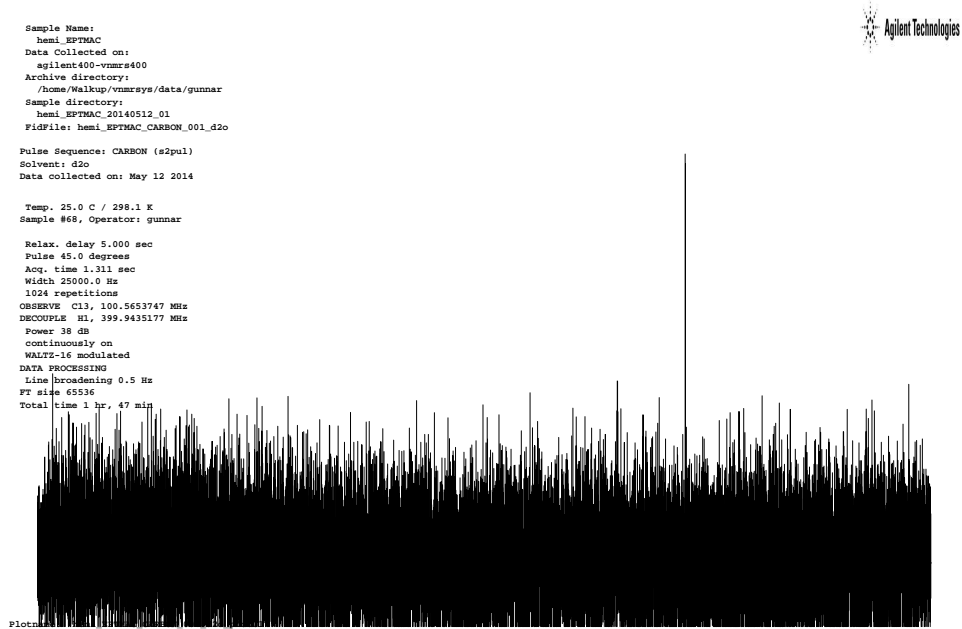


Figur 29: ^1H -NMR-spektrum för prov 17.



Figur 30: ^1H -NMR-spektrum för prov 18.

B.2 ^{13}C -NMR



Figur 31: ^{13}C -NMR-spektrum för modifierat prov.

C MATLAB-algoritm

```
clc
clear all
clf
hold off
%Bygg designmatrix

% (1) A B C
X1 = [ 1 -1 -1 -1
       1 1 -1 -1
       1 -1 1 -1
       1 1 1 -1
       1 -1 -1 1
       1 1 -1 1
       1 -1 1 1
       1 1 1 1
       1 0 0 0
       1 0 0 0
       1 0 0 0
       1 sqrt(3) 0 0
       1 -sqrt(3) 0 0
       1 0 sqrt(3) 0
       1 0 -sqrt(3) 0;
       1 0 0 sqrt(3)
       1 0 0 -sqrt(3) ];

I = X1(:,1);
```

```

    a = X1(:,2);
    b = X1(:,3);
    c = X1(:,4);
    X = [I a b b.^2]
%Den slutgiltiga funktionen. Det gar att lagga till eller ta bort kontraster,
%men dessa visade sig optimala efter en iterativ process med statistiska tester pa regr.

n = length(X);
%Antal matpunkter
p = size(X);
p = p(2);
%Antal parametrar beta
k = p-1;
%Antal beta bortraknat I
%
%Svarsvariabel, matvarden
y=[ 1.79
    1.8
    2.09
    1.6
    2.04
    1.75
    1.82
    1.7
    1.68
    1.58
    1.5
    1.35
    2.14
    1.75
    2.23
    1.5
    1.8];
%
%Tar diagonalvardesmatris C, anvands till berakning av
%regressionskoefficienter B samt t-test av dessa.

C = inv(X'*X);
%Berakning B

B = C*X'*y;
%
%Berakning Sum of Squares Error
SSE = y'*y - B'*X'*y
%
%Berakning varians sigmakvadrat

var = SSE/(n-p)
%
%Berakning t-varden.
tzero = zeros(p,1);
for i = 1:p
tzero(i) = B(i)/sqrt(var*C(i,i));
end
tzero = abs(tzero);

tscore = tzero - tinv(.95, (n - k - 1))
%negativa varden har betyder insignifikant koefficient
%
%Berakning SST (Total)
SST = y'*y - ((sum(y))^2)/n;

%Berakning SSR (Regression)

SSR = SST - SSE;
%
%Berakning R2 och R2adj, matt pa hur val modellen passar. Om R2 och R2adj
%skiljer sig mycket ar det, utOm rimligt tVivel, sannolikt att overflodiga termer ar med.

```

```

R2 = SSR/SST
R2adj = 1 - (SSE/(n-p))/(SST/(n-1))

%-----
%Berakning F0
MSR = SSR/k;
MSE = SSE/(n-k-1);
Freg = MSR/MSE;
Fscore = Freg - finv(.99, k, n - k - 1)

%-----
%Berakning Lack of Fit;
yC = mean(y(9:11));
SSPE = sum((y(9:11) - yC).^2);
SSLOF = SSE - SSPE;
m = 9;
MSPE = SSPE/(n-m);
MSLOF = SSLOF/(m-p);
Flof = MSLOF/MSPE - finv(.95, m-p, n-m);
if Flof > 0
    'Lack of fit'
end

%-----
%Quadratic effects
yF = mean(y(1:8));
yC = mean(y(9:11));
SSPQ = 8*3 * (yF-yC)^2 / (8 + 3);

Fqe = SSPQ / MSPE - finv(.95, 1, n-m);

if Fqe > 0
    'Quadratic effects'
end

%-----
% B
% [x1,x2] = meshgrid(-sqrt(3):0.1:sqrt(3));
% [x11] = .5.*x1 + 4;
% [x22] = .4.*x2 + 2.2;
% hold on
%domainezsurf = [-2,2,-2,2]
%ezsurf('1.6736-0.1613.*x1-0.0715.*x2+0.1192.*x2.^2', domainezsurf)
% xlabel('pH')
% ylabel('Natriumklorit')
% zlabel('Utbyte')
%scatter3(a,b,y)

% Kod ovan plottar y mot kodade variabler

% hold on
% domainezsurf = [3,5,1.5,3]
% ezsurf('1.6736-0.1613.*(x1 - 4)/.5-0.0715.*(x2 - 2.2)/.4+0.1192.*((x2 - 2.2)/.4).^2', domainezsurf);
% xlabel('pH')
% ylabel('Natriumklorit')
% zlabel('Utbyte')
% scatter3((a.*0.5 + 4),(b.*0.4 + 2.2), y);

%Kod ovan plottar y mot ickekodade variabler

x1=linspace(3,5,20); x2=linspace(1.5,3,20);
[XA,XB]=meshgrid(x1,x2);
Z=@(XA,XB)1.6736-0.1613.*(XA - 4)/.5-0.0715.*(XB - 2.2)/.4+0.1192.*((XB - 2.2)/.4).^2;
% contourf(XA,XB,Z(XA,XB)); %konturplot
% colormap(hot);          andrat fargschema
% colorbar;              %lagger till colorbar pa sidan
% h = colorbar;
% title(h,'Hemicellulosa')
% xlabel('pH')

```

```
% ylabel('Natriumklorit')

surf(XA,XB,Z(XA,XB),'facealpha', 0.7) %for 3dplot istallet
hold on
shading interp
camlight right
%lighting phong
material dull
grid on, box on
scatter3((a.*0.5 + 4), (b.*0.4 + 2.2), y, 'b');
xlabel('pH')
ylabel('Natriumklorit')
zlabel('Hemicellulosa')
```