

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknillinen tiedekunta

LUT Kemiantekniikka

BJ01A0030 Kandidaatintyö ja seminaari

**ENTSYMIEN TALTEENOTTO JA KIERRÄTYS SELLULOOSAETANOLIN  
VALMISTUKSESSA**

Recovery and recycling of enzymes in bioethanol production

Mari Sund

4.12.2014

## TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

Teknillinen tiedekunta

LUT Kemiantekniikka

Mari Sund

**Entsyymien talteenotto ja kierrätys selluloosaetanolin valmistuksessa**

Kandidaatintyö

2014

37 sivua, 11 kuvaa ja 7 taulukkoa

Hakusanat: Entsymaattinen hydrolyysi, sellulaasi, talteenotto, kierrätys, bioetanol

Bioetanolin valmistus selluloosapitoisista raaka-aineista vaatii selluloosapolymeerien pilkkomisen liukoiseksi sokereiksi. Tämä voidaan toteuttaa entsyymaattisella hydrolyysillä. Selluloosan pilkkomiseen tarkoitettavat entsyymit, sellulaasit, ovat entsyymaattisen hydrolyysin jälkeen sitoutuneet joko kiintoainefaasiin tai ovat nestemäisessä faasissa ns. vapaina entsyymeinä. Prosessin taloudellisuuden kannalta on erityisen tärkeää minimoida siinä käytettävien entsyymien tarve, sillä tehokkaat entsyymivalmisteet ovat suhteellisen kalliita. Yksi vartenotettava vaihtoehto bioetanoli-prosessin saamiseksi taloudellisemmaksi on käytettyjen entsyymien talteenotto ja kierrätys.

Työn tarkoituksena oli selvittää kirjallisuudesta, millaisia menetelmiä on kehitetty entsyymien talteenottoon ja kierrätykseen lignoselluloosasta valmistettavan bioetanolin valmistuksessa. Työssä on keskitytty tuoreisiin tutkimuksiin ja menetelmien käyttökelpoisuuteen ja taloudellisuuteen.

Viime vuosina sellulaasien talteenotto- ja kierrätysmenetelmiä koskevat tutkimukset ovat keskittyneet pääasiassa käsittelemään nanopartikkelien avulla tapahtuvaa entsyymien immobilisointia, ultrasuodatusta, erilaisia desorptiomenetelmiä, kiinteän hydrolyysijäännöksen kierrättämistä, tuoreen substraatin lisäämistä sekä myös tislausvaiheen jälkeistä entsyymien kierrättämistä. Jotta kierrätysmenetelmä olisi tehokas, tulisi sen pyrkiä säilyttämään entsyymien aktiivisuuksia, sokerisaantoa menettämättä ja sisältää sekä neste-, että kiintoainefaasista tapahtuva kierrätys. Jokaisella kierrätysmenetelmällä on hyvät ja huonot puolensa. Entsyymien talteenottoastetta saadaan kuitenkin parannettua yhdistämällä erilaisia menetelmiä. Useista tutkimuksista huolimatta, taloudellisinta ja käyttökelpoisinta entsyymien talteenotto- ja kierrätysmenetelmää ei ole vielä saavutettu.

## **ABSTRACT**

Lappeenranta University of Technology

School of Technology

LUT Chemistry

Mari Sund

### **Recovery and recycling of enzymes in bioethanol production**

Bachelor's thesis

2014

37 pages, 11 pictures and 7 tables

**Keywords:** Enzymatic hydrolysis, cellulase, recovery, recycling, bioethanol

Bioethanol production from cellulosic raw materials requires cleavage of cellulose polymers to soluble sugars. This may be accomplished by enzymatic hydrolysis. Enzymes for digestion of cellulose, also called cellulases, are after enzymatic hydrolysis either bound to the solid phase or as so-called free enzymes in the liquid phase. For the economy of the process it is particularly important to minimize the need for the used enzymes as efficient enzyme preparations are relatively expensive. To obtain a more economical bioethanol process, one viable alternative for this is the recovery and recycling of the used enzymes.

The purpose of this work was to study from the literature about the methods, which have been developed for enzyme recovery and recycling for bio-ethanol production from lignocellulosic biomass. The focus is on recent studies and their usefulness and efficiency.

In recent years, the studies about recovery and recycling methods of cellulases have mainly focused on dealing with immobilization of enzymes with nanoparticles, ultrafiltration, various types of desorption methods, solids recycling, fresh substrate addition and recycling of enzymes after distillation. In order to be effective, the recycling method should strive to maintain the enzyme activities, without losing sugar yields and it should contain recycling from both liquid and solid phase. Each recycling method has its pros and cons. However, the recovery rate of the enzymes can be improved by combining a variety of methods. Despite of the numerous studies, the most economical and the most useful enzyme recovery and recycling method has not yet been reached.

## Sisällysluettelo

1	JOHDANTO.....	2
2	LIGNOSELLULOOSA.....	2
3	ENTSYYMIT.....	4
3.1	Sellulaasit.....	4
3.2	Muut entsyymit.....	5
3.3	Entsyymikustannukset.....	6
4	BIOETANOLIN VALMISTUS.....	6
4.1	Raaka-aineen esikäsittely.....	8
4.2	Entsyyminen hydrolyysi ja fermentointi.....	9
4.3	Tislaus ja väkevöinti.....	10
5	ENTSYYMIEN TALTEENOTTO JA KIERRÄTYS.....	10
5.1	Kierrätysreitit.....	11
5.2	Kierrätysmenetelmät.....	12
5.2.1	Ultrasuodatus.....	13
5.2.2	Sähköultrasuodatus.....	16
5.2.3	Immobilisointi.....	17
5.2.4	Desorptiomenetelmät.....	20
5.2.5	Kiintoainejäännöksen kierrätys.....	24
5.2.6	Tuoreen substraatin lisäys.....	27
5.2.7	Ioninvaihtokromatografia.....	30
5.2.8	Tislausvaiheen jälkeinen kierrätys.....	31
6	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	32
	LÄHDELUETTELO.....	35

## 1 JOHDANTO

EU:n tavoitteiden mukaan biopolttoaineiden osuutta liikenteen polttoaineista on kasvatettava vuosi vuodelta hiilidioksidipäästöjen pienentämiseksi. Bioetanoli on houkutteleva vaihtoehto liikenteen polttoaineeksi, sillä sitä voidaan sekoittaa bensiiniin tai käyttää sellaisenaan etanoliautoissa, hyödyntämällä korkeita oktaanilukuja ja höyrystymislämpötiloja (Hahn-Hägerdal et al., 2006). Bioetanoli on biopolttoaineena uusiutuvaa energiaa, ja sitä voidaan valmistaa joko sokeri- ja tärkkelyspitoisista kasveista tai biomassasta, kuten selluloosa-, hemiselluloosa- ja ligniinipitoisista materiaaleista, eli ns. lignoselluloosasta. Sokeri- ja tärkkelyspitoisia raaka-aineita hyväksi käytettäessä kilpaillaan ruokateollisuuden kanssa, joten bioetanolin valmistusta selluloosapitoisista raaka-aineista pidetään tulevaisuuden kannalta varteenotettavampana vaihtoehtona.

Bioetanolin valmistus selluloosapitoisista raaka-aineista vaatii selluloosapolymeerien pilkkomisen liukoiseksi sokereiksi. Tämä voidaan toteuttaa entsyymaattisella hydrolyysillä. Prosessin taloudellisuuden kannalta on erityisen tärkeää minimoida siinä käytettävien entsyymien tarve, sillä tehokkaat entsyymivalmisteet ovat suhteellisen kalliita. Yksi varteenotettava vaihtoehto bioetanoli-prosessin saamiseksi taloudellisemmaksi on käytettyjen entsyymien talteenotto ja kierrätys.

Työn tarkoituksena on selvittää kirjallisuudesta, että millaisia menetelmiä on kehitetty entsyymien talteenottoon ja uudelleenkäyttöön lignoselluloosasta valmistettavan bioetanolin valmistuksessa. Tarkoitus on myös keskittyä tuoreisiin menetelmiin ja niiden käyttökelpoisuuteen ja taloudellisuuteen.

## 2 LIGNOSELLULOOSA

Lignoselluloosa koostuu kolmesta pääkomponentista, selluloosasta (30–50%), hemiselluloosasta (15–35%) ja ligniinistä (10–20%). Biomassasta yhteensä n. 70 % koostuu selluloosasta ja hemiselluloosasta, jotka ovat tiukasti kiinnittyneet ligniiniin kovalentti- ja vetysidoksin. Nämä sidokset tekevät rakenteesta erittäin vankan ja kestävän. (Limayem & Ricke, 2012) Lisäksi lignoselluloosassa on myös pieniä määriä uuteaineita, happoja sekä tuhkaa (Hamelinck et al., 2005). Taulukossa 1 on esitetty yleisimpiä raaka-aineita biomassalle ja niiden koostumus.

Taulukko 1. Potentiaalinen lignoselluloosapitoisen biomassan lähde ja koostumus, %- kuivapaino (muokattu lähteestä Limayem & Ricke, 2012).

Raaka-aine	Selluloosa	Hemiselluloosa	Ligniini	Muut
Maatalousjäte	37-50	25-50	5-15	12-16
Lehtipuu	45-47	25-40	20-25	0.80
Havupuu	40-45	25-29	30-60	0.50
Ruohot	25-40	35-50	-	-
Sellujäte	50-70	12-20	6-10	-
Sanomalehtipaperi	40-55	25-40	18-30	-
Ruokohelpi	40-45	30-35	12	-

Bioetanolin valmistuskustannukset riippuvat voimakkaasti raaka-ainekustannuksista ja liiketoiminnan laajuudesta. Biokemiallisen biomassan koostumus on tärkeässä roolissa johtuen siitä, että raaka-aineen (hemi)selluloosa- ja sokerikoostumus vaikuttavat etanolin saantoon (Hamelinck et al., 2005). Taulukko 2 havainnollistaa erilaisten biomassojen sokerikoostumuksia. Biomassan biokemiallinen koostumus riippuu monista eri tekijöistä, kuten kasvualueesta, käytetyistä lannoitteista, korjuuajasta ja varastointiolosuhteista. Lisäksi havupuiden hemiselluloosat tuottavat enemmän kuusihiilisiä sokereita, kun taas lehtipuut tuottavat enemmän viisihiilisiä sokereita. Uuteaineiden määrä olisi myös parasta olla alhainen, koska jotkut niistä ovat haitallisia fermentoinnissa käytetyille mikro-organismeille. (Hamelinck et al., 2005)

Taulukko 2. Tyypillisen lignoselluloosapitoisen biomassan koostumus, %-kuivapaino (muokattu lähteestä Hamelinck et al., 2005).

Raaka-aine	Lehtipuu			Havupuu	Ruoho
	Akaasia	Poppeli	Eukalyptus	Mänty	Ruokohelpi
Selluloosa	41,61	44,70	49,50	44,55	31,98
Glukaani	41,61	44,70	49,50	44,55	31,98
Hemiselluloosa	17,66	18,55	13,07	21,90	25,19
Xylaani	13,86	14,56	10,73	6,30	21,09
Arabinoosi	0,94	0,82	0,31	1,60	2,84
Galaktoosi	0,93	0,97	0,76	2,56	0,95
Mannaani	1,92	2,20	1,27	11,43	0,30
Ligniini	26,70	26,44	27,71	27,67	18,13
Tuhka	2,15	1,71	1,26	0,32	5,95
Hapot	4,57	1,48	4,19	2,67	1,21
Uuteaineet	7,31	7,12	4,27	2,88	17,54
Lämpöarvo (GJ/t)	19,50	19,60	19,50	19,60	18,60

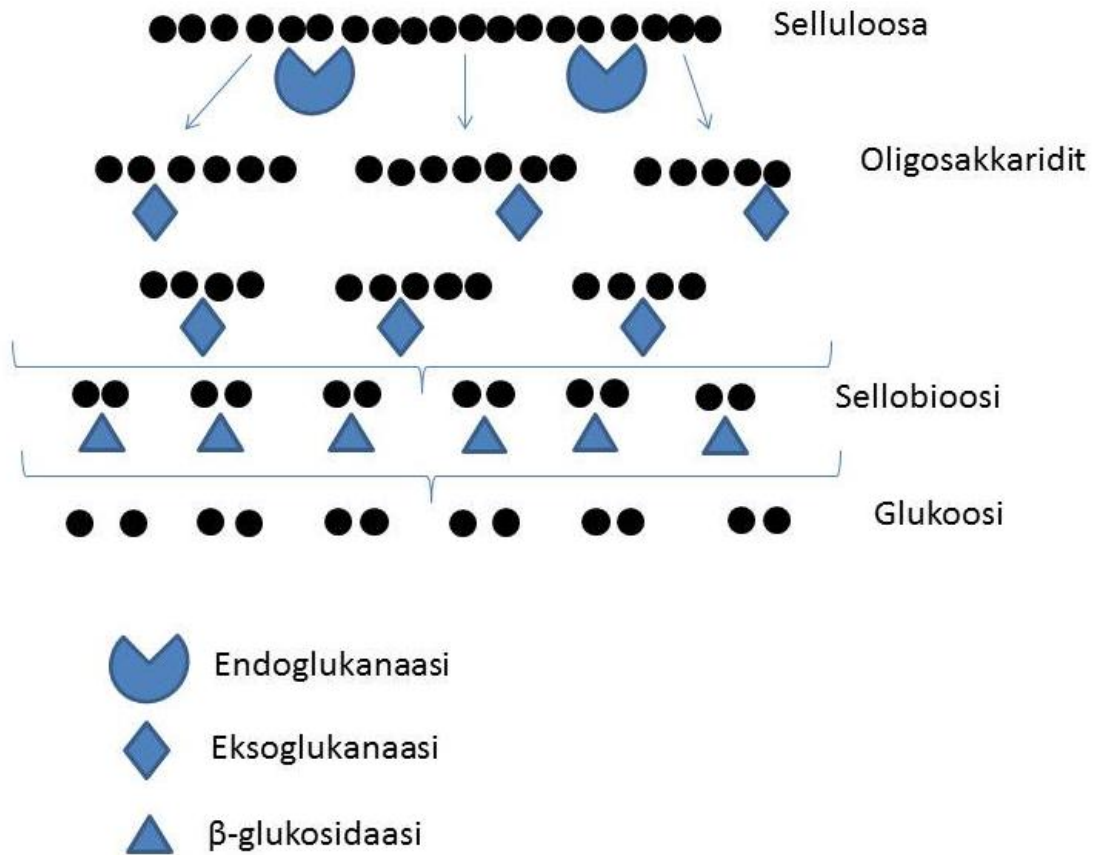
### 3 ENTSYIMIT

Entsyymit ovat luonnon biokatalyyttejä, yleisimmin proteiineja, jotka nopeuttavat elävien organismien kemiallisia reaktioita. Entsyymit osoittavat kemiallisten katalyyttien erinomaisia ominaisuuksia kuten korkean reaktioasteen miedossa pH:ssa ja lämpötilassa, matalan energiakulutuksen, hyvän spesifisyyden sekä alhaiset sivureaktiot. Vaikka entsyymejä pidetään ihanteellisina katalyytteinä teollisiin menetelmiin, niiden käyttö teollisuudessa on usein vaikeaa, koska ne eivät ole stabiileja orgaanisissa liuoksissa ja korkeissa lämpötiloissa. (Min & Yoo, 2014)

Esikäsitellyn kovuuden laskiessa myös sokereiden saanto entsyymaattisen hydrolyysin jälkeen laskee. Tämä synnyttää edelleen vaatimuksen erilaisten entsyymien käyttöön ja näiden korkeampiin annosteluihin, jotta saataisiin maksimoitua sokerisaanto. Näin ollen täydellisen hydrolyysin saamiseksi vaaditaan erilaisten entsyymiseosten kehittämistä. (Binod et al., 2011) Selluloosia ja yleisesti lignoselluloosia pilkkomaan on olemassa useampia kaupallisia sellulaasientsyymejä kuten Novozymesin ja Genencorin kehittämät ja valmistavat entsyymit. Entsyymien kohdalla kehitys on ollut nopeaa ja tavoitteena onkin ollut kalliiden entsyymivalmisteiden kulutuksen alentaminen selluloosapohjaisen bioetanolin valmistuksessa. (Nevalainen, 2012)

#### 3.1 Sellulaasit

Sellulaasientsyymejä tuotetaan sienimikrobeilla ja bakteereilla. *Trichoderma reesei* tuottaa kahta sellobiohydrolaasia, viittä endoglukanaasia ja kahta  $\beta$ -glukosidaasia. Nämä kolme entsyymiä pilkkovat yhdessä selluloosaa ja välituotteena syntyviä sellobiooseja. Endoglukanaasit pilkkovat satunnaisia selluloosaketjun sisäisiä  $\beta$ -1,4-glukosidisia sidoksia, sellobiohydrolaasit, eli ns. eksoglukanaasit, pilkkovat puolestaan selluloosaketjujen päistä sellobiooseja ja  $\beta$ -glukosidaasit viimeistelevät hydrolyysin pilkkoen sellobiooseja glukoosiksi. (Binod et al., 2011) Sellulaasientsyymien toimintamekanismit on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Sellulaasientsyymien toimintamekanismit (muokattu lähteestä, Binod et al., 2011).

### 3.2 Muut entsyymit

Koska käytetty raaka-aine sisältää yleensä myös hemiselluloosaa ja ligniiniä selluloosan lisäksi, tulee entsymiseoksen sisältää myös niiden pilkkomiseen tarkoitettuja entsyymejä.

Yksi pääkomponentti lignoselluloosapohjaisessa biomassassa on ksylaani, joka on hemiselluloosien tärkein hiilihydraatti. Ksylaanien pilkkomiseen käytetään ksylanaaseja. Ksylanaasien käyttö ksylaanin poistamiseen lignoselluloosasta lisää selluloosan vastaanottavuutta entsymaattiselle hydrolyysille. *Aspergillus niger*, *T.reesei*, *Bacillus* ja *Humicola insolens* ovat eräitä teollisia lähteitä kaupallisille ksylanaaseille. (Binod et al., 2011)

Peroksidaaseja ja lakkaaseja käytetään ligniinin hajottamiseen, sillä ligniini on tiukasti sidottuna selluloosaan tehden siitä saavuttamattoman sellulaasientsyymille (Binod et al., 2011). Ligniinin hajoamistuotteet, fenoliset ryhmät, kumminkin deaktivoivat olennaisesti



sellulolyttisiä entsyymejä ja näin ollen vaikuttavat entsyymaattiseen hydrolyysiin (Limayem & Ricke, 2012).

### 3.3 Entsyymikustannukset

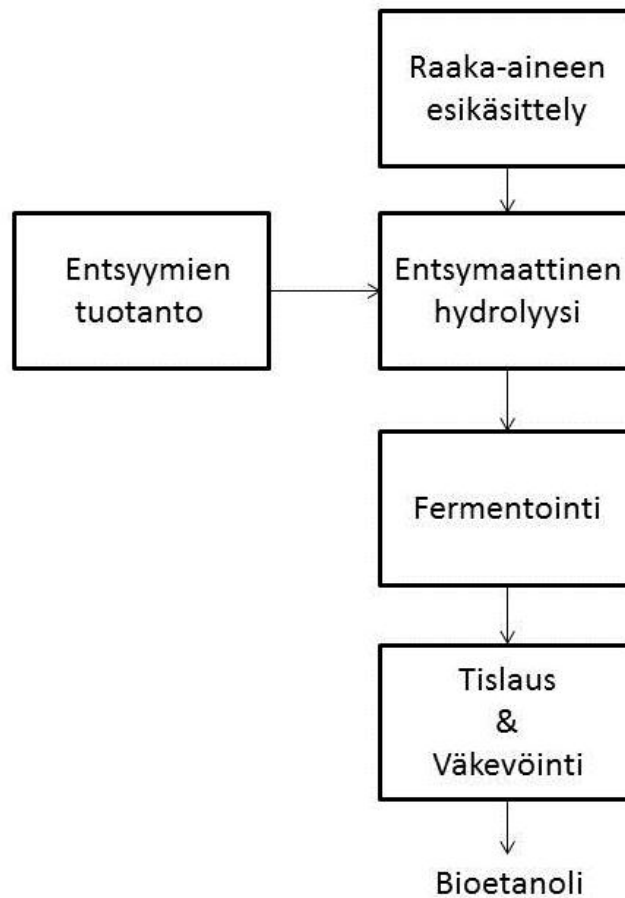
Lignoselluloosapitoisen biomassan muuntaminen sokereiksi entsyymaattisella hydrolyysillä vaatii suhteellisen suuren entsyymikuormituksen, näin ollen vaikuttaen negatiivisesti taloudelliseen tuotantoon. Entsyymaattisen hydrolyysin kustannusten alentamiseksi selluloosaetanolia valmistettaessa on ehdotettu esikäsitteilyn tehokkuuden parantamista, entsyymien valmistuskustannusten alentamista, entsyymien spesifisten aktiivisuuksien kasvattamista sekä entsyymien kierrättämistä uusiin hydrolyysikertoihin. Entsyymien valmistuskustannuksia onkin saatu jo alennettua huomattavasti ja niiden aktiivisuuksia on saatu parannettua, joten entsyymien suhteellisen hyvän stabiilisuus ja kestävyys tekevät entsyymien kierrättämisestä houkuttelevan vaihtoehdon kustannusten vähentämiseksi. On arvioitu, että vaaditaan noin 15 – 50 g sellulaaseja jokaista kg lignoselluloosaa varten ja verrattuna tärkkelyspitoisen biomassan hydrolyysiin, lignoselluloosasta valmistettu etanoli on 40 % kalliimpaa valmistaa. (Pribowo, 2014) Selluloosaetanolin ja maissietanolin valmistuskustannuksia on vertailu taulukossa 3.

Taulukko 3. Entsyymien käytön vertailu selluloosaetanolin ja maissietanolin valmistuksessa. (muokattu lähteestä Pribowo, 2014)

		Selluloosaetanoli	Maissietanoli
Etanolin valmistuskustannukset	(US \$/litra)	0,94	0,67
Entsyymikustannukset	(US \$/litra etanolia)	0,13 - 0,38	~ 0,01
Entsyymien osuus etanolin valmistuskustannuksista	(%)	14 - 40	~ 1,5
Entsyymien määrä	(g/kg selluloosaa/tärkkelystä)	~ 10 - 50	0,2 - 0,3

## 4 BIOETANOLIN VALMISTUS

Bioetanoli on etyylialkoholia, kemiallinen kaava on  $C_2H_5OH$  ts. EtOH. Valmistettaessa bioetanolia lignoselluloosasta prosessi sisältää seuraavat vaiheet: raaka-aineen esikäsitteily, hydrolyysi, fermentointi sekä tislauksen ja väkevöinti (Cotana et al., 2014), jotka on havainnollistettu kuvassa 2.



Kuva 2. Selluloosaetanolin valmistus

Esikäsittelyn jälkeen selluloosa ja joissakin tapauksissa hemiselluloosakuidut on pilkottava pienemmiksi sokereiksi.

Hydrolyysissä selluloosa pilkotaan glukoosiksi seuraavan reaktion mukaisesti (Hamelinck et al., 2005):



Ilman esikäsittelyvaihetta hydrolyysin saanto jää yleensä alle 20 %, mutta raaka-aineen esikäsittelyn jälkeen saanto paranee usein yli 90 % (Hamelinck et al., 2005).

Hydrolyysi voidaan tehdä kemiallisesti tai biokemiallisesti. Kemiallinen hydrolyysi tapahtuu joko happo- tai emäskäsittelyin, biokemiallisen hydrolyysin tapahtuessa sellulaasi entsyymisekoitusta käyttäen (Suokko, 2010). Tässä työssä keskitytään tarkastelemaan entsyymaattista hydrolyysiä.

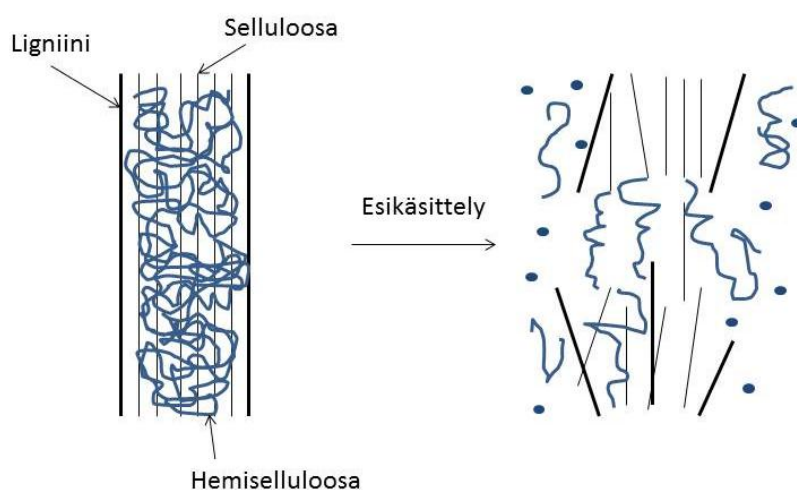
Hydrolyysissä saadut viisi- ja kuusihiiliset sokerit fermentoidaan edelleen etanoliksi seuraavien reaktioiden mukaisesti (Hamelinck et al., 2005):



Lopuksi etanoli erotetaan fermentoinnin jälkeisestä tuotevirrasta tislaamalla ja väkevöimällä jopa enimmillään 99,6 % pitoisuuteen (Balat, 2011).

#### 4.1 Raaka-aineen esikäsittely

Jollei biomassaa ole esikäsitelty, entsyymien avulla tapahtuva selluloosan muuntaminen sokereiksi on verrattain hidas reaktio. Esikäsitely myös parantaa prosessin saantoa ja näin ollen parantaa sen taloudellisuutta (Galbe & Zacchi, 2002). Esikäsitelyllä pyritään muuttamaan lignoselluloosan kiderakennetta, jotta se tulee vastaanottavaisemmaksi entsyymien vaikutukselle hydrolyysissä. Esikäsitelyn tarkoitus on siis murtaa selluloosan kiderakenne, jolloin huokoisuus kasvaa ja näin ollen entsyymit pääsevät käsiksi suurempaan vapaaseen pinta-alaan ja selluloosan pilkkominen helpottuu (Mosier et al., 2005; Nevalainen, 2012). Kuvassa 3 on esitetty esikäsitelyn vaikutus puun rakenteeseen.



Kuva 3. Esikäsitelyn vaikutus puun rakenteeseen. (muokattu lähteestä, Mosier et al., 2005)

Esikäsitelytekniikoita on erilaisia ja todennäköisimmin ei tule olemaan yhtä yleistä menetelmää esikäsitelylle, koska eri raaka-aineet vaativat erilaiset esikäsitelyt. AFEX- (Ammonia Fiber Explosion), märkähapetus- ja LHW- (Liquid Hot Water) menetelmät

soveltuvat parhaiten maatalouden jätteille kun taas höyrymenetelmät näyttävät soveltuvan parhaiten sekä metsätalouden että maatalouden jätteille. (Hahn-Hägerdal et al., 2006)

Yksi tutkituimmista esikäsitteilytavoista, joilla kuidut saadaan erotettua toisistaan ja osa kuiduista pilkottua pienemmiksi sokereiksi, on ns. höyryräjäytys, jossa raaka-aine kyllästetään vedellä tai laimealla tai vahvalla hapolla ja kuumennetaan noin 160–260 asteeseen kylläisellä höyryllä (6 - 47 bar). Tyypillisesti n. 1- 30 min reaktioajan jälkeen paineen annetaan pudota lyhyessä ajassa, jolloin höyry laajenee nopeasti ja räjäyttää kuitupitoisen materiaalin alttiimmaksi entsyymaattiselle hydrolyysille. (Suokko, 2010)

## **4.2 Entsyymaattinen hydrolyysi ja fermentointi**

Lignoselluloosan hiilihydraattipolymeerit täytyy hydrolyysin avulla muuttaa sokereiksi ennen fermentointivaihetta (Balat, 2011). Hydrolyysivaihe suoritettuna entsyymikäsitteilyllä on vaihtoehtona miedompi ja spesifisempi kuin happo- tai emäshydrolyysi. Entsyymaattinen hydrolyysi tapahtuu olosuhteissa joka on optimaalinen sellulaasientsyymille, pH 4,8 ja lämpötila 45–50°C. Entsyymaattisen hydrolyysin suurin hyöty verrattuna kemialliseen hydrolyysiin on se, että se ei aiheuta korroosio-ongelmaa. Prosessi itsessään on kumminkin varsin hidas, ottaen huomioon, että se kestää useita päiviä kun taas kemiallinen hydrolyysi vain muutaman minuutin. Lisäksi entsyymaattisen hydrolyysin lopputuotteet inhiboivat entsyymien toimintaa, lopulta vaikuttaen prosessiin jollei sokereita poisteta heti muodostumisen jälkeen. (Binod et al., 2011)

Entsyymaattinen hydrolyysi koostuu yleensä kolmesta eri vaiheesta: sellulaasin adsorptiosta selluloosan pintaan, sellulaasin avulla tapahtuvasta selluloosan pilkkoutumisesta fermentoitaviksi sokereiksi, sekä sellulaasin desorptiosta lignoselluloosajäännöksestä liuokseen. Hydrolyysin jatkuessa, osa adsorboituneista entsyymeistä vapautuu vähitellen reaktioliuokseen, jolloin sellulaasit jakaantuvat kasvualustan ja liuoksen välille tavalla, jota voidaan mallintaa käyttämällä Langmuirin isotermejä. (Gregg & Saddler, 1996)

Entsyymikäsitteily voidaan suorittaa samanaikaisesti fermentoinnin kanssa, jolloin puhutaan ns. SSF-käsitteilystä (simultaneous saccharification and fermentation) tai hydrolyysi ja fermentointi voidaan suorittaa erikseen jolloin kyseessä on SHF-käsitteily (separate hydrolysis and fermentation). Hydrolyysivaiheessa syntyvät sokerit toimivat entsyymaattisessa hydrolyysissä inhibiittoreina entsyymeille. Tästä johtuen samanaikaista

hydrolyysia ja fermentaatiota pidetään parempana vaihtoehtona, sillä siinä sokereiden pitoisuudet pysyvät alhaisena, eivätkä aiheuta huomattavia entsyymi inhibitioita. (Limayem, 2012). SSF-prosessissa lämpötila on noin 38 °C, joka on kompromissi hydrolyysi- ja fermentointivaiheiden optimaalisista lämpötiloista. Käytetyimpiä mikrobeja SSF-prosessissa ovat *T.reesei* ja *Saccharomyces cerevisiae*. Lisäksi kuumaa sietäviä hiivoja ja bakteereja on käytetty, jotta saadaan lämpötilaa lähemmäksi hydrolyysin optimaalista lämpötilaa, joka on yleensä noin 50 °C. (Binod et al., 2011)

#### **4.3 Tislaus ja väkevöinti**

Tislausvaiheessa fermentoinnin jälkeen, bioetanoli vaatii edelleen etanolin erottamisen ja puhdistamisen vedestä. Perustuen etanolin ja veden erilaisiin haihtuvuuksiin, jakotislaus on käytetty prosessi. Tämä prosessi sisältää yksinkertaisesti etanoli-vesi-seoksen kiehumisen. Koska veden kiehumispiste on 100 °C ja etanolin 78,3 °C, etanoli höyrystyy näin ollen ensimmäisenä ja etanolitise voidaan ottaa uudelleen talteen 95 % pitoisuudessa (Limayem & Ricke, 2012).

### **5 ENTSYMIEN TALTEENOTTO JA KIERRÄTYS**

Entsyyattisen hydrolyysin pullonkaulana toimii käytettävien entsyymien kalleus. On arvioitu, että biomassasta valmistettavan bioetanolin valmistuskustannuksista 20 % koostuu sellulaasientsyymeistä (Gurram & Menkhaus, 2014) ja jopa 50 % SSF-prosessin juoksevista kustannuksista (Skovgaard & Jørgensen, 2013). Kun aktiiviset entsyymit otetaan talteen entsyymattisen hydrolyysin jälkeen, voidaan vähentää lisättävien entsyymien määrää ja prosessin entsyymikustannuksia. Entsyymien kierrätys on otollinen myös jatkuvalle prosessille, joka on teolliselle tuotannolle välttämättömyys. (Weiss et al., 2013). Myös entsyymien käyttöaste tehostuu kierrättämällä. On todettu, että sellulaasi- ja sellobioosientsyymi säilyttävät jopa yli 70 % aktiivisuudestaan käytön jälkeen (Tu & Saddler, 2010). Ihanteellisessa tilanteessa tehokas kierrätysmenetelmä saavuttaa entsyymien maksimaalisen talteenoton, menettäen vähimmäismäärän sokereita ja entsyymien aktiivisuuksia sekä vähimmäismäärän seuraavaan hydrolyysikertaan kulkeutuvia jäännösubstraatteja, sokereita, etanolia ja inhibiittoreita (Pribowo, 2014).

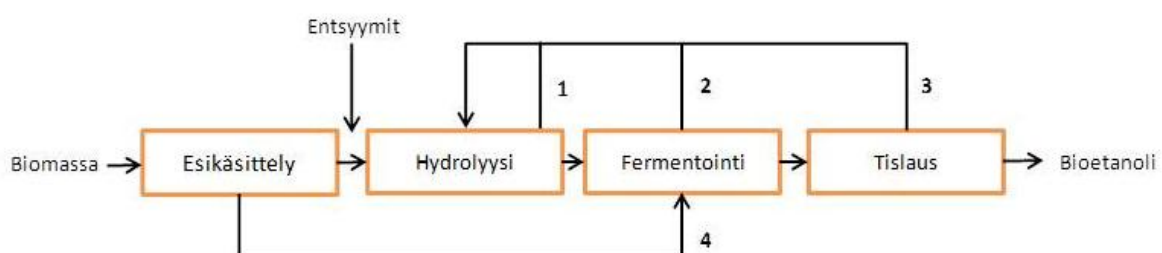
Tutkimuksia sellulaasientsyymien talteenotosta ja kierrätyksestä on tehty huomattava määrä. Riippuen käytetyistä kierrätysmenetelmistä on osoitettu, että hydrolyysin saanto

vaihtelee 9 – 80 % välillä (Lindeman et al., 2013). Entsyymit voidaan kierrättää hydrolyysin tai fermentoinnin jälkeen, mutta nämä vaihtoehdot vaativat sen, että joko sokerit tai etanoli täytyy pystyä tehokkaasti erottamaan entsyymeistä ja kiintoainejäännöksestä. Tislausvaiheen jälkeinen entsyymien kierrättäminen on myös mahdollista ja tällöin ei menetä arvokkaita prosessituotteita (Skovgaard et al., 2014). Entsyymikierrätyksen suurin pullonkaula lignoselluloosapitoista biomassaa käytettäessä on ligniinin runsas määrä, sillä ligniinillä on voimakas sitoutumisaffiniteetti moniin entsyymeihin. Ligniinin lisäksi myös korkeat lämpötilat ja inhibiittorit vaikuttavat entsyymien stabiilisuuteen ja talteenottoon (Skovgaard & Jørgensen, 2013).

## 5.1 Kierrätysreitit

Jotta sellulaaseja voidaan tehokkaasti kierrättää, täytyy niiden täyttää muutama vaatimus sekä lisäksi olla stabiileja pitkäaikaisille kemiallisille ja fysikaalisille vaikutuksille prosessiolosuhteissa. Ensimmäinen vaatimus vaikuttaa entsyymien jakautumiseen kiinteään tai nestemäiseen faasiin ja määrittelee pitkälti takaisinkierrätyksen reitin.

Entsyymejä voidaan kierrättää monessa eri prosessivaiheessa, kuten heti hydrolyysin jälkeen (Reitti 1), fermentoinnin jälkeen (Reitti 2), tislauksen jälkeen (Reitti 3) tai lisäämällä tuoretta biomassaa fermentointivaiheeseen (Reitti 4). Eri kierrätysreitit on havainnollistettu kuvassa 4.



Kuva 4. Vaihtoehtoiset kierrätysreitit entsyymeille bioetanolin valmistuksessa. (muokattu lähteestä Lindeman et al., 2013)

Jokaisella eri kierrätysreitillä on omat etunsa ja haittansa. Entsyymien kierrätyksen tapahtuessa heti hydrolyysin jälkeen etuna on suhteellisen tuoreiden entsyymien kierrättäminen. Kuitenkin tässä tapauksessa sellulaasit ovat voimakkaasti sitoutuneita

jäljelle jääneeseen biomassaan, jolloin prosessikustannukset väistämättä nousevat erotus- ja desorptiotekniikoita käytettäessä.

Fermentoinnin jälkeiselle entsyymien kierrätykselle on hyötyä siinä, että entsyymit eivät ole vielä joutuneet sietämään tislauksen olosuhteita, vaikka niiden korkea muuntuminen voisi johtaa entsyymien eriytymiseen enemmän nestemäisen kuin kiinteän faasin puolelle. Huolimatta siitä, että lopputuoteinhibitio lieventyy sokereiden fermentoituessa etanoliksi, myös etanoli inhiboi entsyymejä. Fermentointiliuoksen kierrättämisestä johtuva korkeampi etanolipitoisuus on tässä tapauksessa edullisempi sen alentaessa tislausvaiheen energiakulutusta.

Tislausvaiheen jälkeinen kierrättäminen on mahdollista vain jos tislauksen suoritetaan alhaisessa lämpötilassa ja vakuuissa. Tässä tapauksessa liete käytetään uudelleen juuri esikäsiteltyyn biomassaan. Tämä menetelmä on teknologisesti helpoin toteuttaa, koska käsiteltävä tuote on ohut mäski, jossa ei ole sokereita eikä etanolia inhiboimassa hydrolyysia. Entsyymit ovat kuitenkin tässä vaiheessa käyneet läpi monet prosessivaiheet ja niiden aktiivisuus on huomattavasti heikentynyt.

Entsyymejä voidaan kierrättää myös lisäämällä tuoretta biomassaa fermentointivaiheeseen, jolloin sellulaasisubstraattien affiniteetti siirtäisi entsyymit esimerkiksi ligniinistä selluloosaan. Tämä entsyymien kierrätysreitti hyödyntää kaikki jäljelle jääneet aktiiviset entsyymit käsittelemättä erotusta ja lisää lopullista etanolipitoisuutta. Haittana on kuitenkin optimaalisten hydrolyysiolosuhteiden väheneminen tuorelle materiaalille, jos tuore biomassaa lisätään fermentointivaiheeseen siinä vaiheessa kun glukoosi- tai etanolipitoisuudet ovat korkeat. (Lindeman et al., 2013)

## **5.2 Kierrätysmenetelmät**

Entsyymien tehokas talteenotto vaatii sen, että ne täytyy joko erottaa ja ottaa talteen niihin liittyneistä jakeista tai entsyymiä sisältävät jakeet täytyy kierrättää jälkikäteisiin hydrolyyseihiin. Suurin osa tutkituista kierrätysmenetelmistä sisältää joko entsyymien erottamisen joko kiinteästä tai nestemäisestä faasista, tai kiinteän ja nestemäisen faasin suoran kierrättämisen. (Weiss et al., 2013) Tyypillisesti hydrolyysin jälkeen 40 – 60 % alkuperäisestä sellulaasi entsyymilisäyksestä säilyy liuoksessa. Näin ollen entsyymien talteenotto nestefaasista on tärkeää (Pribowo, 2014). Potentiaaliin kierrättää entsyymejä

vaikuttavat myös yleiset prosessiolosuhteet kuten lämpötila, pH, proteiinilisäykset, substraattipitoisuudet sekä lopullinen etanolipitoisuus. Myös suunniteltuihin prosessilaitteistoihin liittyvät fyysiset tekijät lisäävät entsyymien kierrätyksen monimutkaisuutta, sillä leikkausvoimilla ja kontakteilla ilma-nesteraajapinnan kanssa on osoitettu olevan negatiivinen vaikutus sellulaasin stabiilisuuteen. (Lindeman et al., 2013)

Entsyymien kierrättämiseen on käytetty useita eri menetelmiä, joissa sedimentaation jälkeen entsyymit erotetaan joko ultrasuodatuksella, uudelleen adsorptiolla ja immobilisoinnilla (Binod et al., 2011). Lisäksi on monia muita menetelmiä, joita käsitellään yksityiskohtaisemmin seuraavissa luvuissa. Eri kierrätysmenetelmien tehokkuuksia on tosin vaikeaa verrata toisiinsa, sillä niissä on käytetty usein erilaisia substraatteja sekä lisäksi eri esikäsitelymenetelmiä ja prosessiolosuhteita (Qi et al., 2011). Jokaisella kierrätysmenetelmällä on omat hyötynsä ja haittansa, koskien menetelmän käyttökelpoisuutta tai taloudellisuutta ajatellen bioetanoli-prosessin teollista tuotantoa. Neljän kierrätyskerran katsotaan yleensä olevan riittävä tuomaan prosessoinnin jatkuvaan tilaan (Xue et al., 2012).

Kierrätysmenetelmän käyttökelpoisuutta ajatellen entsyymiaktiivisuuksien määrittäminen on tärkeää. Entsyymiaktiivisuus kuvaa sellulaasientsyymien kykyä hydrolysoida selluloosaa ja entsyymien aktiivisuuksien säilyttäminen tulisi olla onnistuneen kierrätysmenetelmän lähtökohtana. Sellulaasientsyymien aktiivisuuksien määrittäminen on suoritettu käyttäen sekä luonnollisia, että synteettisiä substraatteja. Biomassan jalostuksessa rutiininomaisesti käytettyjä menetelmiä ovat suodatinpaperimenetelmä (FPA eli Filter Paper Assay), joka mittaa sellulaasin kokonaissuorituskykyä, sekä karboksimeetyliselluloosamenetelmä (CMC-assay) endoglukanaasin aktiivisuuden määrittämiseen,  $\beta$ -glukosidaasimenetelmä sellobiaasia varten ja lisäksi eksoglukanaasin aktiivisuuden mittaamiseksi kehitetty Avicel-menetelmä (Juturu & Wu, 2014).

### **5.2.1 Ultrasuodatus**

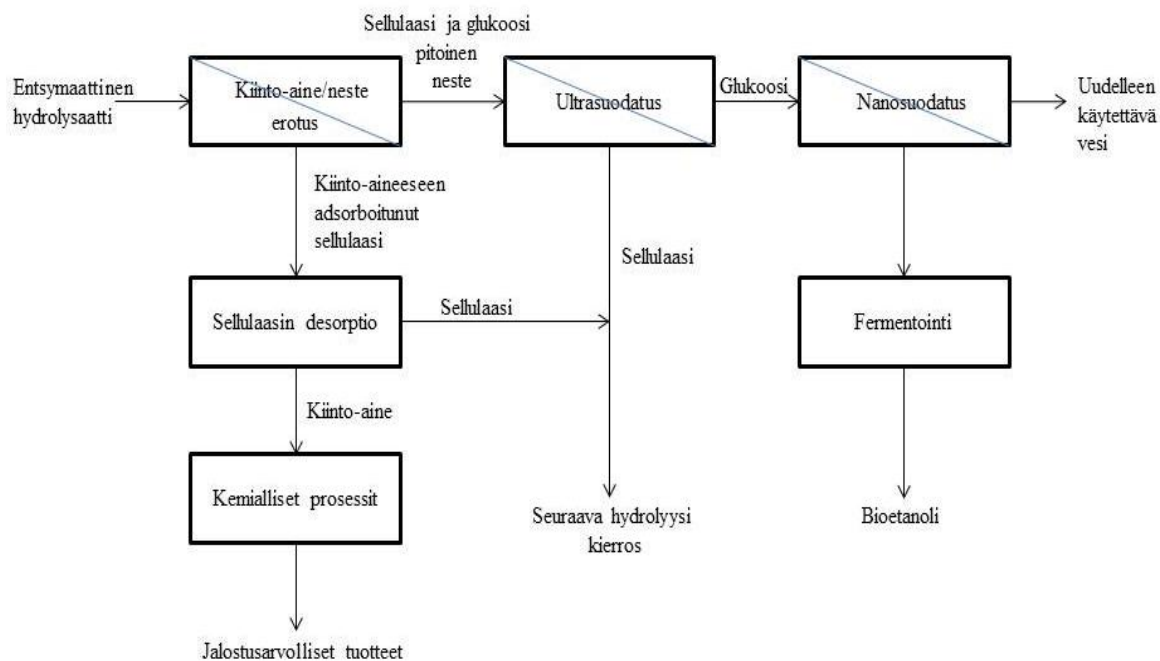
Paineen avulla tapahtuva membraanierotusprosessi on kehittynyttä teknologiaa ja sitä on käytetty eri toimialoilla haluttujen tuotteiden erotukseen, puhdistukseen ja väkevöimiseen, johtuen menetelmän korkeasta talteenotto- tai poistotehosta, tuotetun veden uudelleen käytettävyydestä, matalasta energian käytöstä, lievista käyttöolosuhteista sekä muihin toimintayksiköihin integroimisen helppoudesta. Ultrasuodatuksessa käytettävät



membraanit voivat pidättää makromolekyylejä joiden molekyylipainot vaihtelevat 1000 – 100 000 g/mol välillä ja soveltuvat näin erityisesti proteiinien suodattamiseen. (Qi et al., 2012)

Käyttämällä vain yhtä suodatuskertaa ja lisäämättä ainuttakaan kemikaalia, ultrasuodatuksella voidaan talteenottaa kaikki sellulaasien komponentit, endoglukanaasit, eksoglukanaasit sekä  $\beta$ -glukosidaasit ja lisäksi hydrolyysireaktiossa valmistuneet lopputuotteet saadaan poistettua (Chen et al., 2013; Qi et al., 2011). Ultrasuodatus vaikuttaakin olevan toteuttamiskelpoinen vaihto-ehto entsyymien kierrätykseen, saavuttaen jopa 66–75 % talteenottoasteen (Gurram & Menkhaus, 2014). Rodrigues, Felby & Gama (2014) saavuttivat tutkimuksessaan jopa 80 % talteenottoasteen laboratoriomittakaavassa tehtynä. Kuitenkin tätä menetelmää rajoittaa sen suhteellisen hidas käsittelyaika, korkea hinta sekä väistämätön suodatusmembraanien likaantuminen (Gurram & Menkhaus, 2014). Kiintoaineen poistaminen etukäteen vähentäisi membraanien likaantumista, joten mikrosuodatusvaihe ennen ultrasuodatusta on tarpeen. Membraanien likaantumisen lisäksi konsentraatiopolarisaatio aiheuttaa nopeasti virtauksen alenemisen ja rajoittaa voimakkaasti ultrasuodatusmenetelmän käyttöä. (Chen et al., 2013)

Qi et al. (2012) toteavat, että entsyymattisen hydrolyysin jälkeen jää kaksi haasteellista tehtävää, jotka täytyisi ratkaista. Ensin täytyisi kiinteään jäännökseen adsorboituneet sellulaasit desorboida kierrätystä varten ja sen jälkeen pitäisi sellulaasit erottaa sokereista nestemäisestä faasista. Ensimmäinen haaste voidaan toteuttaa useilla desorptiomenetelmillä kuten pinta-aineen käytöllä, alkalilla, urealla tai erilaisilla pH-puskureilla. Toinen haaste voidaan oletettavasti toteuttaa ultrasuodatuksen ja nanosuodatuksen yhdistelmällä. Tällä yhdistelmällä saadaan lisäksi tehostettua taloudellista kannattavuutta, johtuen saaduista arvokkaista sivutuotteista. Näitä sivutuotteita, kuten esimerkiksi sideaineita, johtavia polymeerejä sekä kuitu- ja epoksihartseja, saadaan prosessoitua sellulaasin desorption jälkeen saadusta, lähinnä ligniinistä koostuvasta kiintoaineesta. Tällainen entsyymattisen hydrolyysin jälkeinen menetelmä on havainnollistettu kuvassa 5, jossa kiintoaine-neste erotus suoritettiin sentrifugoimalla.



Kuva 5. Lignoselluloosapitoisen biomassan entsymaattisen hydrolysaatin käsittelymenetelmä, käyttäen hyväksi ultra- ja nanosuodatusta sekä samalla tuottaen muita arvokkaita tuotteita. (muokattu lähteestä, Qi et al., 2012)

Qi et al. (2012) tutkimuksen tavoitteena oli tutkia höyryräjäytyksellä esikäsitellyn vehnänoljen entsymaattisen hydrolysaatin sellulaasien talteenottoa käyttäen ultrasuodatusvaihetta ja edelleen glukooSiin konsentroimista käyttäen nanosuodatusta. Ultrasuodatukseseen käytettiin polyeetterisulfoni (PES) membraaneja ja nanosuodatukseseen kahta eri polyamidimembraania. Näiden membraanien ominaisuudet on esitelty taulukossa 4. Ultrasuodatusvaiheessa hydrolysaattiliuoksessa olevat sellulaasit talteenotettiin retentaatista ja voitiin käyttää uudelleen seuraavassa hydrolyysissä. GlukooSiin läpäistyä täydellisesti ultrasuodatusmembraanin, voitiin se ottaa talteen permeaatista ja konsentroida edelleen nanosuodatusvaiheessa glukooSisaannon parantamiseksi.

Taulukko 4. Käytettyjen membraanien ominaisuudet. (muokattu lähteestä Qi et al., 2012)

Membraani	PES5	PES10	PES30	NF90	NF270
Maksimi lämpötila °C	50	50	50	45	45
Suosittelut pH-asteikko	2 - 12	2 - 12	2 - 12	3 - 10	3 - 10
Maksimi paine bar	5	5	5	41	41
MWCO g/mol	5000	10 000	30 000	90	150

Tutkimuksissa PES10-membraani osoittautui ultrasuodatuksessa parhaiten soveltuvaksi sellulaasien talteenottamiseen, johtuen sen hyvästä likaantumisen estokyvystä sekä glukoosin täydellisestä läpäisevyydestä. Virtauksen ollessa  $26,5 \text{ l/m}^2\text{h}$ , 73,9 % sellulaaseista pystyttiin talteenottamaan. Nanosuodatusvaiheeseen parhaiten soveltuvaksi havaittiin NF270 membraani, jota käytettäessä ja virtauksen ollessa  $13,3 \text{ l/m}^2\text{h}$  saatiin ultrasuodatuksen jälkeinen glukoosipitoisuus  $30,2 \text{ g/l}$  nostettua  $110,2 \text{ g/l}$ . (Qi et al., 2012)

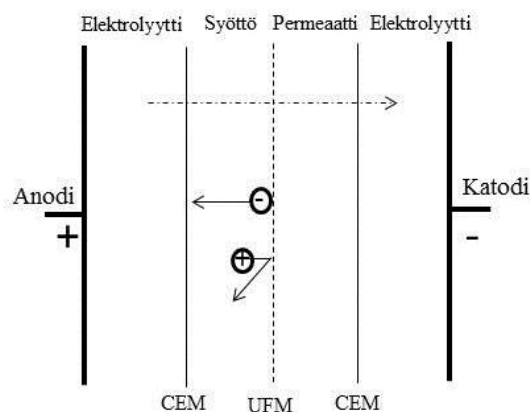
Tämä ultrasuodatuksen ja nanosuodatuksen yhdistelmä olisi yksinkertainen ja varsin tehokas menetelmä niin sellulaasin talteenottoon sekä sokeripitoisuuden parantamiseen. Lisäksi saadut sivutuotteet parantavat menetelmän taloudellisuutta. Membraanien likaantuminen ja siitä johtuva membraanien lyhyt käyttöikä vaikuttavat kuitenkin negatiivisesti suunniteltaessa ultrasuodatusmenetelmää teolliseen tuotantoon.

### 5.2.2 Sähköultrasuodatus

Konsentraatiopolarisaation ollessa merkittävä haitta membraanisuodatuksessa, on sen estämiseksi kehitetty jo useita menetelmiä. Sähkökentällä tehostetun membraanisuodatuksen, eli sähköultrasuodatuksen, tiedetään tehokkaasti alentavan konsentraatiopolarisaatiota. Kun membraania kuormitetaan sopivalla sähkökentällä, varautuneet biomakromolekyylit siirtyvät pois membraanin pinnalta ja näin saadaan aikaan konsentraatiopolarisaation aleneminen sekä virtauksen parantuminen. Sellulaasi koostuu useista proteiinikomponenteista, joilla on eri molekyylipainot ja isoelektridiset pisteet. Entsymaattisen hydrolyysin optimaalisen pH:n ollessa noin 5, ovat sellulaasin komponentit näin ollen varauksiltaan positiivisia, negatiivisia tai neutraaleja. Jos sähkövirralla pystytään pitämään suurin osa näistä varautuneista molekyyleistä pois membraanin pinnalta, vaikuttamatta sellulaasin aktiivisuuteen, on sähköultrasuodatuksella mahdollista kierrättää sellulaaseja. (Chen et al., 2013)

Sähköultrasuodatuksen toteuttamiskelpoisuutta sellulaasien kierrättämiseen ovat työssään tutkineet Chen et al. (2013). Ensin sähköultrasuodatuksen mahdollista käyttöä sellulaasien kierrätykseen arvioitiin mittaamalla suodatetun sellulaasiliuoksen aktiivisuus, virtaus sekä konsentraatiopolarisaatiovastus,  $R_{cp}$ . Lisäksi sähköultrasuodatus suoritettiin happokäsitellyn vehnäöljen entsyymaattiselle hydrolysaatille, käyttäen eri olosuhteita. Sähköultrasuodatusyksikön kaaviokuva on esitetty kuvassa 6. Käytössä oli kaksi kationinvaihtomembraania (CEM) sekä ultrasuodatusmembraani (UFM). Tutkimuksessa

ilmeni, että sähköultrasuodatuksella pystyttiin radikaalisesti lieventämään konsentraatiopolarisaatiota ja lisäämään virtausta sellulaasien kierrätyksestä hydrolysaatista, vaikuttamatta sellulaasien aktiivisuuksiin (Chen et al., 2013). Tämän menetelmän käytettävyyttä rajoittanee kuitenkin eniten käytetystä sähkövirrasta aiheutuvat lisäkustannukset.



Kuva 6. Sähköultrasuodatuksen kaaviokuva, jossa - -merkkiset ovat negatiivisesti varautuneet sellulaasikomponentit ja +-merkkiset positiivisesti varautuneet sellulaasikomponentit. (muokattu lähteestä Chen et al., 2013)

### 5.2.3 Immobilisointi

Entsyymien immobilisointi parantaa niiden käyttöä ja pidentää käyttöikä, sillä immobilisointi tekee entsyymeistä stabiileja ja kestävämpiä vaikeammille olosuhteille, kuten laajemmille pH- ja lämpötila-alueille. Entsyymien aktiivisuus säilyy myös paremmin immobilisointina. Immobilisointi helpottaa tehokasta entsyymien talteenottoa reaktioväliaineesta, mahdollistaen katalyytin uudelleen käytön useita kertoja. Immobilisointi, eli sitouttaminen kiinteään kantajaan, tapahtuu periaatteessa useilla eri tavoilla, kuten adsorptiolla, kovalenttisella kiinnityksellä, kapseloinnilla tai jonkun muun menetelmän yhdistelmällä. Jotta immobilisoidujen entsyymien käyttö olisi taloudellista, täytyy immobilisointimenetelmä ja käytetty kantaja-aine valita huolella. (Cipolatti et al., 2014) Eräs lähestymistapa entsyymien kierrättämiselle lietteestä, joka sisältää hydrolysoimatonta selluloosaa ja ligniiniä, on niiden immobilisointi huokosetomiin magneettiherkkiin partikkeleihin. Tällöin immobilisoidut sellulaasit voidaan talteenottaa

käyttäen magneettista erotinta ja edelleen kierrättää seuraavaan hydrolyysikierrökseen. (Alftrén & Hobley, 2014)

Sekä Shang et al. (2014), että Weiss et al. (2013) toteavat, että immobilisointi ei ole soveltuva menetelmä selluloosan hydrolyysissä, johtuen steerisistä esteistä, aineensiirron vastuksesta sekä hankalasta ja kalliista immobilisoitujen entsyymien erotuksesta kantaja-aineesta. Entsyymien kierrätystä ajatellen immobilisointimenetelmä on sovelias lähinnä  $\beta$ -glukosidaasi entsyymille, koska se ei vaadi adsorboitumista lignoselluloosasubstraattiin toimiakseen. Näin ollen jos halutaan ottaa talteen myös muita sellulaasientsyymejä, immobilisointi täytyy yhdistää johonkin toiseen menetelmään kuten membraanisuodatakseen. (Pribowo, 2014)

Viime vuosina onkin tutkittu runsaasti nanomateriaalien käyttöä biokatalyyttien immobilisoinnissa. Entsyymien immobilisointia ajatellen, nanomateriaalit luovat monipuolisen alustan, johtuen niiden pienestä koosta, suuresta pinta-alasta sekä ainutlaatuisista ominaisuuksista, kuten sähkönjohtavuudesta ja magnetismista. Nanopartikkeleihin kiinnittyneet entsyymit ovat yleensä enemmän stabiileja laajemmalle pH:n ja lämpötilan vaihtelulle kuin vapaat entsyymit. Myös entsyymiseosten immobilisointi voi olla mahdollista käytettäessä nanopartikkeleja. (Cipolatti et al., 2014) Suurimpana haittana nanopartikkeleiden käytölle on niiden kalliit valmistuskustannukset. Taulukossa 5 on luokiteltu nanoimmobilisoinnin käytön hyödyt ja haitat.

Taulukko 5. Nanoimmobilisoinnin hyödyt ja haitat. (muokattu lähteestä Cipolatti et al., 2014)

Hyödyt	Haitat
Aineensiirtovastus	Valmistuskustannusten hinta
Tehokas entsyymikuormitus	Laaja-alainen käyttö
Suuri pinta-ala	Reaktiiväliaineen erottaminen
Korkea mekaaninen lujuus	
Diffuusio ongelmien minimointi	

Eräs tuoreimmista tutkimuksista, jonka ovat suorittaneet Mubarak et al. (2014), käsittelee monikerroksisten hiilinanoputkien käyttämistä sellulaasien immobilisointiin. Tutkimukset paljastivat, että monikerroksisen hiilinanoputken ja sellulaasin yhdistelmä säilytti kuuden kierrätyskerran jälkeen 52 % aktiivisuudestaan karboksimeetylliselluloosan eli CMC:n jatkuvassa hydrolyysissä.

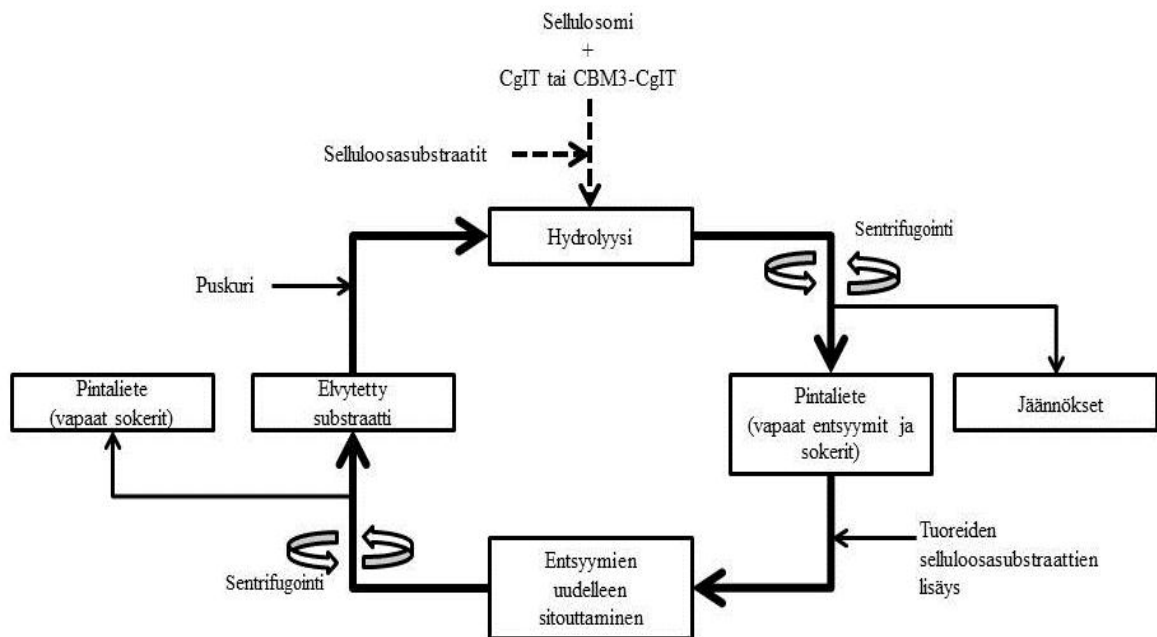
Gokhale et al. (2013) ovat tutkimuksessaan valmistaneet uudenlaisen pH-säätävän, lämpötila- ja magneettiherkän grafeenipohjaisen nanobiokatalysaattorin, MNP-GNP:n (magnetic nanoparticle incorporated graphene nanoplatelets), sellulaasin immobilisaatioon. Vastakkaisesti varautuneiden sekä karkaistujen polyelektrolyyttien supramolekyylinen asennelma ja maghemiitti-magnetiitti nanopartikkelit 2D-grafeenialustalla, jota seurasi kovalenttinen sellulaasin immobilisointi, osoitti merkittävää parannusta grafeenialustojen biovastaanottavuudessa. Magneettisten nanopartikkeleiden yhdistäminen avaa mahdollisuuden entsyymien talteenottoon ja kierrättämiseen useita kierrätyskertoja. Immobilisoidut entsyymit säilyttivät tutkimuksessa noin 55 % alkuperäisestä aktiivisuudestaan jopa neljän kierrätyskerran jälkeen.

Sellulaasien immobilisointia superparamagneettisiin partikkeleihin ovat tutkineet Alfrén ja Hobley (2014) sekä myös Khoshnevisan et al. (2011). Alfrén ja Hobley (2014) suorittivatkin ensimmäistä kertaa kaupallisen CellicCTec2:n kovalenttisen immobilisoinnin mikrokokoluokkaa oleviin magneettisiin partikkeleihin. Endoglukanaasien, sellobiohydrolaasien ja  $\beta$ -glukosidaasien yksittäisten aktiivisuuksien suhteet muuttuivat CellicCTec2:n immobilisoinnin seurauksena ja spesifisen aktiivisuuden (yksikköä per milligramma proteiinia, U/mg) havaittiin alenevan immobilisoinnin aikana. Tutkimuksessa todistettiin myös, että oikean lignoselluloosapitoisen biomassan, tässä tapauksessa esikäsitellyn vehnänoljen, hydrolyysi on mahdollista toteuttaa käyttäen magneettisesti immobilisoituja sellulaaseja (Alfrén & Hobley, 2014). Sellulaasin stabiilisuuden ja aktiivisuuden paranemisen fyysisellä adsorptiolla superparamagneettisiin nanopartikkeleihin, pystyivät tutkimuksessaan todistamaan Khoshnevisan et al. (2011), ja tämän tutkimuksen tulosten perusteella voidaan päätellä, että magneettisiin partikkeleihin immobilisoituja entsyymejä voidaan käyttää laajemmilla lämpötila ja pH alueilla, sekä lisäksi voidaan käyttää pitkäaikaista säilytystä, sallien entsyymien magneettisen talteenoton uudelleen käytettäväksi.

Uusimman mielenkiinnon sellulaasientsyymien immobilisointiin luovat moni-entsyymikompleksit eli sellulosomit, joita tuottavat anaerobiset mikro-organismit. Niin sanottujen scaffolding proteiinien käyttö entsyymien immobilisoinnin tukimateriaalina on saavuttanut lähiaikoina suurta huomiota (Pribowo, 2014). *T.reesei*:n tuottamat sellulaasit, endoglukanaasit, sellobiohydrolaasit ja ksylanaasit eritetään yksilöllisesti ja ne toimivat synergisesti lignoselluloosan hajottamiseksi. *C.thermomocellum* sellulosomi sen sijaan on

proteiini CipA:n avulla järjestäytynyt sellulaasien ja hemisellulaasien makromolekyylinen systeemi. Sellulosomien käyttö vaikuttaakin yksinkertaistavan entsyymien kierrättämistä lignoselluloosan hajottamisprosessissa verrattuna *T.reesei* sellulaaseihin, koska tällöin ei ole välttämätöntä ottaa talteen jokaista erillistä sellulosomi-entsyymin ainesosaa johtuen sellulaasien ja hemisellulaasien kompleksoinnista. (Waeonukul et al., 2013)

Waeonukul et al. (2013) todistivat tutkimuksessaan, että sellulosomit ja CBM3-CgIT:t (family 3 carbohydrate-binding module ja *T.brockii*  $\beta$ -glukosidaasi) pystyttiin kierrättämään 4 kertaa mikrokiteisen selluloosan kanssa, käyttäen kuvan 7 mukaista kierrätysmenetelmää. Tutkimuksessa käytetty selluloosasubstraatti oli ammoniakilla esikäsitelty riisioilki sekä delignifioitu riisioilki. Vaikkakin sellulosomien ja CBM3-CgIT:n peruuttamatonta imeytymistä jäännöksiin havaittiin tutkimuksissa, päästiin kahteen kierrätyskertaan ammoniakilla esikäsitellyllä riisioiljella ja neljään kierrätyskertaan delignifioidulla riisioiljella, joka vastaa 70 % sokerointiastetta.



Kuva 7. Kierrätysmenetelmän kaavio käytettäessä *C.thermocellum* sellulosomia ja *T.brockii*  $\beta$ -glukosidaasia. (muokattu lähteestä Waeonukul et al., 2013)

#### 5.2.4 Desorptiomenetelmät

Jotta kiinteään faasiin adsorboituneet sellulaasit voitaisiin kierrättää, täytyy ne desorboida jollakin menetelmällä. Perinteinen keino sellulaasin desorboimiseksi lignoselluloosasubstraatista on ollut desorptioaineiden, kuten puskuriliuoksen, pinta-

aktiivisen aineen, urean, alkalien, glyserolin tai polyetyleeniglykolin (PEG) lisääminen. Näistä lisättävistä aineista alkalisen liuoksen on todettu olevan toiminnallisimmin ja kustannustehokkain desorption aikaansaamiseksi, muiden ollessa kykenemättömiä tehokkaaseen desorptioon sen lisäksi, että edesauttavat myös desorboituneiden sellulaasien deaktivaatiota. Entsyymien denaturoituminen korkeassa pH:ssa on suurin huolenaihe käytettäessä entsyymien desorptiota kierrätysmenetelmänä. (Pribowo, 2014) Hapan pH (< 4,8) suosii adsorptiota, kun taas neutraali ja emäksinen pH suosivat desorptiota (Du et al., 2012). Sekä Rodrigues et al. (2012), että Du et al. (2012) todistivat omilla tutkimuksissaan sen, että käytetty pH on lämpötilariippuvainen ja vaikuttaa huomattavasti entsyymien adsorboitumiseen kiinto-aineseen. Lisäksi käytetyn substraatin kemialliset ja fysikaaliset rakenteet vaikuttavat suuresti sellulaasin kiinnittymiseen ja desorptioon (Wang et al., 2012). Sellulaasin adsorptio- ja desorptiotaipumuksen syvälinen ymmärtäminen onkin tehokkaan kierrätysmenetelmän perusta, joten useita tutkimuksia on suoritettu tästä johtuen. Shang et al. (2014), Du et al. (2012), sekä Wang et al. (2012) tulivat kaikki samaan johtopäätökseen, että pH:ta ja lämpötilaa säätämällä voidaan yksinkertaisesti sekä melko edullisesti ja tehokkaasti suorittaa entsyymien talteenotto ja kierrättäminen.

Rodrigues et al. (2012) tutkivat työssään sellulaasien talteenottoa ligniinistä, lignoselluloosapitoisesta hydrolysaatista ja selluloosasta käyttäen pH:ssa 9 ja 10 tapahtuvaa alkalipesua. Lämpötilan vaikutus otettiin myös huomioon tutkittaessa vehnäöljen entsyymattista hydrolyysia. Cel7A:n (*T.reesei*n tuottama sellobiohydrolaasi I) aktiivisuuksia arvioitiin käyttämällä fluoresenssi spektrofotometriaa, jossa käytettiin substraattina 4-metyyli-umbelliferyyli- $\beta$ -D-sellobiosidia eli 4-MUC:ia. Lisäksi aktiivisuuksia mitattiin käyttämällä suodatinpaperimenetelmää. Tutkimuksesta saatiin selville, että Cel7A säilyttää aktiivisuutensa jopa sen ollessa adsorboituneena ligniiniin. Lisäksi pH:ssa 9 ja 10 tapahtuvilla alkalipesuilla pystyttiin palauttamaan suuri osuus entsyymien aktiivisuuksista laajasti hydrolysoidusta vehnäöljesta.

Yksi desorptiomenetelmistä on siis pinta-aktiivisten aineiden lisääminen. Pinta-aktiivisten aineiden ei ole todettu vaikuttavan entsyymien aktiivisuuteen, joten näin ollen niiden käyttö tekee entsyymien kierrättämisen helpommaksi. Johtuen ligniinin läsnäolosta hydrolyysin aikana, sidottujen entsyymien prosentuaalinen osuus pyrkii nousemaan. Tämä on johtanut siihen, että pinta-aktiivisia amfifiilisiä molekyylejä ja

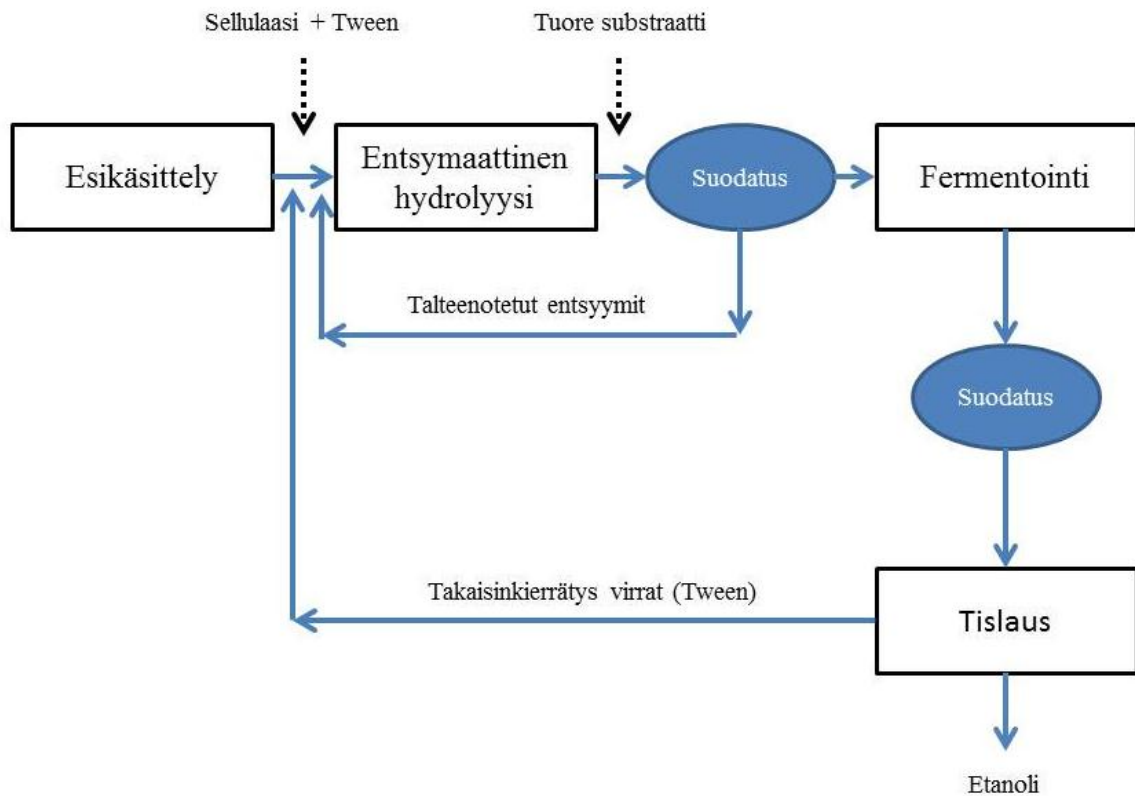


etyleenioksidipolymeerejä on lisätty biomassaan, eristämään etusijaisesti ligniiniä, jotta vapaiden entsyymien suurempaa määrää voitaisiin ylläpitää hydrolyysiä varten, kuten myös kierrätystä varten (Eckard et al., 2013). Pinta-aktiivisten aineiden toiminta perustuu niiden kykyyn saostaa ligniiniä, jolloin syntyy liukenemattomia proteiinien ja pinta-aktiivisten aineiden välisiä yhdistelmiä (Yuan et al., 2014). Tutkittuja pinta-aktiivisia aineita on useita, kuten Span 80, Tween 20, 80, PEG, SDS, sekä bioperäisiä pinta-aktiivisia aineita (Eckard et al., 2013; Yuan et al., 2014). Nonionisten pinta-aktiivisten aineiden, kuten Tween 80 tai Tween 20, lisääminen on todistettavasti parantanut hydrolyysin saantoa jopa 86 %:iin (Gurram & Menkhaus, 2014; Tu & Saddler, 2010). Lisäksi niiden käytön on osoitettu mahdollisesti edistävän entsyymien kierrätystä lignoselluloosan entsyymaattisessa hydrolyysissä. Pinta-aktiiviset aineet jatkavat hydrolysaatin mukana fermentointivaiheeseen, niin SHF- kuin SSF-prosesseissa (Tu & Saddler, 2010).

Bioperäisistä pinta-aktiivisista aineista rhamnolipidin ja saponiinin on todettu omaavan kyvyn talteenottaa sellulaaseja. Yuan et al. (2014) vertasivat näitä kahta ainetta synteettiseen pinta-aktiiviseen aineeseen ja tulivat siihen tulokseen, että käytettäessä asetonia uuttoliuottimena ja lisättäessä 0,1 mmol NaCl ja pH:ssa 5, parhaimmat proteiinin ja aktiivisuuden palautumiset saatiin aikaiseksi rhamnolipidia käyttäen.

Pinta-aktiivisten aineiden lisäämistä kuvan 8 mukaisella prosessivaihtoehdolla ovat ehdottaneet Tu & Saddler (2010). Tutkimuksessa on pohdittu pinta-aktiivisten aineiden lisäyksen taloudellisia hyötyjä entsyymaattiseen hydrolyysiin, käytettäessä kahdella eri tavalla esikäsiteltyä kontortamäntyä. Sellulaasien talteenotto ja kierrättäminen suoritettiin käyttäen uudelleen adsorptiota tuoreisiin substraatteihin. Tuloksien perusteella voitiin päätellä, että sellulaasien kierrättäminen pinta-aktiivisia aineita hyödyntäen oli mahdollista jopa viiden kierroksen verran, joka on yhdenmukainen Xue et al. (2012) tutkimuksen kanssa. Perustuen yksinkertaiseen taloudelliseen analyysiin, Tu & Saddler (2010) selvittivät tutkimuksessaan, että lisäämällä pinta-aktiivista ainetta, Tween 80, pystytään säästämään 60 % entsyymien kokonaiskustannuksista entsyymipitoisuuksien ollessa 0,025 – 0,2 % välillä ja lisäksi olettaen, että Tween 80:n hinta on US \$ 0,25/kg ja ettei ole ylimääräisiä investointi- ja käyttökustannuksia. Eräs haitta pinta-aktiivisten aineiden käytölle on kuitenkin se, että niiden käyttö voi johtaa kohtuuttomaan vaahdonmuodostumiseen fermentoinnin aikana ja näin ollen usein vaaditaan kallis talteenottovaihe tämän välttämiseksi (Gurram & Menkhaus, 2014). Hyväksyttävä tosiasia

on kuitenkin se, että pinta-aktiivisten aineiden käytön hyödyt riippuvat voimakkaasti niiden sekä sellulaasientsyymien hinnasta (Tu & Saddler, 2010). Pinta-aktiivisten aineiden uskotaan lisäksi lisäävään entsyymien kulkeutumista membraanien lävitse, näin ollen vaikeuttaen entsyymien erotusprosessia (Callow & Ju, 2012).



Kuva 8. Kaaviokuva entsyymien kierrätykseen ja prosessivirtojen takaisinkierrätykseen käyttäessä pinta-aktiivisia aineita. (muokattu lähteestä Tu & Saddler, 2010)

Yhdistäen kahta erilaista apuainetta, kuten polyetyleeniglykolin (PEG) – Tween 20 sekä PEG – kaseiinin polymeerisiä misellejä, pystyivät Eckard et al. (2013) todistamaan, että entsyymien kierrätyksen tehokkuutta voitiin parantaa edelleen. SHF- prosessissa, kahden peräkkäisen kierrätyskerran jälkeen, ilman apuaineita, aktiivisten entsyymien määrä hydrolysaatissa väheni ensin 64 % ja sitten 80 %. Käytettäessä apuaineina Tweeniä ja nestemäisiä kaseiiniin misellejä, etanolisaantoa saatiin parannettua ensin 80 % ja toisen kierrätyskerran jälkeen 130 %. Näiden apuaineiden polymeeriset misellit pystyivät parantamaan etanolisaantoa edelleen 50 % kun käytettiin PEG – Tween-yhdistelmää ja jopa 108 % kun käytettiin PEG – kaseiini-yhdistelmää. (Eckard et al., 2013)

Xue et al. (2012) ehdottavat myös, että hydrolyysin tehokkuutta voidaan parantaa lisäämällä pesuvaihe prosessiin, sillä edellisistä hydrolyysikerroista saatu, kierrätetty hydrolysaatti sisältää korkean pitoisuuden sokereita, jotka voivat inhiboida seuraavaa hydrolyysiä. Käytettäessä pesuun tuoretta puskuriliuosta, voidaan sokerit poistaa kierrätysvirroista. Hydrolyysin tehokkuutta voitiin parantaa havupuulla noin 40 % entsyymiannostuksen ollessa 30 mg/g, ja lehtipuulla noin 25 % entsyymiannostuksen ollessa 7,5 mg/g, kun sovellettiin pesuvaihetta pinta-aktiivisten aineiden lisäämisen kanssa.

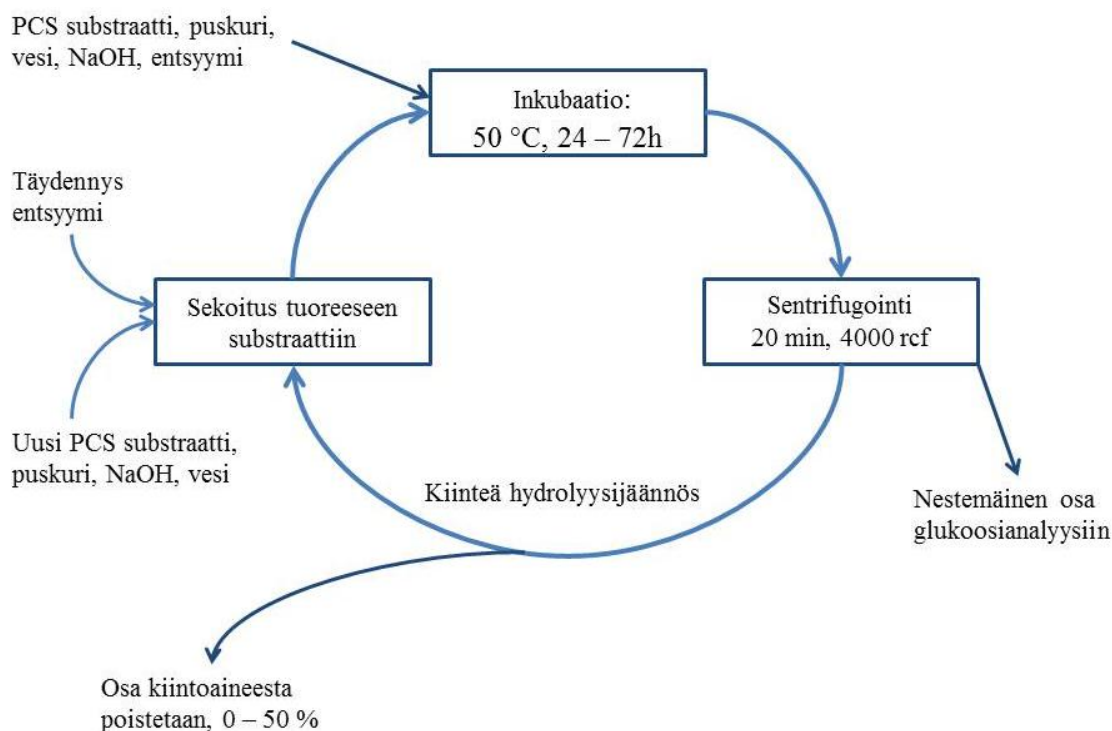
Desorptiomenetelmien käytölle entsyymien kierrätystä ajatellen, on olemassa kaksi pääasiallista hyötyä. Entsyymien desorptio siirtää adsorboituneet sellulaasientsyymit kiinteästä faasista takaisin nestefaasiin ja tästä syystä johtuen sekä desorboidut entsyymit, että nestefaasin entsyymit voidaan talteenottaa nestefaasista käyttäen muita menetelmiä, kuten esimerkiksi ultra- ja nanosuodatuksen yhdistelmällä tai adsorptiolla tuoreeseen substraattiin. (Qi et al., 2012; Pribowo, 2014) Lisäksi desorption jälkeen voidaan entsyymivapaat hydrolyysijäännökset poistaa kierrätysvirroista ja näin ollen kiintoainejäännöksen kasautuminen pystytään minimoimaan. Suurimpana haittana voidaan pitää entsyymien aktiivisuuksien peruuttamattomia menetyksiä korkeissa pH-arvoissa ja lämpötiloissa. Muita haittoja ovat desorboivia aineita käytettäessä niistä aiheutuvat korkeat kustannukset sekä alkalista uuttoa käytettäessä, runsas suolan kehittyminen, joka aiheutuu jatkuvasta pH-säädöstä, aiheuttaen mahdollisesti kohonneita jättekustannuksia. (Pribowo, 2014)

### **5.2.5 Kiintoainejäännöksen kierrätys**

Suurin osa sellulaaseista on adsorboituneina kiinteään substraattiin sitoutuen selluloosaan ja ligniiniin. Selluloosaan adsorboituneet entsyymit vapautuvat useimmiten hydrolyysin jälkeen, kun taas ligniiniin sitoutuminen on vähemmän palautuvaa (Pihlajaniemi et al., 2014). Toisaalta Rodrigues et al. (2012) todistivat tutkimuksessaan, että entsyymit säilyttävät osan aktiivisuudestaan ollessaan adsorboituneena ligniiniin. Yksi näkökulma aktiivisten entsyymien uudelleenkäytölle on kiinteän jäännöksen kierrättäminen hydrolyysin jälkeen, jolloin voidaan hyväksi käyttää adsorptiota (Pihlajaniemi et al., 2014). Tämän menetelmän puolesta puhuu sen yksinkertaisuus ja kustannustehokkuus, vaikka toisaalta suurimpana haittana on kiintoainepitoisuuden kokonaismäärän sekä reaktiivilavuuden kasvaminen lisääntyvien hydrolyysikierrosten myötä, joka on omiaan

vaikkeuttamaan hydrolyysin tehokkuutta. Menetelmän onnistuneelle toteutukselle on myös tärkeää, että käytettyjen substraattien ligniinipitoisuus sekä inhiboivien ligniinien määrä on alhainen (Pribowo, 2014). Varsinkin havupuiden ligniinirikas hydrolyysijäännös omaa voimakkaan inhibitorisen vaikutuksen hydrolyysiin (Rahikainen et al. 2011). Kiintoaineiden kierrätystä voidaan myös pitää reaktiotuotteiden poistokeinona, jonka tavoitteena on estää lopputuoteinhibitiota. Monet lignoselluloosan entsyymaattiseen hydrolyysiin esitetyt reaktorikokoonpanot sisältävätkin jonkinlaisen kiintoainekierrätyksen. Pihlajaniemi et al. (2014) tulivatkin tutkimuksessaan siihen tulokseen, että kiintoaineen kierrätys on sopiva menetelmä tuotteiden poistoon ennemmin kuin entsyymien kierrätykseen.

Weiss et al. (2013) ovat tutkineet sitä, että voidaanko aktiivisia entsyymejä uudelleen käyttää kierrättämällä liukenematonta kiintoainefaasia ja näin ollen parantaa kokonaista tuotesaantoa ja vähentää samalla vaadittujen entsyymilisäysten määrää. Myös eri prosessivaihtoehtojen, kuten kiintoaineen pesun ja kierrätettävän kiintoaineen osuuden, merkittäviä vaikutuksia prosessisaantoihin käsiteltiin. Weiss et al. (2013) kierrättivät, kuvan 9 mukaisella käsittelyllä, kasvavan määrän kiintoainejäännöstä, laimealla hapolla esikäsitellyn maissitärhän hydrolysoinnin jälkeen ja havaitsivat, että entsyymien käyttö aleni 30 %, sokerisaannon pysyessä entisellään, kun suurin osa liukenemattomasta materiaalista kierrätettiin suotuisimmissa olosuhteissa.



Kuva 9. Kiintoaineen kierrätysmenetelmän kaaviokuva, jossa PCS on esikäsitelty maissintähkä. Pesuvaihe suoritettiin sentrifugoinnin jälkeen. (muokattu lähteestä Weiss et al., 2013)

Entsyymien tuottavuus (g tuotettua glukoosia/g käytettyjä entsyymit) parani kierrättämällä 30 – 50 % riippuen käytetyistä olosuhteista. Kuitenkin liukenematonta kiintoainetta kierrättämällä kiintoaineiden kokonaispitoisuudet, reaktiomassat ja ligniinin määrä reaktiossa kasvoivat huomattavasti, lieventäen samalla prosessin parantunutta toimintaa ja taloudellisuutta. Merkittävimmät tekijät, jotka vaikuttivat entsyymien kierrätyksen toimintakykyyn, olivat lisäentsyymien määrän soveltaminen sekä kierrätetyn kiintoaineen osuus. Kiintoaineen pesulla ei havaittu olevan parantavaa vaikutusta kierrätyksen toimintaan, vaikka toisaalta sen havaittiin parantavan hydrolyysin tehokkuutta, joka luultavasti johtuu sokerien ja muiden inhiboivien yhdisteiden poistosta. (Weiss et al., 2013)

Weiss et al. (2013) käyttäessä tutkimuksessaan 10 – 15 % kuiva-ainepitoisuuksia, käyttivät Lindeman et al. (2013) jopa 25 % kuiva-ainepitoisuuksia, jotka ovat lähempänä teollisia olosuhteita, sillä yli 20 % kuiva-ainepitoisuuksien katsotaan olevan edellytyksenä teollisille prosesseille. Lindeman et al. (2013) myös suorittivat osan tutkimuksestaan sekä pilottimittakaavassa, että teollisessa mittakaavassa, laboratoriokokeiden lisäksi. Teollisen mittakaavan kokeet suoritettiin koelaitoksessa, jossa kuiva-ainepitoisuuden ollessa noin

25 %, kahta sellulaasiseosta käyttäen suoritettiin hydrolyysi reaktioajan ollessa 6 h ja lämpötilassa 50 °C ja jota seurasi SSF-prosessi, jossa lämpötila oli 33 °C ja inkubaatioaika noin 144 h. Tämän jälkeen kuituliete tislattiin ja tislattu kokonaisliemi käytettiin edelleen seuraavaan hydrolyysikertaan, sen toimiessa näin entsyymilähteenä. Tavoitteena tutkimuksessa oli selvittää entsyymien kierrätyksen potentiaalia käytettäessä moderneja sellulaasivalmisteita teollisilla entsyymikuormituksilla ja kuiva-ainepitoisuuksilla. Työssään Lindeman et al. (2013) arvioivat kierrätyskelpoisuutta mittaamalla jäljellä olevaa entsyymiaktiivisuutta fermentointiliemestä sekä entsyymien kykyä hydrolysoida tuoretta, esikäsiteltyä vehnänokea. Entsyymistabiilisuudelle suotuisissa olosuhteissa voitiin 85 % aktiivisuuksista palauttaa, kun taas koelaitoksen olosuhteissa päästiin vain 25 % alkuperäisestä sellulolyttisestä aktiivisuudesta. (Lindeman et al., 2013)

### 5.2.6 Tuoreen substraatin lisäys

Tuoreen substraatin lisääminen hyödyntää sellulaasientsyymien luonnollista affiniteettia lignoselluloosapitoisiin substraatteihin, jolloin ne voidaan uudelleen adsorboida ja talteenottaa nestefaasista. Lisäksi hydrolyysijäännöksiin adsorboituneet entsyymit voidaan samanaikaisesti ottaa talteen entsyymien talteenoton maksimoimiseksi. (Pribowo, 2014)  $\beta$ -glukosidaasin talteenottoon tämä menetelmä ei kuitenkaan ole soveltuva, sillä se ei yleensä sitoudu selluloosasubstraattiin ja näin ollen tuoretta  $\beta$ -glukosidaasia on lisättävä jokaisen hydrolyysikerran alussa, jotta vältetään sellobioosin kehittymiseltä ja myöhemmältä sellulaasin lopputuoteinhibitiolta (Qi et al., 2011). Hydrolyysin jälkeen neste- ja kiinto-ainefaaseihin jäljelle jäävien vapaiden entsyymien uudelleen adsorboiminen tuoreeseen substraattiin voi palauttaa 80 % nestefaasiin jääneistä entsyymeistä. Jäännösligniinipitoisuus pyrkii kuitenkin valitettavasti kasvamaan lisättäessä tuoretta substraattia ja sen seurana tuleva lietteen viskositeetin nouseminen peräkkäisissä kierrätyskerroissa vaikuttaa hydrolyysin saantoon, johtuen korkeasta ligniinipitoisuudesta sekä tehottamasta aineensierrosta. (Gurram & Menkhaus, 2014)

Tuoreiden substraattien lisäystä entsyymien kierrätystä varten ovat tutkimuksissaan käsitelleet niin Qi et al. (2011) kuin myös Xue et al. (2012) sekä Ouyang et al. (2013). Näistä Qi et al. (2011) vertailivat entsyymien talteenoton tehokkuutta nestefaasista käyttäen ultrasuodatusta sekä uudelleen adsorboimista tuoreeseen substraattiin, joita molempia seurasi esikäsitellyn vehnäöljen hydrolyysi. Näiden kahden menetelmän

hydrolyysitehokkuuksien pääteltiin olevan vertailukelpoisia, sikäli kun käytettäessä uudelleen adsorboitumista tuoreeseen substraattiin,  $\beta$ -glukosidaasia lisättiin täydentämään kierrätettyjä entsyymejä. Lisäksi Qi et al. (2011) selvittivät, että oli kierrätysmenetelmä mikä tahansa, saatiin paremmat kierrätystulokset käytettäessä heikosti emäskäsiteltyä substraattia verrattuna heikosti happokäsiteltyyn substraattiin. Tuloksista, jotka on esitelty taulukoissa 6 ja 7, voidaan päätellä, että happokäsitellyn vehnäöljen ja emäskäsitellyn vehnäöljen väliset suuret erot ligniinipitoisuuksissa vaikuttavat merkittävästi entsyymattiseen hydrolyysiin, sellulaasin adsorptioon sekä sellulaasikierrätyksen tehokkuuksiin. Tutkimuksessa selvisi myös, että kiinto-aineeseen sitoutuneiden entsyymien suora kierrättäminen johti parempaan hydrolyysisaantoon kuin desorptiota käytettäessä. (Qi et al., 2011; Pribowo, 2014)

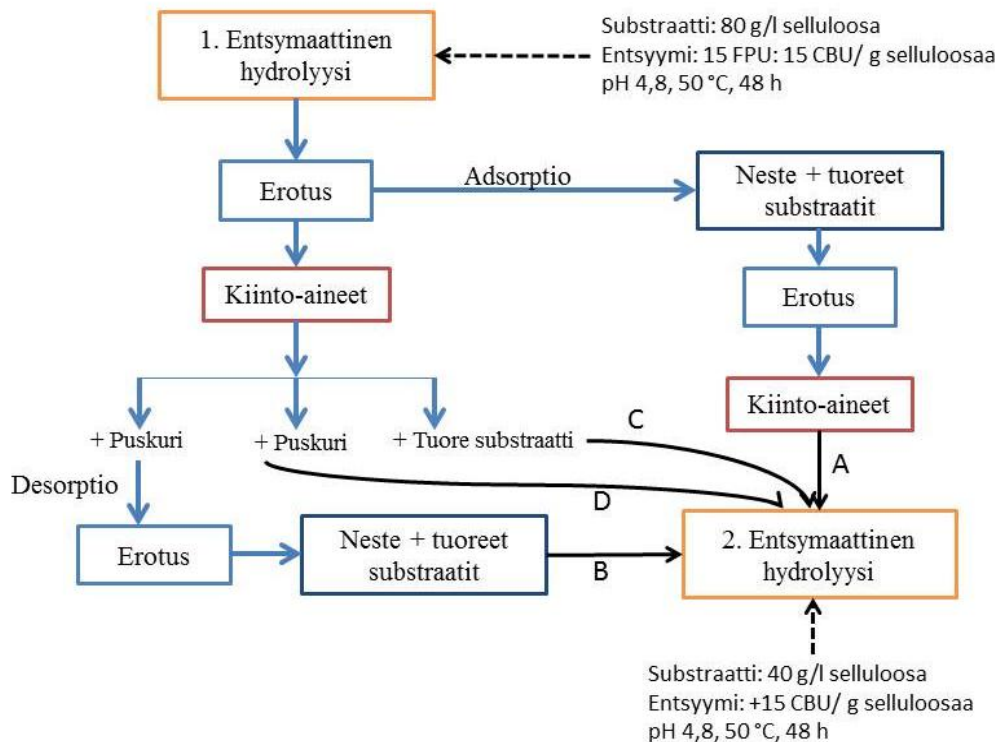
Taulukko 6. Sellulaasin kierrätys kiintoaineesta ja nesteestä, hapolla/emäksellä esikäsitellyn substraatin entsyymattisen hydrolyysin aikana, käyttäen adsorptiota tuoreisiin substraatteihin. (muokattu lähteestä Qi et al., 2011)

Substraatti	Kierrätyskoe		Entsyymattinen hydrolyysi		
	Kierrätyskerta	Substraatti (%)	Ligniini (%)	Pelkistävä sokeri (mg/ml)	Hydrolyysisaanto (%)
Esikäsitely: happo	0	2,0	20,7	9,8	68
	1	3,2	25,9	8,0	41
	2	4,5	27,6	5,3	20
	3	6,0	27,6	5,5	16
Esikäsitely: emäs	0	2,0	3,7	20,0	100
	1	2,2	6,7	17,4	87
	2	2,6	8,5	20,3	90
	3	3,1	9,5	16,6	75

Taulukko 7. Sellulaasin kierrätys kiintoaineesta ja nesteestä, hapolla/emäksellä esikäsitellyn substraatin entsyymattisen hydrolyysin aikana, käyttäen sekä adsorptiota tuoreisiin substraatteihin, että ultrasuodatusta. (muokattu lähteestä Qi et al., 2011)

Substraatti	Kierrätyskoe		Entsyymattinen hydrolyysi		
	Kierrätyskerta	Substraatti (%)	Ligniini (%)	Pelkistävä sokeri (mg/ml)	Hydrolyysisaanto (%)
Esikäsitely: happo	0	2,0	20,7	9,8	68
	1	3,1	26,7	8,4	44
	2	4,3	28,9	6,8	27
	3	5,7	29,1	6,1	17
Esikäsitely: emäs	0	2,0	3,7	19,6	98
	1	2,2	6,6	18,3	90
	2	2,5	8,9	18,5	87
	3	2,8	10,7	15,3	67

Sitoutuneiden ja vapaiden entsyymien tehokkuutta hydrolysoida sokeriruokojätteen sulfiittimassaa kierrättämisen jälkeen tutkivat Ouyang et al. (2013). Vertaillakseen entsyymiadsorption ja -desorption sekä uudelleen adsorboimisen potentiaaleja entsyymien kierrätystä ajatellen, Ouyang et al. (2013) suorittivat kuvan 10 mukaiset kierrätyskokeet (A – D). Sellulaasin kierrätys suoritettiin 48 h hydrolyysin jälkeen keräämällä erikseen jäännösubstraattit ja liuokset. Menetelmässä A lietteeseen sekoitettiin tuoretta substraattia, jotta vapaat entsyymit voitiin talteenottaa adsorption avulla. Adsorptiokokeet (100 rpm ja 2 h) suoritettiin lämpötilan ollessa 4 °C ja selluloosapitoisuudessa 4 % (kg/m<sup>3</sup>). Sitoutuneet entsyymit desorboitiin optimaalisissa olosuhteissa (pH 4,8 ja lämpötila 40 °C) hydrolyysijäännöksestä menetelmässä B, jonka jälkeen ne käytettiin uudelleen toiseen hydrolysointikertaan. Menetelmä C on yksinkertaisempi kierrätysversio, sillä siinä hydrolysoimattomaan jäännökseen sitoutuneet entsyymit kierrätettiin suoraan seuraavaan hydrolyysiin, ilman desorption hyödyntämistä. D-menetelmässä ensimmäisestä hydrolyysistä saatua kiinto-ainetta hydrolysoitiin jatkuvasti, eikä substraatteja lisätty lainkaan. Kaikissa menetelmissä toinen hydrolyysivaihe suoritettiin, jotta voitiin arvioida kierrätettyjen sellulaasien tehokkuuksia. Jälkimmäiseen hydrolysointiin ei lisätty sellulaasia, vaan ainoastaan tuoretta  $\beta$ -glukosidaasia.





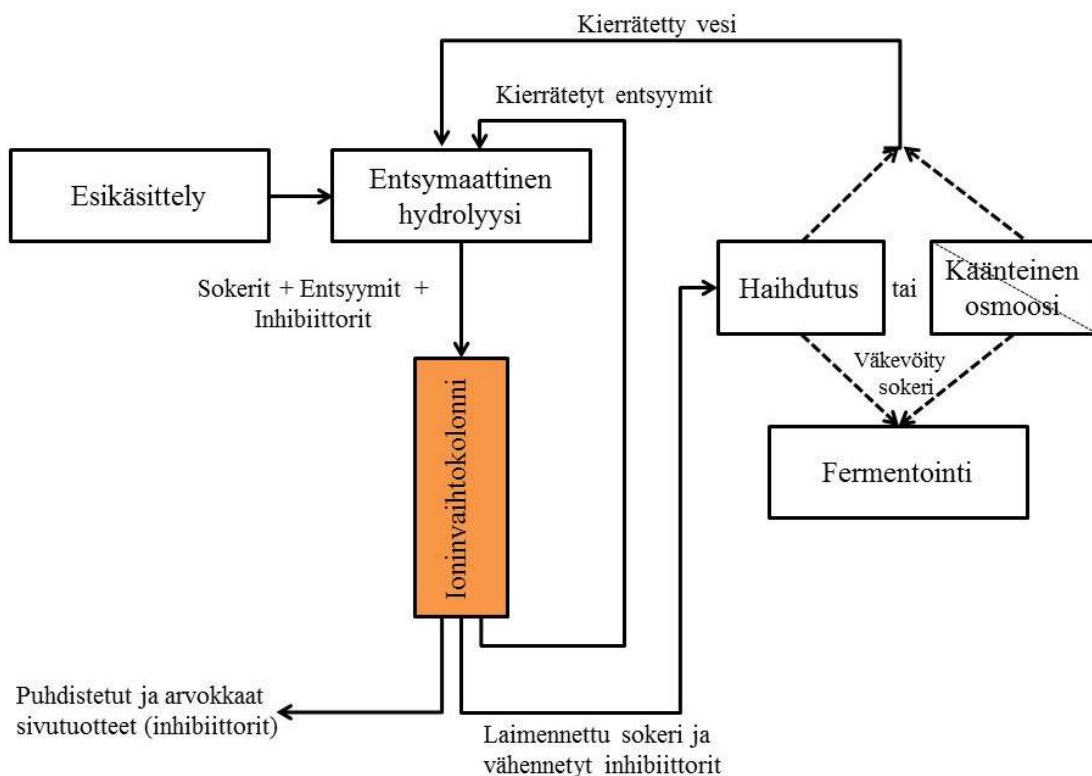
Kuva 10. Vuokaavio eri kierrätysmenetelmistä, jossa menetelmät ovat: entsyymi adsorptio (A), entsyymi desorptio (B), entsyymijäännös (C) sekä entsyymijäämien valvonta ilman lisättyä substraattia (D) ja FPU = filter paper activity units, CBU = sellobiaasi units. (muokattu lähteestä Ouyang et al., 2013)

Tuloksista kävi ilmi, että käytettäessä menetelmää A, saatiin 2,71 g glukoosia tuotettua toisen hydrolyysikerran jälkeen, kun taas menetelmää B käytettäessä, glukoosisaanto oli 2,26 g. Lisäksi menetelmällä C glukoosisaanto oli 4,73 g, joka on huomattavasti parempi kuin menetelmällä B. Kierrätettyjen sellulaasien alentunut kyky hydrolysoida tuoreita substraatteja antaa ymmärtää, että desorptiomenetelmällä on rajallinen kyky toimia entsyymien kierrätyksessä. Tämä tulos on yhdenmukainen Qi et al. (2011) tuloksien kanssa. Useiden kierrätysmenetelmien vertailu osoitti, että uudelleen adsorboimalla talteenotetut sellulaasit osoittivat parempaa hydrolyysitehokkuutta verrattuna desorption avulla kierrätettyihin sellulaaseihin. (Ouyang et al., 2013)

### 5.2.7 Ioninvaihtokromatografia

Adsorptio- ja desorptiotaipumukseen perustuva sellulaasin talteenotto ja kierrätys käyttäen apuna ioninvaihtoa ja muita adsorptiomekanismeja on houkutteleva vaihtoehto johtuen sen samanaikaisesta soveltuvuudesta niin entsyymien kuin inhibiittorien erottamiseen. Ioninvaihtokromatografiakolonnia on käytetty laajasti sellulaasikompleksien erottamiseen ja puhdistamiseen gradienttieluentin ollessa NaCl sekä lisäksi sen tiedetään poistavan orgaanisia happoja, aldehydejä ja ligniinijohdannaisia inhibiittoreja. (Gurram & Menkhaus, 2014) Ioninvaihtokolonnin käyttöä entsyymien kierrättämiseen ja samanaikaiseen hydrolyysi- ja fermentointi-inhibiittorien poistamiseen ovat esittäneet Gurram ja Menkhaus (2014). Tutkimuksessa käytetyn heikosti emäksisen anioninvaihtohartsin (Amberlite IRA-06), tarkoituksena oli samanaikaisesti talteenottaa entsyymit ja poistaa inhibiittorit, kuten etikkahapot, 5-hydroksimetyylifurfuraalit sekä entsyymaattisen hydrolyysiliuoksen furfuraalit. Entsyymien kierrätystä arvioitiin perustuen adsorboituneiden ja desorboituneiden sellulaasien aktiivisuuksiin. Gurram ja Menkhaus (2014) todistivat, että ioninvaihtokolonni voi adsorboida jopa 90 % sellulaaseista pH-säätelyllä, yhdessä sen tarkoituksen mukaisen käytön eli inhibiittorien erottamisen sokereista. Entsyymien ja inhibiittorien talteenotto suoritettiin käyttämällä erilaisia eluointipuskureita, sillä entsyymit voidaan kierrättää käyttäen NaCl-pesua ja inhibiittorit voidaan ottaa talteen suorittamalla

myöhempi NaOH-pesu. Jotta suolan kerääntymiseltä vältyttäisiin, tulisi käytetyn NaCl-liuoksen olla matala molaarista. Entsyymien kierrättämiseksi Gurrin ja Menkhaus (2014) ehdottivat kuvan 11 mukaista prosessia, jossa ioninvaihtokoloni integroituna jatkuva- tai erätoiminnalliseen hydrolyysiin, parantaisi kokonaistehokkuutta sekä laskisi huomattavasti valmistuskustannuksia, jotka liittyvät lignoselluloosapitoisten raaka-aineiden muuttamiseen biopolttoaineiksi ja biokemikaaleiksi.



Kuva 11. Kokonaisvaltainen ja jatkuvatoiminen biomassa-biotuote prosessi, entsyymien ja veden kierrätyksellä (muokattu lähteestä Gurrin ja Menkhaus, 2014).

### 5.2.8 Tislausvaiheen jälkeinen kierrätys

Kierrätettäessä entsyymejä tislausvaiheen jälkeen vältytään sokeri- ja etanolisaannon menetyksistä, mutta tislauslämpötilasta johtuen on riski entsyymien hajoamiselle. Etanolin höyrystymispiste ilmanpaineessa on 78,5 °C joten tislaus suoritetaan lämpötilassa, joka nopeasti tekee suurimman osan kaupallisista sellulaaseista toimimattomaksi. Näin ollen tislausvaiheen jälkeinen entsyymien talteenotto ja kierrätys täytyisi tehdä alennetuissa lämpötiloissa tai erittäin lämpötilastabiileja entsyymejä käyttäen. (Skovgaard et al., 2014)

Tislausvaiheen jälkeisestä entsyymien talteenotosta on lähiaikoina tehty muutamia tutkimuksia, joissa on vertailtu kaupallisia entsyymejä termostabiileihin entsyymeihin. Skovgaard ja Jørgensen (2013) tutkivat omassaan korkean lämpötilan ja etanolin vaikutusta termostabiileihin entsyymeihin ja lisäksi Skovgaard et al. (2014) ovat tuoreemmassa tutkimuksessaan tutkineet sellulaasin aktiivisuuden palauttamista etanolin erottamisen jälkeen uudellaista pilot-yksikköä käyttäen. Tutkimuksissa selvisi, että lämpötilaa nostettaessa sekä kaupallisen, että termostabiilin entsyymiseoksen aktiivisuudet laskivat ja etanolin määrän kasvaessa aktiivisuuden määrän aleneminen oli vielä ilmeisempää. Korkean lämpötilan ja kasvaneen etanolikonsentraation yhteisvaikutuksessa kaupallisen entsyymiseoksen aktiivisuuden aleneminen havaittiin lämpötilassa 60 °C ja termostabiilin entsyymiseoksen lämpötilassa 65 °C. Tämä todisti sen, että termostabiilit entsyymit olisivat hyödyllisempiä suunniteltaessa entsyymien talteenottoa tapahtuvaksi tislausvaiheen jälkeen bioetanolin valmistuksessa. Toisaalta termostabiilien entsyymien valmistuskustannukset ovat varmasti tällä hetkellä korkeampia kuin kaupallisten entsyymien ja näin ollen niiden käyttö prosessissa ei olisi taloudellisesti kannattavaa. (Skovgaard & Jørgensen. 2013: Skovgaard et al., 2014)

## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Entsyyattisen hydrolyysin kustannusten alentamiseksi selluloosaetanolia valmistettaessa on ehdotettu esikäsitteilyn tehokkuuden parantamista, entsyymien valmistuskustannusten alentamista, entsyymien spesifisten aktiivisuuksien kasvattamista sekä entsyymien kierrättämistä uusiin hydrolyysikertoihin. Näistä vaihtoehdoista entsyymien kierrättämistä kustannusten alentamiseksi on tutkittu viime aikoina runsaasti, sillä sellulaasientsyymien valmistuskustannuksia on jo saatu alennettua ja niiden tehokkuuksia saatu parannettua. Vaikka sellulaasientsyymit omaavat verrattain hyvän aktiivisuuden ja stabiilisuuden, niiden joutuessa kestävästi kokonaisvaltaisen bioetanolin valmistusprosessin olosuhteita, varsinkin aktiivisuustaso alenee yleensä huomattavasti. Tehokkaan kierrätysmenetelmän tulisi näin ollen pyrkiä säilyttämään entsyymien aktiivisuuksia ja lisäksi ihanteellisessa tilanteessa entsyymien talteenotto olisi maksimaalista, sokerisaantoa menettämättä sekä seuraavaan hydrolyysikierrökseen etenevät prosessivirrat sisältäisivät mahdollisimman vähän inhibiittoreita. Toistaiseksi kuitenkin näitä kaikkia vaatimuksia täyttävää kierrätysmenetelmää ei ole löydetty.

Viimeaikaiset tutkimukset koskien sellulaasientsyymien kierrättämistä ovat keskittyneet käsittelemään ultrasuodatusta, immobilisointia lähinnä nanopartikkeleihin, erilaisia desorptiomenetelmiä, kiinteän hydrolyysijäännöksen kierrättämistä, tuoreen substraatin lisäämistä sekä myös tislausvaiheen jälkeistä entsyymien kierrättämistä, joka tosin on mahdollista vain käytettäessä termostabiileja entsyymejä. Yksi tärkeimmistä asioista, joka tuli selville eri tutkimuksista oli, että tehokkaan kierrätysmenetelmän kehittämiseksi sellulaasin adsorptio- ja desorptiotaipumuksen syvällinen tuntemus on tarpeen.

Kierrätysmenetelmän tehokkuuteen vaikuttaa myös huomattavasti käytetyn substraatin laatu. Jotta saataisiin kaikenkattava ymmärrys entsyymien ja substraattien vuorovaikutuksista, täytyisi entsyymiseoksia käyttää teollisesti merkityksellisten substraattien hydrolysointiin. Varsinkin Pohjoismaissa havupuiden runsas määrä tekee niistä kiinnostavia materiaaleja selluloosaetanolin valmistukseen. Havupuiden ligniini kuitenkin omaa voimakkaan taipumuksen sitoa sellulaaseja. Tästä johtuen havupuuta käytettäessä, sovelletun kierrätysmenetelmän tulisi välttää runsasta kiintoainejäännöksen kasaantumista. Tämä pois sulkee kiintoainejäännöksen ja tuoreen substraatin lisäämisen mahdollisen käytön kierrätysmenetelmänä. Tosin esimerkiksi ioninvaihtokromatografiaa sovellettaessa entsyymien kierrätykseen, saadaan myös hydrolyysiä inhiboivat ligniinit erotettua.

Koska sellulaasi entsyymit ovat jakautuneet sekä neste-, että kiintoainefaaseihin, entsyymien talteenotto tulisi suorittaa yhdistäen eri kierrätysmenetelmiä, jotta saadaan aikaiseksi maksimaalinen talteenottoaste. Immobilisointimenetelmät ovat viime aikoina keskittyneet käyttämään erilaisia nanopartikkeleita kantaja-aineina. Tätä menetelmää rajoittanee eniten nanopartikkelien mahdolliset korkeat kustannukset. Yhden houkuttelevimmasta kierrätysprosesseista ehdottivat tutkimuksessaan Qi et al. (2012). Siinä entsyymaattisen hydrolyysin jälkeen suoritettua kiintoaine-neste erotuksen jälkeen ehdotettiin käytettäväksi jotakin desorptiotekniikkaa entsyymien talteenottamiseksi kiintoainefaasista ja lisäksi nestefaasista entsyymien talteenotto tapahtuisi käyttäen ultrasuodatusta ja edelleen nanosuodatusta, jotta sokerisaanto saadaan maksimoitua. Desorptiomenetelmistä pinta-aktiivisten aineiden käyttöä rajoittaa eniten niiden kallis hinta, mutta yksinkertaisella pH-säädöllä voitaisiin helposti desorboida sitoutuneet entsyymit, vaarana on kuitenkin korkeasta pH:sta aiheutuva nopea entsyymien deaktivoituminen.

Entsyymien talteenottoon ja kierrätykseen kohdistuva suuri mielenkiinto tuonee esille sen parhaimman ja kustannustehokkaimman menetelmän, jotta selluloosaetanolin valmistuskustannuksia saadaan alennettua niin, että siitä tulee taloudellisesti kannattavaa.

## LÄHDELUETTELO

- Alfrén, J. & Hobley, T.J., 2014, Immobilization of cellulase mixtures on magnetic particles for hydrolysis of lignocellulose and ease of recycling, *Biomass and Bioenergy*, **65**, s. 72 – 78
- Balat, M., 2011, Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review, *Energy Conversion and Management*, **52**, s. 858 – 875
- Binod, P., Janu, K.U., Sindhu, R. & Pandey, A., 2011, Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production, *Biofuels*, Burlington: Academic Press, s. 229 – 205
- Callow, N.W. & Ju, L-K., 2012, Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulase production, *Enzyme and Microbial Technology*, **50**, s. 311 – 317
- Chen, G., Song, W., Qi, B., Lu, J. & Wan, Y., 2013, Recycling cellulose from enzymatic hydrolyzate of acid treated wheat straw by electroultrafiltration, *Bioresource Technology*, **144**, s. 186 – 193
- Cipolatti, E.P., Silva, M.J.A., Klein, M., Feddern, V., Feltes, M.M.C., Oliveira, J.V., Ninow, J.L. & de Oliveira, D., 2014, Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **99**, s. 56 – 67
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Gelosia, M., Nicolini, A., Coccia, V. & Petrozzi, A., 2014, Production of bioethanol in a second generation prototype from pine wood chips, *Energy Procedia*, **45**, s. 42 – 51
- Du R., Su, R., Li, X., Tantai, X., Liu, Z., Yang, J., Qi, W. & He Z., 2012, Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment, *Cellulose*, **19**, s. 371 – 380
- Eckard, A.D., Muthukumarappan, K. & Gibbons, W., 2013, Enzyme recycling in a simultaneous and separate saccharification and fermentation of corn stover: A comparison between the effect of polymeric micelles of surfactants and polypeptides, *Bioresource Technology*, **132**, s. 202 – 209
- Gokhale, A.A., Lu, J. & Lee, I., 2013, Immobilization of cellulase on magneto-responsive graphene nano-supports, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **90**, s. 76 – 86
- Gregg, D.J. & Saddler, J.N., 1996, Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process, *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, s. 375 – 383
- Gurram, R.N. & Menkhaus, T.J., 2014, Continuous enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass with simultaneous detoxification and enzyme recovery, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**(6), s. 1319 – 1335
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. & Zacchi, G., 2006, Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today, *TRENDS in Biotechnology*, **24**(12)

- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G. & Faaij, A.P.C., 2005, Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass and Bioenergy*, **28**, s. 384 – 410
- Juturu, V. & Wu, J.C., 2014, Microbial cellulases: Engineering, production and applications, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **33**, s. 188 – 203
- Khoshnevisan, K., Bordbar, A-K., Zare, D., Davoodi, D., Noruzi, M, Barkhi, M. & Tabatabaei, M., 2011, Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, *Chemical Engineering Journal*, **171**, s. 669 – 673
- Limayem, A. & Ricke, S.T., 2012, Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects, *Progress in Energy and Combustion Science*, **37**, s. 449 – 467
- Lindeman, J., Haven, M.Ø., Chylenski, P., Jørgensen, H. & Felby, C., 2013, Recycling cellulases for cellulosic ethanol production at industrial relevant conditions: Potential and temperature dependency at high solid processes, *Bioresource Technology*, **148**, s. 180 – 188
- Nevalainen, T., 2012, Kartonkijätteestä bioetanolia – Hydrolysoitujen sokerien erotus ja väkevöinti fermentointia varten, *Diplomityö*, Lappeenrannan teknillinen yliopisto, Kemiantekniikan osasto, s. 17 – 19
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. & Ladisch, 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technology*, **96**, s. 673 – 686
- Mubarak, N.M., Wong, J.R., Tan, K.W., Sahu, J.N., Abdullah, E.C., Jayakumar, N.S. & Ganesan, P., 2014, Immobilization of cellulase enzyme on functional multiwall carbon nanotubes, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **107**, s. 124 – 131
- Ouyang, J., Liu, B., Zhang, M., Zheng, Z. & Yu, H., 2013, Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp, *Bioresource Technology*, **146**, s. 288 – 293
- Pihlajaniemi, V., Sipponen, S., Sipponen, M.H., Pastinen, O. & Laakso, S., 2014, Enzymatic saccharification of pretreated wheat straw: Comparison of solids-recycling, sequential hydrolysis and batch hydrolysis, *Bioresource Technology*, **153**, s. 15 – 22
- Pribowo, A., 2014, Enzyme-substrate interactions and their influence on enzyme recycling strategies as a way of reusing cellulases, *Väitöskirja*, The University of British Columbia, Forestry, saatavilla:  
[https://circle.ubc.ca/bitstream/handle/2429/46481/ubc\\_2014\\_spring\\_pribowo\\_amadeus.pdf?sequence=4](https://circle.ubc.ca/bitstream/handle/2429/46481/ubc_2014_spring_pribowo_amadeus.pdf?sequence=4)
- Qi, B., Luo, J., Chen, G., Chen, X. & Wan, Y., 2012, Application of ultrafiltration and nanofiltration for recycling cellulase and concentrating glucose from enzymatic hydrolyzate of steam exploded wheat straw, *Bioresource Technology*, **104**, s. 466 – 472

- Qi, B., Chen, X., Su, Y. & Wan, Y., 2011, Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose, *Bioresource Technology*, **102**, s. 2881 – 2889
- Rahikainen, J., Mikander, S., Marjamaa, K., Tamminen, T., Lappas, A., Viikari, L. & Kruus, K., 2011, Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood- Study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface, *Biotechnology and Bioengineering*, **108**, s. 2823 – 2834
- Rodrigues, A.C., Leitão, A.F., Moreira, S., Felby, C. & Gama, M., 2012, Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution, *Bioresource Technology*, **110**, s. 523 – 533
- Rodrigues, A.C., Felby, C. & Gama, M., 2014, Cellulase stability, adsorption/desorption profiles and recycling during successive cycles of hydrolysis and fermentation of wheat straw, *Bioresource Technology*, **156**, s. 163 – 169
- Shang, Y., Su, R., Huang, R., Yang, Y., Qi, W., Li, Q. & He, Z., 2014, Recycling cellulases by pH-triggered adsorption-desorption during the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, s. 5765 – 5774
- Skovgaard, P.A., Christensen, B.H., Felby, C. & Jørgensen, H., 2014, Recovery of cellulose activity after ethanol stripping in a novel pilot-scale unit, *Journal for Industrial Microbiology and Biotechnology*, **41**, s. 637 – 646.
- Skovgaard, P.A. & Jørgensen, H., 2013, Influence of high temperature and ethanol on thermostable lignocellolytic enzymes, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **40**(5), s. 447 – 456
- Suokko, A., 2010, Lignoselluloosaetanolin ja synteetisikaasusta fermentoitujen polttonesteiden teknologiatarkastelu, *VTT-tiedotteita*, <http://www.vtt.fi/inf/pdf/tiedotteet/2010/T2533.pdf>, (21.10.2014)
- Tu, M. & Saddler, J.N., 2010, Potential enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **161**, s. 274 – 287
- Wang, Q.Q., Zhu, J.Y. & Zhan, H.Y., 2012, Kinetics of adsorption, desorption and re-adsorption of a commercial endoglucanase in lignocellulosic suspension, *Biotechnology and Bioengineering*, **109**(8)
- Weiss, N., Börjesson, J., Pedersen, L.S. & Meyer, A.S., 2013, Enzymatic lignocellulose hydrolysis: Improved cellulose productivity by insoluble solids recycling, *Biotechnology for Biofuels*, **6**(5)
- Xue, Y., Jameel, H. & Park, S., 2012, Strategies to recycle enzymes and their impact on enzymatic hydrolysis for bioethanol production, *Bioresources*, **7**(1), s. 602 – 615
- Yuan, Z-H., Peng, X., Huang, H-J., Wang, H., Ma, Y-J., Bao, S., Liu, H., Leng, L-J., Cui, K-L. & Zeng, G-M., 2014, Precipitation and recovery of cellulose using biosurfactant, *Separation Science and Technology*, **49**, s. 2249 – 2254