CHALMERS

Extraktion av Biopolymerer ur Ettåriga Växter

Simon Mellconius

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Institutionen för Kemi och Kemiteknik
Examinator: Gunnar Westman
Göteborg, Sverige 2016
Kandidatarbete inom Organisk kemi

Förord

Jag vill först börja med att tacka professor Gunnar Westman för att ha tagit emot och gett tillstånd att använda lokaler och utrustning på institutionen för organisk kemi i Chalmers under perioden mars- maj 2016, samt även för en lärorik och underhållande handledning.

Tack till företaget Lyckeby Culinar AB som donerat kornskal och Lantmännen som bidrog med vete samt potatis.

Och även tack till mina medstuderande för trevligt sällskap.

Sammanfattning

Intresset för användning av biopolymerer har ökat då det ses som en potentiell ersättare av petroleumbaserade material. Dock krävs bättre extraktionsmetoder eller råvaror som håller polymeren intakt då vissa material kräver en större grad av polymerisation. Rapporten undersöker vilken råvara som är mest lämplig att extrahera lignin-kolhydratmaterial ur tre ettåriga växter; kornskal, vete och potatis med ett protokoll framtaget av institutionen för organisk kemi, Chalmers. Rapporten undersöker även två metoder där enbart hemicellulosa extraheras. Extrakten som analyserats med NMR, och cellulosan även med XRD, gav resultatet att den mest lämpliga råvara att använda vid extraktion var vete, som var enkel att hantera, hade ett högre utbyte av hemicellulosa och generera en mer kristallin cellulosa. Metoden som var bäst att extrahera hemicellulosa först var en kall alkali extraktion.

Abstract

The interest of biopolymers has increased since being seen as a potential replacement of petroleum-based materials. However, more efficient extraction methods or different raw materials that keep the polymer intact are required, as some materials require a greater degree of polymerization. This report studies the raw product that is most suitable for extracting lignin-carbohydrate materials from three oneyearold plants; barley husks, wheat and potatoes with a protocol prepared by the Department of Organic Chemistry, Chalmers. The report also covers two methods where hemicellulose is extracted only. The extracts analyzed with NMR, and the cellulose also with XRD, gave the result that the most suitable raw material to be used in the extraction method was wheat, which was easy to handle, had a high yield of hemicellulose and generated a more crystalline cellulose. The method that extracted hemicellulose best was the cold alkaline extraction.

Innehållsförteckning

1 Introduktion ... 1
1.1 Syfte ... 1
2 Teoretisk Bakgrund ... 2
2.1 Växtcellvägg ... 2
2.2 Cellulosa ... 3
2.2.1 Cellulosakritallinitet ... 4
2.3 Hemicellulosa ... 4
2.4 Lignin ... 5
2.5 Jordbruksrester ... 6
2.6 Extraktion av Lignin- kolhydratnätverk (LCC) ... 7
3 Materiel ... 9
4 Metod ... 9
4.1 Trestegsextraktion ... 9
4.2 Enstegsextraktion ... 11
4.2.1 Försök 1- Joniskt lösningsmedel ... 11
4.2.2 Försök 2- Kall alkalisk extraktion ... 11
4.3 Analys ... 12
4.3.1 Hydrolys ... 12
4.3.2 NMR- förbehandling ... 12
5 Resultat ... 13
5.1 Andel extraherat material ... 13
5.2 Iakttagelser av extraherat material ... 13
5.3 NMR-resultat ... 14
5.4 XRD-resultat av cellulosa ... 15
6 Diskussion ... 16
6.1Trestegsextraktion- val av råvara ... 16
6.2 Enstegsextraktion ... 17
6.3 NMR undersökning ... 17
7 Slutsats ... 17
8 Litteraturförteckning ... 18
9 Appendix ... 20
9.1 ^{1}H-NMR ... 20
9.2 XRD ... 24

1 Introduktion

Fossila bränslen har spelat den största rollen på energimarknaden under de senaste decennierna, och är än idag de viktigaste för energiförsörjningen [1]. Dock medför fossila bränslen en del problem. Bortsett från att de är ändliga råvaror (främst kol, olja/petroleum och metangas), så genererar de ett flertal miljöproblem. Dels hälsoskador på människor som utvinner och förädlar materialen, dels skador på växt, djurliv och ekosystem vid eventuellt spill, men även större global påverkan såsom luftföroreningar, surt regn och bidrar till den atmosfäriska växthuseffekten [1][2].

Sinande oljekällor, högre krav från myndigheter och en alltmer miljömedveten befolkning resulterar i en dyrare och mindre önskvärd produktion av petroleumbaserade polymerer [3][4]. Då de flesta plastmaterial består utav polymerer där råvaran nästan uteslutande kommer från fossila bränslen finns det intresse att ersätta dessa petroleumbaserade polymerer med förnyelsebara polymerer. Ett sådant alternativ är biopolymerer, och är molekyler som förts samman av levande organismer. Dessa material finns i överflöd som avfall från jordbruk och skogsbruk s.k. biomassa och innehåller huvudsakligen varierade mängder av cellulosa, hemicellulosa och lignin [1][3][4]. Förutom ersättning av petroleumplaster kan dessa derivat även användas som mer förädlade produkter såsom polymerer och molekyler för läkemedelsindustrin eller som bioetanol [1].

Ett antal metoder har utvecklats under de senaste åren som möjliggör en mer effektiv användning av jordbruksrester, såsom kornskal, vetehalm eller potatisskal. Dessa är rikliga rester i flera länder och har potential för användning som lågkostnadsråvaror då exempelvist Europa uppskattas producera över 170 miljoner ton vetehalm varje år [5]. Denna mängd är stor nog att användas som en källa till förnybara material, särskilt för framställning av kemiska derivat av cellulosa, hemicellulosa och lignin. Dessa komponenter kan inte separeras enkelt utan att ändra hemicellulosan, som är nära bundet till lignin och cellulosa-komponenter [1][5]. En av förutsättningarna för ett effektivt utnyttjande av biomassa är fraktionering av de viktigaste komponenterna (polysackarider och lignin) under relativt milda förhållanden, så att man begränsar de fysikaliska och kemiska förändringarna samt generera en acceptabel extraktionseffektivitet [1].

1.1 Syfte

Syftet med projektet är att dels finna en råvara av tre ettåriga växter; kornskal, vete och potatis som är mest lämplig att extrahera lignin, cellulosa och hemicellulosa, ur ett protokoll framtaget av institutionen för organisk kemi, Chalmers, samt finna en metod där hemicellulosa isoleras först. Extrakten skall analyseras med NMR för att verifiera att cellulosa och hemicellulosa har extraherats och cellulosa-kristalliniteten från respektive råvara skall även bestämmas med XRD.

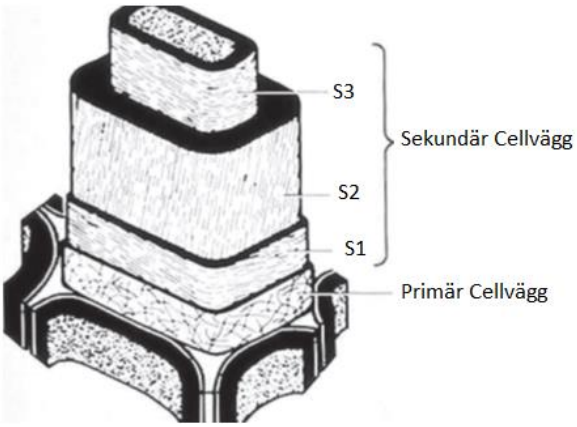
2 Teoretisk Bakgrund

Detta avsnitt beskriver hur växtcellväggar är uppbyggda, vad de innehåller samt hur de främsta biopolymererna i dessa extraheras.

2.1 Växtcellvägg

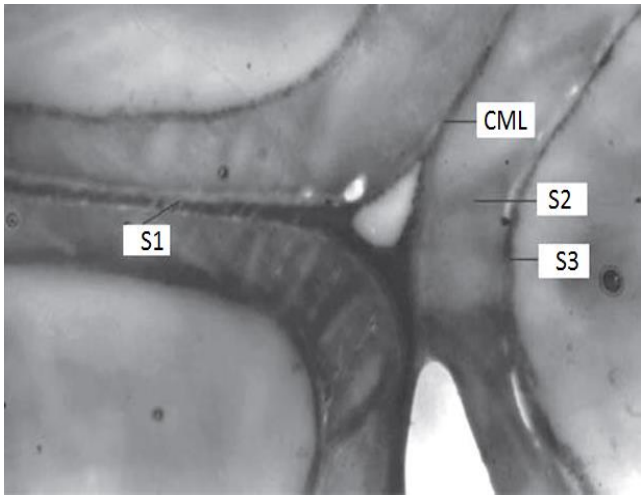
Cellväggen hos växter har ett varierat innehåll och distribution av cellulosa, lignin och hemicellulosa. Cellväggskonstruktionen bestämmer till stor del de kemiska, mekaniska och fysikaliska egenskaperna hos växter. En förståelse för cellväggens konstruktion är alltså viktig för både forskning och tekniska ändamål.

Växtcellväggen består av flera skikt; mittlamellen, den primära cellväggen och den sekundära cellväggen [3][4]. Mittlamellen är ett tunt lager som fäster ihop de enskilda växtcellerna för att bilda vävnad och är i princip helt fri från cellulosa. Primära cellväggen är ett tunt skikt bestående av cellulosa, hemicellulosa, pektin och protein där allt är bundet till lignin. Den sekundära cellväggen är uppdelad i tre skikt; det yttre skiktet (S1), mellanskiktet (S2), och det inre skiktet (S3) [8][10].



Figur 1: Förenklad bild av en växtcellvägg [8][9].

Mittlamellen ihop med primära cellväggen (CML), har en högre koncentration av lignin och hemicellulosa [10]. Det yttre skiktet (S1) utgör endast 10-20% av den totala cellväggen. Mellanskiktet (S2) bildar huvuddelen av cellväggen och tar upp 70-90% av cellväggen. Det inre skiktet (S3) är det tunnaste, med 2-8% av den totala cellväggsytan [8]. Cellväggstjockleken är alltså främst beroende på S2 skiktet där storleken bestäms av växtsäsong, ålder och morfologisk struktur. Noterbart är att vissa växter inte alltid har denna struktur, exempelvis saknar lövträd S3 skiktet [10].



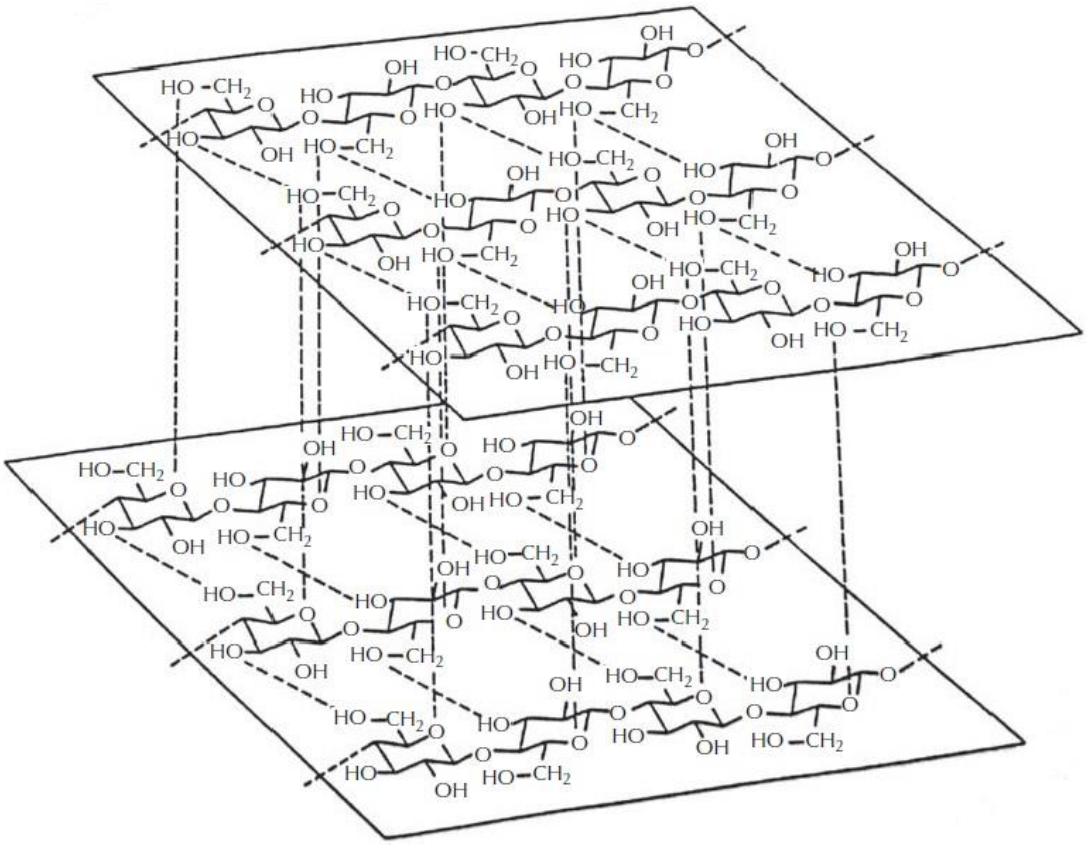
Figur 2: Utsnitt ur hörn av tre växtcellväggar förstorat 10000 ggr [8].

Olika studier har enligt Liu C. et al. [8] visat att cellulosainnehåll ökar från yttre till inre skikt, dvs. att halten cellulosa är högst i den sekundära väggen, speciellt i S2 och S3 skikten. Fördelningen av hemicellulosa är enligt samma källa störst i CML, följt av S1 och S3 skiktet, dock lägst halt hemicellulosa i mellanskiktet (S2). Studien visade även att S1 och S2 lagren har (i bl.a. ettåriga växter) en högre koncentration av två typer av hemicellulosa: xylan och mannan.

2.2 Cellulosa

Cellulosa är den mest förekommande organiska polymeren på jorden och finns i alltifrån välutvecklade träd till mer primitiva organismer som alger och bakterier [8]. Cellulosa är en linjär homopolymer, dvs. en kristallin polymer som består av β-1,4-glykosidbundet D-glukopyranosenheter och kan sträcka sig över 15 000 glukosenheter per molekyl [1][12].

Cellulosamolekyler i växter organiseras som långa smala buntar, mikrofibriller, och binds ihop av starka vätebindningar både inom och mellan mikrofibriller (figur 3), vilket ger växter ett yttre skydd mot förhållanden som exempelvist vind och regn [11]. Dessa nätverk av mikrofibriller är fördelade i kristallina och amorfa regioner. De amorfa regionerna uppstår där en cellulosakedja går från en fibrill till en annan [13] [8].

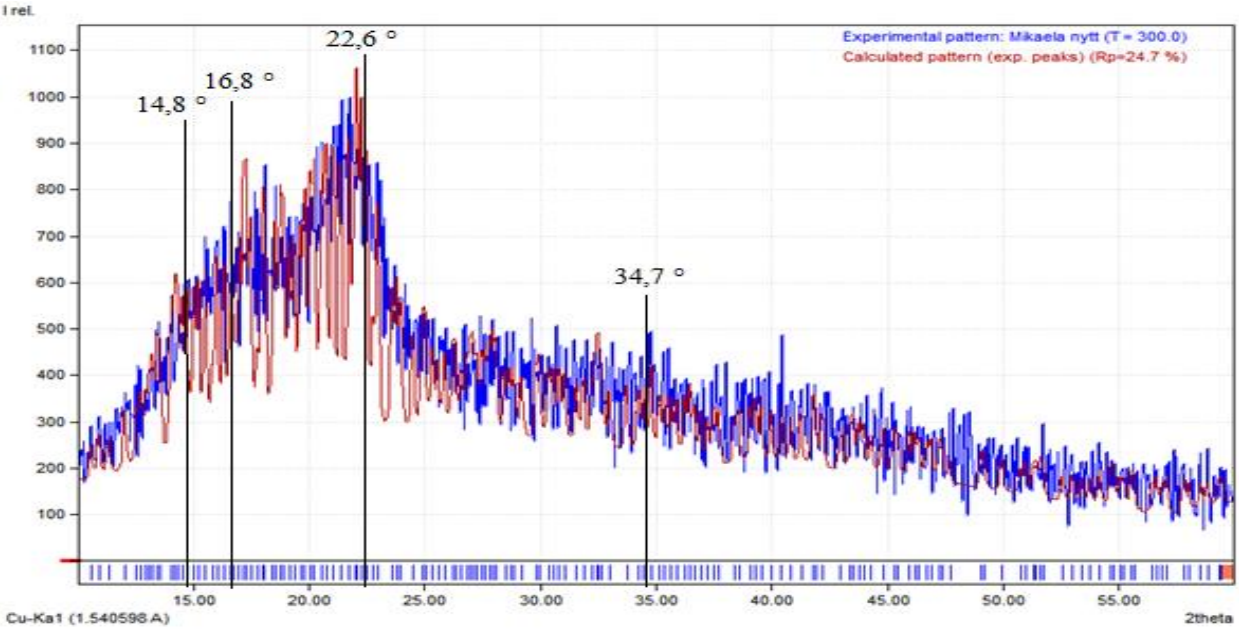


Figur 3: Kristallin nät av mikrofibriller [8]

Glukosresternas stolkonformation i cellulosa tvingar hydroxidgrupper i en viss positionering så att det uppstår en stark vätebindning mellan intilliggande cellulosakedjor och svagare hydrofob interaktion i andra änden. Den hydrofoba delen gör kristallin cellulosa resistent mot sur hydrolys eftersom den bidrar till bildandet av ett tätt skikt av vatten nära den hydratiserade cellulosans yta [14]. Olika typer av behandling kan hydrolyserna cellulosa, bl.a. med svällningsmedel såsom alkali, vilket kan göra cellulosa mindre kristallin och därmed enklare att klyva [12].

2.2.1 Cellulosakritallinitet

Det enda som skiljer olika cellulosa åt är alltså grad av polymerisation och kristallinitet. Vid bestämning av cellulosakristallinitet är röntgendiffraktion (XRD) mest pålitligt, varvid ett torrt prov belyses med röntgenstrålar och genererar ett spridningsmönster av elektroner, unikt för varje element [15]. Spridningsmönstren tolkas som diffraktogram med toppar och dalar av olika intensitet och utbredning. Typisk XRD-kurva av cellulosa (se figur 4) har starka kristallina toppar vid; 14,8 °, 16,8 ° samt 22,6 ° och svaga kristallina toppar vid 34,7 ° [8].



Figur 4: Diffraktogram av cellulosa

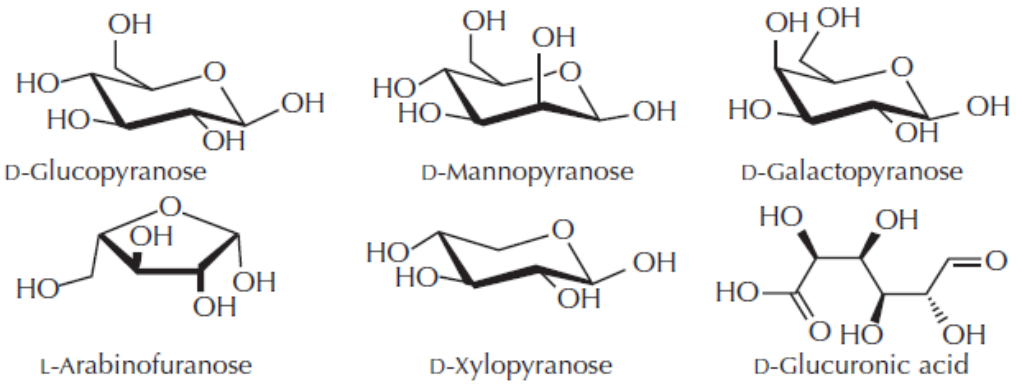
Kristalliniteten kan sedan beräknas från de diffrakterade intensitetsdata om man förutsätter en tvåfasstruktur (kristallin-amorf) där andel kristallinitet, X_c (%), beräknas med följande formel [8]:

$$X_c = \frac{A_{cr}}{A_{cr} + A_{am}} * 100$$

A_{cr} är arean av de kristallina topparna och A_{am} är arean av de amorfa topparna.

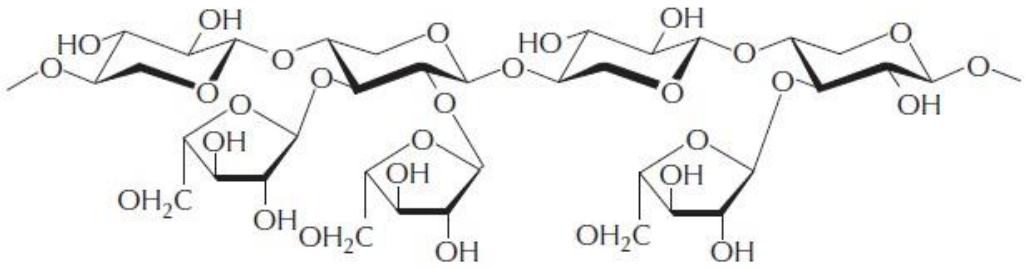
2.3 Hemicellulosa

Hemicellulosa är den näst mest förekommande grupp av biopolymerer på jorden och är främst amorfa heteropolymerer närvarande i bl.a. trä och ettåriga växter. Hemicellulosor består av olika typer och arrangemang av sockerenheter och är mestadels grenade polymerer med upp till 200 sockerenheter per molekyl [1][3]. De främsta sockerarter som bygger upp hemicellulosa är D-xylos, L-arabinos, D-glukos, D-galaktos, D-mannos, D-glukuronsyra [8].



Figur 5: De främsta monomererna som bygger upp Hemicellulosa [8].

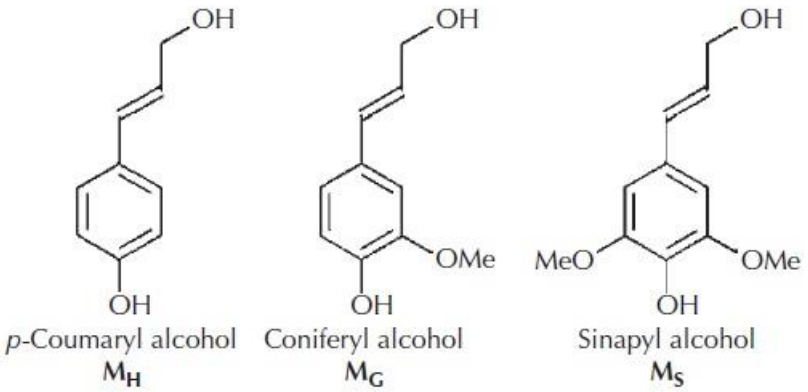
Hemicellulosa delas in i fyra olika polysackaridgrupper varav de två mest förekommande i växter är xyloglukan (xylan) och mannoglukan (mannan) [11]. Polysackarider av xylan sorten är de viktigaste hemicellulosakomponenterna i växtcellväggar där arabinoxylan (figur 6) är den mest rikliga i ettåriga växter och innehåller en ryggrad av D-xylopyranos som kopplas samman med β-1,4-glykosid bindningar och ett antal L-arabinofuranos och D-glukuronsyra rester som sidokedjor. Naturligt förekommande xylan innehåller O-acetylgrupper belägna på några av hydroxidgrupperna i xylan-ryggraden som avlägsnas när en alkalisk lösning används under isoleringsprocessen [1][6].



Figur 6: Primärstrukturen för vattenlöslig L-arabino-D-xylan [8].

2.4 Lignin

Bortsett från polysackariderna ovan är lignin ett av de mest omfattande organiska materialen på jorden. Lignin är ett amorft, polyfenoliskt material som, i vetehalm, består av tre fenylpropanoid monomerer: coniferyl-, sinapyl- och P-kumaryl- alkohol [8][16]. Denna definition är dock begränsad då flera växter har lignin som innehåller signifikanta nivåer av andra ovanliga monomerer, men allmänt gäller de komponenter som finns i vetehalm [16].



Figur 7: Monomerer av lignin i vetehalm [8].

Monomererna är slumpmässigt fördelade och bundna med främst eter och esterbindningar [17]. Förutom 20 olika typer av bindningar som finns inom lignin i sig, är lignin kopplat via kovalenta bindningar mellan hemicellulosakomponenter och cellulosamikrofibriller i primära och sekundära cellväggar, samt även i mittlameller där lignin fungerar som en cementeringskomponent som för samman celler och härdar cellväggarna [8][16][17].

Den hydrofoba naturen och det låga innehållet av hydrolyserbara bindningar gör lignin mycket hållbar, och fungerar som ett skydd mot mekanisk och mikrobiell skada. Lignin styr även fluidflödet i växter, skyddar mot angrepp av mikroorganismer, används som ett UV-absorptionsmedel och möjligen ett flamskyddsmedel samt lagrar energi i växter [16][18].

2.5 Jordbruksrester

Vid produktion av jordbruksprodukter är det endast en viss mängd av råvaran som används eller förädlas. Det resterande biologiska material i form av halm och skal bl.a. kasseras eller används som biobränsle [4][1]. Då cellulosa, hemicellulosa och lignin svarar för över 80 % av torrsubstansen för de tre mest förekommande spannmålsprodukter i Europa; havre, korn och vete [11], finns det mycket användbara material som går till spillo [1][7].

Tabell 1, [8] visar den kemiska sammansättningen av restprodukter från jordbruket i andel torrsubstans. Det kemiska innehållet inom samma växtart varierar enligt mognadsstadie samt jordart och gödselbehandling, därför kan denna tabell användas mer som en fingervisning.

Arter	Vattenlösliga extraktivämnen	Cellulosa	Hemicellulosa	Lignin	Vax	Aska
Vetehalm	4.7	38.6	32.6	14.1	1.7	5.9
Havrehalm	4.6	38.5	31.7	16.8	2.2	6.1
Kornhalm	6.8	34.8	27.9	14.6	1.9	5.7
Kornskal	10	35	25	20	-	-

Tabell 1: Den kemiska sammansättningen av restprodukter från jordbruket (%) [8]

Intresset för användning av jordbruksrester har ökat under de senaste åren, och flera potentiella framtida tillämpningar har föreslagits; cellulosa kan användas för antingen papper eller cellulosaderivat och lignin kan omvandlas till värdefulla produkter såsom kolfiber och lim [7]. Hemicellulosa har visat sig vara bra material som barriärfilmer, hydrogeler och på en industriell skala omvandlas till xylos och xylitol. Även inom pappersindustrin har det visats

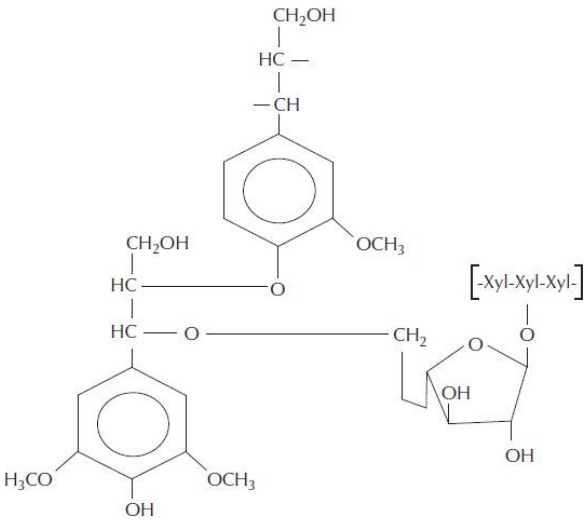
att tillsatsen av hemicellulosa i den cellulosahaltiga massan kan förbättra vissa mekaniska egenskaper hos papper [1].

Därför behövs mer kostnadseffektiva extraktionsmetoder för att uppnå en ökning av utnyttjandet av jordbruksrester, speciellt hemicellulosa. Dessutom får extraktionsmetoden inte försämra materialen, då exempelvis barriärfilmer kräver en högre molekylvikt av hemicellulosa [7].

2.6 Extraktion av Lignin- kolhydratnätverk (LCC)

Hemicellulosa är de mest komplexa komponenterna i cellväggen hos ettåriga växter då de bl.a. bildar vätebindningar med cellulosa, kovalenta bindningar med fenoliska substanser, inklusive lignin och esterbindningar med acetylenheter [7].

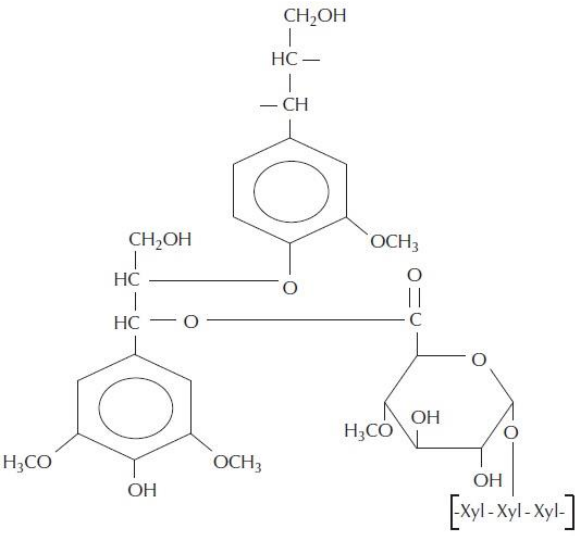
Flera studier från bl.a. Liu C. et al. [8] och Chesson et al. [19] av lignin i vete-cellväggar visar att majoriteten av lignin är direkt kopplade till arabinoxylan med eterbindningar (figur 8). Majoriteten av dessa bensyl-eterbindningar i vetehalm är hydrolyserbara med alkali. En annan lignin-hemicellulosa-bindning är esterbindning mellan lignin och en karboxylgrupp (figur 9). Olika behandlingar har använts för hemicellulosautvinning med tillsats av varierade kemikalier såsom alkali, syra och dimetylsulfoxid (DMSO) [1][3].



Figur 8: Eterbindning mellan arabinos-sidogrupp och en benzylgrupp [8].

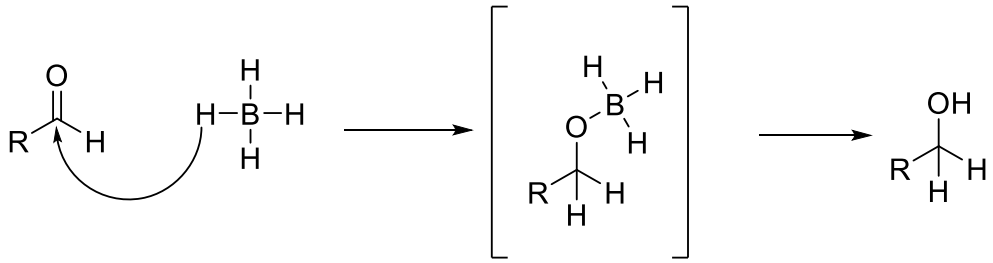
Hemicellulosa består av två olika typer, hydrofil och hydrofob, där endast en mindre del av hemicellulosa är hydrofil och kan extraheras med hett vatten. Ett något effektivare neutralt lösningsmedel är DMSO. Även om endast en del av arabinoxylan kan extraheras med DMSO, är den fördelen att inga kemiska förändringar sker. Större mängder av arabinoxylan kan extraheras med alkaliska lösningsmedel [3].

Alkalibehandling vid måttliga temperaturer är grunden för åtminstone ett tillvägagångssätt för hemicellulosautvinning av olika spannmål som vetehalm och kornskal, genom att hydrolysera uronsyror och ättiksyraestrar samt genom svällning av cellulosa som minskar kristalliniteten [1]. Behandlingen hydrolyserar även ester- och eter-kopplingar mellan lignin och hemicellulosa, vilket i ettåriga växter ökar lösligheten hos arabinoxylan [6].



Figur 9: Esterbindning mellan karboxylgrupp och benzylgrupp [8].

Frisläppandet av arabinoxylan från biomassa under alkaliextraktion kan bistås av förbehandlingsförfaranden, såsom mild syra hydrolys för att avlägsna extraktivämnen såsom fettsyror och proteiner [1][7]. Därefter kan en delignifiering vara lämplig genom att använda klorit eller etanol för att bryta ner lignin samt bindningar mellan kolhydrater och lignin och därmed underlätta extraktionen ytterligare. En lämplig fortsättning på processen är en reduktion av de reducerande ändgrupperna på återstoden av polysackariderna, för att minimera nedbrytning av hemicellulosa och cellulosa. Reduktionen av aldehydform till alkoholform görs med natriumborhydrid eller natriumdithionit i alkalisk miljö (se figur 10).



Figur 10: Mekanism för nukleofil addition av natriumborohydrid till en aldehyd

Tillslut kan cellulosa fällas ut då återstoden av blandningen neutraliseras och därefter fälla ut hemicellulosa på den resterande lösningen med etanol som är det vanligaste lösningsmedlet, men även metanol och aceton har applicerats för fraktionering av hemicellulosa [7][8].

Alkaliska betingelser kan dock försämra hemicellulosa genom att dra av sin reducerande ändgrupp och delvis hydrolysera glykosidbindningar i xylan-ryggraden. Således är en för hög alkalikoncentration kombinerat med en lång uppehållstid vid hög temperatur något som bör undvikas [1][7].

3 Materiel

De råvaror som användes var malda och torkade; kornskal från företaget Culinar och vete samt potatis från Lantmännen. Samtliga kemikalier som användes var från Sigma Aldrich. Vattenbad av märket Grant OLS200 användes, likaså centrifugen av modell Heraeus Megafuge 40. Siemens Diffraktometer D6000 användes för XRD provtagning och för NMR prover systemet Varian 400, med en frekvens på 400 MHz för protondetektion och 100 MHz för koldetektion. Programmet Match! 3 användes vid analys av XRD-data, MestReNova för NMR-prov analys och programmet ChemBioDraw Ultra 12.0 för att rita modeller av molekyler och reaktioner.

4 Metod

Detta avsnitt beskriver tillvägagångssätt vid extraktion i två delar. Den första delen, trestegsextraktion, där lignin, cellulosa och hemicellulosa extraheras ur torkade och malda; kornskal, vete och potatis, omfattar val utav den råvara som är mest lämplig att extrahera lignin-kolhydrat material, där val utav råvara baseras på mängd extraherad hemicellulosa, andel kristallin cellulosa och även den råvara som är lättast att hantera. Den andra delen, enstegsextraktion, avser två olika extraktionsmetoder utav enbart hemicellulosa från kornskal.

4.1 Trestegsextraktion

Denna metod har utvecklats av institutionen för organisk kemi, Chalmers, och kan ses som ett bas protokoll för extraktion av finmalt material.

Råvaran vägdes upp enligt tabell 2 med 0.05 M Saltsyra, HCl, under omrörning i rumstemperatur. Efter ca 18 timmars omrörning centrifugerades blandningen vid 4300 rpm i 15 min. Den fasta fasen överfördes till ett glaskärl med avjoniserat vatten (se tabell 2) och sattes till pH 3 med tillsats av Natriumhydroxid, NaOH. Därefter tillsattes Natriumklorit, $NaClO_2$, (se tabell 2) varvid blandningen i kärlet hettades upp med ett vattenbad till 80° C under omrörning. Efter 2 timmars omrörning centrifugerades blandingen vid 4300 rpm i 15 min varvid vattenlösningen innehållandes lignin sparades.

Figur 11: Vattenbad med omrörning

Råvara	Massa	0,05 M HCl	Avjoniserat vatten	$NaClO_2$
Kornskal	115g	2 l	0.5 l	28.75g
Vete	57.5g	1 l	0.25 l	14.38g
Potatis	57.5g	2 l	0.5 l	14.38g

Tabell 2: Uppmätta mängder råvara, lösningar och kemikalier.

Den fasta fasen tvättades genom addition av 0,5 l avjoniserat vatten under omrörning. Efter tio minuter centrifugerades blandningen och den fasta fasen överfördes till ett kärl med 1 M NaOH och Natriumdithionit, $Na_2S_2O_4$, (se tabell 3) under omrörning i ca 18 timmar.

Därefter neutraliserades blandningen med 12 M HCl tills pH 7 uppnåtts (~75ml / liter NaOH) och centrifugerades vid 4300 rpm i 15 min. Den fasta fasen, innehållandes cellulosa, fick lufttorka på aluminiumfolie och fördes sedan vidare till analys. Den resterande vattenlösningen, innehållandes hemicellulosa, fälldes ut med 95 %-ig etanol (se tabell 3) under omrörning i tio minuter.

Figur 12: Centrifug

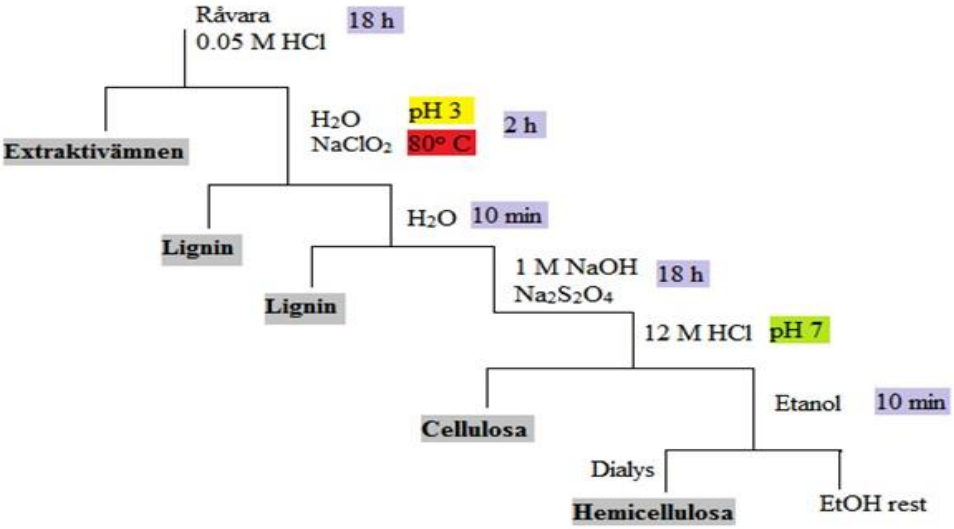
Råvara	1 M NaOH	$Na_2S_2O_4$	95 % Etanol
Kornskal	1 l	5g	0.5 l
Vete	0,5 l	2,5g	0.25 l
Potatis	1 l	2,5g	0.5 l

Tabell 3: Uppmätta mängder lösningar och kemikalier.

Den fasta återstoden från centrifugeringen löstes med 0,5 l avjoniserat vatten och fördes över till en dialysslang med dialysmembran MWCO: 12-14000 g/mol. Dialysslangen lades i en hink med avjoniserat vatten, som byttes varje timme de första 4 timmarna. Därefter byttes vattnet kl. 9 och 16 och då konduktiviteten låg under 5 μSm^{-1}, tre dagar senare, avbröts dialysen och innehållet i dialysslangen fälldes ut med 1 liter etanol.

Figur 13: Dialysslang med innehåll

Blandningen centrifugerades därefter vid 4300 rpm i 15 min och det fasta materialet, hemicellulosa, torkades i ugn på 120° C i 18 timmar. Etanolfraktionerna sparades för vidare destillation och det torkade materialet fördes vidare till analys efter uppvägning.



Figur 14: Schematisk bild över trestegsextraktionen

4.2 Enstegsextraktion

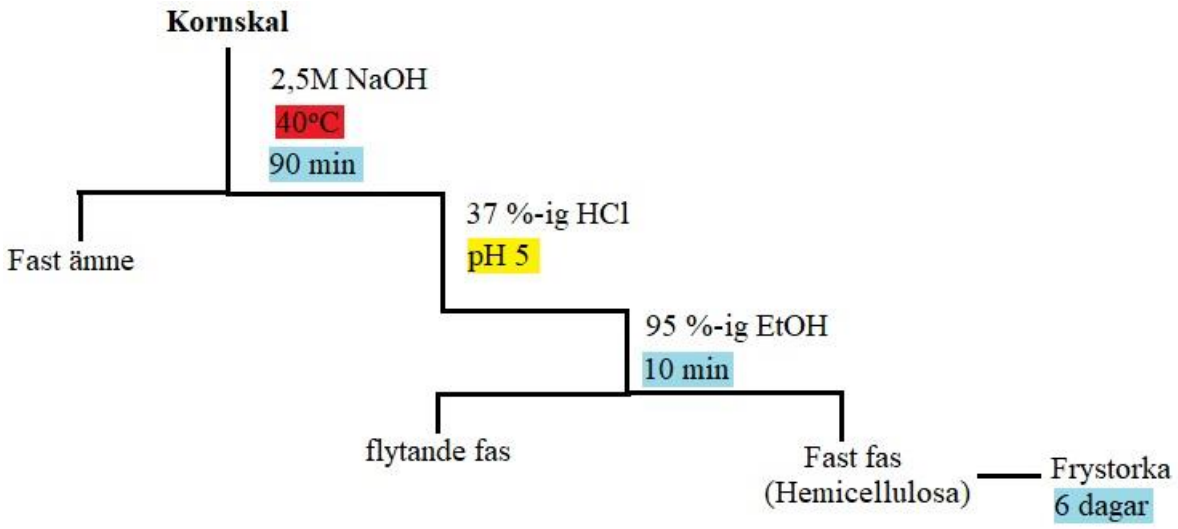
Två olika extraktionsmetoder av hemicellulosa från kornskal utfördes, det första försöket är en metod av Prado R. et al. [2] som använder ett joniskt lösningsmedel, och det andra är en kall alkalisk extraktionsmetod av García J.C. et al. [1].

4.2.1 Försök 1- Joniskt lösningsmedel

Ett joniskt lösningsmedel syntiserades genom droppvis addition av 100 ml 5 M Svavelsyra, H_2SO_4, till en bägare med 50.6 g Trietylamin, Et_3N, under omrörning i 24 timmar. 20g kornskal, 40g avjoniserat vatten och 160 g av det syntiserade joniska lösningsmedlet, $[Et_3NH][HSO_4]$, fördes till en bägare med omrörning. Efter två timmars uppvärmning i 150°C filtrerades den resulterande svartluten med filterpapperet Whatman 541 och tvättades med 750ml Etanol. Den filtrerade blandningen lades i ett kylskåp på 8°C i 48 timmar och filtrerades därefter med en viraduk, och det fasta materialet som fångats upp av duken torkades i ugn på 120°C i 18 timmar, vägdes och fördes vidare till analys.

4.2.2 Försök 2- Kall alkalisk extraktion

20g kornskal vägdes upp och fördes till en 1L bägare innehållandes 300ml 2,5M NaOH. Bägare med innehåll nedsänktes i ett vattenbad på 40°C med omrörning i 90 minuter. Den resulterande suspensionen filtrerades därefter med filterpapperet Whatman 421, varav det fasta ämnet kasserades, och vätskefasen justerades till pH 5 med ~1ml 37 %-ig HCl. Efter tillsats av 1L, 95 %-ig Etanol och 10 minuters omrörning, centrifugerades blandningen vid 4500 rpm i 3 min. Den fasta fällningen, hemicellulosan, frystorkades i 6 dagar, vägdes upp och fördes vidare till analys.



Figur 15: Schematisk bild över kall- alkali extraktionsmetoden

4.3 Analys

Följande metod är utvecklat av institutionen för organisk kemi, Chalmers. Samtliga prover av cellulosa och hemicellulosa hydrolyserades för att sedan kunna genomgå NMR. Materialen från enstegsextraktionerna genomgick ej hydrolys utan istället togs ungefär 0,1g av materialen och löstes i 0,7 ml tungt vatten, D_2O, fördes till ett NMR-rör och vidare till NMR-analys.

4.3.1 Hydrolys

0.2g torkat prov fördes till en bägare med 3ml 72 %-ig H_2SO_4. Innehållet rördes om med en glasstav och bägaren ställdes i en exsickator kopplad till vakuumsug i 15 min. Därefter lades bägaren i ett vattenbad hållandes 30° C. Efter ungefär en timme sattes 84g avjoniserat vatten till bägaren och förslöts med aluminiumfolie. Bägaren fördes till en autoklav och hettades upp till 125° C med tryck i 1,5 timme. När hydrolysen var färdig tillsattes ytterligare avjoniserat vatten till bägaren så att 100 ml lösning erhölls. 10 ml av den hydrolyserade lösningen filtrerades, det fasta material som fastnade på filtret torkades och vägdes upp före och efter filtrering för att bestämma mängd Klason Lignin (ej syralöslig lignin). Den lösning som gick igenom filtreringen användes till NMR- förbehandling.

4.3.2 NMR- förbehandling

3 teskedar bariumhydroxid sattes till den hydrolyserade lösningen. Ungefär 4 timmar senare filtrerades lösningen med filterpappret Munktell no. 8. Den filtrerade lösningen neutraliserades därefter till pH 7 med ~1 ml koncentrerad svavelsyra. Därefter sugfiltrerades lösningen igen tills en klar vätska erhölls med filterpappret Munktell, ART NO: 413 003, och rullindunstades så att ev. vattnen drevs av. Det fasta material som var kvar löstes i 0,7 ml deuteriumoxid, ’’tungt vatten’’ (D_2O), och fördes till ett NMR- rör för vidare NMR analys.

5 Resultat

Följande avsnitt presenterar: mängder extraherad Cellulosa, Stärkelse, Hemicellulosa och Klason lignin från samtliga råvaror/metoder; iakttagelser av extraherat material samt resultat från NMR och XRD prover.

5.1 Andel extraherat material

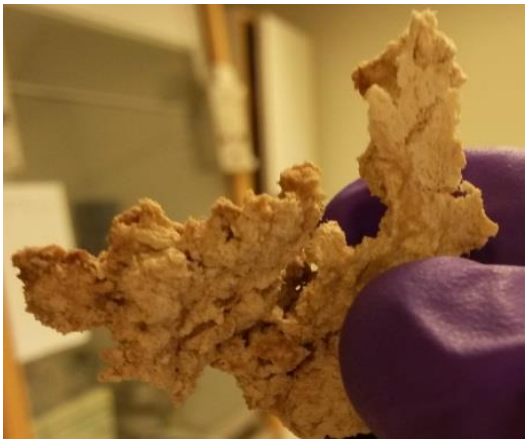
Tabell 4 anger mängd och andel extraherad Cellulosa, Hemicellulosa och Klason Lignin. Mängden Klason Lignin beräknades per 10 ml hydrolyserad lösning av 0,02g extraherat Hemicellulosamassa.

	Trestegsextraktion			Enstegsextraktion (kornskal)	
Biopolymer	**Kornskal**	**Vete**	**Potatis**	**Joniskt lösningsmedel**	**Kall alkali extraktion**
Cellulosa	73.55g av 115g = 64%	32.72g av 57.5g = 57%	-	-	-
Stärkelse	-	-	39.1g av 57.5g = 68%	-	-
Hemicellulosa	15.21g av 115g = 13%	6.15g av 57.5g = 11%	5.33g av 57.5g = 9%	0.9113g av 20g = 5%	7.71g av 20g = 38%
Klason Lignin i Hemicellulosa	0.0017g av 0.02g = 9%	0.002g av 0.02g = 10%	0.0027g av 0.02g = 14%	-	0.0023g av 0.02g = 12%

Tabell 4: Mängd samt andel extraherat material.

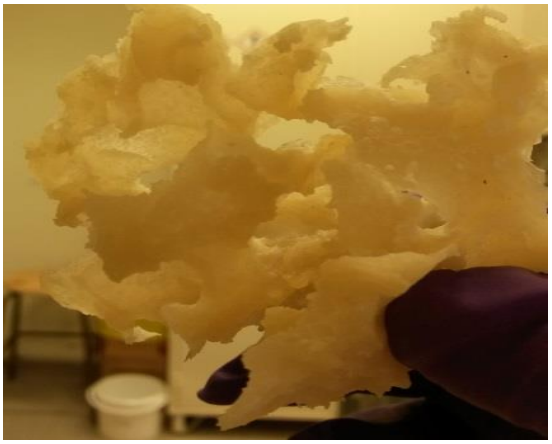
5.2 Iakttagelser av extraherat material

Lufttorkad Cellulosa från kornskal (figur 16) och vete är visuellt lika, fibrösa material som är svåra att ta isär med enbart handen.



Figur 16: Cellulosa från kornskal

Lufttorkad Stärkelsen från potatis (Figur 17) påminner om cellulosa, men har en blekare nyans och är mer böjbar än cellulosa.



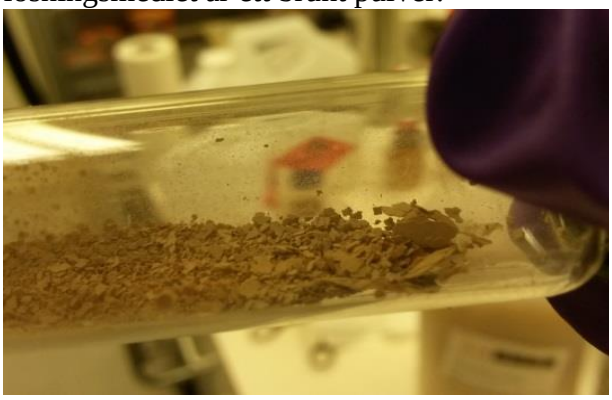
Figur 17: Stärkelse från potatis

Ugnstorkad Hemicellulosa ur respektive råvara från trestegsextraktionen, är visuellt lika: ljusa, transparenta, styva, plastliknande material som bryts med en betydligt mindre kraft än cellulosa och stärkelse.

Figur 18: Hemicellulosa från Vete

Figur 19: Hemicellulosa från Kornskal

Den lufttorkade Hemicellulosan (figur 20) från extraktionsmetoden med det joniska lösningsmedlet är ett brunt pulver.



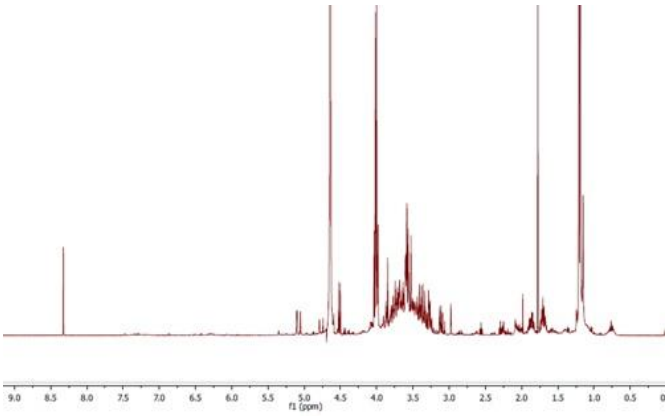
Figur 20: Hemicllulosa från joniskt lösningsmedel

Den frystorkade Hemicellulosan (figur 21) från kall- alkali extraktionsmetoden är ett ljusgrått pulver.

Figur 21: Frystorkat hemicellulosa

5.3 NMR-resultat

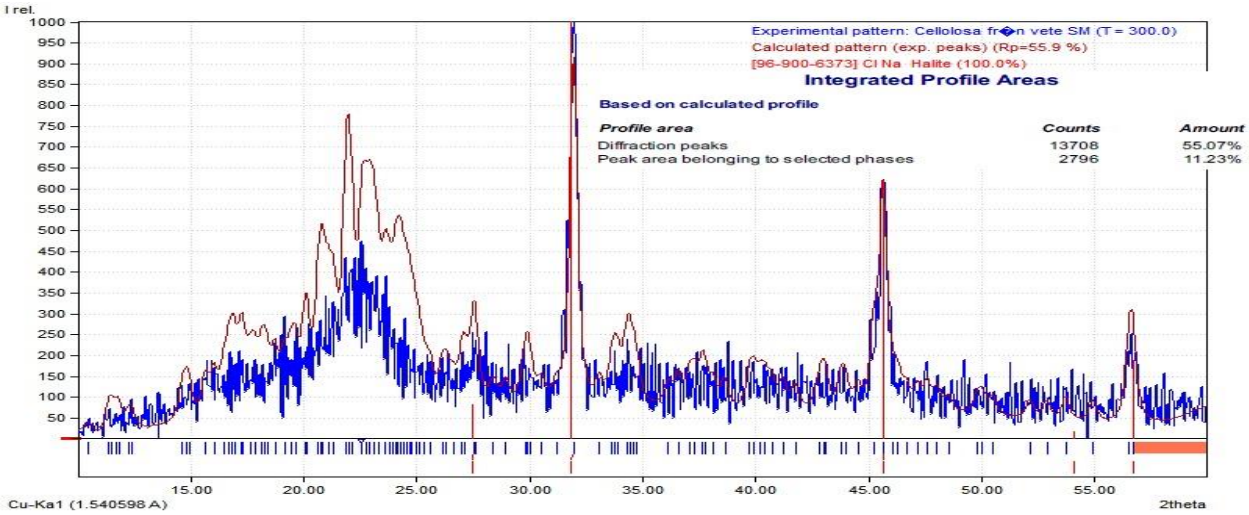
Samtliga ^{1}H-NMR-prover av hemicellulosa och även cellulosa ser ungefär likadana ut (figur 22). Hemicellulosa har toppar vid 3.2-4.4ppm som är spår av anhydroxylosenheter, de svagare topparna av hemicellulosa vid 1.8 samt 1.1ppm är 4-0-metyl-D-glukoronsyra och α-D-arabinofuranosylrester vid 5.2 - 5.4 ppm. För cellulosa erhålls toppar av anhydroglukosenheter vid 4.5 ppm och även andra substitutionsgrupper vid 3.4- 4.0 ppm. En stark signal vid 4,7 ppm har sitt ursprung från det kvarvarande lösningsmedlet D_2O och vid 6.9 ppm finns spår av lignin.



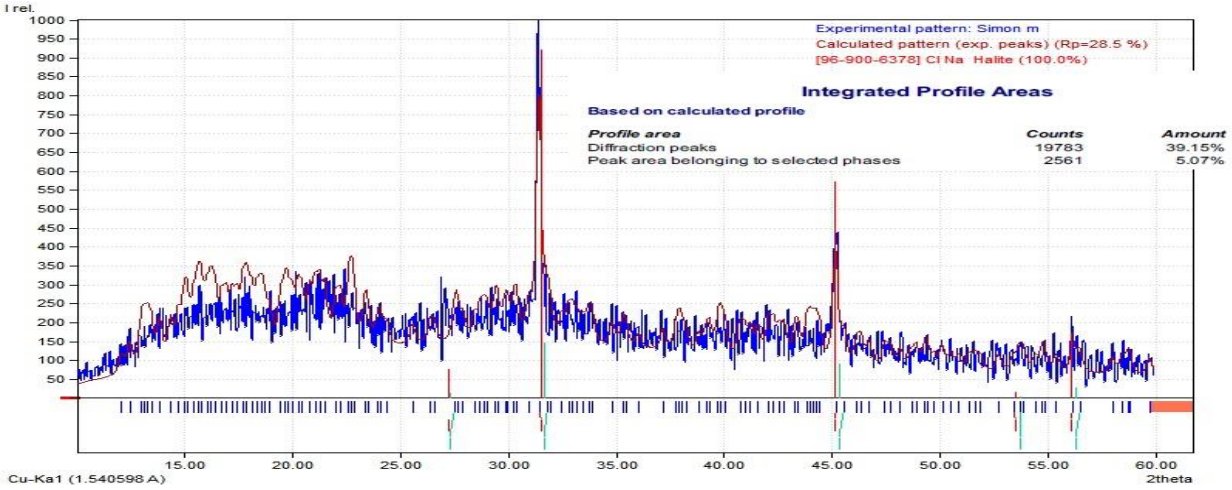
Figur 22: ^{1}H-NMR-spektra av hemicellulosa från vete

5.4 XRD-resultat av cellulosa

XRD-proverna av cellulosa från kornskal och vete visar att cellulosan från kornskal är mindre kristallin än cellulosan från vete, visuellt kan urskiljas en topp med högre intensitet från vete-cellulosan (figur 23) än kornskal-cellulosan (figur 24) vid 22,6 °. Diffraktogrammen visar även spår utav en förorening som har karakteriserats som ett salt, NaCl.



Figur 23: XRD-spektra av cellulosa från vete



Figur 24: XRD-spektra för cellulosa från kornskal

Beräkningsmässigt anger tabell 5 andel kristallin Cellulosa, som bestämdes via XRD-analysprogrammet, med hjälp av de genererade data genom att dividera arean av de kristallina topparna med den totala arean under diffraktionskurvan, dvs. kristallina plus amorfa toppar.

Råvara	$X_c = \frac{A_{cr}}{A_{cr} + A_{am}}$	**Andel Kristallinitet (%)**
Cellulosa från Kornskal	$\frac{2561}{19783}$	13 %
Cellulosa från Vete	$\frac{2796}{13708}$	20 %

Tabell 5: Andel kristallin Cellulosa

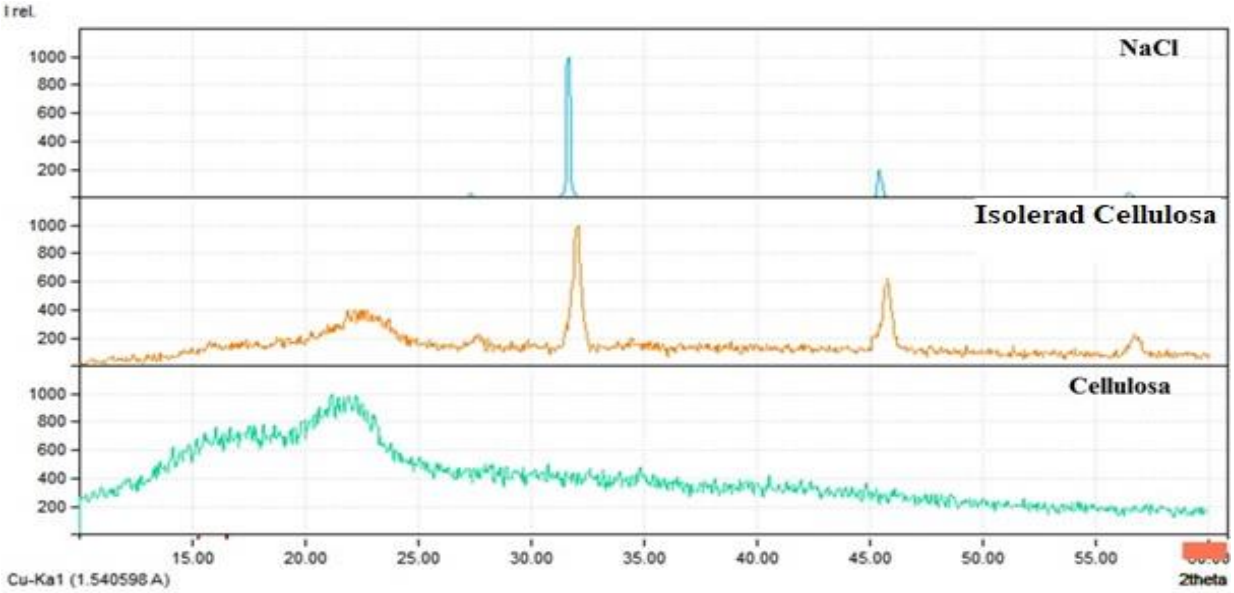
6 Diskussion

Detta avsnitt förklarar och resonerar kring resultaten samt eventuella fel/problem som uppstod i samband med projektet.

6.1Trestegsextraktion- val av råvara

Vid trestegsextraktionen blev andel extraherat hemicellulosa från respektive råvara ungefär lika stor, störst andel från kornskal (13%) sedan vete (11%) och minst från potatis (9%). Dock utfördes extraktion från kornskal i en större skala, som i regel genererar ett högre procentuellt utbyte pga. minskad spill och restkemikalier vid hantering då felmarginalen är lägre. Utöver den skillnaden uppträdde extraktion ur kornskal och vete likartat. Extraktion ur potatis var däremot inte helt problemfritt. En större mängd lösning krävdes för att göra potatismassan volatil då det absorberades mer vätska i biomassan. Större mängder lösning resulterar i en dyrare och mer krävande extraktion av hemicellulosa och därmed är potatis inte en lämplig råvara att använda.

XRD resultaten av cellulosa från vete och kornskal visade spår av ett annat kristallint ämne, natriumklorid, NaCl. Saltet bildas då den alkaliska biomassan innehållandes natriumhydroxid, NaOH, neutraliserades med saltsyra, HCl. Det oönskade saltet går enkelt att få bort genom att tvätta cellulosamassan ett par gånger med vatten innan torkning. Diffraktogrammen i figur 25 visar tydligt innehållet i de isolerade proverna av cellulosa. XRD-spektra av råvarorna klargjorde även att cellulosan från vete var mer kristallin, vilket innebär att större delar av cellulosapolymeren hölls intakt under extraktionsprocessen.



Figur 25: Jämförelse av XRD-spektra på NaCl högst upp, isolerad cellulosa från vete i mitten och ren cellulosa längst ner

Alla argument och resultat pekar alltså på att vete är den lämpligaste råvaran vid trestegsextraktion av hemicellulosa och cellulosa, även om kornskal gav 2% mer hemicellulosa så var dess cellulosa 7% mindre kristallin och dessutom utfördes extraktion ur kornskal i större skala som sannolikt ger större utbyte. För framtida arbete skulle en kolhydratanalys med jonkromatografi, IC, vara lämplig. Detta för att ta reda på hur stor andel av, och vilka kolhydrater som är närvarande i de extraherade materialen, dvs. extraktens renlighet. Dock går det visuellt att se att hemicellulosamaterialet var filmbildande och plastliknande vilket är en viktig förutsättning om de ska ersättas med petroleumbaserade plaster.

6.2 Enstegsextraktion

I det första försöket med det joniska lösningsmedlet erhölls endast 5% extraherat hemicellulosa vilket är en väldigt liten mängd, och slutsatsen blev att extraktionen inte lyckades helt. Olika orsaker kan ligga bakom men antagligen främst att metoden var anpassad att användas med vide trä och inte kornskal som användes. Sannolikt har arabinoxylan brutits ned till mindre komponenter som gick igenom filtreringen.

Kall alkali extraktion däremot, genererade en substantiell mängd extraherat material (38%) där över hälften skall vara ren hemicellulosa. Även här skulle en kolhydratanalys vara lämplig för att se hur stor andel av hemicellulosamassan verkligen är arabinoxylan. En naturlig fortsättning på projektet skulle vara en underökning av smältegenskaper på massan, och se om den har en filmbildande egenskap. En annan lämplig fortsättning skulle vara att försöka rena denna hemicellulosamassa med olika metoder, exempelvis trestegsextraktionsmetoden, men att då börja vid cellulosaextraktionssteget. Sannolikt skulle en större mängd arabinoxylan kunna isoleras på detta sett.

6.3 NMR undersökning

Alla ^{1}H-NMR-spektra såg nästan identiska ut med andra studier av både Y. Peng [4] och C. Liu [8]. Dessa studier extraherade material ur ettåriga växter och använde samma kemikalier vid extraktion och analys som denna rapport använde. Därför kan liknande slutsatser dras om innehåll i materialen, att xylos har toppar vid 3.2– 4.4ppm, sidogrupp av arabinos vid 5.3ppm, D-glukuronsyra vid 3.4ppm, metyl delen i ättiksyraestergrupp vid 1.8ppm , fenoliska ämnen vid 6.9ppm och tungt vatten vid 4.7ppm.

7 Slutsats

Den mest lämpliga råvara att använda vid extraktion av lignin- kolhydratmaterial med ett protokoll framtaget av institutionen för organisk kemi, Chalmers, är vete som var lätthanterlig, hade ett högt utbyte av hemicellulosa och genererade en mer kristallin cellulosa. Den metod som var bäst vid isolering av enbart hemicellulosa var en kall alkali extraktion. Extrakten som analyserats med NMR verifierade att cellulosa och hemicellulosa har extraherats och att hemicellulosorna isolerade från kornskal, vete och potatis är huvudsakligen bestående av arabinoxylan och uronsyror. Cellulosa-kristalliniteten från respektive råvara som bestämdes med XRD, visade en mer kristallin cellulosa från vetehalm, och att en förorening, natriumklorid, var närvarande i de isolerade cellulosorna.

8 Litteraturförteckning

[1] J.C. García, M.J. Díaza, M.T. Garcia, M.J. Feria, D.M. Gómez, F. López, ''Search for optimum conditions of wheat straw hemicelluloses cold alkaline extraction process'', Biochemical Engineering Journal, vol. 71, ss. 127-133, 2013.

[2] R. Prado, X. Erdocia, G.F. De Gregori, J. Labidi, T. Welton, ''Willow lignin oxidation and depolymerization under low cost ionic liquid'', ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2016.

[3] A. Höije, M. Gröndahl, K. Tømmeraas, P. Gatenholm, ''Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks'', Carbohydrate Polymers, vol. 61, ss. 266–275, 2005.

[4] Y. Peng, S. Wu, ''The structural and thermal characteristics of wheat straw hemicellulose'', Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, vol. 88, ss. 134–139, 2010.

[5] W. Chen, P. Kuo, ''Isothermal torrefaction kinetics of hemicellulose, cellulose, lignin and xylan using thermogravimetric analysis'', Energy, vol. 36, ss. 6451-6460, 2011.

[6] D. Barana, A. Salanti, M. Orlandi, D. Ali, L. Zoia, ''Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and Arundo donax'', Industrial Crops and Products, vol. 86, ss. 31–39, 2016.

[7] T. Persson, E. Dinh, A. Jönsson, ''Improvement of arabinoxylan isolation from barley husks'', Food and Bioproducts Processing, vol. 87, ss. 228–233, 2009.

[8] C. Liu, R. Sun, ''Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels'', Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2010 [cited 2016 May 11] Online version available at: http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCSRSBBC1/cereal-straw-resource/cereal-straw-resource

[9] W.A. Côté, Wood Ultrastructure, University of Washington Press, New York, 1967.

[10] J.D. Boyd, ''Helical fissures in compression wood cells: causative factors and mechanics of development'', Wood Sci. Technol, vol. 7, ss. 92–111, 1973.

[11] I.M. Morrison, ''The degradation and utilization of straw in the rumen'', in: E. Grossbard (Ed.), Straw Decay and its Effect on Disposal and Utilization, Wiley, Chichester, ss. 237–245, 1979.

[12] O. Theander, ''Review of straw carbohydrate research, in: R.D. Hill, L. Munck (Eds.), New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates'', Elsevier, Amsterdam, ss. 217–230, 1985.

[13] P.J. Evans, ''Chemical and physical aspects of the interaction of sodium hydroxide with the cell wall components of straw'', in: E. Grossbard (Ed.), Straw Decay and Its Effect on Disposal and Utilization, University of Research Ltd, Sharnbrook, Bedford, ss. 187–197, 1979.

[14] J.F. Matthews, C.E. Skopec, P.E. Mason, P. Zuccato, R.W. Torget, J. Sugiyama, M.E. Himmel, J.W. Brady, ''Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I beta'', Carbohydr. Res. 341, ss. 138–152, 2006.

[15] A. Isogai, M. Usuda, T. Kato, T. Uryu, R.H. Atalla, ''Solid-state CP/MAS carbon-13 NMR study of cellulose polymorphs'', Macromolecules 22, ss. 3168–3172, 1989.

[16] R.C. Sun, P. Rowlands, J.M. Lawther, ''Rapid isolation and physicochemical characterization of wheat straw lignins'', Recent Res. Dev. Agric. Food Chem. 4, ss. 1–26, 2000.

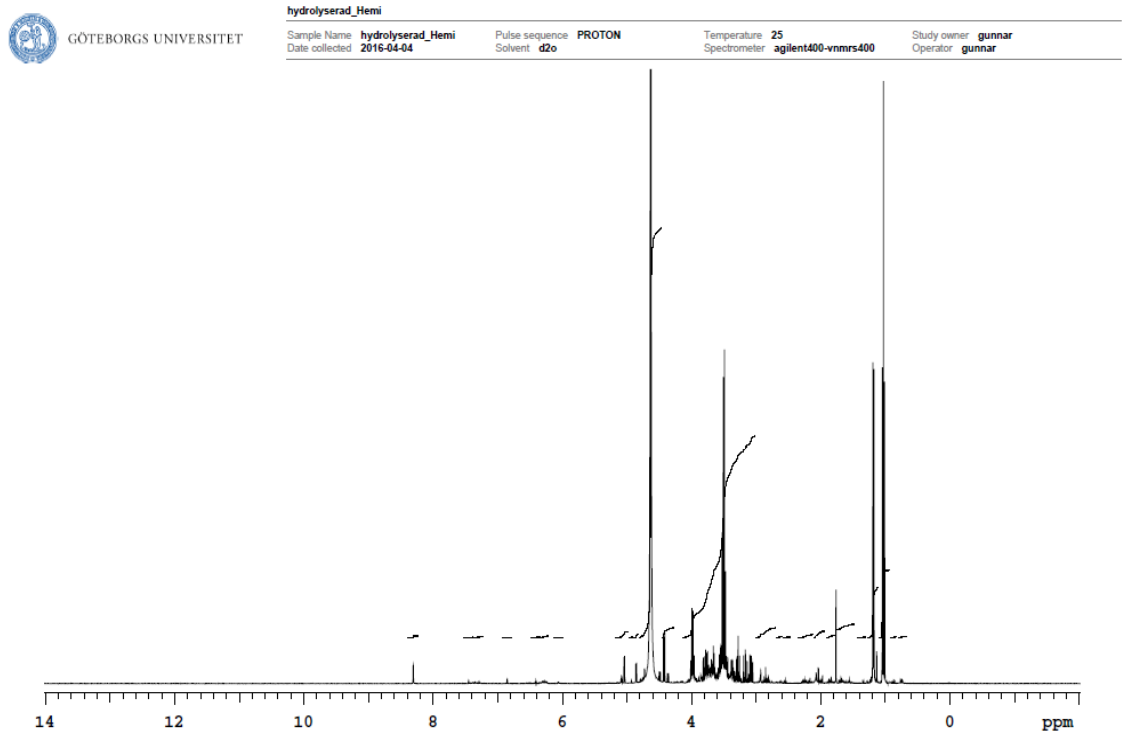
[17] T. Higuchi, ''Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation'', Wood Sci. Technol. 24, ss. 23–63, 1990.

[18] U.P. Agarwal, S.A. Ralph, ''Revealing organization of cellulose in wood cell walls by Raman imaging'', Proceedings of the 14th international symposium on wood fiber and pulping chemistry in Durban, Sydafrika, ss. 1–6, 2007.

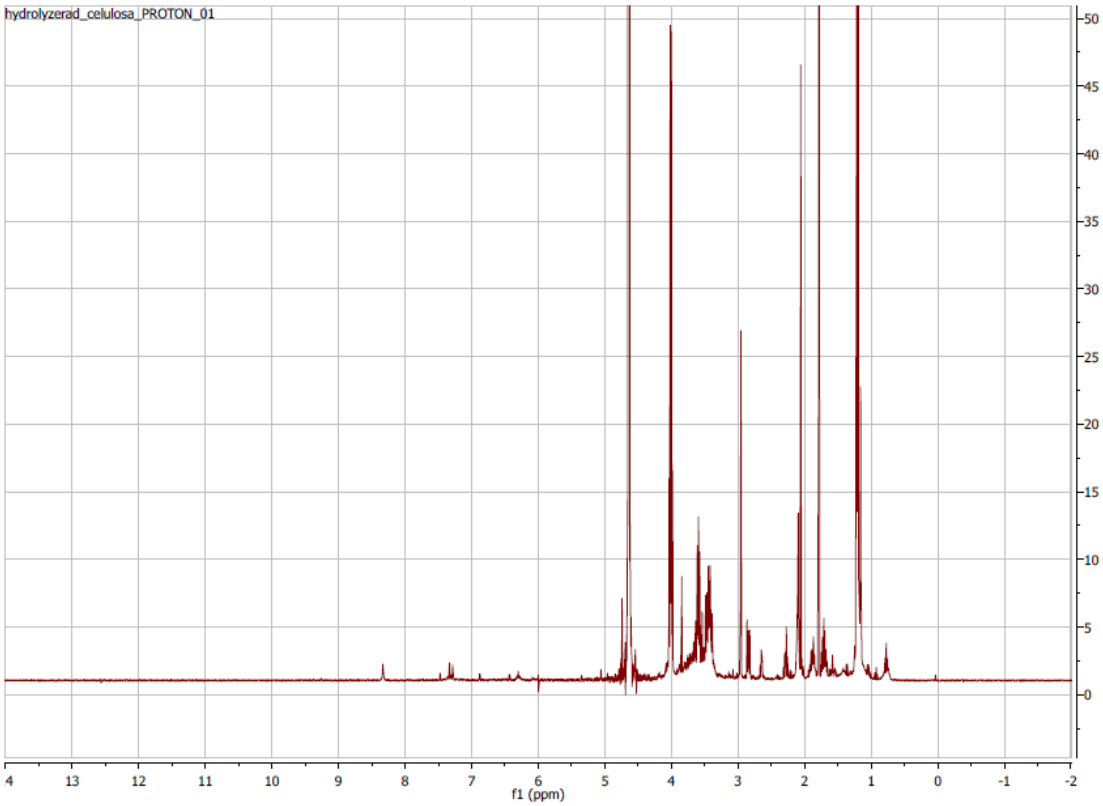
[19] A. Chesson, A.H. Gordon, J.A. Lomax, ''Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms'', J. Sci. Food Agric. 34, ss. 1330–1340, 1983.

9 Appendix

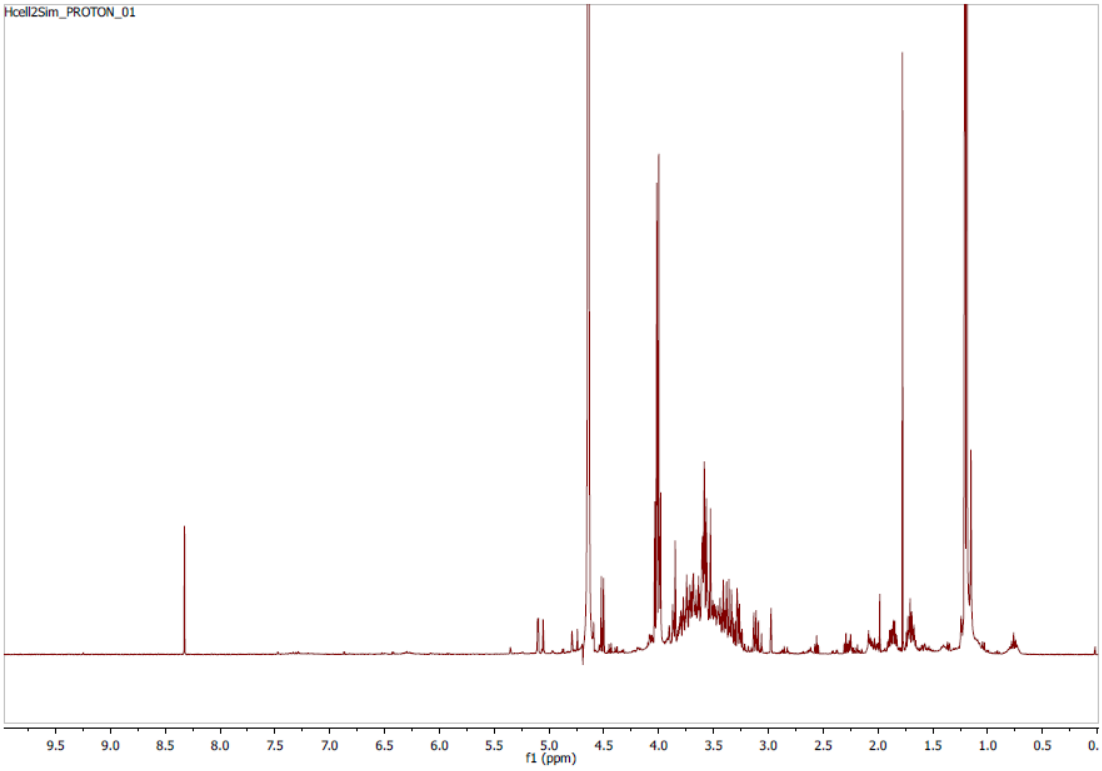
9.1 ^{1}H-NMR



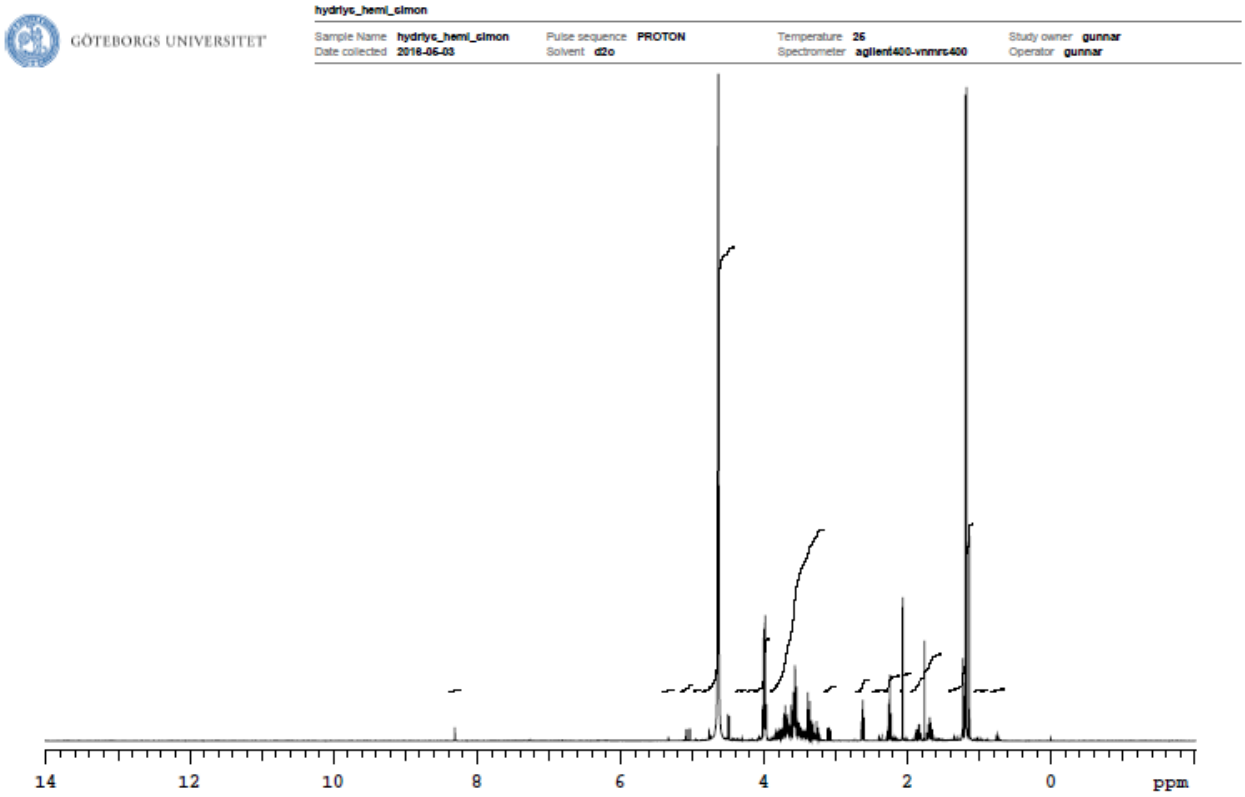
Figur 26: ^{1}H-NMR-spektrum för hemicellulosa från kornskal- trestegsextraktion



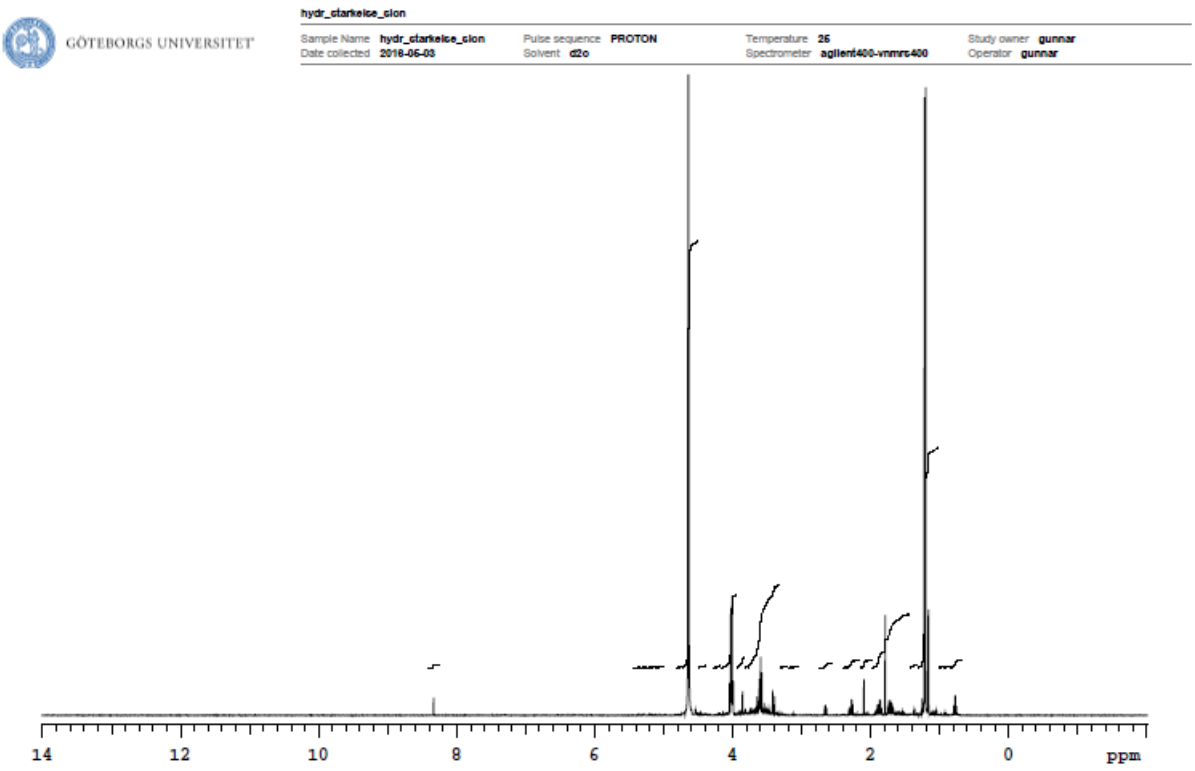
Figur 27: ^{1}H-NMR-spektrum för cellulosa från kornskal- trestegsextraktion



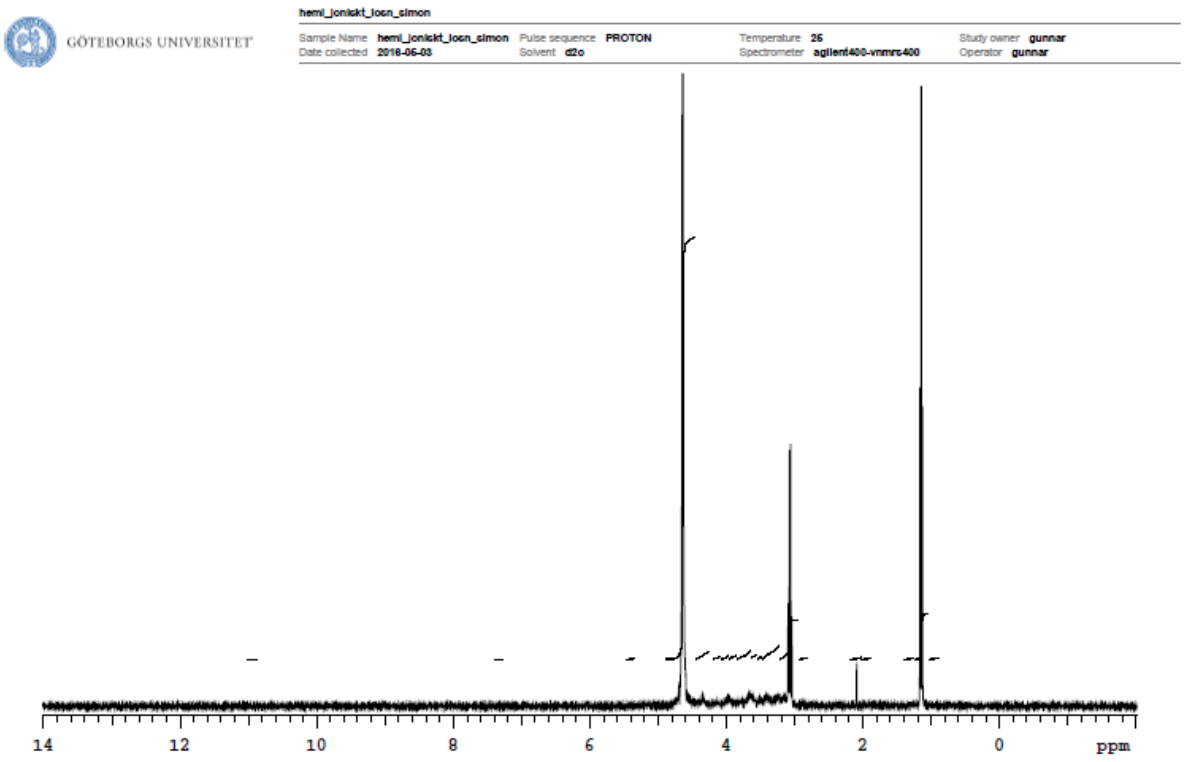
Figur 28: ^{1}H-NMR-spektrum för hemicellulosa från vete- trestegsextraktion



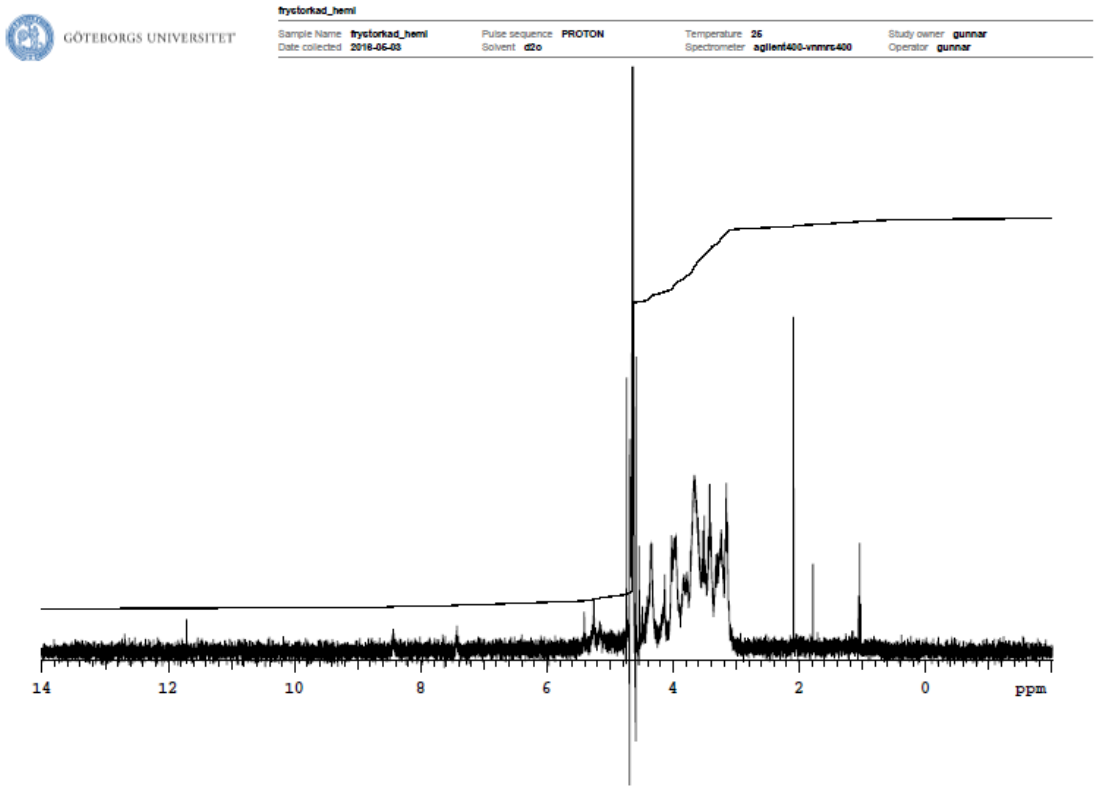
Figur 29: ^{1}H-NMR-spektrum för hemicellulosa från potatis- trestegsextraktion



Figur 30: ^{1}H-NMR-spektrum för stärkelse från potatis- trestegsextraktion

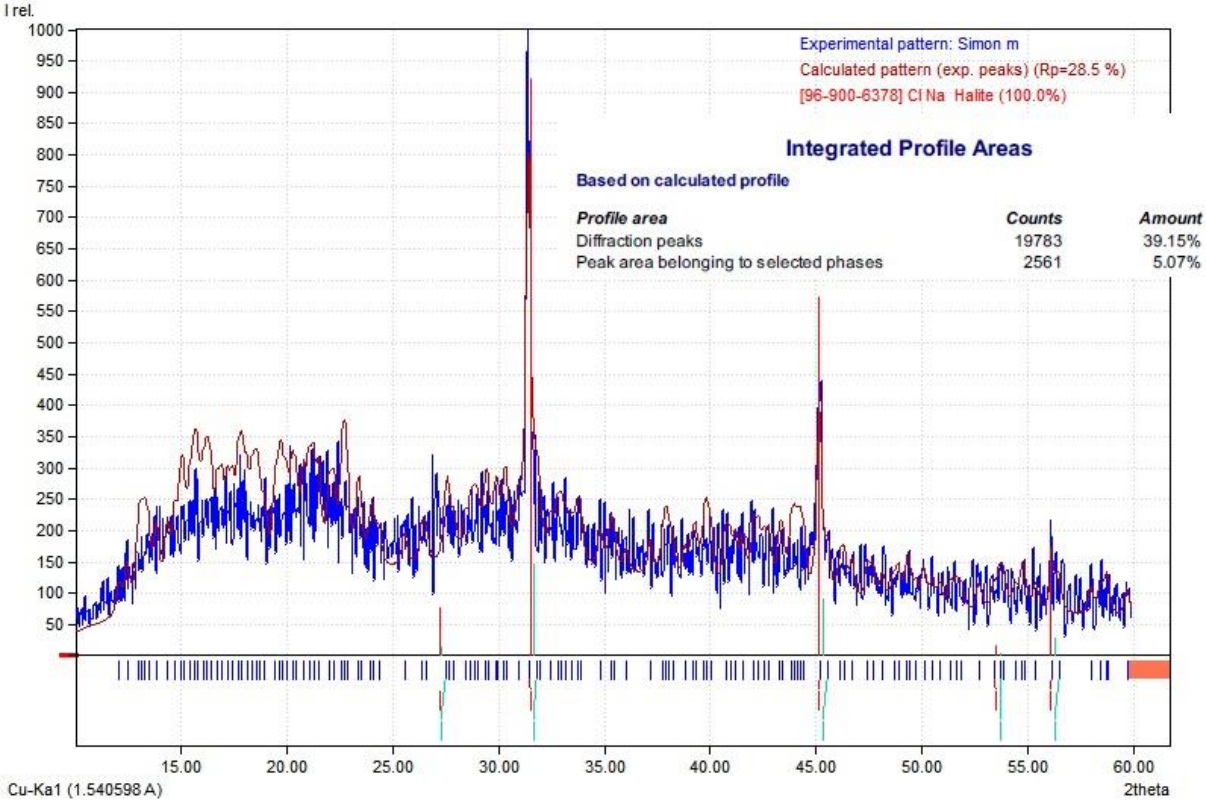


Figur 31: ^{1}H-NMR-spektrum för hemicellulosa från jonisk lösningsmedel

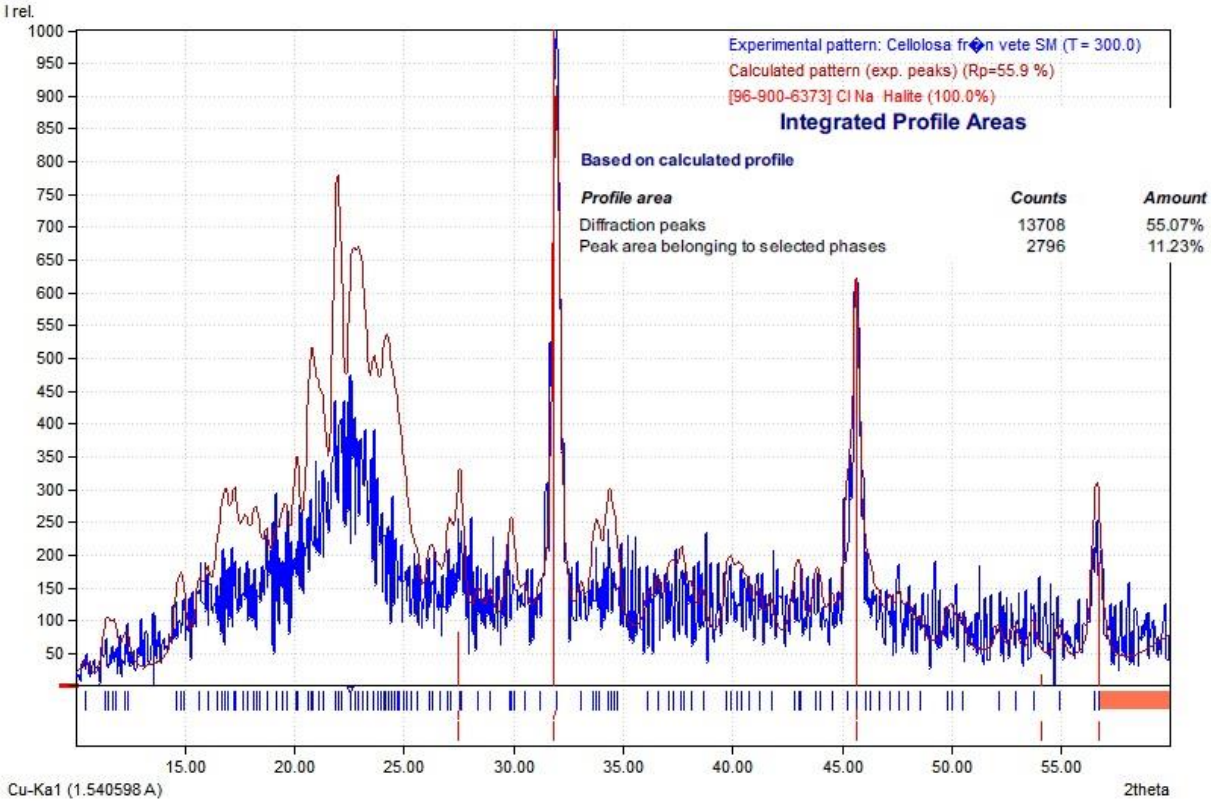


Figur 32: ^{1}H-NMR-spektrum för hemicellulosa från kall alkali extraktion

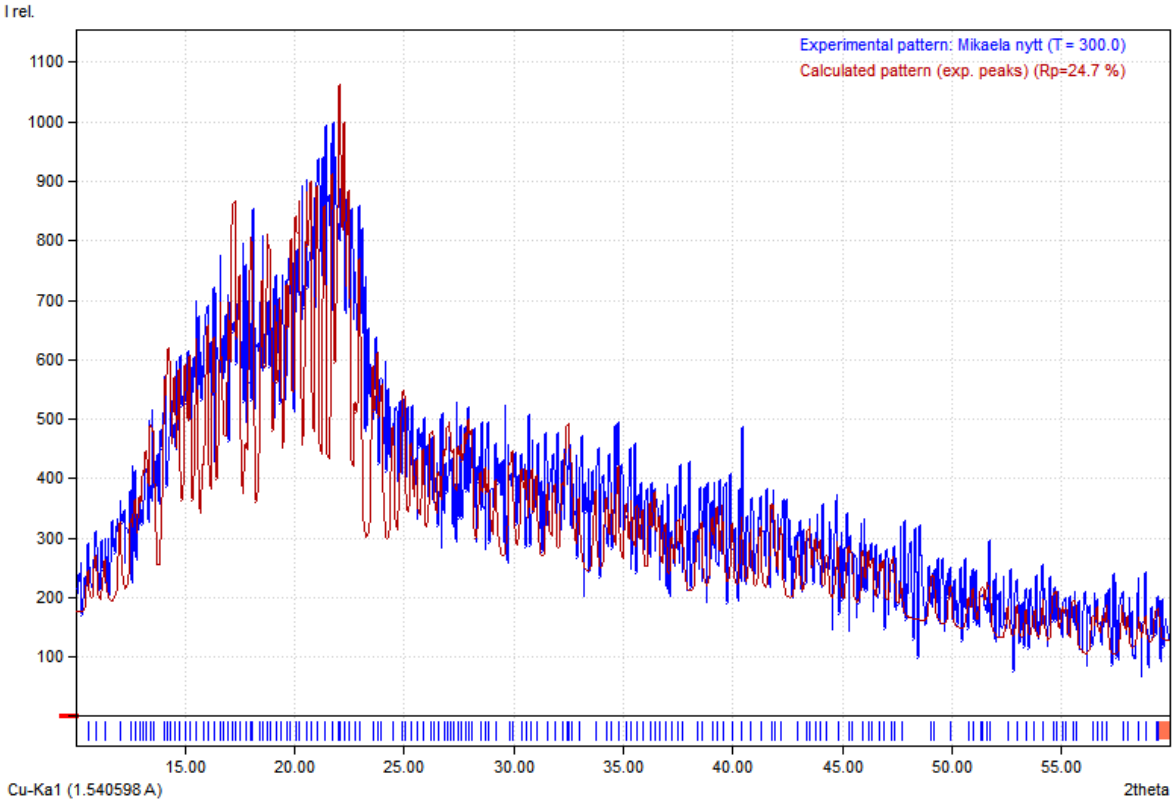
9.2 XRD



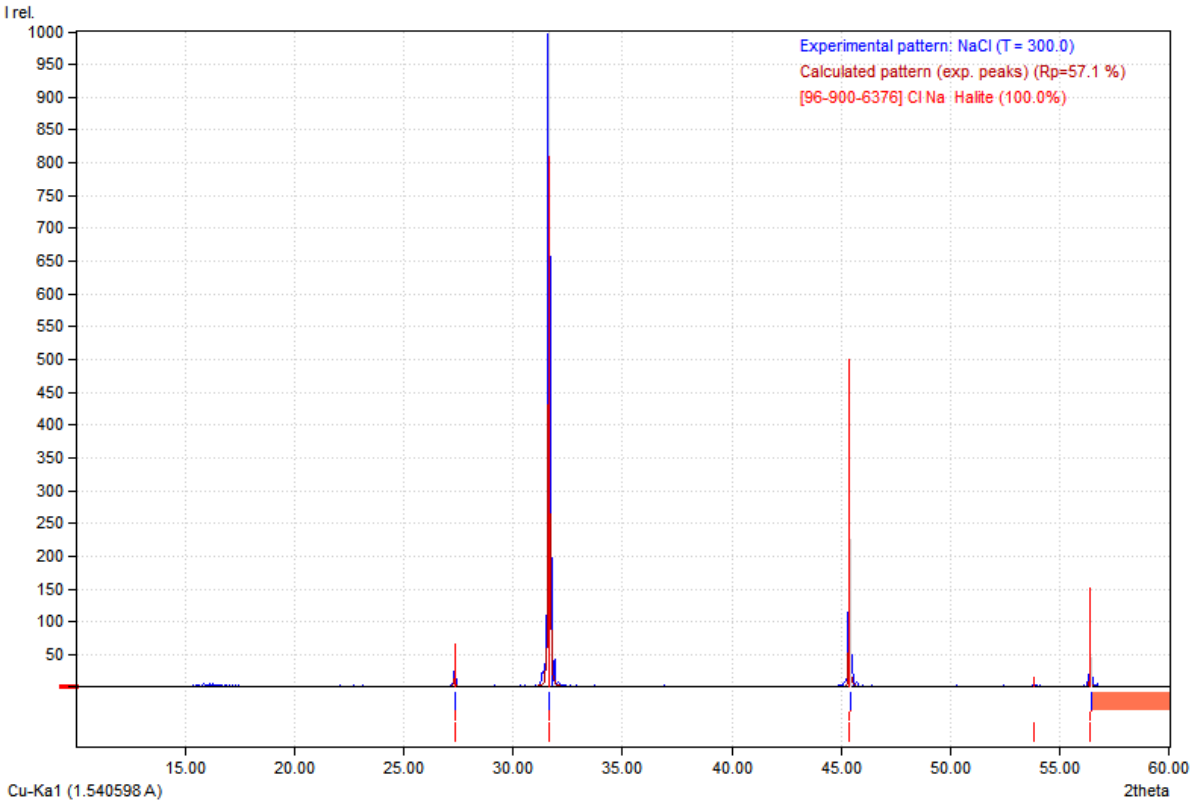
Figur 33: XRD-spektrum för cellulosa från kornskal- trestegsextraktion



Figur 34: XRD-spektrum för cellulosa från vete- trestegsextraktion



Figur 35: XRD-spektrum för cellulosa från kornskal (referens)



Figur 36: XRD-spektrum för NaCl (referens)