

LAPPEENRANNAN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknillinen tiedekunta

Kemiantekniikan koulutusohjelma

Teknillisen kemian laboratorio

Jaakko Siitonen

**UUTTO-OLOSUHTEIDEN VAIKUTUS KASVIPERÄISEN
INDIGON SAANTOON**

Työn tarkastajat

Professori Erkki Paatero

TkT Kimmo Klemola

Työn ohjaaja:

MMT Marjo Keskitalo

ALKUSANAT

Työ tehtiin 17.5.-9.10.2010 Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksella Jokioisissa kasvintuotannon yksikössä osana FARMIVÄRI-hanketta. Vastasin itse kaikesta siementen kylvämisestä ja kasvien hoitamisesta uuttamiseen ja analysointiin. Tutustuin siis morsinkoon ja indigoon kattavasti molekyylitasolta ruohonjuuritasolle.

Haluaisin kiittää kaikkia työn valmistumiseen osallisia: laboratorion väkeä opista ja innoituksesta sekä MTT:n väkeä mukavasta työilmapiiristä ja opeista maanviljelyn saralla. Kiitokset kuuluvat myös perheelle ja vuosien varsilta kertyneille ystäville tuesta ja kannustuksesta. Ilman teitä tämä ei olisi tässä.

Omistettu mummulle.

Lappeenrannassa 22.10.2010

Jaakko Siitonen

TIIVISTELMÄ

Lappeenrannan teknillinen yliopisto

Teknillinen tiedekunta

Teknillisen kemian laboratorio

Jaakko Siitonen

Uutto-olosuhteiden vaikutus kasviperäisen indigon saantoon

Diplomityö

2010

71 sivua, 26 kuvaa, 8 taulukkoa ja 3 liitettä

Tarkastajat: Professori Erkki Paatero

TkT Kimmo Klemola

Hakusanat: Indigo, morsinko, liuotus, kiinteä–nesteuutto

Keywords: Indigo, woad, leaching, solid–liquid extraction

Indigo on väriaine, jota valmistetaan petrokemianteollisuuden välituotteena syntyvästä aniliinista. Indigolla on kuitenkin pitkä historia. Sitä on valmistettu perinteisesti eri viljelykasveista, joista Euroopassa merkittävin on ollut morsinko. Luonnonmukaisten tuotteiden suosion kasvaessa on ryhdytty selvittämään morsingon viljelyn potentiaalia.

Viljelyn kannattavuuden kannalta olennaista on kasvin lehdissä esiintyvien indigon esiasteiden mahdollisimman täydellinen eristäminen. Indigoa tuotetaan uuttamalla indigon esiasteet veteen. Esiasteet hajoavat synnyttäen indoksyylä, josta hapen vaikutuksella muodostuu indigoa. Syntynyt indigo saostuu ja laskeutuu pohjalle. Samalla kuitenkin tapahtuu epätoivottuja sivureaktioita, jotka vähentävät indigon saantoa.

Tutkimuksen tavoitteena oli laboratorio- ja kenttäkokeiden avulla löytää indigon saantoa parantavat uutto-olosuhteet. Kokeiden perusteella havaittiin, että indigon saantoon vaikuttavat positiivisesti pH:n laskeminen, lämpötilan nostaminen, morsingon lehtien pilkkominen ja uuttoliuoksen sekoittaminen. Uuttoliuoksen suolapitoisuuden havaittiin puolestaan vaikuttavan indigon saantoon negatiivisesti. Laboratoriokokeiden perusteella havaittu pH:n laskemisen vaikutus indigon saantoon todistettiin myös kenttäolosuhteissa.

Kokeiden havaintojen perusteella esitettiin olosuhteiden indigosaantoa parantavien vaikutusten johtuvan kahdesta tekijästä: indoksyylin stabiloitumisesta happamassa ympäristössä, jolloin sivureaktioiden osuus vähenee, sekä aineensiirron paranemisella sekoituksen, faasien rajapinnan kasvamisen ja etenkin lehtien vahakerroksen rikkoutumisen kuumen veden ja hapen vaikutuksesta.

ABSTRACT

Lappeenranta University of Technology

Faculty of Technology

Laboratory of industrial chemistry

Jaakko Siitonen

The influence of extraction conditions to the yield of plant derived indigo

Master's thesis

2010

71 pages, 26 figures, 8 tables and 3 appendices

Examiners: Professor Erkki Paatero

M.Sc. (Tech.) Kimmo Klemola

Keywords: Indigo, leaching, solid–liquid extraction

Indigo is a dye and it's made of aniline which is an intermediate compound in petrochemical industry by-product of oil refining. However, indigo has long history. It has been traditionally produced from different crops, of which woad has been the most important plant in Europe. Recently, with the increased popularity to organic products, there has been more research on the potential of cultivation of woad.

Essential for the profitable cultivation of woad is that the separation of indigo precursors in the plant leaves is optimal. Currently indigo is produced by extracting the precursors with water. The precursors break down and indoxyl is formed. When oxygen is present, the indoxyl molecules react together and produce indigo. The formed indigo precipitates to the bottom. However there are some side reactions that reduce the yield of indigo.

The goal of the research was to find by laboratory experiments the extraction conditions that increase the extraction yield. The tests show that lower pH, higher temperature and chopped leaves in addition to stirring had positive impact on the yield. Addition of salt in the extraction water had negative impact. The positive properties of lower pH were also found to be true in field tests.

Based on the test results, two factors had effect on the increase of the yield: indoxyl is stabilized in low pH which reduces the amount of the side reactions and the mass transfer is more efficient with higher temperature, stirring, increase in the interfacial surface and especially with the breaking of the surface wax caused by acid and high temperature.

SYMBOLILUETTELO

A_{600nm}	absorbanssi aallonpituudella 600 nm, -
c	konsentraatio, g/L
m	massa, g
T	lämpötila, °C
t	aika, min
V	tilavuus, L
x	pitoisuus, g/kg

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	2
2	INDIGO.....	3
3	INDIGOKASVIT.....	4
	3.1 Trooppinen indigo.....	4
	3.2 Väritatar.....	5
	3.3 Morsinko.....	6
4	INDIGON KEMIAA.....	7
	4.1 Indigon pelkistäminen.....	12
	4.2 Indigon analysointimentelmät.....	15
6	INDIGON EROTTAMINEN KASVEISTA.....	17
	6.1 Perinteiset menetelmät.....	17
	6.1.1 Indigon tuottaminen käymisteitse morsingosta.....	17
	6.1.2 Perinteinen indigon tuottaminen väritattarista.....	19
	6.1.3 Indigon perinteinen uuttaminen trooppisista indigokasveista.....	20
	6.2 Nykyaikaiset menetelmät.....	22
	6.2.1 Morsingon vesiuutto.....	22
	6.2.2 Väritattarin vesiuutto.....	25
7	KASVI-INDIGON PUHTAUS.....	26
8	KIRJALLISUUDEN TULOSTEN VERTAILU.....	28
9	PROSESSIN KUVAUS.....	30
	9.1 Sadonkorjuu.....	31
	9.2 Esikäsittely.....	31
	9.2.1 Lehtien peseminen.....	31
	9.2.2 Lehtien pilkkominen.....	32
	9.2.3 Lehtien varastointi.....	33
	9.3 Utto (liuotus).....	33
	9.4 Jäähdytys.....	34
	9.5 Puhdistaminen.....	35
	9.6 Ilmaus.....	36
	9.7 Selkeytys.....	38
	9.8 Jäljelle jäävän kasvimateriaalin hyötykäyttö.....	38
	9.8.1 Biokaasutus.....	38
	9.8.2 Kasvimassan levittäminen pelloille.....	40
10	KOKEELLISET MENETELMÄT.....	40
	10.1 Kemikaalit.....	40
	10.2 Kasvimateriaali.....	41
	10.3 Koemenetelmät.....	42
	10.3.1 Esikokeet.....	42
	10.3.2 Uuttokokeet.....	44
	10.3.3 Kenttäkokeet.....	46
	10.4 Näytteiden käsittely ja analysointi.....	46
11	TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU.....	47
	11.1 Kuiva-ainepitoisuudet.....	47
	11.2 Esikokeet.....	47
	11.3 Uuttokokeet.....	50
	11.4 Kenttäkokeet.....	62
12	JOHTOPÄÄTÖKSET.....	63
13	YHTEENVETO.....	67
	LÄHDELUETTELO.....	68

1 JOHDANTO

Indigo on ollut kautta historian tärkeä väriaine ja kauppatavara. Vielä nykyisinkin se on yleinen näky sillä värjättyjen farkkujen pysyvän suosion ansiosta. Perinteisesti sitä on tuotettu eri viljelykasveista riippuen alueesta. Euroopassa on viljelty morsinkoa (*isatis tinctoria*), Kiinassa ja Japanissa väritataria (*polygonum tinctoria*), sekä trooppisilla alueilla indigokasveja, joista merkittävimpana *indigofera tinctoria*. Väriaine on saatu kasveista joko uuttamalla indigon esiasteet vedellä tai lehtien käymisprosessin avulla. Kuitenkin 1900-luvun vaihteessa BASFin markkinoille tuoma synteettinen indigo supisti nopeasti kasviperäisen indigon markkinat lähes olemattomiin. Synteettistä indigoa valmistetaan öljyteollisuuden sivutuotteena syntyvästä aniliinista. Öljyn hinnan kallistuessa, ja toisaalta uudistuvien luonnonmukaisten valmistusmenetelmien saadessa suosiota on kasviperäisen indigon tuottaminen saanut kasvavaa kiinnostusta.

Perinteisen maatalouden keskittyessä suuriin yksiköihin ja maaseudun työpaikkojen vähentyessä vaihtoehtoisten kasvien, kuten värikasvien, viljely voisi olla yksi maaseudulle sopiva elinkeino. Värikasveista Suomessa on tutkittu eniten morsingon viljelyä, jota tutkittiin vuosina 2001–2004 Maa- ja elintarviketalouden tutkimuskeskuksessa osana eurooppalaista Spindigo-hanketta. Morsingon viljelyn kannalta olennaista on erotuksen ja muiden tuotantoteknisten tekijöiden, kuten sadonkorjuun optimointi. Näiden lisäksi oleellista viljelyn kannattavuuden kannalta on kasviperäisen indigon markkinat. Kasviperäinen indigo ei ole laadultaan yhtä tasaista synteettisen indigon kanssa, joten se ei pysty kilpailemaan suoraan samoilla markkinoilla. Toisaalta kasviperäisen indigon laadun luonnollinen epätasaisuus on myös sen kilpailuvaltti. Luonnon indigon markkinat ovatkin erikoistuotteiden saralla. Hyvänä esimerkkinä on ruotsalainen Indigofera (2010) vaatemerkki, joka valmistaa luonnon indigolla värjättyjä farkkuja.

Työ jakaantuu kirjalliseen ja kokeelliseen osaan. Kirjallisessa osassa käsitellään lyhyesti indigontuotannon historiaa, eri indigoa tuottavat kasvit, indigon kemiaa, ja aikaisempi tutkimus kasvi-indigon tuotannosta. Tämän ohella käydään lävitse indigon tuotantoprosessi. Prosessin vaiheet käsitellään vaiheittain ja käsittelyssä tuodaan myös esille omia näkemyksiä eri prosessi- ja laitemahdollisuuksista.

Työn kokeellinen osa keskittyy indigon erottamiseen morsingosta uuttamalla esiasteet vedellä. Tavoitteena on pyrkiä kehittämään aikaisempien tutkimusten menetelmiä. Eri uutto-olosuhteiden, joilla tässä tarkoitetaan varsinaisten olosuhteiden kuten lämpötilan ja pH:n ohella myös uutettavan lehtimateriaalin esikäsittelyä ja prosessiteknisiä ratkaisuja. Huomioitavaa on myös, että työssä käytetään termiä (kiinteä–neste)uutto yleisemmin kemianteollisuudessa käytetyn liuotuksen sijaan. Tämän syynä on yhdenmukaisuus aiemman tutkimuksen kanssa.

2 INDIGO

Kasveista saatu indigo on yksi vanhimmista, ellei vanhin käytetty väriaine. Sitä on löydetty yli neljä tuhatta vuotta vanhoista arkeologisista kaivauksista. Sen useimpiin luonnon väriaineisiin verrattuna voimakas ja kestävä sininen väri on tehnyt siitä halutun ja arvostetun kauppatavaran. Aikojen saatossa sillä onkin ollut omat vaikutuksensa eri kulttuurien kehityksessä.

Indigoa on perinteisesti valmistettu eri kasveista eri maailmankolkissa: Euroopassa morsingosta (*Isatis tinctoria*), Japanissa ja Kiinassa väritattarista (*Polygonum tinctoria*) ja trooppisissa oloissa kuten Intiassa ja Karibialla palkokasveihin kuuluvista *indigofera*-kasveista. Euroopassa etenkin Toulousen alue Ranskassa ja Thüringenin alue Saksassa olivat historiassa tunnettuja morsingon kasvatuksesta. Pikkuhiljaa laajentuneet kauppareitit Intiaan ja myöhemmin Amerikkaan mahdollistivat indigokasvista saadun indigon käyttämisen, joka pikkuhiljaa korvasi perinteisen morsingosta erotetun indigon. Sittemmin myös *indigofera*-kasveista saatu indigo on saanut väistyä BASFin vuonna 1897 markkinoille tuoman synteettisen indigon tieltä. (Belfour-Paul 1998)

Vaikka indigoa kehittyneempiäkin sinisiä väriaineita on kehitetty, on se pitänyt kuitenkin hyvin pintansa. Indigolla värjätty kangas kestää erinomaisesti pesua ja valoa, mutta kuluu käytössä hankauksen johdosta. Tämä yksilöllinen hankautumisen aiheuttama värin haaleneminen onkin muodostunut sen myyntivaltiksi. Pääasiallinen indigon käyttökohde on farkkuihin käytettävä denimkangas. Levi Straussin 1800-luvun puolivälissä markkinoille tuomien housujen suosio onkin pitänyt indigon kysynnän korkeana. Stoker *et al.* (1998)

ovat ilmoittaneet vuonna 1998 maailmassa käytetyn indigon määräksi 80 kt, joka vastaa kymmentä prosenttia koko maailman väriaineiden käytöstä. Tästä alle 1 % on kasvi-indigoa (Gilbert *et al.* 2001).

3 INDIGOKASVIT

Kasviperäistä indigoa on käytetty ympäri maailmaa antiikin ajoista asti. Indigon esiasteita syntyy monen kasvin sekundaarisen aineenvaihdunnan seurauksena. Siitä, miten näiden kasvien siniseksi värjäävät ominaisuudet on keksitty, ei ole varmaa tietoa. Balfour-Paulin (1998) mukaan arkeologiset tutkimukset viittaavat siihen, että tämä on tapahtunut itsenäisesti eri puolilla maailmaa. Morsingon, väritattarin ja *Indigofera*-suvun kasvien lisäksi lukuisia muita kasveja on käytetty paikallisesti. Balfour-Paul (1998) on maininnut seuraavat kasvit: *Strobilanthes flaccidifolius* Aasian vuoristoisilla alueilla, *Lonchocarpus cyanescens* Länsi-Afrikassa ja *Wrightia tinctoria* sekä *Marsdenia tinctoria* Kaakkois-Aasiassa. Syystä tai toisesta nämä kasvit eivät ole kuitenkaan saavuttaneet yhtä laajaa käyttöä kuin kolme aiemmin mainittua, joista onkin syytä kertoa hiukan tarkemmin.

3.1 Trooppinen indigo

Indigofera-suvun palkokasveihin kuuluvista indigokasveista *Indigofera tinctoria* L.:ää on käytetty eniten indigon tuotannossa. Se on monivuotinen ja voi kasvaa jopa kahden metrin mittaiseksi. Sitä ja muita saman suvun indigon esiasteita sisältäviä kasveja on viljelty laajalti trooppisilla ja subtrooppisilla alueilla. *Indigofera*-lajien etuna muihin värikkäisiin kasveihin onkin ollut niiden runsas määrä, jolloin eri olosuhteisiin on löytynyt hyvin niihin sopivia kasveja. Nämä kasvit ovat myös olleet kylmemmillä alueilla viljeltäviä kasveja (morsinko) tuottavampia. Tärkeä seikka näiden kasvien suosioon on myös ollut se, että indigo on saatu erotettua kuivana ja konsentroituna pigmenttinä. Jotain viljelyn määrästä kertoo se, että 1800-luvun alkupuolella Pohjois-Intian ja Bengalin alueella on vuosittain tuotettu noin 3 miljoonaa kiloa indigoväriä (Bechtold ja Mussak 2009).

Vaikka *Indigofera*-lajit olivatkin siirtomaa-aikana laajimmin hyödynnettyjä indigokasveja, niitä ei ole tutkittu yhtä paljon kuin morsinkoa ja väritattaria. *Indigoferaan* liittyvä tutkimus on lähinnä peräisin 1900-luvun alulta Intiasta, joka

oli vielä tuolloin Ison-Britannian siirtomaa. Perkin ja Everest (1918) osoittivat tutkimuksissaan, että indigon esiasteet sijaitsevat lehdistä, joiden osuus kasvisadon painosta on n. 40 %. Indigon esiasteen (indikaani) osuudeksi saatiin saadun indigon massasta mitattuna 0,2–0,76 m-% lehden kuiva-aineesta. Lisäksi havaittiin, että nuorista lehdistä saatiin noin kaksinkertainen määrä (0,7 m-% vrt. 0,35 m-%) indigoa vanhoihin lehtiin nähden. Kuitenkaan *Indigofera*-suvun kasveja ei ole tutkittu morsingon ja väritattarin tutkimisessa käytetyillä moderneilla määritysmenetelmillä.

3.2 Väritatar

Tatarkasveihin kuuluva *Polygonum tinctorium* (joka tunnetaan myös nimellä *Persicaria tinctoria*), eli väritatar (eng. dyers knotweed), on subtrooppinen kasvi, joka on peräisin Etelä-Kiinasta ja Vietnamista. Sitä on viljelty Japanissa ja Kiinassa satojen vuosien ajan. Se onkin tunnettu yleisesti nimillä Japanin indigo ja Kiinan indigo. Kasvi on yksi- tai kaksivuotinen. Se kasvaa noin puolen metrin mittaiseksi ja varresta erkanee epäsäännöllisesti tummat sinivihreät lehdet. Väritattarin kukkien väri vaihtelee valkoisesta vaaleanpunaiseen. (Belfour-Paul 1998)

Kasvin perinteisestä kosteassa subtrooppisessa ilmastossa viljelystä huolimatta Angelini *et al.* (2004) osoittivat kasvin sopivan viljeltäväksi myös Italiassa. Spindigo-hankkeen (2004) tuloksena havaittiin, että kasvi menestyy myös Välimeren alueella ja Keski-Euroopassa, muttei siedä kuivuutta eikä liikaa kuumuutta. Saksassa todettiin samaan tutkimukseen liittyen *Polygonumin* olevan sopivin indigoa tuottava kasvi Keski-Euroopan olosuhteisiin. MTT on tutkinut kasvin viljelyä myös Suomessa (Keskitalo 2010). Tutkimusten mukaan väritatar voi menestyä Suomen olosuhteissa lämpimällä paikalla. Tatar-kasvin tapaan, myös väritatar on hyvin hallanarka. Väritatarista saatavan lehtimassan on todettu olevan samaa luokkaa morsingon kanssa, mutta indigon esiastetta on määritetty olevan siinä 3–5-kertainen määrä (noin 1,4 % kuiva-aineesta) (Bechtold ja Mussak 2009). Angelinin *et al.* (2004) kokeissa valkokukkaiset yksilöt tuottivat vähemmän lehtiä, ja siten vähemmän indigoa, kuin ne kasvit joilla oli vaaleanpunaiset kukat.

3.3 Morsinko

Isatis tinctoria eli morsinko (eng. woad) on ristikukkaisiin kuuluva kaksivuotinen *Cruciferae*-suvun kasvi. Se on sukua mm. kaalille, rypsilille ja rapsille. Morsinko on peräisin Etelä-Venäjältä, mutta sen historian viljelykasvina vuoksi se on levinnyt Pohjois-Eurooppaan ja Pohjois-Amerikkaan. Morsinko kasvattaa ensimmäisenä kasvuvuotenaan lehtiruusukkeeseen. Toisen kasvuvuoden alkukesällä se kasvattaa kukinnon, jonka varsi kasvaa jopa metrin mittaiseksi ja sisältää paljon pieniä keltaisia kukkia. Loppukesällä kukista kehittyy tummat siemenkodat. On huomattavaa, että indigon esiasteita esiintyy morsingossa merkittäviä määriä vain sen ensimmäisenä kasvuvuotena. (Balfour-Paul 1998)

Morsinko on perinteinen eurooppalainen viljelykasvi. Sen kasvatuksesta löytyy merkkejä jo rauta-ajan Englannista (Balfour-Paul 1998). Viljely oli laajamittaista 1600-luvulle saakka, jolloin trooppisen indigon markkinoille tulo lopetti morsingon viljelemisen lähes tyystin. Toulousessa Ranskassa ja Erfurtissa Saksassa indigokaupan vaikutukset ovat kuitenkin vieläkin näkyvissä rikkaiden indigokauppioiden taloissa. Nykyisin morsingon viljely on harvinaista, mutta se on saanut kasvavaa huomiota osakseen luonnonmukaisten tuotteiden markkionoiden kasvaessa. Kaupallisesti morsinkoa viljellään indigon tuotantoon tällä hetkellä Euroopassa ainakin kolmen eri yrityksen toimesta: Bleu de Pastel de Lectoure (2010) Toulousessa, Woad-inc. (2010) Norfolkkissa Englannissa ja La Campana (2010), Italiassa.

Angelini *et al.* (2004) totesivat Indigon esiasteiden määrän morsingossa riippuvan auringon säteilyn määrästä korjuuhetkellä. Tämän vuoksi kylvö tulisi suorittaa mahdollisimman aikaisin, jotta satoa päästäisiin korjaamaan kesän valoisimpaan aikaan. MTT:n tutkimusten mukaan Suomessa morsinko voidaan kylvää rypsin tavoin toukokuun puolessa välissä maan lämmentyessä. Kylvöä ei kannata tehdä liian aikaisin, sillä kylmässä maassa morsinko kasvaa hitaasti ja rikkakasvit saavat silloin etulyöntiaseman. (Keskitalo 2010)

Morsinko kasvattaa uudet lehdet leikattujen tilalle. Täten satoa voidaan korjata yhden kasvukauden aikana useammin kuin kerran, kunhan vain kasvi saa tarpeeksi vettä ja ravinteita. Spindigo-hankkeessa (2004), jossa morsingon

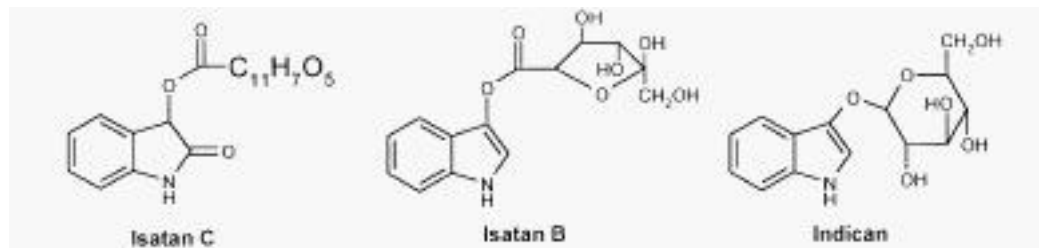
kasvatusta tutkittiin Espanjassa, Italiassa, Saksassa, Englannissa ja Suomessa, saatiin satoa korjattua kasvukauden aikana Italiassa ja Espanjassa neljä kertaa, Saksassa kolme ja Suomessa ja Englannissa kaksi kertaa. Jotta lehtisato saataisiin maksimoitua, suositellaan lannoitukseen 60–80 kg/ha P₂O₅:ia, 80–100 kg/ha K₂O:ia ja 150 kg/ha typpeä (Bechtold ja Mussak 2009). Typpilannoite tulisi levittää kolmessa osassa, ensimmäinen kylvön yhteydessä ja kaksi muuta jokaisen sadonkorjuun yhteydessä (olettaen kolme sadonkorjuuta kasvukaudella). MTT:n kokeissa on kuitenkin todettu tämän lannoitemäärän olevan ylimitoitettu (Keskitalo 2010). Suomen oloissa tarvitaan typpeä 80 kg/ha ja fosforia 15 kg/ha. Sadonkorjuun yhteydessä voidaan lisätä typpeä 20–30 kg/ha.

Isatis tinctorian ohella *isatis*-sukuun kuuluu yli viisikymmentä kasvia, näissä lajeissa esiintyy myös muita indigon esiasteita tuottavia kasveja. Toinen merkittävä *isatis*-lajike on *Isatis indigotica* eli kiinalainen morsinko, joka tunnetaan myös Englannissa nimellä 'tee indigo', koska kiinalaiset käyttivät sitä vihreiden teelehtien värjäämiseen tummiksi. Kiinalaisen morsingon menestymistä eurooppalaisissa olosuhteissa on tutkittu mm. Angelinin *et al.* (2007) toimesta Pisan alueella Italiassa. Tutkimukset osoittivat, että kiinalaisessa morsingossa oli noin 1,5-kertainen määrä indigon esiasteita eurooppalaiseen (*I. tinctoria*) nähden, mutta lehtimassaa oli eurooppalaisessa 1,3-kertainen määrä. Kokonaisuudessa siis kiinalainen morsinko olisi tuottavampi indigoväriin kannalta. Kuitenkin kiinalainen morsinko todettiin ongelmalliseksi, sillä se on herkkä hyönteisille ja sillä on huonompi sadonkorjuun jälkeinen kasvukyky. Näiden riskien todettiin kumoavan kasvaneen tuotantokapasiteetin edut. MTT:n kokeissa 2000-luvun alussa kiinalainen morsinko ei menestynyt Suomessa (Keskitalo 2010).

4 INDIGON KEMIAA

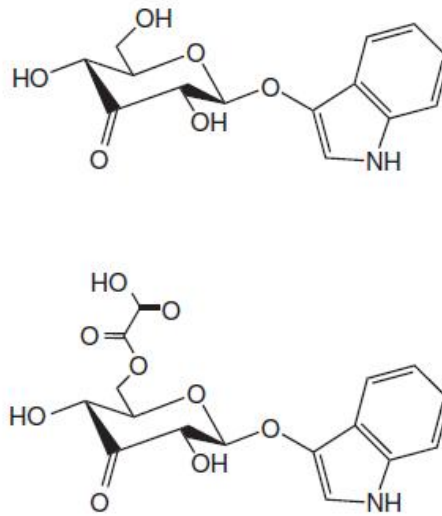
Kasviperäisen indigon (indigotiini) valmistamisen mahdollistaa eri kasvien sekundaarisen aineenvaihdunnan tuottamat indoksyylirakenteen sisältämät yhdisteet. *Polygonum tinctorian* (väritatar) ja *Indigoferan* (trooppiset lajit) tapauksissa indigon esiasteena on indikaani (indican, indoksyyli-β-glukosidi). *Isatis tinctoria* (morsinko) puolestaan sisältää useampaa eri yhdistettä, jotka toimivat indigon esiasteina. Indigotiinia on morsingossa vain pieniä määriä. Sen sijaan merkittävämpiä ovat isatan yhdisteet. Näille on esitetty eri tutkimuksissa

erilaisia koostumuksia. Pitkään pidettiin Epsteinin *et al.* (1967) esittämää isatan B:tä (indoksyyli- β -ketoglukonaatti) morsinkoindigon lähteenä. Kuitenkin morsingon saadessa enemmän huomiota ja lisätutkimusta 2000-luvulla on tutkimuksissa tullut esiin uusia näkökantoja. Maugard *et al.* (2001) löysivät morsingosta isatan C -yhdisteen. Yhdisteelle ei esitetty tarkkaa rakennetta, mutta kyseessä on dioksyndolin esteri. Sen todettiin vaikuttavan lähinnä punaisen indirubiinin syntymiseen, joka on eräs kasviperäisen indigosynteesin sivutuotteista. Isatan C:n määrä oli kuitenkin niin pieni ja sen pysyvyys niin huono, ettei sen todettu olevan merkittävä tekijä indigon valmistamisen kannalta. Indigotiinin ja Maugardin *et al.* (2001) esittämien isatan B ja isatan C -yhdisteiden molekyylikaavat on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Kasvi-indigon lähtöaineet. (Maugard *et al.* 2001)

Oberthür *et al.* (2004b) saivat aikaisemmista tuloksista poikkeavia tuloksia tutkiessaan morsinkoa lääketieteellisistä lähtökohdista sen sisältämien tulehduksia ehkäisevien ominaisuuksien vuoksi. He totesivat merkittävämmäksi morsingon indigoesiasteeksi löytämänsä isatan A -yhdisteen ja esittivät isatan B -yhdisteelle aikaisemmasta poikkeavan rakenteen. Merkittävänä erona aiempaan isatan B:n rakenteeseen on Oberthürin *et al.* (2004b) esittämässä yhdisteessä indoksyylin liittyminen sokeriryhmään eetterisidoksella esterisidoksen sijaan. Oberthürin *et al.* (2004b) esittämien isatan A ja B -yhdisteiden molekyylikaavat on esitetty kuvassa 2.



Kuva 2. Isatan B (ylh.) ja Isatan A. (Bechtold ja Mussak 2009).

Selityksenä isatan A:n löytymiselle pidetään analyysimenetelmää. Aiemmat tutkimukset on tehty nestekromatografialla (HPLC, High Precision Liquid Chromatography), jolla Oberthürin *et al.* (2004a) mukaan isatan A:n määrittäminen ei onnistu. Syyksi on esitetty isatan A:n ja B:n muodostamia hydraatteja vesiliuoksessa. Käytettäessä muita liuottimia saatiin erotettua isatan B ja indikaani, mutta isatan A:n erottaminen ei onnistunut. Isatan A saatiin määritettyä käyttämällä ohutkerroskromatografiaa (TLC, Thin Layer Chromatography) silikageelillä.

Isatan-yhdisteet ovat osoittautuneet hyvin hankaliksi määritettäviksi niiden huonon pysyvyyden vuoksi. Samasta syystä morsingon lehtiä ei pystytä kuivaamaan indigoa valmistettaessa, vaan ne on käsiteltävä välittömästi sadonkorjuun jälkeen (Oberthür *et al.* 2004a). Eri määritysmenetelmillä ja olosuhteilla saaduissa tuloksissa on paljon eroavaisuuksia. Taulukossa I on esitetty neljän eri tutkimuksen (Oberthür *et al.* (2004a), Campeol *et al.* (2006), Angelini *et al.* (2007) ja Kokubun *et al.* (1998)) tuloksia morsingon lehdistä erotettujen indigon esiasteiden osalta.

Taulukko I. Eri tutkimusmenetelmien määrittystuloksia morsingon lehdistä erotettujen indigon esiasteiden pitoisuuksille lehtien tuorepainoon (FW) ja kuivapainoon (DW) nähden ja näitä vastaavat teoreettiset indigomäärät. (Bechtold ja Mussak 2009)

Precursor	Methodology	Precursor content		Indigo equivalent		Reference
		g/kg FW	g/kg DW	g/kg FW	g/kg DW	
(a) <i>Isatis tinctoria</i>						
Indican	HPTLC-densitometry		2–9		0.9–4.0	Oberthür <i>et al.</i> (2004a)
Indican	HPLC-ELSD		2–6		0.9–2.7	Campeol <i>et al.</i> (2006)
Indican	HPLC-ELSD	0.4 ^c		0.2		Angelini <i>et al.</i> (2007)
Indican	Spectrophotometry		4–6		2–2.7	Kokubun <i>et al.</i> (1998)
	Rhodanine derivative					
Isatan B ^a	Spectrophotometry	10–18		4–8		Kokubun <i>et al.</i> (1998)
	Rhodanine derivative					
Isatan B ^a	HPLC-ELSD		2–20		0.9–8.5	Campeol <i>et al.</i> (2006)
Isatan B ^b	HPTLC-densitometry		4–23		1.7–9.8	Oberthür <i>et al.</i> (2004a)
Isatan A	HPTLC-densitometry		10–76		3.5–26	Oberthür <i>et al.</i> (2004)
Isatan B ^a	HPLC-ELSD	1.9 ^c		0.8		(Angelini <i>et al.</i> (2007)

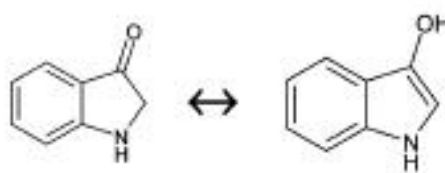
^aMeasured as indoxyl-5-ketogluconate.

^bMeasured as indoxyl-ribohex-3-ulopyranoside.

^cMean values, two harvests in 2003.

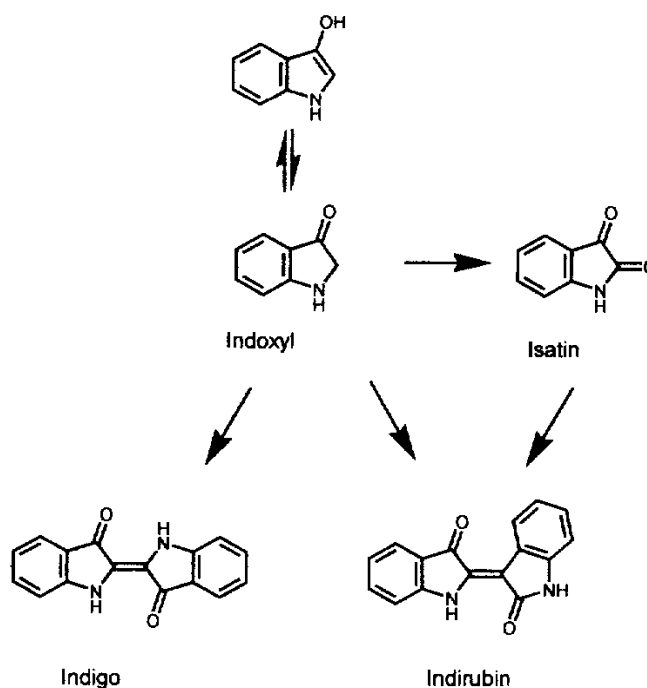
Taulukosta nähdään etenkin Kokubunin *et al.* (1998) käyttämän menetelmän eroavaisuus valon siroutumista mittaavalla (ELSD, Evaporative Light Scattering Detector) laitteella varustettuihin kromatografisiin menetelmiin. Tässä menetelmässä indikaanista ja isatin B:stä vapautunut indoksyyliradikaali sidottiin rhodaniiniin (2-thioxo-4-thiazolidinone), pelkistettiin indigoksi ja määritettiin spektrofotometrisesti. Indigon esiasteiden määrä kuitenkin vaihtelee suuresti myös muissa määryksissä. Oberthür *et al.* (2004a) esittivät syyksi sen, että yhdisteiden määrä riippuu ulkoisista tekijöistä, kuten auringon säteilyn määrästä sadonkorjuuhetkellä. Indigon mahdollisimman tehokkaan tuottamisen kannalta onkin tärkeää selvittää ja ottaa huomioon indigon esiasteiden määrään vaikuttavat tekijät sadonkorjuussa ja uuttamisessa.

Riippumatta esiasteen varsinaisesta molekyylikaavasta, varsinainen reaktio indigoksi on yhtenevä. Ensin esiastemolekyylä hydrolysoituu emäksen tai β -glukositaasientsyymien vaikutuksesta ja indoksyyliryhmän sitova sidos katkeaa. Seurauksena on indoksyylimolekyylä, jolla on kuvassa 3 esitetty resonanssirakenne.



Kuva 3. Indoksyylin resonanssimuodot.(Angelini *et al.* 2004)

Resonanssirakenteen vuoksi indoksyyli on hyvin reaktiivinen. Indoksyylin reaktiot on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4 Kaksi indoksyyliä reagoi indigoksi, tai yksi indoksyyli hapettuu isatiiniksi, joka muodostaa indoksyylin kanssa indirubiinia. (Kokubun 1998)

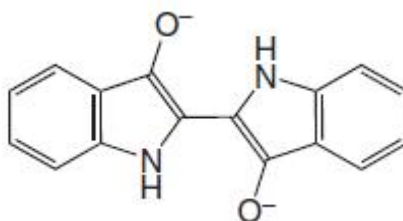
Kaksi indoksyylimolekyyliä reagoivat hapen vaikutuksesta muodostaen negatiivisesti varatun leuko-indigoionin, joka edelleen hapettuu indigoksi. Emäs katalysoi reaktiota. Indoksyyli voi myös hapettua muodostaen isatiinia, joka voi reagoida edelleen indoksyylin kanssa muodostaen indirubiinia. Indirubiini on heikko punainen väriaine ja siten epätoivottu tuote. Indirubiinin muodostumiseen johtava sivureaktio kuitenkin on aina läsnä indoksyylin reagoidessa. Tämän, ja muiden sivureaktioiden, vuoksi Bechtold ja Mussak (2009) esittävät puhtailla lähtöaineilla varsinaiseksi indigosaannoksi noin 85 %. Saantoa saadaan parannettua nostamalla hapen osapainetta ja indoksyylin konsentraatiota.

Indirubiinin ja isatiinin muodostumisen lisäksi epätoivottuja sivutuotteita on ainakin isatiinin johdannainen antraniliinihappo.

Syntynyt indigo tunnetaan myös nimellä indigotiini (indigotin), sen kauppanimike on CI Vat Blue 1 ja englanninkielinen IUPAC-nimi 2-(1,3-dihydro-3-oxo-2H-indol-2-ylidene)-1,2-dihydro-3H-indol-3-one. Se muodostaa neulamaisia kiteitä ja sen sublimoitumislämpötila on 170 °C. (Vuorema 2008a)

4.1 Indigon pelkistäminen

Indigo liukenee erittäin huonosti veteen ja muihin tavallisiin liuottimiin. Indigo ei sovellukaan sellaisenaan tekstiilivärjäykseen, vaan se on kyppiväri, eli värjäyskäytössä indigo täytyy pelkistää ensin vesiliukoiseen leuko-muotoon, jonka rakenne on esitetty kuvassa 5.



Kuva 5. Leuko-indigo (Bechtold ja Mussak 2009)

Leuko-muodossa väritön (kreikaksi *leucos* tarkoittaa valkoista) indigo absorboituu värjättäviin kuituihin. Leuko-indigon hapettuessa takaisin indigoksi indigo jää kuituihin ja värjää ne siniseksi. Värjäämisessä tarvitaan korkeaa pH:ta, sillä puuvillan (tyypillinen indigolla värjättävä tuote on puuvillasta tehty denimkangas) selluloosakuidut sisältävät hydroksyyli-ryhmiä, jotka varautuvat negatiivisesti pH:n ollessa yli 11. Tällöin myös negatiivinen leuko-indigo pääsee absorboitumaan paremmin indigokuituihin. (Vuorema 2008a)

Indigo voidaan pelkistää leuko-muotoon monin eri tavoin. Vuorema (2008a) listaa erilaisiksi tavoiksi perinteisen mikrobiologisen menetelmän lisäksi pelkistämisen natriumditioniitillä, sähkökemiallisen pelkistämisen ja glukoosin avulla tapahtuvan pelkistämisen.

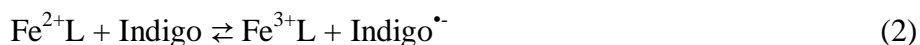
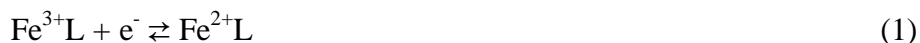
Mikrobiologinen pelkistäminen tapahtuu bakteerien vaikutuksesta. Se on perinteinen menetelmä, joka oli käytössä jo keskiajalla. Keskiajalla morsingon

lehdet murskattiin ja pyöriteltiin palloiksi joiden annettiin kuivua varastoituna. Ennen käyttöä värjäämisessä kuivuneet pallot murskattiin ja kasteltiin uudestaan. Syntyneen seoksen annettiin kompostoitua. Tätä jatkettiin, kunnes seos oli koostumukseltaan tummaa savimaista massaa. Näin aikaansaatu indigo sisälsi siis paljon kasvimassaa ja muita epäpuhtauksia. Tämä kasvimassa on sopiva kasvualusta pelkistäville bakteereille. Käymisastiaan lisättiin käymisen aikaansaamiseksi virtsaa, jonka biologisesti hajotessa vapautui emäksistä ammoniakkaa. Kun pH nousi yhdeksään, alkoi indigon pelkistyminen. Tällöin värjääminen voitiin aloittaa, kun astiassa olevan liuoksen väri vaihtui sinisestä värittömäksi.

Natriumditioniitti ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) on eniten käytetty pelkistin kyyppivärjäämisessä, jossa väriaine on ensin pelkistettävä liukoiseen muotoon. Sen käyttö perustuu sen hyvään pelkistyskykyyn suhteessa hintaan (Vuorema 2008a). Natriumditioniitti pelkistää indigon nopeasti ja aikaansaa hyvän värin kiinnittymisen ja tasaisen laadun. Varjopuolena on kuitenkin sen epästabiilisuus, sillä natriumditioniitti hapettuu helposti ilmakehän hapen vaikutuksesta. Myös hapettomissa olosuhteissa natriumditioniitti muuttuu epästabiiliksi lämpötilan kasvaessa. Näiden tekijöiden vuoksi sitä ja emästä tarvitaan pelkistämiseen huomattavasti stoikiometristä määrää suurempi määrä. Lisäksi kemikaalijäämiä ei voida perinteisin menetelmin poistaa jätevesistä ja käyttää uudelleen. Tämän ongelman tekee myös merkittäväksi se, että syntyvät sulfaatti-, sulfiitti- ja tiosulfaatti-ionit ovat myrkyllisiä ja ne laskevat jätevesien pH:ta. Nämä vaikuttavat haitallisesti sekä korroosion, että ympäristön kannalta. Vaihtoehtoiset menetelmät kiinnostavatkin teollisuutta. Vuoreman (2008a) mukaan vaihtoehtoisina kemikaaleina on tutkittu rauta(II)komplekseja, boorihydridiä ja orgaanisia pelkistäjiä. Markkinoilla on myös tehtaalla valmiiksi katalyyttisesti pelkistettyä indigoa, joka on sellaisenaan valmista käytettäväksi.

Sähkökemiallinen pelkistäminen on myös mahdollinen menetelmä. Suora sähkön avulla tapahtuva pelkistäminen on hankalaa indigon liukenemattomuuden vuoksi. Siksi tutkimus on keskittynyt epäsuoraan menetelmään. Tässä elektronien välittäjänä elektrodin ja indigomolekyylien välillä toimii jokin (vesi)liukoinen kompleksi, joka pystyy hapettumaan ja pelkistymään helposti. Tällaisia ovat Vuoreman⁹ mukaan mm. rauta(III)trietanoliamiinikompleksi (TEA-kompleksi),

HEDTA (Hydroxyethyl Ethylenediamine Triacetic Acid) -rautakompleksit, Fe^{3+} tai Ca^{2+} - Fe^{3+} -D-glukonaatit ja antrakininijohdannaiset. Rautakompleksin välityksellä tapahtuvan indigon sähkökemiallisen pelkistämisen yleinen reaktiomekanismi on muotoa:



Ensimmäisessä vaiheessa rauta pelkistyy kaksiarvoiseksi katodilla. Toisessa vaiheessa rauta hapettuu takaisin kolmiarvoiseksi indigopartikkeliin adsorboituneena ja pelkistää indigon negatiivisesti varatuksi radikaaliksi. Indigomolekyylissä on kaksi karbonyyliryhmää, joiden pelkistyessä saavutetaan leuko-muoto. Toinen pelkistyminen tapahtuu kahden radikaalin tai radikaalin ja rauta(II)-kompleksin välillä reaktioiden (3) ja (4) mukaisesti. Reaktio (5) on hapetus-pelkistysreaktion kokonaistasapaino. (Vuorema 2008a)

Ongelmana sähkökemiallisessa pelkistyksessä on välittäjäaineen ominaisuudet. Sähkövirran suuruus ja sen aikaansaama pelkistyminen on riippuvainen välittäjäaineen konsentraatiosta. Konsentraatiota ei voida kuitenkaan nostaa paljoa sen hinnan ja ympäristölle haitallisten vaikutusten vuoksi. Lisäksi konsentraation nostaminen voi vaikuttaa värjäysominaisuuksiin. (Vuorema 2008a)

Ympäristötekijöiden saadessa kasvavaa huomiota ja sähkökemiallisen pelkistämisen osoittautuessa hankalaksi ovat ympäristöystävälliset orgaaniset pelkistimet kiinnostavia. Lupaavin näistä on D-(+)-glukoosi. Vuorema *et al.* (2008b) tutkivat glukoosipelkistämistä. Sokereiden tiedetään soveltuvan pelkistämiseen, mutta tarkka mekanismi on epäselvä. Sokerimolekyylien tiedetään hajoavan hapettumisen seurauksena orgaanisiksi hapoiksi emäksisissä olosuhteissa ja glukoosin pelkistävän vaikutus liittyy johonkin näistä hajoamisen välivaiheista. Nämä välivaiheet ovat riippuvaisia liuoksen emäksisyydestä, joka

selittää syyn tarvittavaan korkeaan pH:hon. Glukoosin sopivuutta pelkistimenä tukee värjäyksen historia. Sundquistin (1982) mukaan käymiskyyppiin lisättiin mm. jauhoja, hunajaa ja runsaasti hiilihydraatteja sisältäviä hedelmiä kuten taateleita ja rypäleitä. Myös väriaineen seassa olleista kasvinosista syntyi pieniä määriä glukoosia. Emäksiseksi seoksen teki virtsan biologisesti hajotessa syntynyt ammoniakki.

Toinen perinteisissä menetelmissä esiintyvä orgaaninen pelkistin on antrakinoni ja sen johdannaiset. Antrakinoneja sisältävästä krapista (eng. madder, *rubia tinctorum*) saatua punaista väriainetta lisättiin joissain ”resepteissä” käymisastiaan. Antrakinonien vaikutus perinteisissä menetelmissä liittyi indigoa pelkistävien bakteerien pelkistävien ominaisuuksien parantamiseen. Niitä kuitenkin voidaan hyödyntää myös sähkökemiallisessa pelkistämisessä. Ne, toisin kuin indigo, voidaan pelkistää vesiliuoksessa, jolloin ne pelkistetyssä muodossa voivat luovuttaa elektroneja liukenemattomille indigomolekyyleille ja toimia siten välittäjäaineena. (Vuorema 2008a)

4.2 Indigon analysointimenetelmät

Indigon erottamista tutkittaessa indigon määrän tarkka mittaaminen on tärkeää. Standardimenetelmää indigon määrittämiseksi ei kuitenkaan ole (Bechtold ja Mussak 2009). Yleisimmin määrittäminen on tehty spektrofotometrillä siten, että indigo on liuotettu sopivaan orgaaniseen yhdisteeseen tai se on saatu reagoimaan vesiliukoiseen muotoon jonkin sopivan aineen kanssa. Erilaisia käytettyjä menetelmiä spektrofotometriin mittauksiin on listattu taulukossa II.

Taulukko II. Menetelmiä indigon spektrofotometriseen määrittämiseen.

Liutusmenetelmä	Aallonpituus (nm)	Lähde
Etyyliasetatti	600	Stoker <i>et al.</i> (1998) Kokubun <i>et al.</i> (1998)
N,N-dimetyyliformamidi	615	Campos <i>et al.</i> (2001)
Kiehuva K ₂ Cr ₂ O ₇ liuos	441	Bechtold <i>et al.</i> (2002)
Pelkistäminen leuko-muotoon rauta(II)trietanoliamiinilla ja vesiliuos	350–700	Garcia-Macias ja John (2004)
N-metyyli-2-pyrrolidoni	614	

Liuottaminen orgaaniseen liuottimeen ja analysoiminen aallonpituudella 600 nm on yksinkertaisin menetelmä, mutta siihen sisältyy ongelmia. Indigomolekyylien välille muodostuu voimakkaita vetysidoksia, joiden vaikutuksesta ne agglomeroituvat. Tällöin absorption maksimiaallonpituus pienenee. Seurauksena mitatut indigon määrät voivat olla pienempiä kuin näytteiden todelliset määrät. Huomattavaa on myös se, että puhdas synteettinen indigo on voimakkaammin sitoutunut (Bechtold ja Mussak 2009). Tällöin synteettisellä indigolla tehtyjen kalibroitimittausten seurauksena näytteiden indigomääräksi voi tulla myös todellista korkeampia arvoja.

Garcia-Maciasin ja Johnin (2004) mukaan agglomeroitumista ei tapahdu käytettäessä liuottimena N-metyyli-2-pyrrolidonia (NMP). Tämä todistettiin pelkistämällä indigo leuko-muotoon ja hapettamalla se takaisin indigoksi. Muilla liuottimilla indigon määrä kasvoi tämän seurauksena. Tämä kasvu selittyy yhteen ryhmittyneiden indigomolekyylien hajaantumisella. Käytettäessä NMP:tä tätä ilmiötä ei havaittu, vaan indigon määrä laski. Tämä indigon määrän lasku on oletettu lopputulos reaktiossa syntyvien sivutuotteiden, kuten indirubiinin vuoksi. Ongelmana NMP:n käytössä on indigon värin haaleneminen nopeasti. Garcia-Macias ja John (2004) osoittivat, että lisättäessä liuokseen antioksidanttina butyylihydroksitolueenia (BHT) tämä haaleneminen voitiin välttää.

Spektrofotometrinen menetelmä ohella leuko-indigon ionisuus mahdollistaa indigon määrän määrittämisen myös sähköisesti. Vuoreman (2008a) mukaan käytettyjä menetelmiä on potentiometrinen titraus ja hydrodynaaminen voltammetria. Potentiometrisessä titraamisessa käytetään hapetinta, kuten kaliumferrosyanidia. Leuko-indigon määrä saadaan stoikiometrisesti käytetyn hapettimen määrästä, kun liuoksen potentiaali saavuttaa nollan.

Hydrodynaamista voltammetriaa käyttämällä voidaan saada jatkuvaa tietoa värjäysastiasta. Tämä mahdollistaa paremman prosessinohjauksen ja automaation. Analyysimenetelmä perustuu sähkövirran muutokseen potentiaalia muutettaessa. Tämä muutos on suoraan verrannollinen ionien konsentraatioon. Ongelmana indigon tapauksessa on, että hapettava indigo tukkii elektrodin pinnan. Govaert *et al.* (1997) ratkaisivat tämän johtamalla säännöllisin väliajoin elektrodiin

negatiivisen jännitteen. Tämä jännite pelkistää elektrodin pinnalle muodostuneen indigon ja pitää sen siten puhtaana.

6 INDIGON EROTTAMINEN KASVEISTA

Indigon erottaminen kasveista on osattu jo kauan. Arkeologisista kohteista löydetty orgaaniset materiaalit, kuten tekstiilit ja niiden värit, ovat säilyneet huonosti, joten tarkkojen ikämääritysten tekeminen on hankalaa. Kuitenkin Egyptistä on löydetty indigolla värjättyjä muumioiden käärinliinoja peräisin ajalta 2400 eaa. (Balfour-Paul 1998). Aikojen saatossa indigoa on erotettu useilla tavoilla monesta eri kasvista. Karkeasti menetelmät voidaan jakaa nykyaikaisiin ja perinteisiin.

6.1 Perinteiset menetelmät

Perinteisiä menetelmiä on pääpiirteissään kolme erilaista. Morsingon murskaaminen ja morsinkopallojen valmistaminen, väritattarin perinteinen japanilainen käsittely ja trooppisen *indigofera*-indigon uuttaminen vedellä. Toki eri puolella maailmaa indigo on erotettu eri kasveista ja eri menetelmin, mutta nämä kolme ovat laajimmin käytettyjä, joten ne ansaitsevat tarkemman tarkastelun.

6.1.1 Indigon tuottaminen käymisteitse morsingosta

Indigon valmistaminen murskaamalla morsingon lehtiä on perinteinen menetelmä, joka pysyi samanlaisena esihistoriallisista ajoista siirtomaista tuodun trooppisen indigon markkinoille tulon asti. Tässä menetelmässä ei niinkään voida puhua indigon erottamisesta, sillä lopputuotteena syntyvä väriaine on sekoittuneena kasvimassaan. Morsingossa pääosa indigon esiasteista on isatin-yhdisteitä, jotka hapettuvat helposti indigon valmistamiseen epäsoviviksi yhdisteiksi. Tämän vuoksi morsingon lehdet tuli käsitellä heti sadonkorjuun jälkeen. Lehdet tuotiin sadonkorjuun jälkeen myllylle, jossa ne murskattiin kasvimassaksi. Mylly oli tyypillisesti iso ja raskas kivistä tehty rengas, joka oli kiinnitetty akselilla pyörivään napaan. Näitä renkaita ja myllyjä on säilynyt nykypäivään mm. joissain Thüringien alueen kylissä Saksassa (Belfour-Paul 1998).

Murskaamisen jälkeen kasvimassa pyöriteltiin noin greipin kokoisiksi palloiksi, jotka aseteltiin näille rakennettuihin telineisiin kuivumaan. Indigo syntyi tänä aikana kasvin rikkoutuessa vapautuvien solunesteiden reagoitessa ilman hapen ja kasvin sisältämien entsyymien kanssa. Kuivumisajaksi Gilbert *et al.* (2001) kertovat 4–6 viikkoa, jonka aikana pallot kuivussa kutistuivat noin puoleen koostaan. Kokubun *et al.* (1998) ovat tutkineet indigon syntymistä morsinkopalloissa ja todenneet juuri pallojen tekemisen tärkeimmäksi vaiheeksi tässä menetelmässä indigon tuotannon kannalta. Menetelmä kasvattaa indigon saantoa ja vähentää indirubiinin muodostumista. Oletettavasti tämä johtuu siitä, että lehdistä tai bakteereista peräisin olevat entsyymit pilkkovat isatan molekyylit glukoosiksi ja indoksyyliksi. Tiiviiksi käärityn pallon sisällä mikrobien aineenvaihdunta kuluttaa happea ja laskee hapen osapainetta. Tämä vähentää indoksyylin hapettumista isatiiniksi ja siten parantaa indigon saantoa.

Kuivuttuaan morsinkopallot olivat valmiita käytettäväksi ja varastoitaviksi. Näin pallot voitiin kuljettaa kaupunkeihin, joissa morsingon käsittelyyn erikoistuneet jalostajat suorittivat käsittelyn toisen vaiheen ja myivät valmiin tuotteen värjäreille ja kauppiaille. Toisessa käymisvaiheessa kuivat pallot murskattiin uudestaan joko tähän tarkoitukseen tehdyillä nuijilla tai käyttämällä lehtien murskaamiseen käytettyä myllyä. Syntynyt massa levitettiin maahan noin 30 cm paksuiseksi kerrokseksi ja kasteltiin. Massan annettiin käydä kuudesta yhdeksään viikkoa, jonka aikana sitä käännettiin ja kasteltiin, jotta lämpötila saatiin pysymään noin 50 °C:ssa. Tämä vaihe vaati kokemusta, jotta lämpötila ja kompostoituminen saatiin pysymään tasaisena. Väriaine oli valmista kun sen koostumus saavutti kuivan multamaisen tilan. (Belfour-Paul 1998)

Tämän toisen käymisvaiheen tarkkaa merkitystä ei tunneta. Kokubun *et al.* (1998) arvelevat syyksi aineksen homogenisoinnin. Kompostoitua selluloosasta ja hemiselluloosasta muodostuneet kasvikuudit hajoavat ja samalla kuitujen sisälle syntynyt indigo irtoaa käytettäväksi värjäämisessä. Tämä savimainen materiaali pakattiin säkkeihin tai tynnyreihin ja myytiin kauppiaille ja värjäreille.

Kokubun *et al.* (1998) saivat indigon saannoksi tällä menetelmällä 8–12 g/kg_{ka.}. Tämä vastaa noin 14 % analysoitujen indigon esiasteiden mahdollistamasta saannosta. Tämä saanto on verrattavissa Vuoreman (2008a) modernilla vesiutolla

saamiin noin 8 g/kg_{ka}. saantoihin. Bechtold ja Mussak (2009) pitävät perinteisellä menetelmällä saadun saannon suuruutta yllätyksellisenä ottaen huomioon epäedulliset olosuhteet indigon muodostumiseen indoksyylistä. Lehtien soluista peräisin oleva neste on hapanta (pH 4,5). Hapan ympäristö stabiloi indoksyylin ja hidastaa sen reagoimista indigoksi. Toiseksi kasviperäiset aromaattiset yhdisteet altistavat sivureaktioille ja kolmanneksi hapen pieni määrä pallon sisällä hidastaa indigon muodostumista ja pidentää siten reaktiivisten välivaiheiden indoksyylin ja leuko-indigon ikää. Tulokset kuitenkin osoittavat, että menetelmässä on potentiaalia. Bechtold ja Mussak (2009) esittävät kehitysmahdollisuuksiksi mm. indoksyylin nopeamman reagoimisen indigoksi hapen lisäämisen pallojen sisällä ja/tai pH:n nostamisen avulla. Myös työtapojen kehittämällä voitaisiin saada etuja, mm. paremmalla murskaamisessa syntyvien nesteiden talteenotolla.

Saksassa on myönnetty patenti, joka mukailee perinteisiä menetelmiä indigon erottamiselle mekaanisesti murskatuista lehdistä käymisteitse (Rosner 1993). Patentin kuvaamassa menetelmässä lehdet murskataan ja niitä lämmitetään (tämä voi tapahtua jo puimakoneessa, jolloin voidaan käyttää moottorin lämpöä lämmitykseen), jolloin mikrobien toiminta alkaa. Tämän jälkeen syntyneestä nesteestä suodatetaan kasvimateriaali pois ensin esisuodattamalla isommat kasvinosat ja tämän jälkeen loput ultrasuodatuksella. Saatu neste siirretään käymisastiaan, jossa siihen lisätään hapetinta ja indikso-glukosideja pilkkovaa entsyymiä. Lopuksi käymisastiassa syntyvä indigo erotetaan ultrasuodatuksella. Vaihtoehtoisesti värjäys voidaan suorittaa suoraan käymisastiassa. Näin toteutettuna erotus ja värjäys voidaan toteuttaa luonnonmukaisesti ilman myrkyllisiä sulfaattipäästöjä.

6.1.2 Perinteinen indigon tuottaminen väritattarista

Väritattaria (*Polygonum tinctorium*) on viljelty perinteisesti Japanissa indigon tuotantoon. Perinteet elävät yhä Japanin kulttuuriministeriön rahoittamana pienen käsityöläisjoukon voimin Tokushiman alueella. Morsingosta poiketen väritattarin lehdet voidaan kuivata sadonkorjuun jälkeen. Lehdet erotetaan kasvien varsista ja niiden annetaan kuivua yksi päivä auringossa, jonka jälkeen niitä kuivataan vielä tupakan kuivaamiseen tarkoitetuissa kuivureissa yön yli. Kuivat lehdet pakataan ruokosäkkeihin odottamaan jatkokäsittelyä. Jatkokäsittely on hyvin samanlainen

morsingon toisen käymisvaiheen kanssa. Lehdet levitellään keskeltä reunoille viettävän huoneen lattialle, joka on pohjustettu kerroksilla erikokoisia kiviä, hiekkaa, riisin kuoria ja savea. Massaa kastellaan vedellä ja huokoinen pohja mahdollistaa ylimääräisen veden valumisen reunoilta ulos. Vähintään kerran viikossa massaa hämmennetään ja syntyvät ”paakut” hajotetaan. Kompostoituuksessa lehtimassa kutistuu, jolloin pinnalle lisätään tuoreita lehtiä. Hämmennys ja vesi takaavat tasaisen hajoamisen. Molempien määrä on tarkkaa, jotta lämpötila pysyy noin 70 °C:ssa ja vettä ei ole liikaa anaerobisten taskujen syntymiseen, eikä liian vähän mikrobien toiminnalle. Kompostoituminen kestää kaiken kaikkiaan noin 100 päivää. Loppuvaiheessa lehtimassa peitetään ruokomatoilla. Mattojen tehtävä on lähinnä pitää massa lämpimänä, sillä lehdet käsitellään perinteisesti syksyllä, ja kompostoinnin loppuvaiheessa on jo talvi. Lopuksi massa jäähdytetään, jolloin ylimääräinen kosteus haihtuu ja lopputuote *sukumo* varastoidaan säkkeihin, tai pyöritellään *aidama*-paloiksi (Miller 1999) valmiina käytettäväksi värjäämiseen. (Bechtold ja Mussak 2009)

Tällä menetelmällä Bechtoldin ja Mussakin (2009) antamien tietojen mukaan on saatu 300 kg:sta kuivattuja värimorsingon lehtiä 195 kg *sukumoa*, jonka painosta 3–8 % on ollut indigoa. Tämä vastaa 20–50 g/kg_{ka} saantoa. Määrä on merkittävä, sillä Angelinin *et al.* (2004) määrityksissä lehtien indikaanipitoisuudeksi mitattiin 80 g/kg_{ka}, joka vastaa noin 40 grammaa indigoa. Perinteisessä menetelmässä on tämän perusteella huomattavaa potentiaalia. Ongelmana on lähinnä tuotteen huono puhtaus sen sisältäessä kasvien hajoamistuotteita.

6.1.3 Indigon perinteinen uuttaminen trooppisista indigokasveista

Indigon esiasteet ovat vesiliukoisia, joten uuttaminen (liuottaminen) vedellä on toimiva tapa erottaa indigoa. Näin saadaan puhdasta tuotetta ja prosessi on nopeampi. Vesiuutto onkin ollut käytössä trooppisen indigon kasvualueilla pitkään. Perkin ja Everest (1918) ovat kuvailleet prosessin. Ensimmäisessä vaiheessa *Indigofera tinctoria* -kasvin lehdet laitettiin tiiviisti pakattuna likoamaan veteen, jossa kasvien annettiin olla 10–15 tuntia. Tänä aikana kasvit aloittivat mätänemisprosessin anaerobisten bakteerien vaikutuksesta. Liotuksen aikana vesi värjäytyi keltavihreäksi, jonka jälkeen se valutettiin seuraavaan astiaan. Toisessa vaiheessa liuokseen sekoitettiin ilmaa joko manuaalisesti tai

mekaanisten apuvälineiden kanssa. Esimerkiksi vettä voitiin pumpata astiasta ja suihkuttaa takaisin tai sitä yksinkertaisesti roiskuteltiin käsin tai tähän käyttöön suunnitelluilla meloilla. Ilman hapen vaikutuksesta liuoksessa ollut indoksyyli ja leuko-indigo hapettuivat indigoksi, joka saostui altaan pohjalle. Pohjalle laskeutunut indigoliete valutettiin kolmanteen astiaan, jossa se puhdistettiin keittämällä ja lopulta suodatettiin kankaan läpi, pestiin, kuivattiin ja muotoiltiin kakuiksi. Belfour-Paul (1998) kertoo Bengalin laadukkaimpien indigokakkujen sisältäneen yli 70 % indigoa.

Tarkkaa kemiallista tutkimusta prosessin vaiheista ei ole tehty, mutta Perkinin ja Everestin (1918) mukaan lehdistä ja osin bakteereista peräisin oleva β -glukosidaasi-entsyymi aikaansaa indikaanin pilkkoutumisen indoksyyliksi. He havaitsivat myös, että indikaani ei liukene lehdistä, vaan indoksyyli muodostuu jo lehdistä ja liukenee sen jälkeen veteen. Lehtien tiukka pakkaaminen johtaa hapen vähyyteen ja siten parantaa indoksyylin pysyvyyttä estäen sen reagoimisen indigoksi lehdistä, josta sen erottaminen on hankalaa. Lehtien oikea liotusaika on ollut tarkkaa, jotta mahdollisimman paljon indigon esiasteita liukenisivat veteen, mutta samalla liian pitkää aikaa on haluttu välttää, jotta muiden kasvin hajoamistuotteiden joutuminen veteen on saatu minimoitua (Bechtold ja Mussak 2009).

Synteettisen indigon tullessa markkinoille 1900-luvun vaihteessa yrittivät trooppisen indigon tuottajat tehostaa uuttoprosessia paremman saannon ja puhtauden aikaansaamiseksi. Hapetuksen ja liuotuksen välisen aikaa pyrittiin vähentämään, sillä liian pitkä lehtien liuotusaika aiheutti sivureaktioita indoksyylin hapettuessa ja reagoidessa muiden kasviperäisten yhdisteiden kanssa epätoivotuiksi yhdisteiksi. Toinen parannus oli pienen emäsmäärän lisääminen liuotusvaiheessa. Emäksenä käytettiin ammoniakkaa tai kalkkikivestä saatavaa natriumkarbonaattia ja kalsiumhydroksidia. Kalkin käyttö toi ongelmia kalsiumhydroksidin reagoidessa kalsiumkarbonaatiksi ilmastusastiassa. Saostuva kalsiumkarbonaatti paransi samalla myös indigon saostumista, mutta toisaalta se jäi indigon sekaan epäpuhtaudeksi. Tämän vuoksi kuivattu indigo pestiin laimealla HCl-liuoksella, jolloin samalla saatiin puhdistettua muitakin epäpuhtauksia. (Bechtold ja Mussak 2009)

Käytetyillä menetelmillä arvioitiin saatavan noin 60–70 % saanto verrattuna lehtien sisältämiin esiasteisiin. Tappiot selittyvät indigon esiasteiden epätäydellisellä liukenemisella lehdistä, epätoivotuilla sivureaktioilla ja saostusaltaan epätäydellisellä indigon talteenotolla. Indigoa saatiin 7 kg 3700 tuoreesta lehtikilosta, joka vastaa 0,2 % saantoa. (Bechtold ja Mussak 2009)

6.2 Nykyaikaiset menetelmät

Nykyaikaisiksi menetelmiksi voidaan katsoa aiemmin esitetyn Rosnerin (1993) patentin lisäksi Stokerin *et al.* (1998) esittämä morsingon vesiuuttaminen, Bechtoldin *et al.* (2002) vastaava menetelmä väritattarille ja näiden muunnelmat. Nykyaikaisella menetelmällä tarkoitetaan menetelmää joka on yhä käytössä.

6.2.1 Morsingon vesiuutto

Menetelmiä indigon uuttamiseksi vedellä morsingosta on esitetty jo 1800-luvulla. Plowright (1901) on kuvaillut prosessin. Osittain kuivatut morsingon lehdet peitettiin vedellä ja astia nostettiin korkealle, jotta vesi voitiin laskea toiseen astiaan painovoiman avulla. Siinä siihen sekoitettiin kalkkivettä ja seosta hämmennettiin ilman sekoittumiseksi. Seos laskettiin vielä kolmanteen astiaan, jossa muodostunut indigo saostui.

Sama periaate on käytössä nykyisinkin, joten sinänsä jaottelemisen nykyaikaisiin menetelmiin on osittain harhaanjohtava. Indigoa morsingosta tuottaa tällä hetkellä kolme yritystä Euroopassa: Bleu de Pastel de Lectoure (2010) Toulousessa, Woad-inc. (2010) Norfolkissa Englannissa ja La Campana (2010) Montefiore sull'Asossa Italiassa. Kaikki käyttävät menetelmänä uuttamista. Bleu de Pastelin prosessissa uuttovaiheeseen sisältyy lisäksi lehtien fermentoiminen, joten se on hyvin samankaltainen perinteisen siirtomaiden indigon tuotantomenetelmän kanssa.

Merkittävin ero indigon uuttamisessa morsingosta verrattuna väritattariin ja *indigofera*-suvun kasveihin on morsingon sisältämät isatan-esiasteet, jotka ovat herkempiä kuin indikaani. Tämä näkyy mm. indigon saannon vähenemisenä käytettäessä kuivattuja lehtiä. Tämän vuoksi oikeiden olosuhteiden löytäminen on erityisen tärkeää saannon maksimoimiseksi.

Stoker *et al.* (1998) ovat tutkineet indigon uuttamista morsingosta isommassa mittakaavassa. Ensin lehtien pinta rikottiin kiehuvalle vedelle. Tämän jälkeen lämpötilaa laskettiin lisäämällä vettä, johon indigon esiasteet liukenivat. Veteen lisättiin myös pieni määrä happoa isatan B:n stabiloimiseksi. Laboratoriossa tutkitut lämpötilat uuttamiseen olivat 30 °C, 60 °C ja 90 °C ja lehtien annettiin liota yön yli. Näistä lämpötiloista 30 °C antoi parhaat tulokset (380 mg/kg tuoreita lehtiä). Muilla lämpötiloilla tulokset olivat selvästi huonompia (47 mg/kg, 60 °C ja 18 mg/kg, 90 °C). Tutkimuksissa kuitenkin ilmeni, että uuttamalla lehtiä vain 5 minuuttia 100 °C vedessä antoi suuruusluokaltaan samanlaisia tuloksia kuin vuorokauden kestänyt liottaminen 30 °C vedessä. Stokerin *et al.* (1998) tulokset ovat osittain epäjohdonmukaisia, sillä indigon saannoksi on 30 °C vedellä uutettaessa ilmoitettu sekä 380 µg/g, että 2,08 mg/g tuoretta lehtimateriaalia kohden. On myös huomattava, että Kokubunin *et al.* (1998) kokeissa 10 sekunnin käsittely kiehuvalle vedelle laskee isatan B:n pitoisuuden lehdissä alle yhteen kuudesosaan tuoreisiin lehtiin verrattuna.

Laboratoriokokeiden pohjalta Stoker *et al.* (1998) suorittivat pilotmittakaavan kokeet käyttäen 50–100 kg tuoreita morsingon lehtiä panosta kohden. Lehdet pakattiin verkkosäkkeihin, siten että yhteen tuli 10 kg lehtiä. Säkit laitettiin 500 litran säiliöihin, joissa oli kiertovesipumput. Jokaista lehtikiloa kohden säiliöihin lisättiin 2 litraa 60 °C vettä lehtien vahapinnan rikkomiseksi. Tämän jälkeen vettä lisättiin niin, että loppulämpötilaksi tuli 38 °C. Lopuksi veden pH säädettiin 3,5:een rikkihapolla. Astioihin asetettiin painot joilla lehdet pidettiin nestepinnan alapuolella, jotta olosuhteet pysyivät anaerobisina hydrolyyttisten entsyymien toiminnan ehkäisemiseksi. Tämän jälkeen lehtien annettiin olla 24 tuntia astiassa, jossa vettä kierrätettiin pumpuilla kahden ensimmäisen tunnin ajan. Tämän jälkeen lehdet pestiin kylmällä vedellä ja poistettiin. Liotuksen aikana veden lämpötila laskee huoneenlämpötilaan (noin 25 °C). Lehtien liotuksen jälkeen vesi pumpattiin 500 litran selkeytysastiaan, jossa sen pH säädettiin välille 9–10 ammoniakkiliuoksella. Tämän jälkeen liuosta ilmattiin 2–4 h paineilmalla. Lopuksi liuoksen annettiin selkeytyä 24 tuntia. Indigon laskeuduttua astian pohjalle suurin osa vedestä poistettiin lapolla ja jäljelle jäänyt indigo sisältävä liete konsentroidtiin ristivirtasuodatuksella ja kuivattiin. Stoker *et al.* (1998) eivät ole kirjanneet tarkkoja tuloksia raporttiin, mutta arvioivat potentiaalisiksi

saannoksi noin 20 kg/t tuoreita lehtiä, joka on noin kymmenkertainen laboratorionkokeissa saatuihin tuloksiin verrattuna.

Stokerin *et al.* (1998) kokeiden pohjalta on kehitetty kaupallinen liikuteltava maatilalla käytettäväksi soveltuva indigon erotuslaitteisto osana EU:n rahoittamaa Spindigo-hanketta (2010). Laitetta ja sen kahta Critical Processess Ltd:n rakentamaa prototyyppiä on testattu Spindigo-hankkeeseen liittyen eri puolilla Eurooppaa vuosina 2002–2004. Bechtold ja Mussak (2009) esittivät laitteen toiminnan. Uutto tapahtuu kahdessa 750 litran astiasta, jotka täytetään lehtien lisäämisen jälkeen 75 °C vedellä niin, että vettä on nelinkertainen määrä lehtien massaan nähden. Vesi lämmitetään öljyllä 3500 litran lämmittimessä. Osa lämmöstä palautetaan lämmönvaihtimella lämmitysyksikköön, kun vesi jäähdytetään uuttamisen jälkeen. Ennen uuttamista lehdet pestään runsaalla kylmällä vedellä epäpuhtauksien minimoimiseksi, jonka jälkeen ne pakataan metallihäkkeihin. Häkit peitetään vedellä ja annetaan olla upotettuina 15 min. Tämän jälkeen häkit nostetaan pois ja veden annetaan valua takaisin säiliöön. Laitteiston kapasiteetti on 60 tonnia 75 °C vettä päivässä, joka mahdollistaa 20–30 tonnin lehtimassan käsittelyn päivässä.

Uuttamisen jälkeen vesi suodatetaan, jäähdytetään lämmönvaihtimessa 25 °C lämpötilaan ja pumpataan muovisiin säilytysastioihin. Säilytysastioissa veden pH säädetään välille 10–11 lisäämällä ammoniakkia, sammutettua kalkkia ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), tai kaliumhydroksidia ja sekoitetaan ilman kanssa pumppaamalla liuosta uppopumpulla takaisin astiaan suihkusuuttimen läpi. Tämä vaihe kestää noin 20 minuuttia, jonka jälkeen seos pumpataan selkeytysastiaan, jossa syntyvän indigon annetaan saostua. Kun indigo on laskeutunut säiliön pohjalle, ylimääräinen vesi pumpataan pois. Pohjalla oleva indigoliete suodatetaan ja kuivataan, jolloin saadaan raakaa indigoa. Laitteistolla suoritetuissa kokeissa on saatu raakaa indigoa 1,2–2,6 kg tonnista tuoreita lehtiä. Tästä indigosta on arviolta 10 % puhdasta indigoväriä, jolloin todelliseksi indigon saannoksi on saatu 0,12–0,26 g/kg tuoretta lehteä. Raan indigon saanto on vertailukelpoinen Bleu de Pastelin (2010) ja Stokerin *et al.* (1998) tulosten kanssa.

Garcia-Macias ja John (2004) ovat tutkineet mahdollisuutta morsingosta uutetun indigon puhtauden parantamiseen käyttämällä ioninvaihtohartseja. Lehdistä

veteen uutetun indoksyylin konsentraatio on pieni, jolloin sen reagoiminen leuko-indigoksi on hidasta. Tällöin mahdollisuus sen hapettumiseen ja reagoimiseen muiden kasviperäisten yhdisteiden kanssa kasvaa. Onkin tutkittu mahdollisuutta erottaa nämä indigon esiasteet uutoliuksesta adsorboimalla ne ioninvaihtohartsiin. Kokeissa käytettiin varauksetonta Amberlite XAD16 -hartsia. Lisäksi heikosti emäksisellä Amberlyst A-21 -hartsilla tutkittiin sen kykyä katalysoida indigon esiasteiden hydrolyysia indoksyyliksi. Kokeissa saatiin 30–70 % indigon esiasteista adsorboitua hartsiin. Kuitenkin tunnin kuluessa hartsi muuttui punaiseksi. Amberlyst A-21:llä tämä punainen väri muuttui nopeasti siniseksi viitaten indirubiinin ja indigon muodostumiseen. Garcia-Macias ja John (2004) päättelivät tämän johtuvan indoksyyliestereiden hydrolysoitumisesta ja syntyneen indoksyylin reagoimisesta alkuoletuksen mukaisesti. Amberlite XAD16:n tapauksessa puolestaan he epäilivät esiasteiden hajoamisen ja indoksyylin (ja siten indirubiinin) muodostumisen indigon esiasteiden sisältämien esterisidosten jännittymisellä niiden adsorboituessa hartsin pinnalle. Tämä ei kuitenkaan selitä yksinomaan punaisen indirubiinin muodostumista. Hartseihin adsorboitunutta sinistä indigoa ei saatu eluoitua asetonilla, metanolilla tai etanolilla. Indigoa ei myöskään saatu desorbtoitumaan pelkistämällä natriumditioniitilla leuko-muotoon, vaan leuko-indigo pysyi adsorboituneena hartsiin sen keltaisen värin perusteella. Indigon voimakas adsorptio onkin ongelma ioninvaihtohartsien hyödyntämisessä, sillä tarvittavat voimakkaat liuottimet eivät sovi haluttuun luonnonmukaiseen tuotantoon.

6.2.2 Väritattarin vesiuutto

Bechtold *et al.* (2002) ovat tutkineet indigon uuttamista vedellä väritattarista. Uuttaminen suoritettiin kahdessa vaiheessa. Ensimmäisessä vaiheessa 15–20 kg kasvimassaa (lehtiä ja varsia) liuotettiin 4 tuntia 40 litrassa 50–70 °C vettä, jonka jälkeen vesi vaihdettiin ja lehtiä liotettiin vielä 2 tuntia 20 litrassa 40 °C vettä. Tämän jälkeen molempien vaiheiden liuokset yhdistettiin samaan astiaan, jossa niiden annettiin olla 4–5 päivää satunnaisesti sekoittaen. Saostumisen parantamiseksi seokseen lisättiin 1,5 g/L kalsiumkloridia (CaCl₂). Lopuksi syntynyt indigo suodatettiin ja kuivattiin 70 °C lämpötilassa. Kokeissa painotettiin yksinkertaisia menetelmiä ja vältettiin ylimääräisten kemikaalien käyttämistä. Täten saadun indigon puhtaus ja saannot olivat pieniä. Parhaat tulokset (noin 0,5

g/kg kasvimassaa) saatiin kun uutto tapahtui samana päivänä korjaamisen kanssa. Parhaimmillaan indigon puhtaus oli noin 10 %. On kuitenkin huomattava, että perinteisesti väritattarista on käytetty värintuotannossa vain lehdet, jotka muodostavat noin puolet kasvin massasta.

Aiemmin kuvailtua Spindigo-projektissa kehitettyä morsingon käsittelyyn suunniteltua uuttolaitteistoa on myös käytetty väritatarin kanssa (Bechtold ja Mussak 2009). Prosessi oli samanlainen pienin eroin. Väritatar on korkeampi kasvi, jolloin sen lehdet ei ole kosketuksissa maahan ja siten niitä ei tarvitse pestä. Samoin lehdistä saadaan uutetuksi indigon esiasteet matalammassa lämpötilassa (30 min, 50 °C tai 72 h, 25 °C). Tällä menetelmällä raakaa indigoa saatiin 3,2–7,8 g/kg tuoreista lehdistä. Tästä noin 5–13 % oli puhdasta indigoa. Näin ollen saanto oli noin 2–3-kertainen morsinkoon nähden.

7 KASVI-INDIGON PUHTAUS

Merkittävä ongelma kasviperäisellä indigolla verrattuna synteettiseen indigoon on kasviperäisen indigon epäpuhtaudet. Synteettisen indigon tullessa markkinoille 1900-luvun alussa sen parempi laatu oli hinnan ohella merkittävä tekijä trooppisen indigon häviämisessä markkinoilta. Perkin ja Everest (1918) ilmoittavat parhaimman *indigofera*-indigon olleen noin 60 % puhdasta, kun synteettinen indigo on lähes 100-% puhdasta. Uudemmissa tutkimuksissa, joissa indigoa on uutettu vedellä morsingosta, tuotteen puhtaus on ollut vain 20–40 % (Vuorema 2008a; Stoker *et al.* 1998).

Indigon puhtautta voidaan määrittää monella tapaa. Vuorema (2008a) käytti spektrofotometriä vertaamalla N-metyylipyrrolidoniliuokseen liuotetun, asetonilla indirubiinista puhdistetun, synteettisen indigon massan ja absorbanssin suhdetta morsingosta uuttamalla saatuun indigoon. Garcia-Macias ja John (2004) käyttivät tämän ohella fluoresenssispektrometriä tutkiessaan välituotteiden reaktioita ja pyyhkäisyelektronimikroskooppia indigokiteiden tutkimiseen.

Garcia-Macias ja John (2004) ovat tutkineet indigon muodostumista tuotteen puhtauden kannalta ja todenneet epäpuhtauksien olevan pääsääntöisesti indoksyylin muita reaktiotuotteita, joista merkittävimpanä indirubiini, kasviperäisiä yhdisteitä, maa-ainesta ja kalsiumin suoloja. Indoksyylin

reagoiminen indirubiiniksi on normaalia ja sitä syntyy myös synteettistä indigoa valmistettaessa. Bechtold ja Mussak (2009) esittävät menetelmiä puhtauden parantamiseksi. Puhtain lopputuote saadaan, kun käytettävissä lehdissä on mahdollisimman suuri määrä indigon esiasteita. Käytännössä tämä tarkoittaa nuorten lehtien käyttämistä, sillä vanhemmissa ja suuremmissa lehdissä esiasteiden osuus on pienempi. Todennäköisesti esiasteita syntyy kasvun alkuvaiheessa enemmän kuin myöhemmissä vaiheissa. Pienemmissä lehdissä on myös vähemmän muuta kasviainesta, jolloin kasviperäisten yhdisteiden aiheuttamat epäpuhtaudet vähenevät. Maa-aineksesta aiheutuvia epäpuhtauksia voidaan puolestaan välttää pesemällä lehdet huolella. Aiemmin esitellyssä Spindigo-hankkeen uuttolaitteistossa pesuun käytettiin lehtimäisten vihannesten pesuun tarkoitettua pesuria (Bechtold ja Mussak 2009). Vuorema (2008a) havaitsi, että puhtain tuote saadaan kahdella pesukerralla.

Puhtautta heikentävät kalsiumin suolat ovat peräisin pH:n säätämiseksi käytetystä kalsiumhydroksidista, jonka on havaittu parantavan indigon saostumista. Kalsiumhydroksidit ja muut, esimerkiksi maaperästä peräisin olevat, suolat toimivat agglomeraattien ytiminä. Metallisuoloilla on positiivista varausta, jolloin negatiivisesti varautuneet indoksyyli-ionit adsorboituvat niiden pinnalle. Indoksyyli-ionien reagoidessa keskenään hiukkasten pinnalle muodostuu ”kuori” veteen liukenemattomista indigomolekyyleistä. Seurauksena on isompia (noin 50 µm) indigoagglomeraatteja, jotka saostuvat nopeammin, mutta sisältävät epäpuhtauksia. Kuivattu indigo voidaan pestä esimerkiksi laimealla suolahapolla (HCl), jolloin mineraalisuoloista peräisin olevat epäpuhtaudet saadaan poistettua. Kokeissa tällä menetelmällä morsingosta uutetun raakaindigon puhtautta (indigopitoisuus) on parannettu 50–60 prosenttiyksikköä kahdestakymmenestä massaprosentista seitsemääkymmeneen. Vaihtoehtoisesti jo sedimentointi voidaan suorittaa happamassa liuoksessa, jolloin puhtaus parani noin viidestätoista massaprosentista kuuteenkymmeneen. (Bechtold ja Mussak 2009)

Bechtold ja Mussak (2009) mainitsevat sublimoinnin mahdolliseksi indigon puhdistusmenetelmäksi. Indigo sublimoituu 300 °C lämpötilassa, jolloin kuumentamalla epäpuhtauksia sisältävää indigoa hieman yli 300 °C lämpötilaan saadaan indigo erotettua kaasufaasiin epäpuhtauksien pysyessä kiinteinä. Huomattavaa on, ettei lämpötila saa nousta yli 390 °C, jolloin indigo hajoaa

termisesti. Ongelmana on myös indigon sisältämien mahdollisten orgaanisten yhdisteiden haihtuminen ja sekoittuminen kaasufaasissa. Ne voivat myös muodostaa hiiliyhdisteitä, jotka kaasun jäähtyessä ja indigon jälleen palatessa kiinteään faasiin jäävät sen sekaan epäpuhtauksiksi. Tämä voidaan välttää pitämällä indigon jäähdytyslämpötila tervojen kastepisteen yläpuolella, joka on tyypillisesti alle 200 °C. Käytännössä kuitenkin lämpötilan pitäminen tarkasti sopivassa lämpötilassa koko kuumennuksen ajan on hankalaa virtauksien ja faasimuutosten vuoksi. Etenkin tarvittava lämpötilan äkillinen muuttaminen on hankalaa. Jos lämpötila pääsee laskemaan alle sublimoitumislämpötilan ennen varsinaista jäähdytysosiota, on seurauksena indigon häviötä.

8 KIRJALLISUUDEN TULOSTEN VERTAILU

Taulukossa III on esitetty eri määrittelyissä saatuja tuloksia indigon esiasteiden pitoisuuksille *Isatis tinctoria* ja *Polygonum tinctorium* -kasveissa.

Taulukko III. Indigon esiasteiden pitoisuuksia ilmoitettuna lehtien kuiva- tai tuorepainoa kohti. Määrittelyt on tehty nestekromatografilla vesi/asetonitriili-uutteesta. Teoreettinen indigon saanto on laskettu kertomalla esiasteiden (isatan B ja indikaani) Gilbertin *et al.* (2004) ilmoittamalla suhdeluvulla 0,444.

Kasvi:	Menetelmä:	Esiasteiden saanto:		Indigon saanto:		Lähde:
		g/kg _{ka} .	g/kg _{tp} .	g/kg _{ka} .	g/kg _{tp} .	
<i>Isatis tinctoria</i>	HPLC-ELSD, 75%/25%/0,1% vesi/asetonitriili/muurahais-happo			2,0–8,8		Campeol <i>et al.</i> (2006)
<i>Isatis tinctoria</i>	HPLC-ELSD, spektrofotometria EtOAc ja NMP/BHT		3,15 (±0,61)		1,40 (±0,51)	Gilbert <i>et al.</i> (2004)
<i>Isatis tinctoria</i>	HPLC-ELSD, 75%/25%/0,1% vesi/asetonitriili/muurahais-happo		2,29		0,98	Angelini <i>et al.</i> (2007)
<i>Polygonum tinctorium</i>	HPLC-ELSD, spektrofotometria EtOAc ja NMP/BHT		9,80 (±0,87)		4,35 (±0,39)	Gilbert <i>et al.</i> (2004)
<i>Polygonum tinctorium</i>	HPLC-ELSD 68%/32%/0,1% vesi/asetonitriili/muurahais-happo	63,83	14,1	28,34	6,26	Angelini <i>et al.</i> (2004)
<i>Polygonum tinctorium</i>	HPLC-ELSD, 75%/25%/0,1% vesi/asetonitriili/muurahais-happo	72–106		50–80		Campeol <i>et al.</i> (2006)

Taulukossa IV on esitetty eri pitoisuuksia *Isatis tinctoria* ja *Polygonum tinctorium* -kasveista erotetulle indigolle eri lähteistä.

Taulukko IV. Eri menetelmin saatuja indigon saantoja ilmoitettuna lehtien kuiva- tai tuorepainoa kohti.

Kasvi:	Menetelmä:	Indigon saanto:		Puhtaus: %	Lähde:
		g/kg _{ka.}	g/kg _{tp.}		
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, 17 h, 30 °C		2,08 (±0,28)		Stoker <i>et al.</i> (1998)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, 5 min, 100 °C		2,1 (±0,14)		Stoker <i>et al.</i> (1998)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, pilot-scale, 40 °C, 24 h		20	20–40	Stoker <i>et al.</i> (1998)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, 4 °C	1,12			Viljanen (2004)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, 20 °C	1,65			Viljanen (2004)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, 40 °C	2,13			Viljanen (2004)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, 80 °C	2,0–8,0		20–40	Vuorema (2008a)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, lehtien käymisellä		2		Bleu de Pastel (2010)
<i>Isatis tinctoria</i>	vesiuutto, spindigo hankkeen laitteella, 75 °C		1,2–2,6	10	Bechtold ja Mussak (2009)
<i>Isatis tinctoria</i>	perinteinen morsinkopallo käyminen	8,89– 9,78			Kokubun <i>et al.</i> (1998)
<i>Polygonum tinctorium</i>	vesiuutto, 25 °C, 72 h		3,43		Mäkinen (2003)
<i>Polygonum tinctorium</i>	vesiuutto, spindigo- laitteella, 25 °C, 72 h		3,2–7,8	5–13	Bectold ja Mussak (2009)
<i>Polygonum tinctorium</i>	vesiuutto, 4h, 60 °C, 2 h 40 °C		0,5	10	Bechtold <i>et al.</i> (2002)

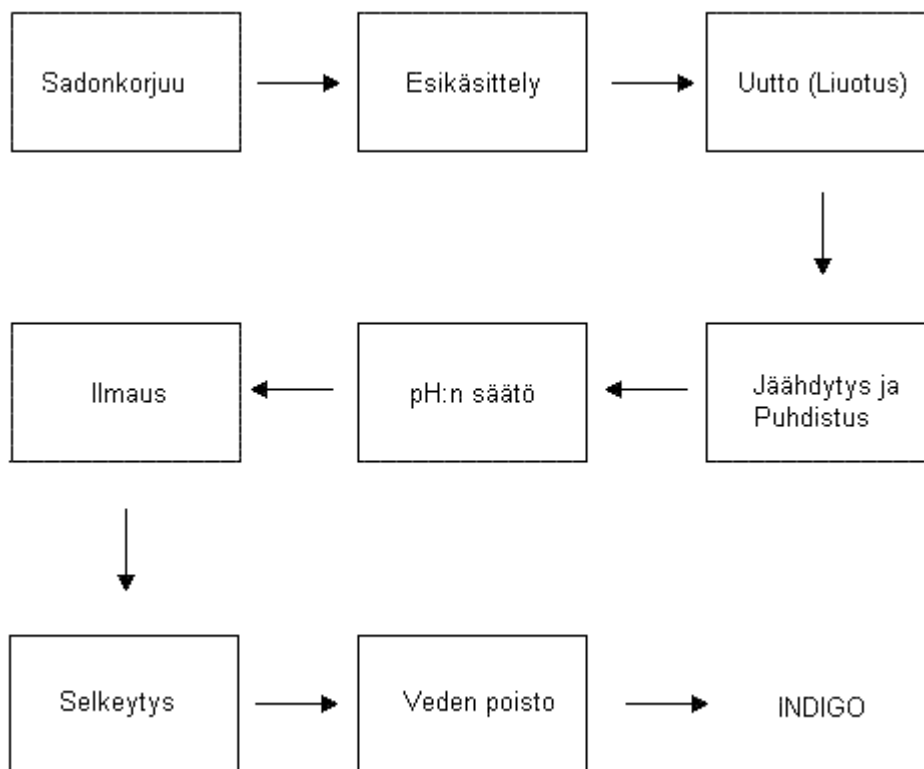
Taulukoita III ja IV vertaamalla huomataan eri kokeiden tuloksissa eroavaisuuksia. *Isatis tinctorian* tapauksessa saaduissa indigomäärissä on paljon eroja, ja varsinkin Stokerin *et al.* (1998) pilot-mittakaavan uuttokokeissa arvioima 20 g/kg_{ka.} saanto vaikuttaa epäilyttävän suurelta. Verrattaessa taulukon IV indigon pitoisuuksia taulukon III laskettuihin teoreettisiin indigosaantoihin havaitaan eroavaisuuksia. Tuorepainoon suhteutetut tulokset vaihtelevat suuresti. Etenkin teoreettisia tuloksia korkeammat uuttokokeiden saannot pistävät silmään. Tämä voi johtua kosteuspitoisuuden vaihteluista eri lehtinäytteissä ja uutetun indigon epäpuhtauksista. Keskimäärin indigoa on saatu 2 g/kg tuoretta kasvia. Oletuksella, että kasvin kuiva-ainepitoisuus on noin 20 %, saadaan saannoksi noin 10 g/kg_{ka.} Jos indigon puhtaus on noin 10 %, niin todelliseksi indigon saannoksi saadaan noin 1 g/kg_{ka.} Verrattaessa tätä Campeolin *et al.* (2006) määrittämään indigon esiasteiden pitoisuudesta saatuun teoreettiseen maksimisaantoon, nähdään

saannon olevan noin 11–50 % teoreettisesta maksimista. Näin ollen uuttoprosessia tulee ehdottomasti kehittää.

Polygonum tinctoriuma on tutkittu vähemmän, mutta esiasteiden ja indigon saannot tukevat toisiaan verrattaessa *Isatis tinctoriasta* saatuihin tuloksiin, molempien ollessa noin 2–4-kertaisia *Isatis tinctorian* saantoihin nähden.

9 PROSESSIN KUVAUS

Indigon tuottaminen morsingosta, tai muista kasveista, on monivaiheinen prosessi. Menetelmiltään prosessi on yksinkertainen, mutta raaka-aineena käytettävä kasviaines ja siitä uutettavien indigon esiasteiden herkkyys tekevät prosessista hankalan. Lehtiä ei voi varastoida, joten erotusprosessin täytyy sijaita maatilalla tai sen välittömässä läheisyydessä. Tämän vuoksi erotuslaitteistoista on pyritty tekemään liikuteltavia (Bechtold ja Mussak 2009). Prosessin lohkokaavio on esitetty kuvassa 6. Eri vaiheet on syytä käsitellä erikseen.



Kuva 6. Morsingosta saatavan indigon tuotantoprosessin lohkokaavio.

9.1 Sadonkorjuu

Sadonkorjuussa yksi merkittävä tekijä on morsingossa olevien indoksyyliä sisältävien isatan-yhdisteiden heikko pysyvyys. Tästä syystä lehtiä ei voi säilöä ja samoin ne tulisi saada kerättyä mahdollisimman ehjänä. Rikkoutuessaan lehtien soluneste pääsee kosketuksiin ilman kanssa ja indigo pääsee muodostumaan jo lehdisissä. Tällöin se on erittäin hankalasti erotettavissa sen huonon liukoisuuden vuoksi. Toisaalta perinteisessä morsinkopallomenetelmässä tämä oli haluttu lopputulos ja indigo kerättiin talteen hajottamalla kasviaines biologisesti. Samoin Rosnerin (1993) patentoimassa menetelmässä lehdet silputaan jo kerättäessä. Tällöin ongelmana voi olla myös lehtien mukana kulkeutuvan maa-aineksen aiheuttamat epäpuhtaudet.

Morsinko on korjuuvalmista kun se on noin 20–30 cm korkea. Suomen oloissa satoja saadaan vuodessa keskimäärin kaksi, Keski-Euroopassa kolme ja Espanjassa jopa 4–7 (Bechtold ja Mussak 2009). Jokioisilla tehdyissä viljelykokeissa tuore lehtisato on vaihdellut 15 000–25 000 kg/ha välillä (Keskitalo *et al.* 2007). Korjuuseen on käytetty nurmen niittoon tarkoitettua laitetta. Myös pinaatin ja muiden lehtimäisten kasviksien korjuuseen käytettäviä koneita on käytetty muualla (Bechtold ja Mussak 2009). Ongelmana on ollut kasvin alimpien lehtien kerääminen niiden kasvaessa maata pitkin. Tavoiteltavaa on viljellä mahdollisimman pystykasvuisia kasveja jotta sadonkorjuu olisi helpompaa. Tähän voidaan päästä mm. jalostamalla sopivia lajikkeita. Myös kylvörivien etäisyydellä toisistaan on ollut vaikutusta. Lähempänä toisiaan kasvavat kasvit kasvavat pystympään (Bechtold ja Mussak 2009).

9.2 Esikäsittely

Esikäsittelyyn kuuluu lehtien pesun lisäksi mahdollinen silppuaminen ja muut mekaaniset toimenpiteet sekä mahdollinen varastointi.

9.2.1 Lehtien peseminen

Garcia-Macias ja John (2004) tutkivat epäpuhtauksien vaikutusta lehtien puhtauteen. Lisättäessä maa-ainesta indoksyyliasetaattiliuokseen, joka hydrolysoitiin indigoksi kaliumhydroksidilla, indigon saanto laski noin 55 %:sta noin 40 %:iin, josta epäpuhtauksia oli noin 80 %. Vuorema (2008a) tutki lehtien

pesukertojen vaikutuksia ja havaitsi, ettei indigon puhtaus juuri muutu ensimmäisen pesun jälkeen, jolloin saavutettiin noin 10 prosenttiyksikön parannus puhtauteen, loppupuhtauden ollessa noin 30 %. Tästä voidaan päätellä pesun olevan tarpeellista, mutta suurimman osan epäpuhtauksista tulevan jostain muusta lähteestä kuin maa-aineksesta. Pesuun on käytetty Italiassa Spindigo-hankkeen kokeissa lehtimäisten kasvisten (pinaatti, salaatti, yms.) pesuun tarkoitettua laitetta (Bechtold ja Mussak 2009). Pesu tehdään kylmällä vedellä, jotta vältetään indigon esiasteiden enneaikaiselta liukenemiselta pesuveteen ja siten indigon hävikiltä.

9.2.2 Lehtien pilkkominen

Lehtien pilkkomisen vaikutusta ei ole kovin laajalti tutkittu. Viljasen (2004) uuttokokeissa matalammilla (4–40 °C) lämpötiloilla silputuilla lehdillä saavutettiin saman suuruusluokan saantoja kuin kokonaisilla lehdillä. Stoker *et al.* (1998) pitivät tärkeänä lehden pinnalla olevan vahakerroksen poistamista kuumalla vedellä. Lehtien silppuamisella saavutetaan samaa etua veden kanssa kosketuksissa olevan lehden sisäosan pinta-alan kasvaessa. Lisäksi lehtien rikkoutuessa tapahtuvat entsyymaattiset reaktiot edistävät indoksyilin muodostumista. Mielenkiintoinen menetelmä on Rosnerin (1993) esittämä, jossa lehdet silputaan ja niiden annetaan käydä ilman lisättyä vettä, jonka jälkeen syntynyt neste suodatetaan. Ongelmana saattaa olla suuri hävikki, jos vesiliukoinen indoksyli pääsee reagoimaan liukenemattomaksi indigoksi, jolloin se jää suodatettaessa kasvimateriaalin sekaan. Tämän vuoksi astia tulisi pitää ilmatiiviinä, jotta hapen osapaine pysyy matalana ja siten indoksyilin ja leukoindigon hapettuminen indigoksi vähäisenä. Ilmatiiviys myös vähentää mikrobiologisen toiminnan seurauksena syntyvien epämiellyttävien hajujen karkaamista ympäröivään ilmaan. Lehtiä silputtaessa tulisi kiinnittää huomiota lehtisilpun ja syntyvän ”lehtimehun” tehokkaaseen talteenottoon. Sopiva keino maatilakäytössä voisi olla esimerkiksi porakoneeseen liitettävä silppuriterä, jolla lehdet voitaisiin silputa suoraan liotusastiassa. Silppuri voisi olla myös kiinteästi yhdistettynä pesulaitteeseen niin, että pestyt lehdet ajettaisiin suoraan silppurin läpi liotusastioihin.

9.2.3 Lehtien varastointi

Oberthür *et al.* (2004a) ovat tutkineet morsingon lehtien kuivaamista ja sen vaikutuksia indigon esiasteiden määrään. Tutkimuksessa lehtiä kuivattiin sekä huoneenlämmössä, että 40 °C kuivausuunissa. Tutkimuksissa havaittiin, että isatan A ja B -yhdisteet hävisivät kokonaan lehtiä kuivattaessa, mutta toisaalta indikaanipitoisuus kasvoi. Oberthür *et al.* (2004a) olettivat lisääntyneen indikaanin olevan isatan-yhdisteiden hajoamistuotteita, kuitenkin indikaanin pitoisuuden kasvu ei selittänyt koko isatan-yhdisteiden häviämistä. Isatanin katoaminen kokonaan esitettiin johtuvan siitä, että ne ovat esiasteita, paitsi indigolle ja indirubiinille, myös monimutkaisemmille indolijohdannaisille, joita syntyy kasvin kuollessa. Isatan-yhdisteiden ollessa morsingon merkittävimmät indigon esiasteet, ei kuivaamista ja varastointia voida pitää kannattavana menetelmänä. Väritattarissa esiasteet ovat pääosin indikaania, joten sen lehdet voidaan kuivata ja varastoida käsiteltäväksi myöhemmin. Mahdollinen morsingon varastointimenetelmä voisi olla perinteisen morsinkopallomenetelmän soveltaminen. Silputut lehdet voitaisiin sulkea esimerkiksi muovipusseihin, jotka voisivat toimia morsinkopallon kuoren tavoin pitäen olosuhteet anaerobisina ja siten estäen indoksyylin hapettumisen epätoivotuiksi yhdisteiksi.

9.3 Utto (liuotus)

Kiinteä–nesteuutosta käytetään myös nimityksiä liuotus ja perkolaatio. Prosessissa liukenemattomasta kiinteästä faasista erotetaan liukenevaa ainetta nestefaasiin. Kasvi-indigon tapauksessa siis liukenemattomista lehdistä liuotetaan indigon esiasteita veteen. Liuotuksen kinetiikka on riippuvainen liuottimen siirtymisestä kiinteään faasiin, liuotettavan aineen siirtymisestä liuottimeen, syntyneen liuoksen siirtymisestä ulos kiinteästä faasista, tai näiden yhteisvaikutuksesta. Myös faasien välinen pintajännitys vaikuttaa liuotuksen kinetiikkaan. (Green ja Perry 1997)

Stokerin *et al.* (1998) käyttämä laitteisto indigon esiasteiden liuottamiseen morsingosta on yksivaiheinen panosliuotin. Morsingosta valmistettavan indigon heikkoon saantoon yksi parannusvaihtoehto voisi olla useamman liuotusvaiheen käyttäminen, jolloin mahdollisesti ensimmäisellä liuotuskerralla lehtiin jäävät indigon esiasteet voitaisiin saada talteen. Samoin mahdollisesti liuotuksessa

käytettävä veden lämpötila voisi olla matalampi useamman uuttoaskeleen parantaessa liuotuksen tehokkuutta, jolloin alhaisemmassa lämpötilassa hitaamman aineensiirron vaikutus vähenisi. Alentamalla lämpötilaa saavutettaisiin parempi energiatehokkuus ja vältettäisiin indigon esiasteiden altistuminen korkealle lämpötilalle, joka Kokubunin *et al.* (1998) mukaan vaikuttaa morsingosta saatuihin isatin B -pitoisuuksiin negatiivisesti.

Sekoitussäiliötä ei ole kirjallisuuden perusteella käytetty kasvi-indigon tuottamisessa, mutta se olisi mahdollinen menetelmä. Sekoituksella saavutettaisiin hyvä kontaktipinta-ala lehtien ja veden välille lehtien yhteen pakkautumisen vähentyessä. Lehtien erottaminen vedestä kuitenkin vaatisi yhden lisävaiheen prosessiin. Tosin kasaliuotuksessa on sama ongelma, mikäli ei käytetä jonkinlaista pussia lehtien pakkaamiseen. Jälleen parannettu kontaktipinta-ala voisi mahdollistaa alhaisemman uuttolämpötilan.

Useamman uuttoaskeleen käyttäminen toisi myös muita etuja mahdollisen alhaisemman lämpötilan lisäksi. Garcia-Macias ja John (2004) esittivät indigon puhtauden olevan riippuvainen esiasteiden riittävän korkeasta määrästä lehdissä, eli tarkemmin uuttoliuoksessa olevan indoksyysin määrästä. Indoksyysin konsentraation kasvaessa mahdollisuus indoksyysin reagoimiseen toisen indoksyysin kanssa kasvaa, jolloin epätoivottuja tuotteita synnyttävien sivureaktioiden osuus vähenee. Saman liuottimen kierrättäminen useamman lehtierän läpi mahdollistaisi korkeamman indoksyysin konsentraation liuoksessa ja siten mahdollisesti paremman puhtauden ja saannon. Ongelmana voi tosin olla myös epäpuhtauksien konsentroituminen samassa suhteessa. Tai jopa suuremmassa, jos lehtien pinnalla olevat maaperälähtöiset epäpuhtaudet liukenevat helpommin kuin lehtien sisältämät indoksyyljohdannaiset. Useampi uuttoaskel myös mahdollistaisi suuremman kasvimassan käsittelyn kerralla. Tällöin korjattu morsinko saataisiin tehokkaammin käsiteltyä heti sadonkorjuun jälkeen ja varastoimisesta seuraavia isatan-yhdisteiden tappioita voitaisiin välttää.

9.4 Jäähdytys

Jäähdytys voidaan toteuttaa esimerkiksi lämmönvaihtimella tai antamalla veden jäähtyä hitaasti lämmön siirtyessä säiliötä ympäröivään tilaan. Jäähdyttämisen

tarpeellisuus riippuu uuttolämpötilasta. Stoker *et al.* (1998) saivat 17 tunnin uuttamisella 30 °C:ssa samansuuruisia tuloksia kuin 5 min uuttamisella 100 °C:ssa, jolloin uuttolämpötilan muuttaminen näyttäisi vaikuttavan lähinnä liukenemiseen kestäväan aikaan. Uutto-olosuhteiden muuttamisella voitaisiin mahdollisesti toteuttaa liuottaminen matalammassa lämpötilassa tehokkaammin, jolloin myös erillistä jäähdyttämistä ei välttämättä tarvittaisi. Mikäli liuotus suoritetaan kuumalla vedellä, tulee liuos jäähdyttää nopeasti. Tällöin välttyään Kokubunin *et al.* (1998) havaitsemalta isatan B:n häviämiseltä kuumassa vedessä. Nopea jäähdyttäminen voidaan toteuttaa maatalaoloissa helpoiten yksinkertaisella putkilämmönvaihtimella jossa jäähdytykseen käytetään normaalia käyttövettä. Lämmönvaihdin voisi olla myös siirrettävä malli, jolloin jäähdytysvesiputket upotetaan suoraan astiaan, jossa jäähdytettävää liuosta säilytetään.

9.5 Puhdistaminen

Kiinteän faasin erottamiseen nesteestä on kaksi peruseriaatetta: suodattaminen ja painovoimaan perustuva selkeytys (McCabe ja Smith 1976). Näistä etenkin suodatukseen on olemassa lukuisia erilaisia tapoja ja laitteistoja. Lisäksi huomionarvoisia ovat myös mikro- ja ultrasuodatus, jota käytetään mm. Rosnerin (1993) patentissa. Ultrasuodatuksella voitaisiin myös nostaa indoksylin konsentraatiota liuoksessa ennen sen hapettamista indigoksi. Kiinteän faasin erottaminen on kasvipärisen indigon valmistamisessa tarpeen paitsi uuton jälkeisessä puhdistuksessa, myös varsinaisen hienon lopputuotteena syntyvän indigon erottamisessa. Suodatus käsitellään tässä ja painovoimaan perustuvat selkeytysmenetelmät käsitellään tarkemmin myöhemmin.

Suodattaminen on periaatteeltaan yksinkertainen prosessi, jossa seulottava virta kulkee suodatinmateriaalin läpi sen eri puolien paine-eron vaikutuksesta. Seurauksena suodattimen huokoskokoja suuremmat kiinteät partikkelit jäävät sen pinnalle. Suodatinmateriaali voi olla esimerkiksi hiekkakerros, ultra- ja mikrosuodatuksen soveltuva suodatinkalvo tai vaikkapa yksinkertainen roskien poistamiseen tarkoitettu metalliristikko. Käytännössä suodatuksesta kuitenkin suurimmaksi osaksi vastaa suodatinmateriaalin pinnalle muodostuva suodatinkakku. (McCabe ja Smith 1976)

Morsingon lehtien suodattamiseen uuton jälkeen sopii harva seula, jossa lehdet pestään puhtaalla vedellä huolellisesti, jotta uuttoliuos saadaan kokonaan talteen. Indigon suodattamiseen sopii esimerkiksi panostoiminen imusuodatus, koska uuttaminen tapahtuu panoksissa ja määrät ovat suhteellisen pieniä. Ongelmana on suodatettavan materiaalin pieni koko. Indigon partikkelikoko vaihtelee 2–50 µm välillä (Garcia-Macias ja John 2004), joka on mikrosuodatuksen kokoluokassa. Veden suuri suhteellinen osuus kiinteään aineeseen nähden aiheuttaa kuitenkin ongelmia korkeiden kustannusten muodossa. Tämän vuoksi voisikin olla järkevää käyttää mikrosuodatusta yhdistettynä sedimentointiin. Toinen vaihtoehto olisi käyttää suodatusta konsentroimaan kiinteän aineen osuutta ja kuivata syntynyt liete. Tähän tarkoitukseen voisi sopia ristivirralla toimiva suodatus. Haittapuolena on kuitenkin ristivirtalaitteistojen kallis hinta. Kustannusten minimoimiseksi suodatus voitaisiin toteuttaa painovoimasuodatuksella. Tämä on hyvin hidasa tapa, muttei vaadi erityisiä imulaitteistoja, jolloin se olisi toteutettavissa maatilaympäristössä

9.6 Ilmaus

Ilmausvaiheessa morsingon uuttoliuokseen lisätään emästä ja saatetaan ilmaa, jolloin indigon esiasteet hydrolysoituvat ja muodostavat indoksyylä, joka reagoi leuko-indogoksi, joka edelleen hapettuu indigoksi. Vuorema (2008a) osoitti, että pH:n tulee olla vähintään 11, jotta saavutetaan mahdollisimman puhdas tuote. Eri emäksillä on etunsa. Kalsiumhydroksidin on huomattu parantavan indigon saostumista, mutta toisaalta heikentävän puhtautta (Bechtold ja Mussak 2009). Ammoniakkia käytettäessä voidaan hyödyntää jäljelle jäänyttä vettä maanparannukseen sen typpipitoisuuden ansiosta (Stoker *et al.* 1998).

Ilman sekoittamiseen nesteen kanssa on paljon eri tapoja. Benitezin 2009 mukaan tavoitteena on saada mahdollisimman suuri kontaktipinta-ala nesteen ja kaasun välille, sillä aineensiirron nopeus on suoraan verrannollinen pinta-alaan. Kun menetelmänä on nesteen dispersointi kaasuun, tavoitellaan nesteestä mahdollisimman ohutta filmiä tai pieniä pisaroita. Tähän tarkoitukseen käytetään mm. märkäseinäkolonneja, spraykolonneja ja täytekappalekolonneja. Näistä teollisuudessa käytössä on yleensä jälkimmäiset, joissa täytekappaleet antavat hyvän kontaktipinta-alan. Indigon tuotannossa täytekappaleita sisältävät

järjestelmät eivät kuitenkaan ole mahdollisia, sillä ilman hapen vaikutuksesta syntyvä indigo on hankala ottaa talteen sen sekoittuessa täytekappaleiden sekaan. Myös tuotanto on niin pientä, ettei näin monimutkaisille laitteille ole tarvetta ja taloudellisia edellytyksiä. Tämän vuoksi nesteen dispersointiin perustuvista menetelmistä käyttöön sopivat lähinnä spraykolonnit.

Spraykolonnit voivat toimia joko vaaka- tai pystysuunnassa. Menetelmä on yksinkertainen: nestettä pumpataan suuttimen läpi joka hajottaa virran pieniksi pisaroiksi, jotka sekoittuvat ilman kanssa. Yleensä menetelmää käytetään adiabaattiseen kaasun viilentämiseen ja kosteuttamiseen kierrätettävän nesteen kanssa. Ongelmina tässä menetelmässä on nesteen pumppaamisesta syntyvät kustannukset ja suihkutuksessa syntyvä sumu ja sen mukana menetetty neste. Suihkutussäiliön koko täytyy olla niin suuri, ettei neste kerääny reunoille. Tällöin suihkusta saatava hyöty vähenee nesteen virratessa reunoja pitkin filminä. Indigon tuotantoprosessin tapauksessa, uuttoliuos voitaisiin suihkuttaa suoraan takaisin säiliöön, jolloin pystyttäisiin saamaan pienempi laitteisto ilman tarvetta ylimääräiselle kolonnille. Tällöin samaa säiliötä voidaan käyttää varastointiin ja selkeyttämiseen. (Benitez 2009)

Indigon tuotantoon käyttökelpoisia laitteistoja ovat sprakolonnin ohella yksinkertaiset kuplakolonnit ja sekoitussäiliöt. Kuplakolonnissa paikallaan olevaan nesteeseen johdetaan kaasua pohjalta. Pienessä säiliössä kaasu voidaan yksinkertaisesti johtaa keskeltä säiliön pohjaa olevasta suuttimesta, mutta isommilla säiliöillä reikiä tarvitaan useampia. Sekoitus voidaan toteuttaa mekaanisella sekoittimella tai se voidaan aikaansaada syötetyllä kaasulla. (Benitez 2009)

Eri tutkimuksissa ilmaamiseen on käytetty eri menetelmiä. Stoker *et al.* (1998) ja Vuorema (2008a) käyttivät ilmaukseen menetelmää, jossa paineilmaa johdettiin säiliöön pohjalta, kun taas Bechtold *et al.* (2002) antoivat liuoksen seistä avoimessa astiassa jota sekoitettiin muutamia kertoja päivässä. Siirtomaa-ajan aikaisessa indigonvalmistuksessa puolestaan ilmaa saatettiin uuttoveden sekaan mekaanisilla siivillä ja pumppaamalla vettä suihkuna takaisin altaaseen (Balfour-Paul 1998). Paineilman käyttäminen on kuitenkin muodostunut

vakiomenetelmäksi ja sitä käytettiin myös Spindigo-hankkeen prosessissa (Bechtold ja Mussak 2009).

9.7 Selkeytys

Selkeytysvaiheessa muodostuneen indigon annetaan saostua ja laskeutua (sedimentoitua) selkeytysäiliön pohjalle. Tämä voidaan yhdistää myös suodattukseen esimerkiksi niin, että ensin sedimentoinnilla saadaan veden osuus pienemmäksi, jolloin jäljelle jäävä osuus on nopeampi suodattaa. Itse prosessi on yksinkertainen: tarpeeksi isot ja vettä tiheämmät partikkelit laskeutuvat nestealtaan pohjalle. Ongelmia voi tuottaa kuitenkin hitaat laskeutumisasjat. McCaben ja Smithin (1976) mukaan pienillä partikkelikooilla (<10 µm) hiukkaset eivät pääse agglomeroitumaan. Indigohiukkaset voivat olla halkaisijaltaan alle 2 µm jolloin selkeytymisasjat ovat hyvin hitaita. Tällöin sedimentoinnin apuna voidaan käyttää floggulanttia, joka sitoo yksittäiset indigohiukkaset isommiksi partikkeleiksi yleensä varauksen avulla. Tämä on kuitenkin ongelmallista indigon puhtauden kärsiessä. Sedimentoinnin on kuitenkin havaittu Bechtoldin ja Mussakin (2009) mukaan olevan nopeampaa käytettäessä ilmausvaiheessa emäksenä kalsiumhydroksidia. Positiivisesti varautuneet kalsiumionit toimivat tällöin agglomeroitumisen aloittajina. Indigon sekaan jäävät kalsiumepäpuhtaudet voidaan lopuksi pestä laimealla hapolla.

9.8 Jäljelle jäävän kasvimateriaalin hyötykäyttö

Morsingosta käytetään indigon valmistuksessa vain pieni osa. Tämän vuoksi syntyvälle kasvimassalle on toivottavaa löytää hyötykäyttöä. Potentiaalisia käyttömahdollisuuksia ovat ainakin käyttö eläinten rehuna, levittäminen takaisin pelloille maanparannusaineeksi ja biokaasun tuottaminen mädättämällä.

9.8.1 Biokaasutus

Biokaasun tuottaminen on houkutteleva vaihtoehto ottaen huomioon yleinen kiinnostus uusiutuviin energiamuotoihin. Morsingosta ei yksinään saada riittävästi kaasua kattamaan biokaasulaitoksen kustannukset, mutta yhdessä muun maatalous- ja puutarhajätteen yms. kanssa biokaasun valmistaminen mädättämällä olisi mahdollinen vaihtoehto indigon valmistuksessa syntyvän kasvijätteen

hyötykäyttöön. Mädätyksestä jäljelle jäävä aines voitaisiin vielä lisäksi hyödyntää edelleen maanparannusaineena, sillä typpi ja muut ravinteet eivät merkittävästi vähene biokaasuprosessissa.

Biokaasun tuotannossa eloperäistä ainesta mädätetään anaerobisten bakteerien avulla. Mätäneminen on kaksivaiheista. Ensimmäisessä vaiheessa bakteerit muuttavat hydrolyysin avulla materiaalin asetaateiksi, vedyksi ja hiilidioksidiksi, jotka niiden aineenvaihdunnassa muuntuvat metaaniksi. Reaktori voi olla kaksiosainen, jolloin mätänemisen vaiheet tapahtuvat erillään, tai molemmat voivat tapahtua yhtaikaisesti samassa tilassa. Lisäksi reaktorit voidaan jaotella jatkuvatoimisiin ja panosreaktoreihin, sekä kuiva- ja märkäreaktoreihin. (Mata-Alvarez 2002)

Märkäreaktorissa kiinteä aines laimennetaan vedellä kuiva-ainepitoisuudeltaan alle 15 % lietteeksi. Itse reaktori on sekoitussäiliöreaktori, joka voi olla panos tai jatkuvatoiminen. Etuina on samanlaisuus laajasti käytettyjen jätevedenkäsittelylaitteiden kanssa, bakteerien inhibiittoreiden laimentuminen vedellä ja lietteiden käsittelyn halvempi hinta kuiva-aineiden käsittelyyn nähden. Huonoja puolia ovat suuri vedenkulutus, suurempi tilavuus, mekaanisten osien kuluminen, erikokoisten partikkelien kerrostuminen ja osalle käsiteltävästä materiaalista mahdollinen ”oikosulku”, jossa materiaali pääsee reaktorin läpi alle normaalin viipymääjan, jolloin haluttuja reaktioita ei ehdi tapahtumaan. (Mata-Alvarez 2002)

Kuivareaktorissa käsiteltävän materiaalin kuiva-ainepitoisuus on välillä 20–40 %. Tyypiltään reaktorit ovat tulppavirtausreaktoreja. Uuden materiaalin sekoitukseen käsiteltävään massaansa on käytössä kaksi tapaa: sekoittaminen kierrätettyyn reaktorin läpikäyneeseen materiaaliin tai osan syntyvästä kaasusta kierrättäminen reaktorin lävitse, jolloin se samalla aiheuttaa sekoittumista. Kuivareaktorin etuina ovat: pieni veden ja lämmön tarve, pienempi reaktori, hyvä konversio, liikkuvien osien puuttuminen ja sopivuus vaihtelevankokoisille partikkeleille. Huonoja puolia puolestaan ovat kiinteiden aineiden kalliimmat käsittelykustannukset ja epäsopevuus matalan kuiva-ainepitoisuuden omaaville jätteille. (Mata-Alvarez 2002)

Kaksivaiheisessa reaktorissa pyritään optimoimaan anaerobisten bakteerien eri biokemiallisille reaktioille mahdollisimman hyvät olosuhteet. Näin pyritään kasvattamaan biokaasun saantoa ja biomassan hajoamisen nopeutta. Ensimmäisessä vaiheessa mikrobit nesteyttävät biomassaa ja laskevat pH:ta. Tämän rajoittava tekijä on selluloosan hydrolysoitumisen nopeus. Toisessa vaiheessa bakteerit muuntavat ensimmäisen vaiheen tuotteet metaaniksi ja hiilidioksidiksi. Tätä puolestaan rajoittaa mikrobien kasvunopeus. Näihin tekijöihin voidaan vaikuttaa eri menetelmillä reaktoreiden ollessa erilliset. Etuina tällaisessa järjestelyssä on mahdollisuus suunnitella reaktori paremmin sopimaan käsiteltävälle materiaalille, luotettavuus korkeilla biomassan typpipitoisuuksilla ja tehokkuus vähemmän selluloosaa sisältäville jätteille. Ongelmina kuitenkin on laitteiston monimutkaisuus ja suuremmat investointikustannukset. (Mata-Alvarez 2002)

9.8.2 Kasvimassan levittäminen pelloille

Kasvimassan levittäminen pelloille perustuu kasvin sisältämän typen ja muiden ravinteiden palauttamiseen takaisin kiertoon. Tämä voidaan tehdä myös biokaasutuksen jälkeen, sillä typpi ja muut ravinteet jäävät kaasutuksesta jäävään tähteeseen. Lannoitukseen mädättämällä saatu aines ei ole aivan yhtä hyvää kuin kompostoimalla, sillä mädätettäessä syntyy jonkin verran kasvua haittaavia aineita ja se ei tuhoa yhtä hyvin rikkakasvien siemeniä, taudinaiheuttajia, torjunta-aineita yms. Toisaalta typpi säilyy paremmin tällä menetelmällä, mikä tasapainottaa haittoja. (Rajala 1995)

10 KOKEELLISET MENETELMÄT

Kokeissa tutkittiin eri uutto-olosuhteiden vaikutuksia morsingosta tuotetun indigon saantoon. Tavoitteena oli indigon saannon maksimointi pitäen samalla liuottamiseen käytettävän veden lämpötila mahdollisimman matalana. Kokeiden perusteella esitettiin suunnitelma koelaitteistoksi tulevaa tutkimusta varten.

10.1 Kemikaalit

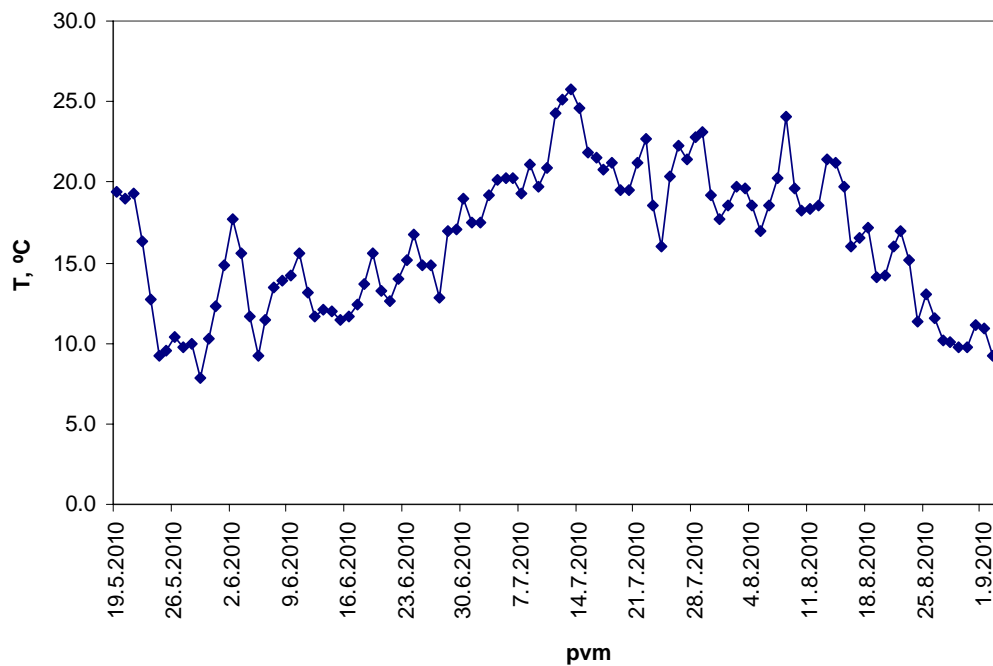
Kokeissa käytettiin taulukossa V esitettyjä kemikaaleja sellaisenaan ilman jatkopuhdistamista. Käytetty vesi oli ionivaihdettua.

Taulukko V. Kokeissa käytetyt kemikaalit.

kemikaali	toimittaja	olomuoto	puhtaus
etyyliasettaatti	Mallinckrodt	neste	HPLC-grade
indigo (synt.)	Sigma-Aldrich	jauhe	
kaliumhydroksidi	Merck	pelletit	pro analysi
natriumkloridi	J.T. Baker	jauhe	
suolahappo	J.T. Baker	vesiliuos	

10.2 Kasvimateriaali

Morsingon siemenet kylvettiin 19.5.2010 Jokioisissa Maa- ja elintarviketutkimuslaitoksessa (MTT). Siemenet olivat vuoden 2003 satoa Jokioisista. Kyseinen sato oli kylvetty Saksan Thüringenistä peräisin olleilla siemenillä. Siemenet kylvettiin Kekkilän esilannoitetulla puutarhamullalla täytettyihin 10 litran altakasteluruukkuihin siten, että multaan painettiin kehämäisesti tasaisin etäisyyksiin 12 noin 2 cm syvyistä kuoppaa joihin jokaiseen asetettiin noin 1–3 siementä. Lopuksi multa tasoitettiin ja kasteltiin. Ruukut pidettiin häkkikasvihuoneessa, jossa oli lasikatto ja avoimet sivuseinät. Siemenistä kasvoi keskimäärin 11 taimea ruukku kohden. Kun kasvit olivat kasvattaneet täysikokoisia lehtiä, siirrettiin ruukut lasikaton alta verkkokaton alle. Ruukkuja kasteltiin alkuun päältä 2–3 kertaa viikossa siten, että jokainen ruukku sai noin litran vettä. Kasvien kasvaessa isommiksi ja katon alta siirron jälkeen kastelu muutettiin juurikasteluksi ja kasveja kasteltiin vain sateettomina aikoina. Heinäkuun alussa lehtien alkaessa kellastua ruukkuja lannoitettiin YaraMilla (2010) Pellon Y 1 lannoitteella (N 27 m-%, P 2 m-%, K 2,5 m-%), jota annettiin noin 5 grammaa ruukku kohden. Rikkaruohot poistettiin käsin niitä huomattaessa. Kuvassa 7 on esitetty kasvukauden (siementen kylvämisestä kokeiden lopettamiseen) päivittäiset keskilämpötilat mitattuna ilmatieteenlaitoksen Jokioisten tutkimusasemalla.



Kuva 7. Ilmatieteenlaitoksen Jokioisten tutkimusasemalla mitatut päiväkohtaiset keskilämpötilat aikavälillä 19.5.2010–2.9.2010.

Kokeet aloitettiin 7.7.2010 ja lopetettiin 2.9.2010. Kuvasta 7 nähdään, että keskilämpötilat kokeiden alussa olivat noin 1,5-kertaiset kokeiden loppuun nähden. Huomattavaa on myös, että kokeiden suorituskesä oli poikkeuksellisen lämmin Suomessa. Kokeisiin kerättiin lehtiä satunnaisesti eri ruukuista poimien lehdet käsin tyvestä katkaisemalla. Lehtimateriaali pyrittiin poimimaan mahdollisimman ehjinä. Lehtien keskikoko pieneni kokeiden edetessä. Alussa käytettiin täysikokoisia lehtiä ja niiden loputtua tilalle kasvaneita lehtiä, joiden kasvu-aika oli lyhyempi. Lehdet pestiin huolella juoksevan veden alla ennen käyttöä.

10.3 Koemenetelmät

Kokeet suoritettiin kahdessa osassa. Ensin suoritettiin esikokeita, joiden tarkoituksena oli perehtyä prosessiin ja valita tutkittavat olosuhteet laajempiin uuttokokeisiin. Tutkittavaksi valittiin olosuhteita, joita aiemmissa tutkimuksissa ei oltu käsitelty ja joissa vaikutti olevan potentiaalia.

10.3.1 Esikokeet

Tutkimukset aloitettiin tutkimalla kokeiluluontoisesti eri menetelmien vaikutuksia. Tutkittuja menetelmiä olivat hapon ja suolan lisääminen uuttoveteen,

sekä lehtien pilkkominen. Kokeet tehtiin 250 grammalla lehtiä joiden uuttamiseen käytettiin litra vettä. Kokeista ei tehty rinnakkaiskokeita, koska lehtimateriaalia haluttiin säästää laajempiin kokeisiin. Lehdet uutettiin 60 °C vedellä 2 litran dekanterilasissa. Lehtien annettiin olla vedessä 10 minuuttia, jonka jälkeen vesi vaihdettiin uuteen jossa lehtien annettiin olla toiset 10 minuuttia. Lehdet pidettiin pinnan alla käyttämällä vedellä täytettyä lasiastiaa (tässä tapauksessa 500 mL mittapulloa) painona. Toisen uuttokerran jälkeen jäljelle jääneet lehdet vielä pestiin huoneenlämpöisellä vedellä. Lehdet huuhdeltiin huolellisesti ja pesuvesi laimennettiin ionivaihdetulla vedellä niin, että lopputilavuus oli yksi litra.

Happoa lisättiin liuokseen niin, että liuoksen pH laski alle kahden. Hapon vaikutusta ei oltu juuri aiemmissa tutkimuksissa dokumentoitu, vaikka sitä koemenetelmissä oli raportoitu käytettävän. Suolaliuoksella haluttiin testata elektrolyytin vaikutusta esiasteiden liukenemiseen ja sen ajateltiin myös mahdollisesti auttavan kasvin solujen hajottamisessa ja siten parantavan esiasteiden liukenemistä. Kokeissa käytettiin 0,2 M NaCl-liuosta.

Lisäksi testattiin monivaiheista liuotusta, jossa lehdet jaettiin kahteen astiaan siten, että molempiin tuli 125 grammaa lehtiä. Ensimmäiseen astiaan lisättiin 0,5 litraa vettä, joka viiden minuutin jälkeen siirrettiin toiseen astiaan ja korvattiin puhtaalla vedellä. Sama toistettiin, jolloin yhdessä astiassa olevat lehdet olivat vedessä kaksi kertaa viisi minuuttia.

Saadut liukset suodatettiin Büchner-suodattimessa roskien poistamiseksi, jonka jälkeen niiden pH säädettiin kaliumhydroksidilla yli yhdentoista. Liuoksia ilmattiin sekoittamalla magneettisekoittajalla noin 10–15 minuuttia. Tämän jälkeen niiden annettiin seistä avoimena yön yli jolloin astian pohjalle laskeutui sininen indigosakka.

Indigon määrän määrittämiseksi indigosakka suodatettiin uuttoliuoksesta. Suodatukset suoritettiin Whatman 42 -suodatinpaperilla Büchner-suppilossa. Suodatinpaperien valmistaja takaa vesiliuoksessa 98 % retention 2,5 µm partikkeleille (Whatman 2010). Suodatinkakku huuhdeltiin huolellisesti ionivaihdetulla vedellä. Indigon määrä saatiin määritettyä suodatinpaperin massan muutoksesta. On huomattavaa, että tällä menetelmällä saadut tulokset ovat hyvin

epätarkkoja, sillä indigon määrä on hyvin pieni ja näin ollen muilla kiinteillä epäpuhtauksilla on suuri suhteellinen vaikutus kiintoaineen massaan. Kokeissa kiinnitettiin suurta huomiota myös visuaaliseen havainnointiin.

Veden vaihtamisen vaikutusten tutkimiseksi suoritettiin koe, jossa rinnakkaisissa astioissa (A ja B) oli 100 grammaa lehtiä ja 0,5 litraa vettä, jonka alkulämpötila oli 80 °C. Astiassa A saman veden annettiin olla 2 tuntia ja astiassa B vesi vaihdettiin 15 minuutin välein. Astiaan B lisättävän veden lämpötila säädettiin vastaamaan astian A lämpötilaa kyseisellä ajanhetkellä. astioista. Veden vaihdon yhteydessä molemmista astioista otettiin näytteet analysoitavaksi spektrofotometrillä. Saadut liuokset suodatettiin ja ilmattiin kuten aikaisemmissakin kokeissa.

Näiden kokeiden perusteella valittiin tutkittavat olosuhteet (muuttujat) laajempiin uuttokokeisiin. Eri muuttujiksi valittiin: uuttoliuoksen lämpötila (40 °C, 60 °C ja 80 °C), lehtien käsittely (pilkotut ja kokonaiset), sekä uuttoliuoksen sisältö (pelkkä vesi, hapan liuos ja suolaliuos). Kokeissa käytettiin suolaliuoksena NaCl liuosta, jonka konsentraatio oli 0,2 M. Hapan liuos saatiin lisäämällä 1 M suolahappoa siten, että liuoksen pH oli indikaattoripaperilla (Macherey-Nagel pH-fix 0–14 indicator sticks) tarkistettaessa selvästi alle kahden. Hapon määrää ei mitattu tarkasti. Eri muuttujien yhdistelmiä oli siis 18 erilaista. Näistä tehtiin kolme rinnakkaiskoetta niin, että yhden kerranteen kokeet tehtiin aina perättäisinä päivinä, jotta kasvien kasvuolosuhteet olisivat mahdollisimman yhtäläiset. Uuttokokeiden pituudeksi valittiin 2 tuntia, sillä esikokeista havaittiin, että pitemmällä uuttoajalla saadaan parempi saanto. Veden kierrättämistä ja vaihtamista sisältäviä menetelmiä ei tutkittu niiden monimutkaisuuden ja heikkojen tulosten vuoksi. Lisäksi sekoittamisen vaikutusta tutkittiin erikseen.

10.3.2 Uuttokokeet

Indigon esiasteiden uuttaminen suoritettiin mukailen Vuoreman (2008a) menetelmiä. Uuttokokeet suoritettiin 2 litran dekantterilasissa 100 grammalla lehtiä ja 0,5 litralla vettä. Lehdet pidettiin nestepinnan alla Vuoreman (2008a) käyttämistä kivipainoista poiketen käyttämällä painona pienempää vedellä täytettyä dekantterilasia. Lehtimäärä todettiin kuitenkin liian suureksi saatavilla

olevaan kasvimateriaalin nähden ja lehtien ja nesteen määrä tiputettiin aluksi puoleen (50 g, 250 mL) ja astia vaihdettiin yhden litran dekantterilasiin. Havaittiin, etteivät lehdet riitä näinkään ja kahden viimeisen kerranteen kokeet tehtiin 10 grammalla lehtiä ja 100 mL vettä 250 mL astiassa. Veden määrän suhde oli muutettava, koska 50 mL vettä ei riittänyt peittämään lehtiä kokonaan vedellä. Viimeisen kerranteen osalta kokeet 40 °C lämpötilassa jouduttiin jättämään tekemättä kasvimateriaalin loppumisen vuoksi. Ratkaisuun vaikutti myös kahden ensimmäisen kerranteen koetuloksien heikot saannot.

Uuttoaika oli 120 minuuttia. Ajanlasku aloitettiin veden lisäämisen jälkeen. Vesi lämmitettiin tutkittavaan lämpötilaan (± 5 °C) ja sen annettiin jäähtyä vapaasti uuttoastiaan kaatamisen jälkeen. Liuoksen lämpötilan kehittyminen kirjattiin ylös näytteenoton yhteydessä. Näytteet otettiin pipetillä samasta kohdasta astiaa niin, että ensimmäisen puolen tunnin aikana näytteitä otettiin 5 minuutin välein, seuraavan puolen tunnin ajan 10 minuutin välein ja viimeisen tunnin ajan 15 minuutin välein. Yhteensä näytteitä siis otettiin 13 yhdestä panoksesta. Näytteenotossa poistunut liuos huomioitiin laskettaessa indigon massa näytteiden g/L pitoisuuksista.

Lisäksi erillisinä kokeina tutkittiin pilkottujen lehtien sekoittamisen vaikutusta painojen avulla veden peitossa pidettyihin lehtiin verrattuna. Lehtien sekoittaminen toteutettiin magneettisekoittimella. Lehtiä oli yhdessä panoksessa 50 g ja vettä 500 mL. Sekoituskokeet suoritettiin 2 L dekantterilaseissa ja sekoittamattomat vertailunäytteet olivat 1 L astioissa, joissa lehdet pidettiin veden alla painona olleella pienemmällä vedellä täytetyllä dekantterilasilla. Kokeet tehtiin 80 °C alkulämpötilassa hapolla ja ilman happoa. Näin ollen koeastioita oli neljä erilaista, kaksi sekoitettua ja näiden sekoittamattomat vertailuastiat. Kokeiden kesto oli 70 minuuttia. Ensimmäisen puolen tunnin aikana näytteitä otettiin 5 minuutin välein ja tämän jälkeen kymmenen minuutin välein. Täten näytteitä tuli yhteensä 10. Rinnakkaiskokeita tehtiin kaksi kappaletta saman päivän kuluessa. Kokeissa käytettiin yön yli muovipusseissa varastoituja lehtiä, jotka olivat peräisin maatilalta Uudenkaupungin Kalannista.

10.3.3 Kenttäkokeet

Kenttäkokeet suoritettiin maatilalla Uuteenkaupunkiin kuuluvassa Kalannissa. Indigon erottamisessa maatilalla kasvatetusta morsingosta testattiin hapon vaikutusta. Happona käytettiin normaalia kaupasta saatavaa vihannesten säilöntään tarkoitettua etikkaa, jonka etikkahappopitoisuus oli 10 m-%. Lehdet pakattiin 7 kg erissä verkkokangassäkkeihin. Säkit siirrettiin ruostumattomasta teräksestä valmistettuihin säiliöihin pareittain. Molempiin astioihin pumpattiin 35 litraa noin 80 °C vettä. Toiseen astioista lisättiin 2,5 litraa etikkaa, jolloin liuoksen pH laski noin neljään. Lehdet pidettiin pinnan alla käyttäen vedellä täytettyjä muovikanistereja painona. Säkkien annettiin olla vedessä 30 minuuttia ja vedestä otettiin näytteet 15 minuutin ja 30 minuutin kohdalla. Tämän jälkeen säkit nostettiin ylös ja huuhdeltiin. Pesuveden annettiin valua uuttoastiaan. Saatu liuos pumpattiin varastointisäiliöön, jossa siihen lisättiin 0,5 litraa 5 M natriumhydroksidia ja liukseen johdettiin paineilmaa noin 10 minuutin ajan. Syntyneen indigon annettiin laskeutua astian pohjalle, josta se varastoitiin lietteenä kanistereihin. Lehtiä käsiteltiin neljä säkillistä käyttäen etikkaa ja kaksi ilman etikkaa.

10.4 Näytteiden käsittely ja analysointi

Uuttoastioista otettuihin näytteisiin lisättiin muutama pisara 1 M KOH-liuosta, jolloin pH nousi indikaattoripaperilla tarkistettuna yli yhdentoista, jonka Vuorema⁹ totesi olevan sopiva pH indigon muodostumiselle. Tämän jälkeen koeputkia ravistettiin voimakkaasti ja ne varastoitiin suljettuina myöhempää analysointia varten.

Ennen analysointia näytteisiin lisättiin 3 mL etyyliasetaattia johon veteen liukenematon indigo ravistettaessa liukeni. Etyyliasetaattiin liunneen määrä määritettiin spektrofotometrillä aallonpituudella 600 nm. Analysointiin käytettiin Shimadzu UV-160A-spektrofotometria. Saaduista absorbansseista laskettiin synteettisellä indigolla muodostetun standardisuoran perusteella pitoisuudet grammoina litraa kohden. Standardisuora on esitetty liitteessä I. Saaduista pitoisuuksista laskettiin indigon massa uuttoliuoksessa, mikä suhteutettiin kokeessa käytettyjen lehtien massaan ja niistä määritettyyn kuiva-ainepitoisuuteen.

Indigon analysoiminen on hankalaa, kuten kirjallisuudessa on tullut esille. Voimakkaista molekyylien välisistä vetysidoksista johtuen indigo liukenee huonosti. Liukenemista huonontaa vielä indigomolekyylien taipumus muodostaa isompia partikkeleja ja konsentroitua rajapinnoille. Tämän vuoksi mitatut pitoisuudet voivat poiketa todellisista pitoisuuksista. Tällä on kuitenkin vähemmän merkitystä, kun verrataan eri menetelmien vaikutuksia toisiinsa.

Kuiva-ainepitoisuus määritettiin punnitsemalla viisi rinnakkaisnäytettä lehtiä ja kuivaamalla ne lämpökaapissa yön yli 60 °C lämpötilassa. Kuiva-ainepitoisuus saatiin jäljelle jääneen massan osuudesta alkuperäisestä massasta.

11 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

Edellisessä luvussa esitettyjen kokeiden tulokset on esitetty jaoteltuna kuiva-ainepitoisuuksiin, esikokeisiin, uuttokokeisiin ja kenttäkokeisiin.

11.1 Kuiva-ainepitoisuudet

Kuiva-ainemääritykset tehtiin isoille lehdille (pituus 10–20 cm) 2.8.2010 ja pienille lehdille (5–10 cm) 2.9.2010. Lisäksi Kalannista 7.9.2010 korjatuista lehdistä tehtiin oma määrittäminen. Saadut tulokset on esitetty taulukossa VI.

Taulukko VI. Kuiva-ainepitoisuudet eri mittauksille.

Näytteenotto pvm ja paikka	Näytteiden kuiva-ainepitoisuudet massaprosentteina.					Keskiarvo
	1	2	3	4	5	
2.8.2010 Jokioinen	13,6	13,9	13,3	13,4	13,8	13,6
2.9.2010 Jokioinen	18,3	18,7	19,15	18,2	19,3	18,7
7.9.2010 Kalanti	15,1	13,9	14,4	14,7	14,7	14,6

Elokuussa ja syyskuussa tehtyjen mittausten välillä on merkittävä ero. Syyskuun kokeiden keskiarvo on 37,5 % suurempi. Syyksi tähän voidaan pitää jälkimmäisen kokeen pienempää lehtikokoa ja vallinneita sääolosuhteita. Laskettaessa indigosaantoja on syyskuun arvoa käytetty toisen ja kolmannen kerranteen uuttokokeissa, joissa lehtimateriaali oli pienempää ja elokuun arvoa aikaisemmille isoilla lehdille tehdyille kokeille.

11.2 Esikokeet

Esikokeilla selvitettiin käytettäviä menetelmiä laajempiin ja tarkempiin kokeisiin. Analysointimenetelmänä käytettiin liuoksen suodattamista ja indigon massan

määrittämistä gravimetrisesti. Taulukossa VII on esitetty kokeiden tulokset. On huomattavaa, että tähdellä merkitty suolaliuoksella tehty määrittäminen ei ole vertailukelpoinen, koska se jouduttiin tekemään eri huokoskoon suodatinpaperilla.

Taulukko VII. Indigon saannot 250 grammasta morsinkoa. Uuttamiseen käytetty 1 L vettä, jonka alkulämpötila oli 60 °C. Uutto suoritettu kahdessa 10 minuutin askeleessa joiden välissä liuos on vaihdettu uuteen, lopuksi lehdet on pesty puhtaalla vedellä ja pesuliuos laimennettu niin, että sen kokonaistilavuus on 1 litra.

Koe	Suodatinkakun massa				Indigon saanto	
	m ₁ , g	m ₂ , g	m _{pesu} , g	m _{summa} , g	g/kg _{tp}	g/kg _{ka}
Vesi	0,028	0,036	0,042	0,106	0,422	3,10
Pilkotut lehdet	0,025	0,061	0,029	0,114	0,457	3,36
Happo (pH < 2)	0,046	0,040	0,023	0,110	0,439	3,23
Suola* (0,2 M NaCl)	0,052	0,068	0,052	0,171	0,684	5,03
kaksi astiaa	0,022	0,018	0,042	0,082	0,326	2,40

Kokeissa huomattiin, että happamalla uuttoliuoksella morsingon lehtiä uutettaessa liuoksen väri erosi muista menetelmistä. Puhtaalla vedellä ja suolaliuoksella uutettaessa liuos värjäytyi punaruskeaksi. Happaman liuoksen väri oli vihreä. Oletettavasti tämä johtuu Bechtoldin ja Mussakin (2009) esittämästä indoksyylin stabiloitumisesta happamassa ympäristössä. Tällöin indoksyyli ei pääse hapettumaan isatiiniksi ja siten indirubiinin ja muiden sivureaktioiden osuus laskee. Tuloksista ei nähdä suuria eroja eri menetelmien välillä. Tämä johtuu siitä, että liokset sisälsivät paljon epäpuhtauksia suhteessa indigon massaan ja toisaalta indigon hiukkaskoko on niin pieni, että perinteinen suodatinpaperi ei sovellu sen suodattamiseen. Suodatettaessa havaittiin selvästi sinisiä partikkeleja suodoksessa. Visuaalisen tarkastelun perusteella havaittiin lehtien pilkkomisen, sekä suolan ja hapon lisäämisen uuttoveteen tuottavan enemmän indigoa verrattaessa puhtaalla vedellä tehtyihin liuotuksiin. Huomattavana poikkeuksena kahdessa vaiheessa suoritettu uutto tuotti huonommat tulokset. Tähän syynä voi olla se, että lehdet olivat vedessä yhteensä vain 10 minuuttia, joka ei riittänyt indigon esiasteiden kunnolliseen liukenemiseen.

Edeltävien kokeiden pohjalta tutkittiin uuttoliuoksen vaihtamisen vaikutusta. Kahdessa astiassa oli sama määrä (100 grammaa) lehtiä. Toisessa astiassa uuttovesi vaihdettiin 15 minuutin välein uuteen ja toisessa saman veden annettiin olla astiassa koko kokeen kesto eli 2 tuntia. Samalla tutkittiin suodattamalla

määritettyjä tuloksia spektrofotometrillä analysoituihin näytteisiin. Näytteet otettiin 15 minuutin välein. Kokeiden tulokset on esitetty taulukossa VIII. Suodattamalla mitatuista tuloksista astiassa A liuokset ajanhetkiltä 60 ja 75 min on yhdistetty pienen kiinto-ainemäärän johdosta, samoin 90–120 ja pesuliuos.

Taulukko VIII. Indigon saannot 100 grammasta lehtiä 80 °C alkulämpötilan vedellä. Astiassa A vesi vaihdettiin 15 minuutin välein uuteen ja astiassa B annettiin saman liuoksen olla koko 2 tuntia. Indigopitoisuus määritettiin suodattamalla ja punnitsemalla, sekä spektrofotometrillä liuoksista otetuista näytteistä.

Mittaustapa: spektrofotometri				suodatus ja punnitus		
Astia A	m_{indigo} ,	x ,	x ,	m_{indigo} ,	x ,	x ,
t, min	g	g/kg _{tp}	g/kg _{ka}	g	g/kg _{tp}	g/kg _{ka}
15	0,004	0,044	0,321	0,022	0,220	1,618
30	0,006	0,055	0,408	0,019	0,190	1,397
45	0,004	0,043	0,315	0,019	0,190	1,397
60	0,015	0,149	1,095			
75	0,001	0,008	0,055	0,022	0,220	1,618
90	0,001	0,005	0,039			
105	0,003	0,034	0,248			
120	0,001	0,015	0,107	0,023	0,230	1,691
summa	0,035	0,352	2,589			
Pesu	0,001	0,012	0,091			
summa	0,036	0,364	2,679	0,105	1,050	7,721
Astia B						
15	0,010	0,104	0,766			
30	0,010	0,095	0,701			
45	0,010	0,100	0,735			
60	0,011	0,114	0,839			
75	0,007	0,067	0,490			
90	0,022	0,224	1,644			
105	0,012	0,118	0,867			
120	0,012	0,120	0,881	0,106	1,060	7,794
Pesu	0,022	0,219	1,607	0,036	0,360	2,647
summa	0,034	0,338	2,488	0,142	1,420	10,441

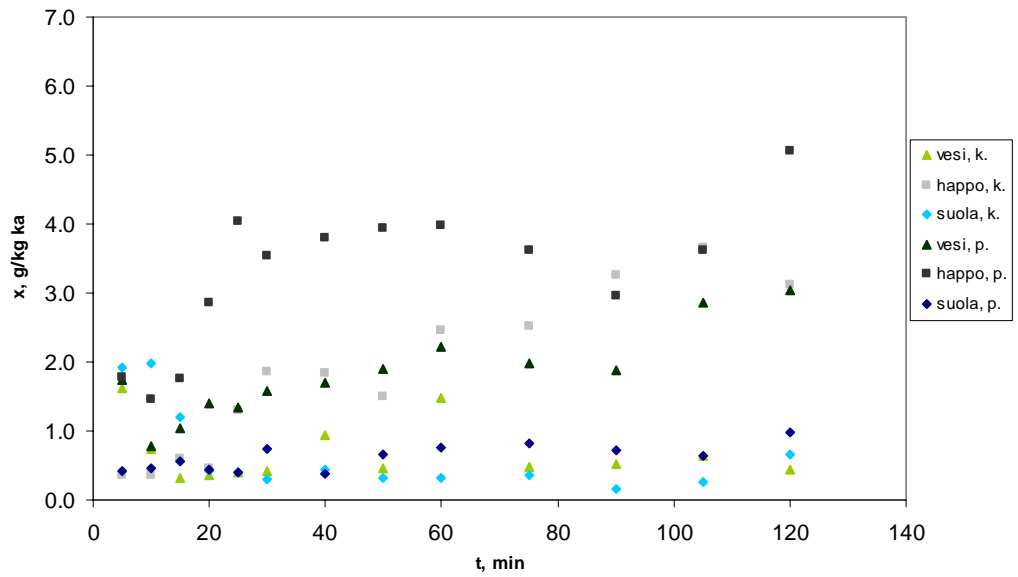
Tuloksista nähdään hyvin suuri ero määrittymenetelmien välillä. Spektrofotometrillä määritetyt tulokset voidaan olettaa olevan todellisia arvoja. Indigon yhteismassaksi astiassa A on suodatusmenetelmällä saatu 2,9-kertainen tulos spektrofotometrillä analysoituun massaansa nähden ja astiassa B jopa 4,2-kertainen. Verrattaessa spektrofotometrillä analysoituja tuloksia astian A ja B osalta yhteismassat ovat hyvin lähellä toisiaan. Tuloksissa nähdään kuitenkin muutama poikkeustulos, kuten astian A tulos kohdalta t = 60 min. Menetelmien välille onkin näiden tulosten perusteella hankalaa nähdä eroa. Veden vaihtaminen

oli kuitenkin hankala toteuttaa manuaalisesti ja on taloudellisesti huono menetelmä, joten sitä ei tutkittu enempää.

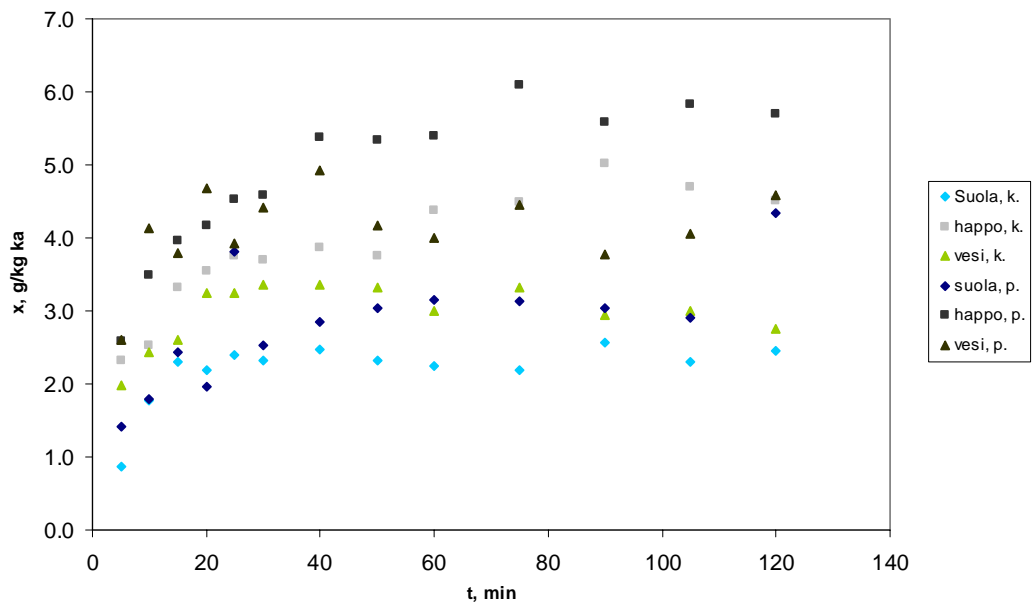
11.3 Uuttokokeet

Esikokeiden perusteella uuttokokeisiin valittiin eri olosuhteiksi: lämpötilat 40, 60 ja 80 °C, kokonaiset ja pilkotut lehdet, sekä uuttaminen puhtaalla vedellä, 0,2 M NaCl-liuoksella ja happamalla liuoksella. Hapan liuos tehtiin lisäämällä veteen suolahappoa niin, että indikaattoripaperilla tarkistettaessa liuoksen pH oli alle kahden. Hapon määrä siis vaihteli hiukan eri määrityksissä. Olosuhteiden yhdistelmiä oli yhteensä 18. Tehtyjen kokeiden mittaustulokset, lämpötilat, sekä niistä lasketut keskiarvot ja keskihajonnat on esitetty liitteessä II.

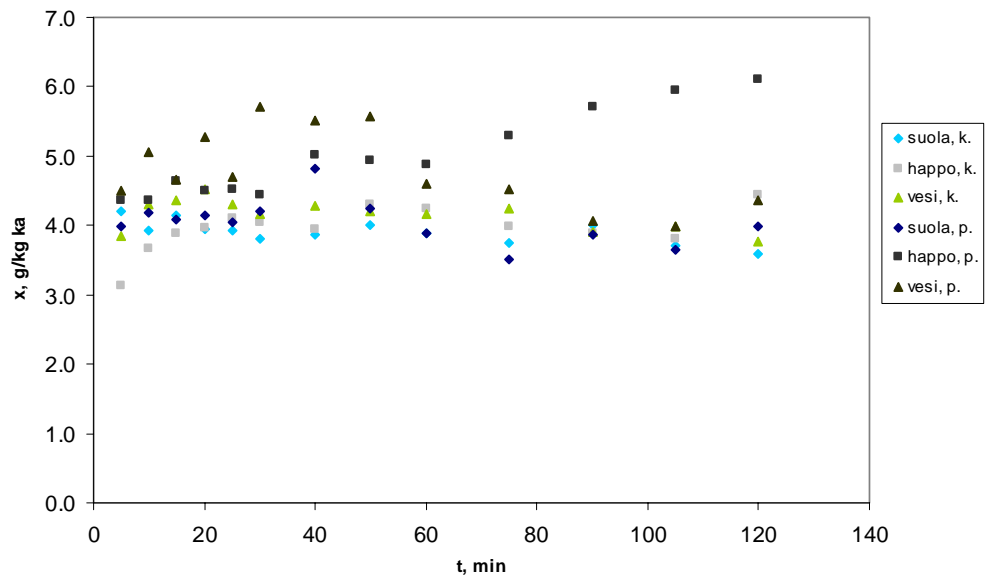
Kuvissa 8, 9 ja 10 on esitetty saadut keskiarvotulokset eri lämpötiloissa. Kuvista nähdään että 0,2 M NaCl liuoksella saannot ovat vedellä uutettuja saantoja pienempiä ja vastaavasti happamalla liuoksella on saatu suurimmat saannot kaikissa lämpötiloissa. Samoin pilkotuilla lehdillä on saatu kokonaisiin lehtiin verrattuna paremmat saannot. Tuloksista havaitaan myös, että alkulämpötilan kasvaessa eri olosuhteiden vaikutus vähenee. Alkulämpötilaltaan 40 °C vedellä paras saanto (happo ja pilkotut lehdet, noin 4g/kg_{ka}) on noin kahdeksankertainen huonoimpiin tuloksiin (suola ja vesi kokonaisilla lehdillä, noin 0,5 g/kg_{ka}.) nähden. Kun alkulämpötila nostettiin 80 °C:een, paras saanto (happo ja pilkotut lehdet, noin 6g/kg_{ka}) on noin 1,5-kertainen huonoimpiin saantoihin (suola ja kokonaiset lehdet, noin 4 g/kg_{ka}) verrattuna.



Kuva 8. Indigon saannot g/kg_{ka} . alkulämpötilaltaan $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ vedellä. Merkinnoissä 'k.' tarkoittaa kokonaisia lehtiä ja 'p.' pilkottuja lehtiä.

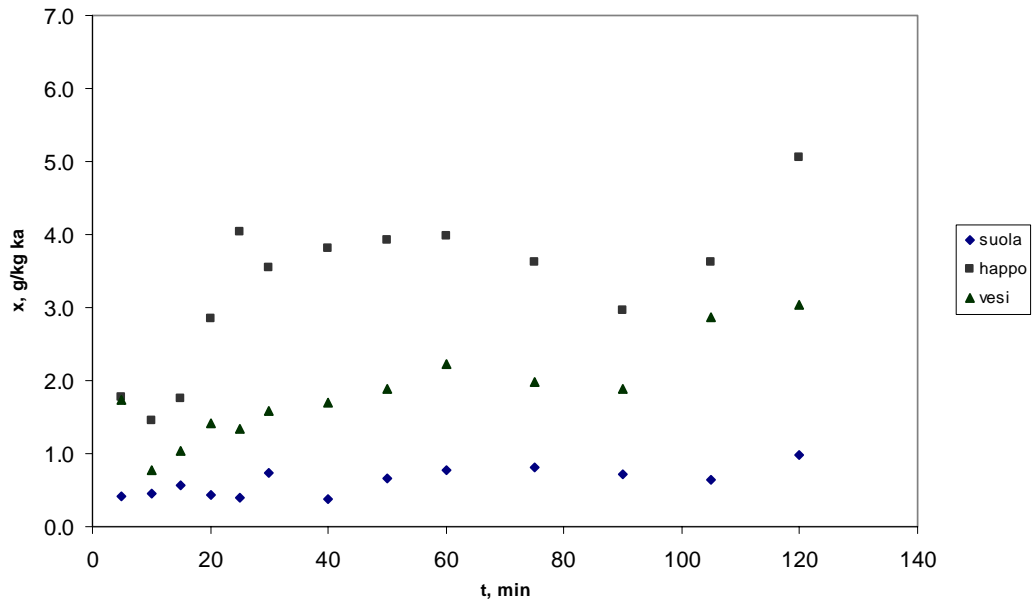


Kuva 9. Indigon saannot g/kg_{ka} . kohden alkulämpötilaltaan $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ vedellä. Merkinnoissä 'k.' tarkoittaa kokonaisia lehtiä ja 'p.' pilkottuja lehtiä.

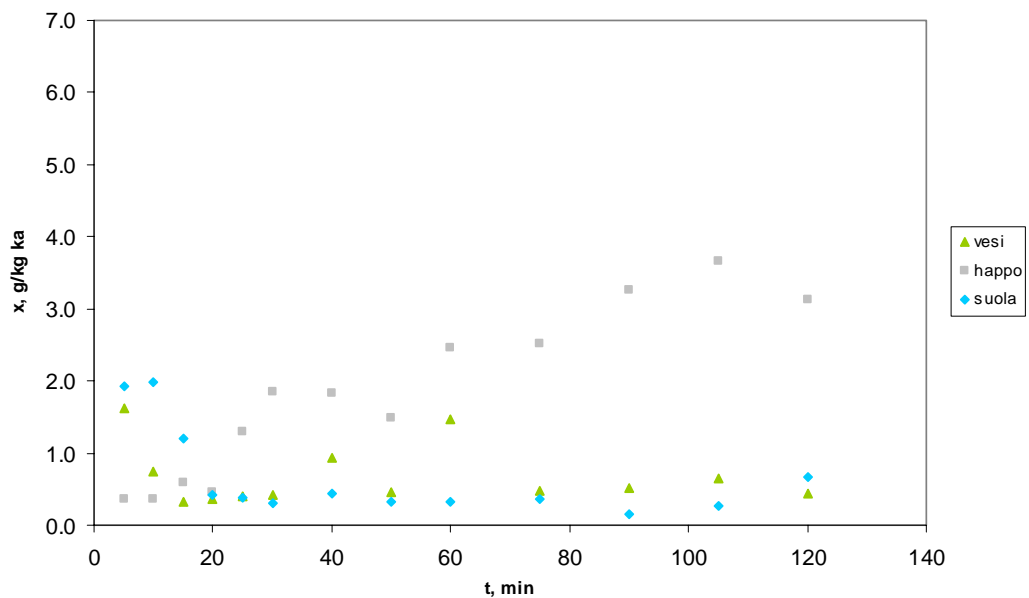


Kuva 10. Indigon saannot g/kg_{ka} alkulämpötilaltaan $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vedellä. Merkinnoissa 'k.' tarkoittaa kokonaisia lehtiä ja 'p.' pilkottuja lehtiä.

Kuvissa 11 ja 12 on esitetty alkulämpötilaltaan $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ kokeiden tulokset eriteltyinä niin, että pilkottujen ja kokonaisten lehtien tulokset ovat esitetty omissa kuvaajissaan. Tuloksista nähdään kuinka käytettäessä kokonaisia lehtiä vain happamalla liuoksella on saatu merkittävä indigon saanto, kun alkulämpötila on $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pilkotuilla lehdillä tehtyjen kokeiden tuloksista erottuu selvästi kuinka suolaliuoksella saanto on huonompi ja happamalla liuoksella parempi kuin käytettäessä puhdasta vettä.

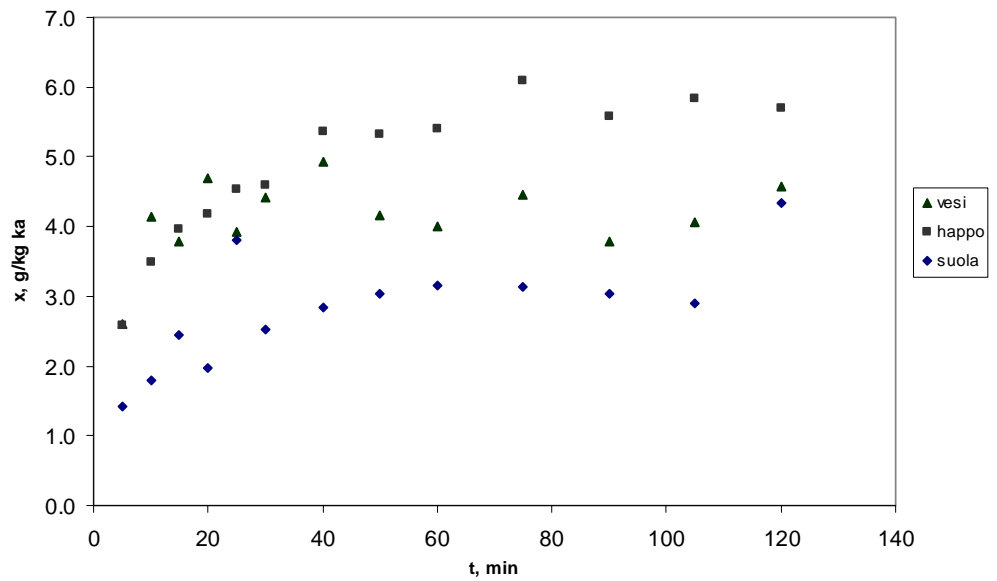


Kuva 11. Indigon saannot g/kg_{ka} käytettäessä pilkottuja morsingon lehtiä alkulämpötilassa 40 °C.

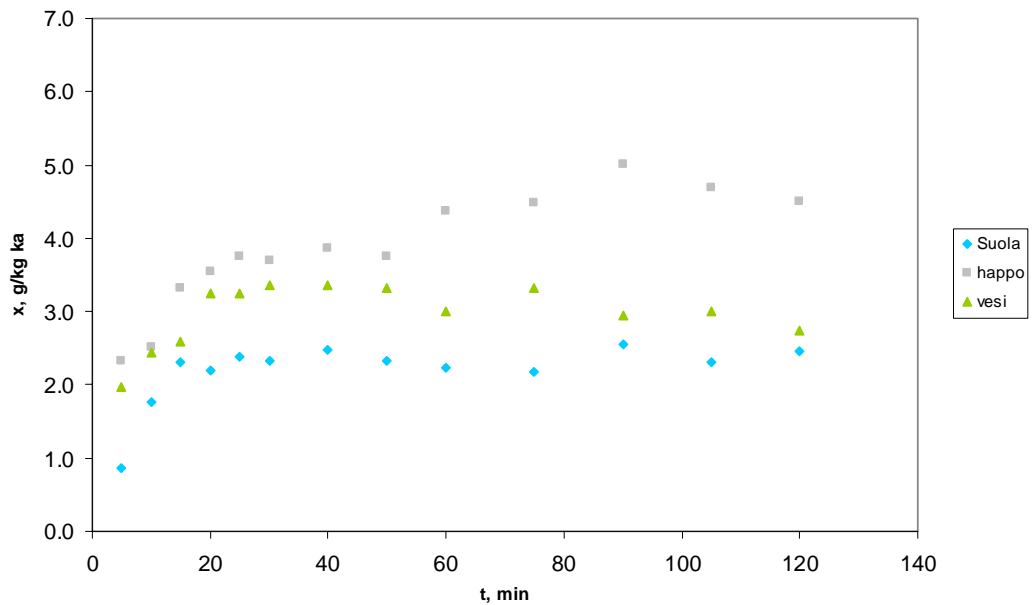


Kuva 12. Indigon saannot g/kg_{ka} käytettäessä kokonaisia morsingon lehtiä alkulämpötilassa 40 °C.

Kuvissa 13 ja 14 on tehty vastaava erottelu alkulämpötilan 60 °C kokeille, jossa nähdään vastaava järjestys.



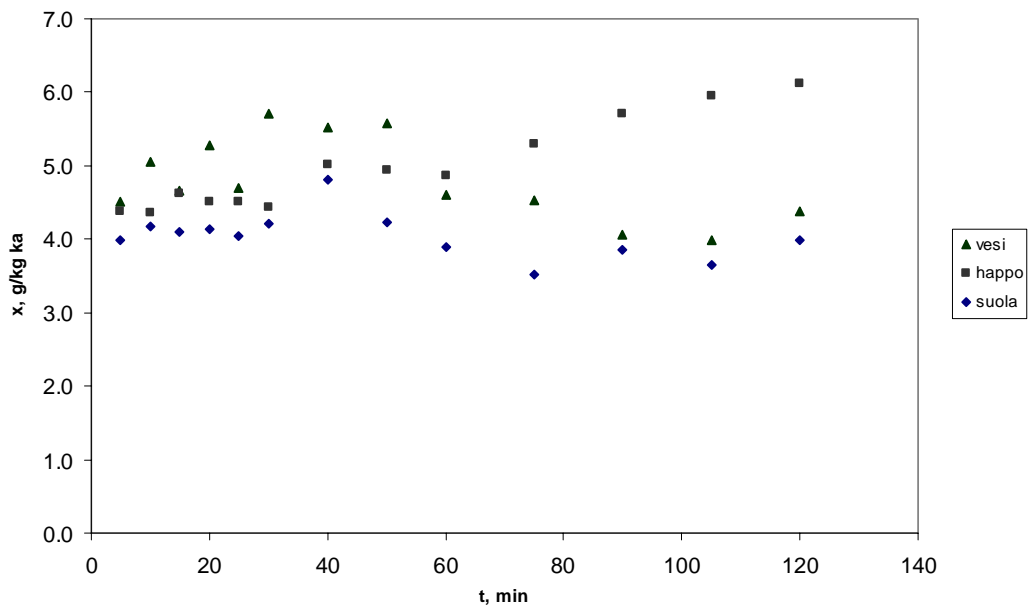
Kuva 13. Indigon saannot g/kg_{ka} käytettäessä pilkottuja morsingon lehtiä alkulämpötilassa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.



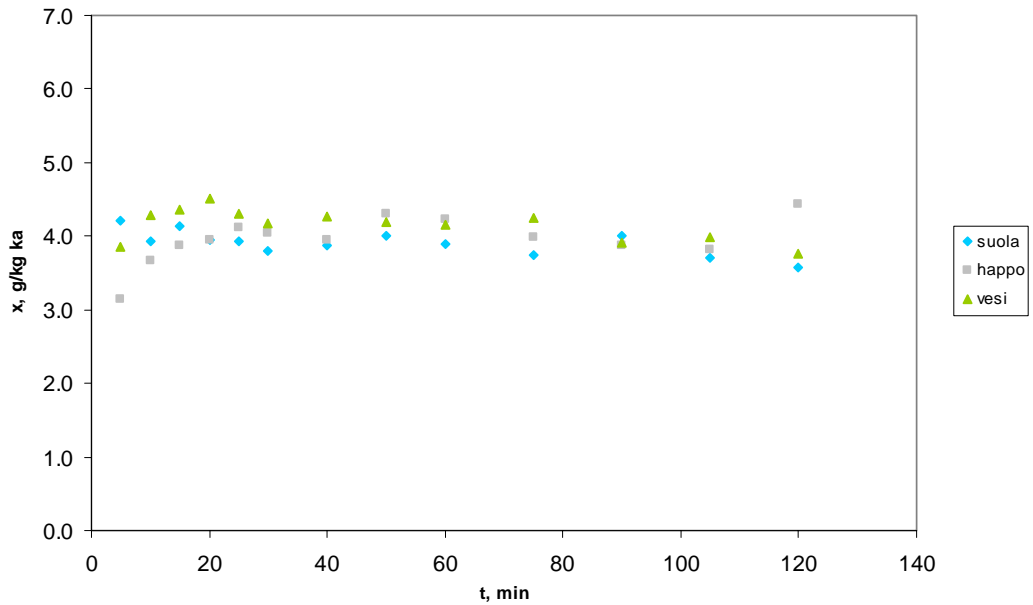
Kuva 14. Indigon saannot g/kg_{ka} käytettäessä kokonaisia morsingon lehtiä alkulämpötilassa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kuvista 15 ja 16 nähdään, että kokonaisia lehtiä käyttäessä menetelmien välillä ei ole selkeää eroa, kun alkulämpötila on $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pilkottuja lehtiä käytettäessä tuloksista nähdään mielenkiintoinen ilmiö: noin 45 minuutin kohdalla vedellä ja

suolaliuoksella uutettujen kokeiden saannot laskevat, kun taas happamalla liuoksella saanto jatkaa kasvua kokeen loppuun asti. Saannon heikkeneminen johtuu oletettavasti epätoivottujen sivureaktioiden osuuden kasvusta. Happamassa ympäristössä indoksyylimolekyylit ovat stabiilimpia, jolloin ne eivät hapetu isatiiniksi ja reagoivat keskenään toivottuun tapaan indigoksi.

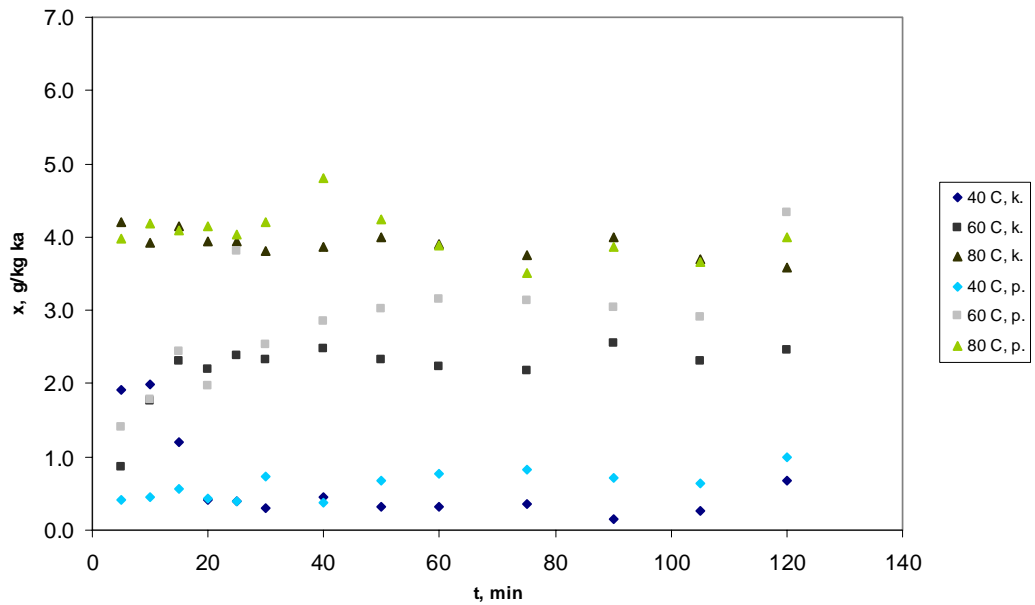


Kuva 15. Indigon saannot g/kg_{ka} käytettäessä pilkottuja morsingon lehtiä alkulämpötilassa $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

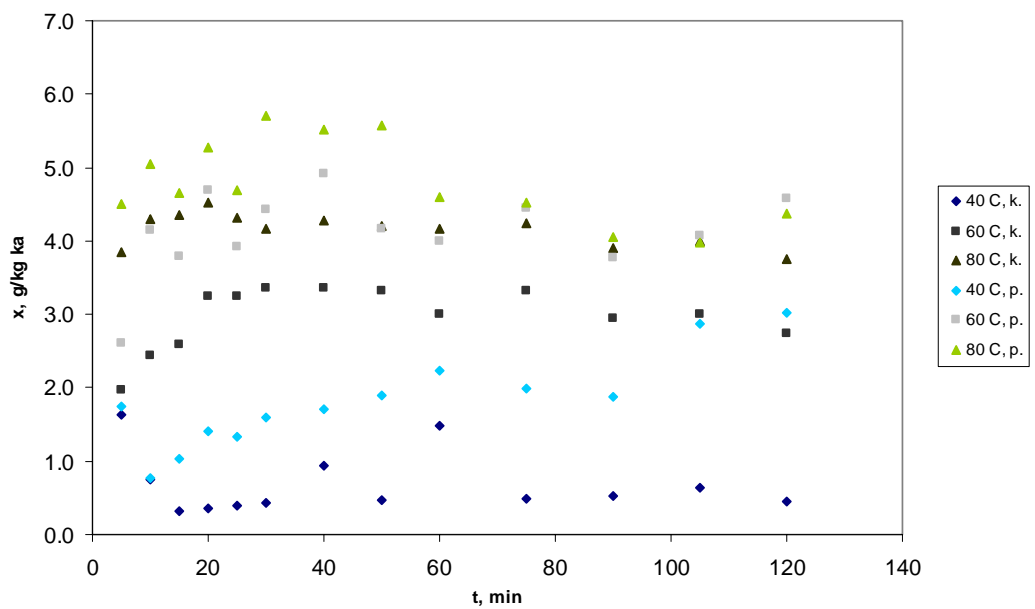


Kuva 16. Indigon saannot g/kg_{ka} käytettäessä kokonaisia morsingon lehtiä alkulämpötilassa $80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

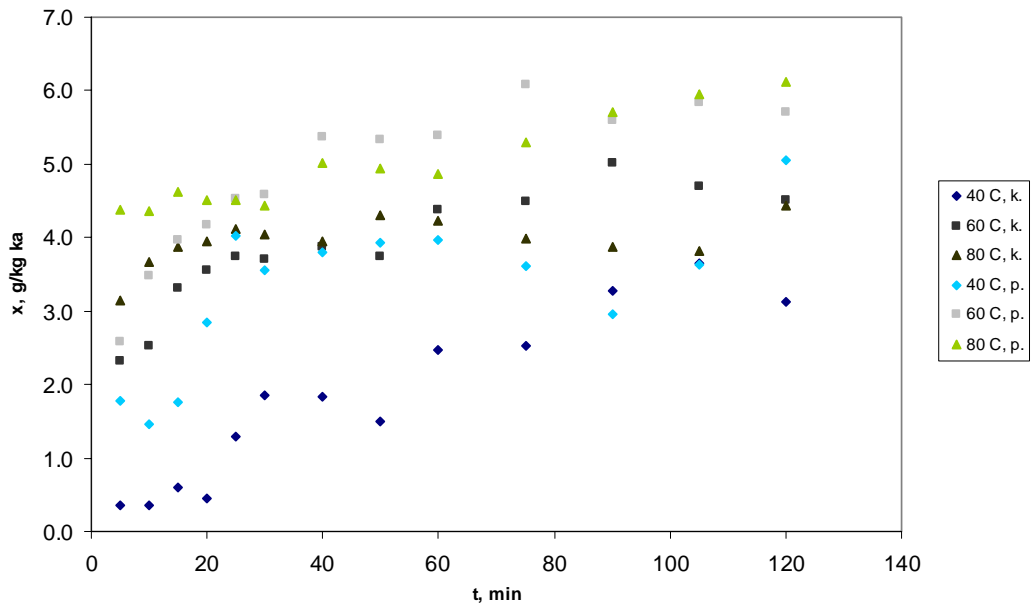
Kuvassa 17 esitetyistä suolaliuksella saaduista tuloksista nähdään hyvin alkulämpötilan noston vaikutus saantoon. Sama ilmiö on nähtävissä myös kuvissa 18 ja 19 esitetyistä vedellä ja happamalla liuksella saaduista tuloksista. Näissä kuitenkin pilkottuja lehtiä uutettaessa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ alkulämpötilalla on saatu vastaavia tuloksia kuin $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ alkulämpötilalla. On kuitenkin huomattavaa, että happamassa ympäristössä korkeammalla alkulämpötilalla saanto kasvaa nopeammin.



Kuva 17. Indigon saannot g/kg_{ka} 0,2 M NaCl-liuoksella. Merkinnoissä 'k.' tarkoittaa kokonaisia lehtiä ja 'p.' pilkottuja lehtiä.



Kuva 18. Indigon saannot g/kg_{ka} ionivaihdetulla vedellä. Merkinnoissä 'k.' tarkoittaa kokonaisia lehtiä ja 'p.' pilkottuja lehtiä.



Kuva 19. Indigon saannot g/kg_{ka} ionivaihdetulla vedellä, jonka pH on säädetty alle kahden käyttäen suolahappoa. Merkinnöissä 'k.' tarkoittaa kokonaisia lehtiä ja 'p.' pilkottuja lehtiä

Kuvien 17, 18 ja 19 tulokset eriteltyinä pilkotuille ja kokonaisille lehdille, jolloin lämpötilojen erot on selvemmin nähtävissä, on esitetty liitteessä III.

Kuvissa 20, 21 ja 22 on ensimmäisen kerranteen näytteistä etyyliasetaatin lisäämisen jälkeen otetut valokuvat. Kuvissa on sarjojen ensimmäiset ja viimeiset näytteet, eli ajanhetkiltä $t = 5\text{ min}$ ja $t = 120\text{ min}$. Näytteet on tilavuudeltaan 5 mL ja niistä on uutettu indigo 3 mL:an etyyliasetaattia.



Kuva 20. Alkulämpötila 40 °C, näytteet vasemmalta oikealle pareittain, $t = 120$ min ja $t = 5$ min: 1–2, pilkotut lehdet ja suola; 3–4, pilkotut lehdet ja happo; 5–6, pilkotut lehdet ja puhdas vesi; 7–8, kokonaiset lehdet ja happo; 9–10, kokonaiset lehdet ja suola; 11–12, kokonaiset lehdet ja puhdas vesi.



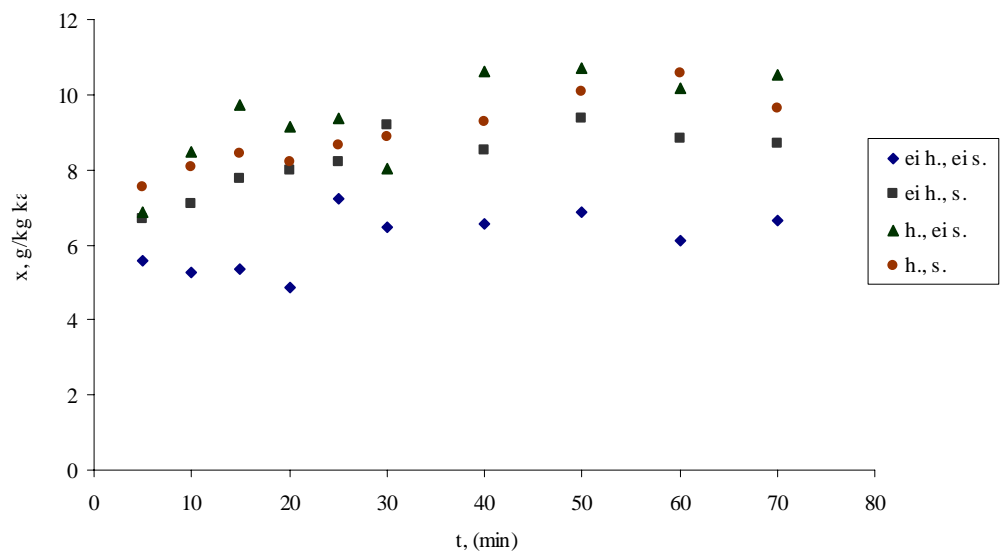
Kuva 21. Alkulämpötila 60 °C, näytteet vasemmalta oikealle pareittain, $t = 120$ min ja $t = 5$ min: 1–2, kokonaiset lehdet ja puhdas vesi; 3–4, kokonaiset lehdet ja happo; 5–6, kokonaiset lehdet ja suola; 7–8, pilkotut lehdet ja puhdas vesi; 9–10, pilkotut lehdet ja happo; 11–12, pilkotut lehdet ja suola.



Kuva 22. Alkulämpötila 80 °C, näytteet vasemmalta oikealle pareittain, $t = 120$ min ja $t = 5$ min: 1–2, pilkotut lehdet ja suola; 3–4, pilkotut lehdet ja happo; 5–6, pilkotut lehdet ja puhdas vesi; 7–8, kokonaiset lehdet ja suola; 9–10, kokonaiset lehdet ja happo; 11–12, kokonaiset lehdet ja puhdas vesi.

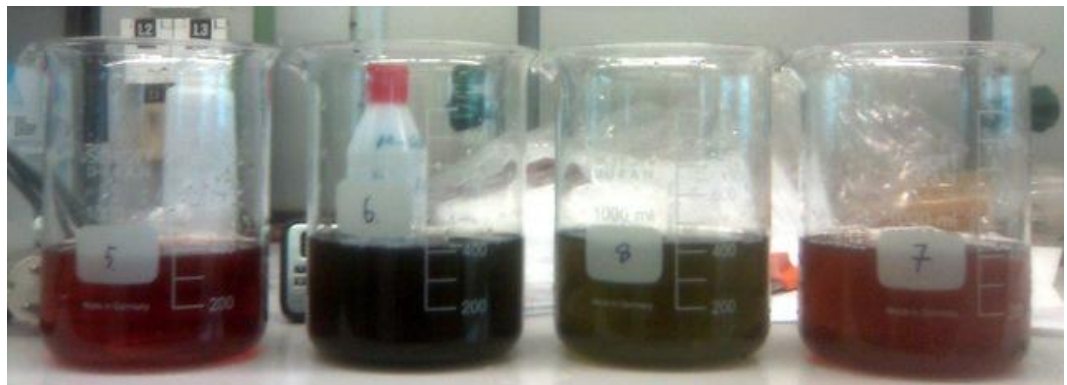
Kuvista nähdään hapon vaikutus; happoa sisältävien näytteiden vesifaasin väri on sävyltään vihreä, kun taas muissa näytteissä väri on keltaruskea. Samoin lehtien pilkkomisen vaikutus on havaittavissa paljaalla silmällä faasien voimakkaampina värisävyinä. Myös tuloksissa havaittu korkea indigosaan to happamalla liuoksella uutettaessa pilkotuista lehdistä 60 °C:ssa nähdään hyvin kuvassa 21. Osassa näytteistä on nähtävissä myös analysoinnissa hankaluuksia aiheuttanut indigon konsentroituminen faasien rajapinnalle ja taipumus kuplien muodostamiseen.

Erillisessä kokeessa tutkittiin pilkottujen lehtien sekoittamisen vaikutusta. Uuttokokeissa käytetyssä menetelmässä, jossa lehdet pidetään nestepinnan alla, on ongelmana lehtien pakkautuminen tiiviisti. Tällöin osa lehtien pinta-alasta ei toimi faasien rajapintana ja saannosta saadaan heikompi kuin mihin on mahdollisuudet. Täten saantoa voitaisiin parantaa pitämällä lehdet nestepinnan alla sekoittamalla. Kuvassa 23 on esitetty sekoituskokeiden tulokset. Sekoittaminen toteutettiin magneettisekoittajalla.



Kuva 23. Indigon saannot $\text{g/kg}_{\text{ka.}}$, kun alkulämpötilana on $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, pilkottuja lehtiä 50 g ja vettä $0,5\text{ L}$. Lyhennyksistä 'h.' tarkoittaa happoa ja 's.' sekoitusta.

Tuloksista havaitaan, että puhdasta vettä sisältävän sekoittamattoman astian saannot ovat selvästi heikommät kuin sekoitetun astian. Astioissa joihin on lisätty happoa saantojen erot on pieniä. Huomioitavaa on kuitenkin se, että puhtaalla vedellä on saavutettu sekoituksen avulla lähelle samoja tuloksia kuin happamilla liuoksilla. Eri menetelmien välillä havaittiin eroa myös visuaalisesti. Kaikissa neljässä astiassa liuos oli kokeen lopussa eriväristä. Valokuva eri liuoksista on esitetty kuvassa 24.

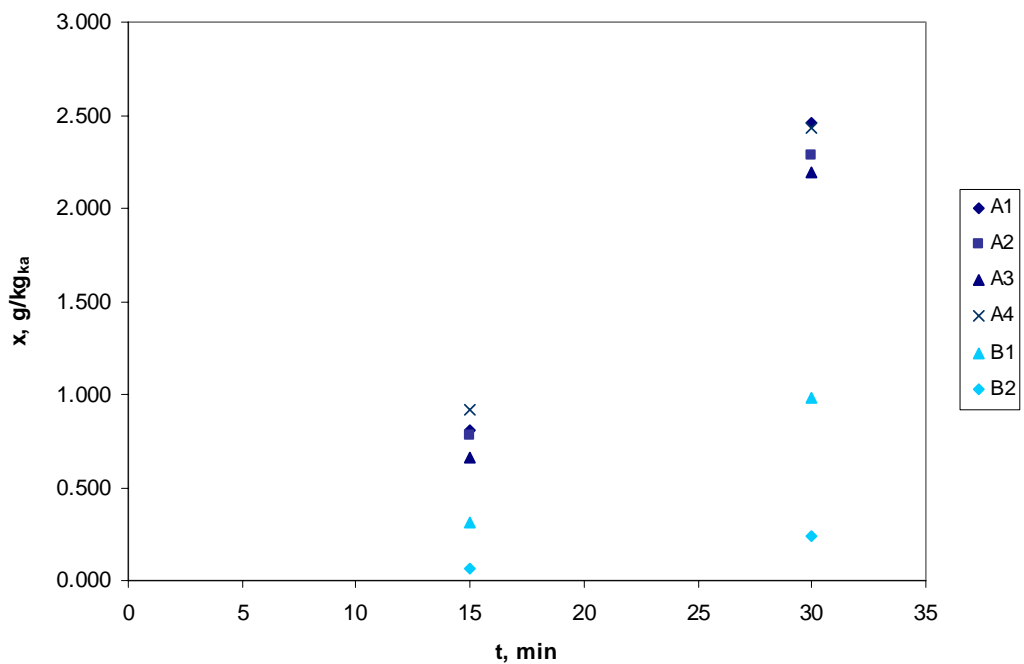


Kuva 24. Uttoliuokset lehtien poistamisen jälkeen vasemmalta oikealle: vesi sekoituksella, happo sekoituksella, happo ilman sekoitusta ja vesi ilman sekoitusta.

Happoa sisältävät liuokset olivat sinivihreitä ja pelkällä vedellä uutetut liuokset ruosteenpunaisia, sekoitettujen astioiden ollessa sävyltään voimakkaampia. Sekoituksen yhteydessä syntyvä tummempi väri johtunee indigon muodostumista liuenneen indoksyylin reagoiessa ilman hapen kanssa. Huomattavaa on myös aikaisempiin tuloksiin verrattuna korkeat saannot. Tämä voi johtua siitä, että käytetty lehtimateriaali oli hyväkuntoista. Huomioitavaa on myös se, että lehtiä oli säilytetty yön yli muovipusseissa, vaikka aiemmat tutkimukset painottavat, että morsingon lehdet tulisi käyttää mahdollisimman nopeasti sadonkorjuun jälkeen niiden sisältämien isatan-yhdisteiden nopean hajoamisen vuoksi.

11.4 Kenttäkokeet

Maatilalla otetuista näytteistä saadut tulokset on esitetty kuvassa 25. On huomattavaa, että kolmas uuttokerta tehtiin vain vedellä jonka pH oli säädetty etikalla noin neljään, koska siten saatiin parempi indigosaanto.



Kuva 25. Kenttäkokeiden saannot, A-näytteiden uuttamiseen on käytetty vettä johon on lisätty etikkaa ja B-näytteet on uutettu pelkällä vedellä.

Tuloksista nähdään selvästi korkeampi saanto uuttoliuoksen pH:n ollessa noin neljä. Saanto happamalla liuoksella on noin 3–5 kertaa pelkällä vedellä saatuun nähden. Happaman liuoksen paremmuus oli myös nähtävissä kun liuokseen johdettiin paineilmaa. Nesteen pinnalle muodostuva vaahto oli etikan avulla uutetun liuoksen tapauksessa voimakkaan indigonsinistä, pelkällä vedellä uutetun

liuoksen vaahdon ollessa vihertävää. Huomattavaa on myös se, että laboratorikokeisiin verrattaessa indigon saanto oli huomattavasti pienempi. Kokonaisilla lehdillä käyttäen puhdasta vettä samassa lämpötilassa on saatu indigon saannoksi 30 minuutin uuttoajalla noin 4 g/kg_{ka}. Tämä on yli nelinkertainen määrä kenttäkokeisiin nähden. Syyksi heikompaan saantoon voi olla sekoittamattoman uuttoliuoksen pinnasta otetun näytteen huono edustavuus ja etenkin isommalla lehtimäärällä säkkiin pakatessa syntyvät ilmataskut, jolloin kaikki lehdet eivät ole kosketuksissa veden kanssa.

12 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tulosten perusteella voidaan päätellä, että indigon saantoa kasvattaa uuttoliuoksen matala pH, lehtien pilkkominen ja sekoittaminen. Lisäksi havaitaan, että näillä menetelmillä uuttamiseen voidaan käyttää matalampaa veden lämpötilaa, kuin aiemmissa tutkimuksissa (Vuorema 2008a, Bechtold ja Mussak 2009). Natriumkloridinn lisäämisellä uuttoliuokseen havaittiin puolestaan vähentävän indigon saantoa.

Matalan pH:n vaikutus perustuu Bechtoldin ja Mussakin (2009) esittämään indoksyylin stabiloitumiseen. Tällöin indoksyyliä hapettuu vähemmän isatiiniksi. Isatiini puolestaan toimii lähtöaineena merkittävimmälle epätoivotuista sivureaktioista, jossa isatiini reagoi yhdessä indoksyylin kanssa indirubiiniksi. Stabiloituminen hidastaa myös indigon muodostumisreaktiota, jossa kaksi indoksyyliä reagoi keskenään. Täten indigoa ei pääse muodostumaan uuttoastiassa ja vältytään sen menettämiseltä lehtien poistamisen yhteydessä.

Indoksyylin stabiloinnin ohella happo edesauttaa lehtien vahapinnan ja soluseinien rikkoutumista. Kokeita tehdessä havaittiin, että happamassa liuoksessa olleet lehdet olivat kokeen lopussa menettäneet rakenteensa. Vahapinnan rikkoutuminen nopeuttaa indigon esiasteiden liukenemistä diffuusion helpottuessa Puhtaassa vedessä ja suolaliuoksessa olleet lehdet pitivät jäykän rakenteensa ja taivutettaessa murtuivat, kun taas happamassa liuoksessa olleet lehdet olivat pehmenneet, muuttuneet väriltään tummemmiksi ja puristuivat pienempään tilaan. Sama vaikutus havaittiin lämpötilan noustessa. Lisäksi lämpötilan nostaminen parantaa myös aineensiiirtoa ja liukoisuutta. Havaintojen perusteella näyttäisi siltä, että kriittinen vaihe indigon saannon kannalta on esiasteiden diffuusio lehdistä

uuttoliuokseen Bechtoldin ja Mussakin (2009) esittämän indoksyylin sivureaktioiden minimoinnin ohella.

Lehtien pilkkomisen vaikutus indigosaannon kasvuun näyttäisi perustuvan useaan tekijään. Pilkkominen kasvattaa nesteen ja kiinteän faasin välistä rajapintaa. Kokeissa havaittiin lehtien alkavan tummua reunoilta ja tämä tummuminen laajeni ajan kuluessa. Tämä viittaisi siihen, että aineensiirto on nopeampaa leikkauspinoilla joissa ei ole suojaavaa vahapintaa. Lisäksi Kokubun *et. al* (1998) esittivät, että kasvien rikkoutuessa vapautuu entsyymejä, jotka katalysoivat morsingon sisältämien isatan-yhdisteiden hajoamista indoksyyliksi. Mahdollisesti parempia tuloksia voitaisiin saada lehtien rakenteen hajottamisella silppurilla.

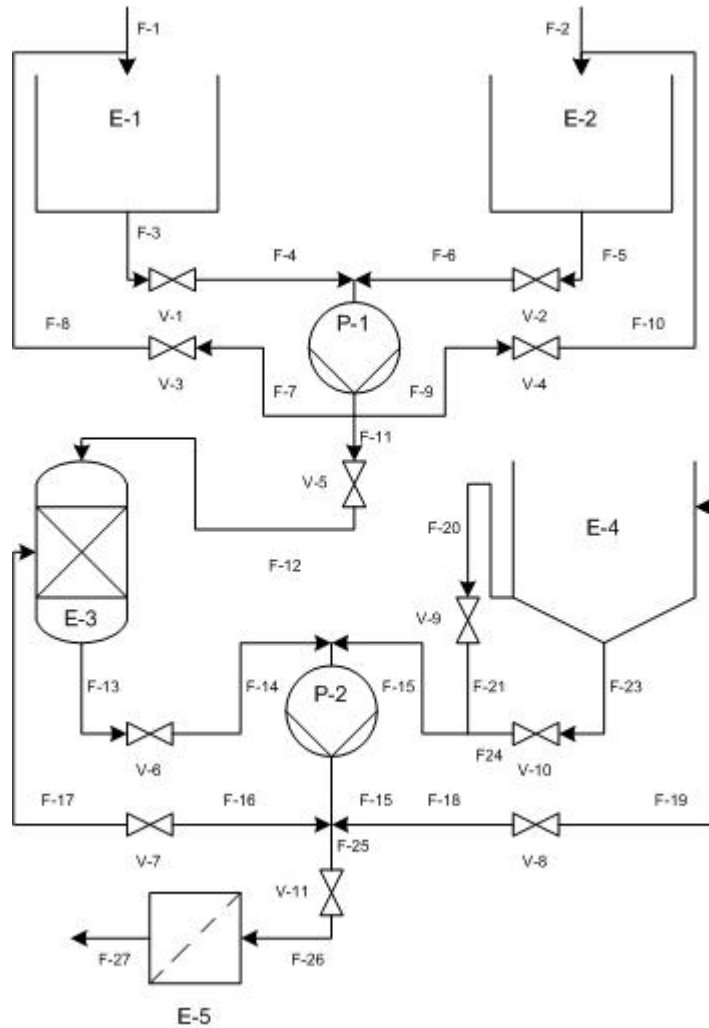
Lehtien sekoittaminen puolestaan vaikuttaa aineensiirtoon kahdella tapaa. Sekoitettuna lehdet ovat vapaasti nesteessä, jolloin lehtien pinnat ovat paremmin kosketuksissa nesteen kanssa. Painoilla nestepinnan alla pidetyt lehdet pakkaantuvat helposti tiiviiksi nipuiksi ja muodostavat ilmataskuja, jolloin osa lehtien pinta-alasta jää hyödyntämättä aineensiirtopintana. Toinen liukenemistä parantava tekijä on yksinkertaisesti nesteen liike. Sekoituksen synnyttämät turbulenssit parantavat aineensiirtoa.

Suolaliuos otettiin mukaan kokeisiin esikokeiden perusteella. On huomattavaa, että taulukossa VII esitetyissä kokeissa suolaliuksella saatu korkea saanto johtuu erilaisesta suodatinpaperista. Kuitenkin visuaalisesti tarkastelemalla saanto vaikutti hyvältä. Uuttokokeiden perusteella kuitenkin havaittiin, että suolaliuksella saatiin puhdasta vettä matalammat saannot. Kuvissa 20–22 esitetyissä valokuvissa nähdään, että paitsi indigon sisältävä sininen etyyliasettaattifaasi, niin myös keltaruskea vesifaasi on väriltään vaaleampi kuin vastaavat puhtaalla vedellä uutetut näytteet. Voidaankin olettaa, että lehden sisältämät yhdisteet liukenivat heikommin, koska käytettyyn uuttoveteen oli jo liuennut natriumkloridia ja siten konsentraatioero lehden ja nesteen välillä oli pienempi. Tämän perusteella uuttamiseen käytettävän veden tulisi olla mahdollisimman puhdasta ja voidaan olettaa, että esimerkiksi veden kovuudella voi olla samansuuntaisia vaikutuksia.

Vertaaminen aikaisempien tutkimusten tuloksiin on hankalaa, sillä taulukossa IV esitetyt arvot ovat pääosin ilmoitettu suhteutettuna lehtien tuorepainoon. Kuten määritetyistä kuiva-ainepitoisuuksista, joiden välillä oli lähes 40 m-% eroja, huomataan, voivat ne vaihdella hyvin paljon riippuen kasvuolosuhteista. Lisäksi indigomäärän tarkka analysoiminen on hankalaa. Vuoreman (2008a) aiemmissa MTT:llä tekemissä kokeissa, joissa uuttolämpötila oli noin 80 °C ja uuttoaika 10 minuuttia, on saatu noin 4–5 g/kg_{ka} saantoja. Tässä tutkimuksessa pidemmällä uuttoajalla ja happamalla liuoksella pilkotuista lehdistä saadut noin 6 g/kg_{ka} saannot ovat siis hyvin merkittäviä. Olosuhteiden optimoimisella voidaan siis selvästi parantaa indigon saantoa. Tämä todistettiin myös käytännössä maatilalla tehdyissä kokeissa.

Jatkotutkimuksissa tulisi tutkia edelleen pH:n lämpötilan ja sekoittamisen vaikutusta niin, että löydettäisiin taloudellisesti järkevin menetelmä. Lisäksi tulisi tutkia lehtien esikäsittelemistä silppurilla. Hapon käyttö uuttoliuoksessa havaittiin hyödylliseksi, mutta sen käytön esteenä voi olla sen hinta ja saatavuus. Maatilaympäristössä tosin aiv-rehun säilöntään käytettävän hapon käyttäminen voisi olla hyvä mahdollisuus. Sekoituksen avulla saatiin vedellä lähes sama saanto happoa sisältävien liuosten kanssa. Hapolla on kuitenkin tärkeä vaikutus sen indoksyylä stabiloivan vaikutuksen vuoksi, jolloin sivureaktioiden osuutta saadaan vähennetyksi. Veden lämpötila ja määrä tulisi pitää mahdollisimman pieninä. Peltomittakaavassa tarvittavien vesimäärien ollessa kuutiometriluokkaa, saadaan näin merkittäviä säästöjä. Sekoittamisen intensiteetin ohella tulisi myös tutkia useamman peräkkäisen uuttoaskeleen käyttämistä eli käytännössä useampaa lehdillä täytettyä sekoitussäiliötä joissa sama uuttoliuos virtaa kaikkien säiliöiden lävitse. Tällä menetelmällä voitaisiin vähentää prosessissa tarvittavan veden määrää ja samalla käsitellä enemmän lehtimateriaalia kerralla.

Jatkotutkimuksia varten tarvitaan laitteisto joka mahdollistaa sekoittamisen ja uuttoliuoksen kierrättämisen useamman säiliön lävitse. Tehtyjen kokeiden perusteella tämän työn tekijä suunnitteli panostoimisen pilot-laitteiston, jonka virtauskaavio on esitetty kuvassa 26.



Kuva 26. Pilot-mittakaavan koelaitteiston ehdotettu virtauskaavio prosessille, jossa indigoa tuotetaan morsingon lehdistä uuttamalla eristetyistä indigon esiasteista.

Laitteisto on suunniteltu niin, että kerralla voitaisiin uutaa enimmillään kaksi kiloa lehtiä viidellä litralla uuttoliuosta. Lehdet syötetään säiliöihin E-1 ja E-2. Säiliöt ovat tilavuudeltaan kymmenen litran suljettavia sekoitussäiliöitä. Uuttoliuos lisätään säiliöön E-1, josta se voidaan pumpulla P-1 pumpata säiliöön E-2. Näin pystytään toteuttamaan uuttaminen kahdessa peräkkäisessä askeleessa. Sulkemalla kierto venttiileillä V-1 ja V-2, voidaan askeleita lisätä vaihtamalla jo käsitellyt lehdet tuoreisiin.

Sekoitussäiliöiden sisällä tulisi olla irrotettavat hiukan säiliöitä pienemmät samanmuotoiset verkkohäkit, jotta lehdet voidaan poistaa helposti uuttamisen jälkeen. Poistoputki tulee olla suojattu tiheällä verkolla, jotta lehtien mukana tulevat roskat eivät pääse prosessiin.

E-3 on tilavuudeltaan noin 25 litran korkea välisäiliö jossa uuttoaastioista tulevaan liuokseen lisätään emäs. Liuosta voidaan kierrättää pohjaventtiilin kautta spraysuuttimen läpi suihkuna takaisin säiliöön, jolloin liuokseen saadaan sekoitetuksi ilmaa. Halutun ilmausajan jälkeen liuos pumpataan noin 15 litran selkeytys säiliöön E-4, jossa liuoksen annetaan selkeytyä. Indigon vajotessa pohjalle pinnalle jäävä liuos voidaan poistaa sivuventtiilin kautta. Pohjalle jäävä indigoliete voidaan pumpata suodatuslaitteistoon E-5. Suodatukseen voidaan testata erilaisia menetelmiä. Ristivirtasuodatus mikrosuodattimella olisi kuitenkin suositeltava menetelmä. Suodatus voidaan myös jättää pois ja esimerkiksi varastoida indigoliete suodatinkangaspohjaisiin kehikoihin, joissa se voisi suodattua painovoiman avulla pitemmän ajan kuluessa.

Laitteisto on suunniteltu niin, että siinä on mahdollisimman vähän eri laitteita kustannusten minimoimiseksi. Mahdollisuuksien mukaan pumppuja voidaan lisätä. Materiaalien tulisi olla haponkestäviä, joten esimerkiksi PVC tai lujitemuovi olisi hyviä materiaaleja. Pumpuiksi sopivia olisivat letkupumput, sillä niissä pumpun osien ei tarvitse olla haponkestäviä, jolloin säästetään kustannuksissa. Säiliöissä E-1, E-2 ja E-3 tulee olla mahdollisuus näytteenottoon ja lämpötilan ja pH:n mittaamiseen.

13 YHTEENVETO

Tutkimuksen tavoitteena oli löytää indigon saantoa parantavat olosuhteet tuottaessa indigoa uuttamalla esiasteet morsingon lehdistä vedellä. Tutkituista menetelmistä indigon saantoon vaikuttivat positiivisesti pH:n laskeminen, morsingon lehtien pilkkominen ja uuttoliuoksen sekoittaminen. Uuttoliuoksen lämpötilan kasvattaminen paransi saantoa, mutta sen vaikutuksen havaittiin olevan aiempiin tutkimuksiin verrattuna pienempi ja parhaat saannot saatiin matalammassa lämpötilassa. Uuttoliuoksen suolapitoisuuden havaittiin vaikuttavan indigon saantoon negatiivisesti. Laboratoriokokeiden perusteella havaittu pH:n laskemisen vaikutus indigon saantoon todistettiin myös kenttäolosuhteissa. Kehitetyillä menetelmillä saatiin aiempiin MTT:llä tehtyihin kokeisiin verrattuna 1,5-kertainen indigon saanto.

Kokeiden havaintojen perusteella esitettiin olosuhteiden indigosaantoa parantavien vaikutusten johtuvan kahdesta tekijästä: indoksyylin stabiloitumisesta

happamassa ympäristössä, jolloin sivureaktioiden osuus vähenee ja aineensiirron paranemisella sekoituksen, lehtien koon ja etenkin lehtien vahakerroksen rikkomisella kuumen veden ja hapon vaikutuksella.

Tulosten pohjalta esitettiin ehdotuksia jatkotutkimuksiin ja suunnitelma koelaitteistoksi, jota voidaan myös käyttää pohjana kehitettäessä mahdollista laitteistoa laajempaan tuotantoon.

LÄHDELUETTELO

Agriturismo La Campana, internet-sivu, <http://www.lacampana.it>, käytetty 21.6.2010.

Angelini, L.G., Tozzi, S., Di Nasso, N. Nassi O., Environmental Factors Affecting Productivity, Indican Content, and Indigo Yield in *Polygonum tinctorinum* Ait., a Subtropical Crop Grown under Temperate Conditions, *J. Agric. Food Chem.* **52**(2004), 7541-7547.

Angelini, L.G., Tozzi, S., Di Nasso, N. Nassi O., Differences in leaf yield and indigo precursors production in woad (*Isatis tinctoria* L.) and Chinese woad (*Isatis indigotica* Fort.) genotypes, *Field Crops Research* **101**(2007), 285–295.

Balfour-Paul, J., *Indigo*, British museum press, Lontoo 1998.

Bechtold, T., Turcanu, A., Geissler, S., Ganglberger, E., Process balance and product quality in the production of natural indigo from *Polugonum tinctorium* Ait. applying low-technology methods, *Bioresource Technology* **81**(2002), 171-177.

Bechtold, T., Mussak, R., *Handbook of Natural Colorants*, John Wiley ja Sons, Ltd., Wiltshire 2009.

Benitez, J., *Principles and modern applications of mass transfer operations*, Wiley interscience, 2009.

Bleu Pastel de Lecture, internet-sivu, <http://www.bleu-de-lecture.com>, käytetty 21.6.2010.

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo, A., Gübitz, G.M., Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*, *Journal of Biotechnology* **89**(2001), 131-139.

Campeol, E., Angelini, L. G., Tozzi, S., Bertolacci, M., Seasonal variation of indigo precursors in *Isatis tinctoria* L. and *Polygonum tinctorium* Ait. as affected by water deficit, *Environmental and Experimental Botany* **58**(2006), 223-233.

Epstein, E., Nabors, M. W., Stowe, B. B., The origin of indigo in woad, *Nature* **216**(1967), 547-549.

Garcia-Macias, P., John, P., Formation of natural indigo derived from woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity, *J. Agric. Food Chem.* **52**(2004), 7891-7896.

Gilbert, K.G., Cooke, D.T., Dyes from plants: Past usage, present understanding and potential, *Plant growth regulation* **34**(2001), 57-69.

Gilbert, K.G., Maule, H.G., Rudolph, B., Lewis, M., Vandenburg, H., Sales, E., Tozzi, S., Cooke D.T., Quantitative analysis of indigo and indigo precursors in leaves of *Isatis* spp. and *Polygonum tinctorium*, *Biotechnol. Prog.*, **20**(2004), 1289-1292.

Govaert, F., Temmerman, E., Kiekens, P., Development of voltammetric sensors for the determination of sodium dithionite and indanthrene/indigo dyes in alkaline solutions, *Anal. Chim. Acta* **385**(1997), 307–314 .

Green, D.W., Perry, R.H., *Perry's chemical engineering handbook*, 8th ed., McGraw-Hill, 1997, Chapter 18.

Indigofera Jeans, internet-sivu, <http://www.indigoferajeans.com/>, käytetty 8.10.2010.

Keskitalo, M., Hakala, K., Peltonen, S., Harmoinen, T., *Erikoiskasvien viljely, Tieto tuottamaan 118*, Otava, Keuruu 2007, 56–59.

Keskitalo, Marjo, MTT, *suullinen tiedonanto*, 2010.

Kokubun, T., Edmonds, J., John, P., Indoxyl derivatives in woad in relation to medieval indigo production, *Phytochemistry* **49**(1998), 79-87.

Mata-Alvarez, J., *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes*, IWA Publishing 2002.

Maugard, T., Enaud, E., Choisy, P., Dominique Legoy, M., Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (woad), *Phytochemistry* **58**(2001), 897-904.

McCabe, W.L., Smith, J.C., *Unit operations of chemical engineering*, 3rd ed., McGraw-Hill, Tokio 1976.

Miller, D., *Indigo, From Seed to Dye*, 5. painos, Indigo press, Santa Cruz 1999.

Mäkinen, T., Väritattaren viljely ja indigon eristys, Opinnäytetyö, Laurea-ammattikorkeakoulu, Hyvinkää 2003.

Oberthür, C., Graf, H., Hamburger, M., The content of indigo precursors in *Isatis tinctoria* leaves – a comparative study of selected accessions and post-harvest treatments, *Phytochemistry* **65**(2004), 3261–3268.

Oberthür, C., Schneider, B., Graf, H., Hamburger, M., The Elusive indigo precursors in woad (*Isatis tinctoria* L.) – Identification of the major indigor precursor, Isatan A, and structure revision of isatan B, *Chemistry ja Biodiversity* **1**(2004), 174-182.

Perkin, A., Everest, A., *The Natural Organic Colouring Matters*, Longmans Green and Co., Lontoo 1918.

Plowright, C., On woad as a prehistoric pigment, *Journal of the Royal Horticultural Society* **26**(1901).

Rajala, J., *Luonnonmukainen maatalous*, Helsingin yliopiston Maaseudun tutkimus- ja koulutuskeskuksen julkaisuja 38, Mikkeli 1995.

Rosner, W., Prepn. of technically pure indigo from fresh plant material – by opening up cells, dissolving indigo precursors, removing plant components,

fermenting to give indigotin and sep. indigotin, Patent No. DE4211719, October 14, 1993.

Spindigo, year 3 Project progress summary 2004,
<http://www.spindigo.net/SPINDIGO%20Third%20Year%20Report.pdf>.

Spindigo-projektin internet-sivu, <http://www.spindigo.net>, käytetty 22.6.2010 .

Stoker, K.G., Cooke, D.T., Hill, D.J., An Improved method for the large-scale processing of woad (*Isatis tinctoria*) for possible commercial production of woad indigo, *J. agric. Engng Res.* **71**(1998), 315-320.

Sundquist, J., *Tekstiilikemian historiaa – Vanha luonnonaine-värjäys*, Satakunnan painotalo Oy, Kokemäki 1982.

Viljanen, K., Lämpötilan vaikutus indigon uuttumiseen värimorsingon (*Isatis tinctoria*) lehdistä, Opinnäytetyö, Pirkanmaan ammattikorkeakoulu, Pirkanmaa 2004.

Vuorema, A., Reduction and analysis methods of indigo, Ph.D. dissertation, Turun yliopisto, Turku 2008.

Vuorema, A., John, P., Keskitalo, M. Kulandainathan, M.A., Marken, F., Electrochemical and sonoelctrochemical monitoring of indigo reduction by glucose, *Dyes and Pigments* **76**(2008), 542–549.

Whatman, Quantitative Filter Papers,
<http://www.whatman.com/QuantitativeFilterPapersAshlessGrades.aspx>, käytetty 24.9.2010.

Woad Inc., internet-sivu, <http://www.woad-inc.co.uk>, käytetty 21.6.2010.

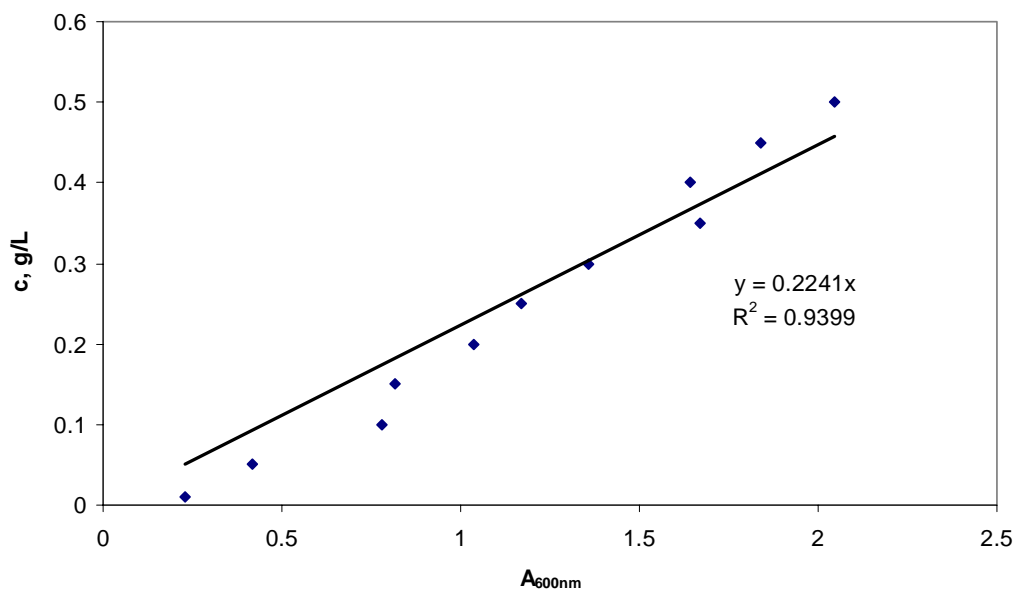
YaraMilla Pellon Y 1 lannoitteen kosstumustiedot,
http://www.yara.fi/fertilizer/products/arable_farming/yaramila_pellon_y1.aspx,
käytetty 28.9.2010.

LIITE I

Spektrofotometrin standardisuora

Taulukko I. Standardiliuoksen pitoisuudet grammoina indigoa litraa etyyli-asetaattia kohden ja absorbanssit mitattuna spektrofotometrillä aallonpituudella 600 nm.

c, g/L	A _{600nm}
0,01	0,23
0,05	0,418
0,1	0,779
0,15	0,816
0,2	1,035
0,25	1,168
0,3	1,359
0,35	1,671
0,4	1,644
0,45	1,838
0,5	2,046

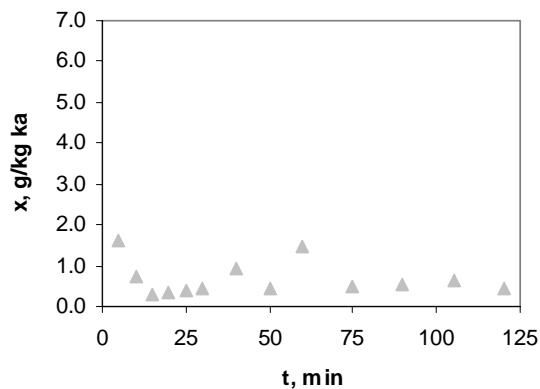


Kuva 1. Standardiliuoksesta mitattuihin pitoisuuksiin sovitettu standardisuora, sen yhtälö ja regressiokerroin.

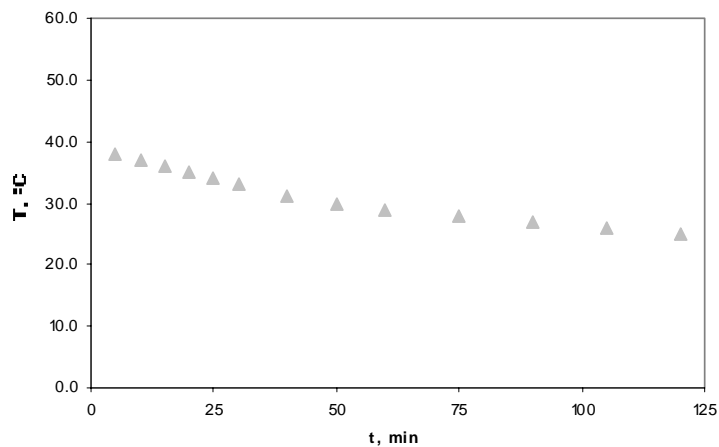
LIITE II**Uuttokokeiden pitoisuudet ja lämpötilat, sekä niiden keskiarvot ja keskihajonnat.**

Taulukko I. Pitoisuudet ja lämpötilat kun koemuuttujina: alku-lämpötila 40 °C, puhdas vesi ja kokonaiset lehdet.

$x, \text{g/kg}_{\text{ka}}$	$T, ^\circ\text{C}$
1,630	38,0
0,744	37,0
0,315	36,0
0,360	35,0
0,401	34,0
0,428	33,0
0,934	31,0
0,464	30,0
1,475	29,0
0,481	28,0
0,520	27,0
0,642	26,0
0,445	25,0



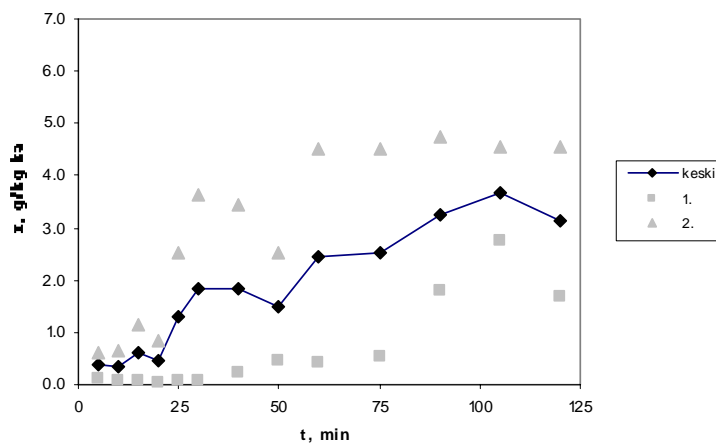
Kuva 1. Taulukossa esitetyn kokeen saannot.



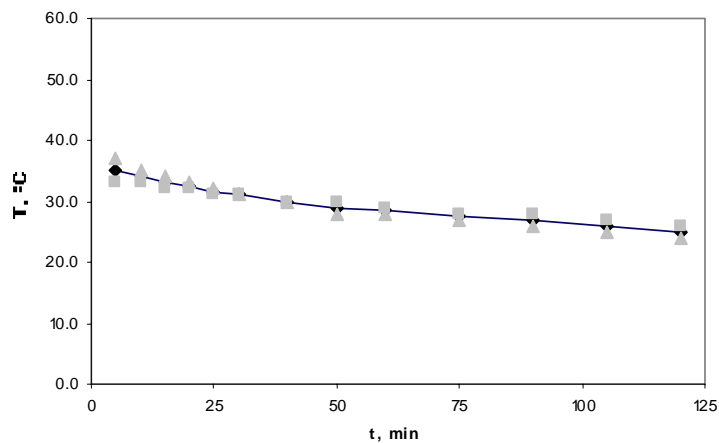
Kuva 2. Taulukossa esitetystä kokeesta mitatut lämpötilat.

Taulukko II. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keski-hajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 40 °C, hapan liuos ja kokonaiset lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
0,363	0,367	35,0	2,8
0,359	0,397	34,0	1,4
0,600	0,760	33,0	1,4
0,452	0,564	32,5	0,7
1,293	1,721	31,5	0,7
1,851	2,525	31,0	0,0
1,838	2,278	30,0	0,0
1,491	1,466	29,0	1,4
2,463	2,892	28,5	0,7
2,520	2,807	27,5	0,7
3,267	2,071	27,0	1,4
3,654	1,248	26,0	1,4
3,120	2,019	25,0	1,4



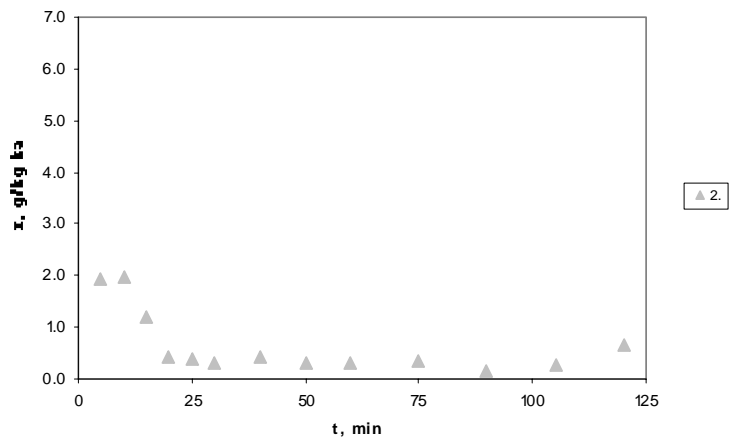
Kuva 3. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



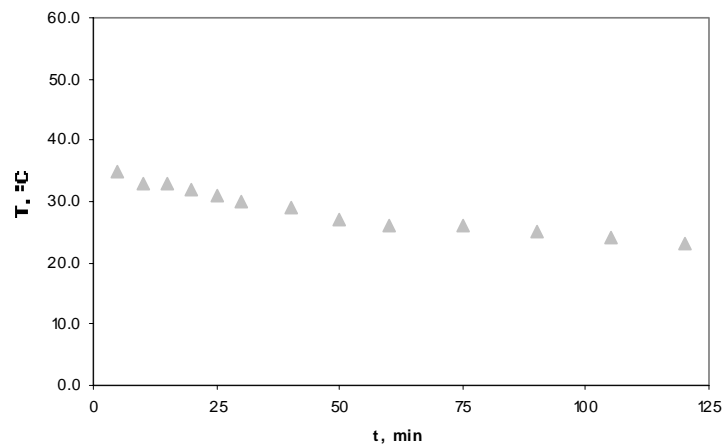
Kuva 4. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko III. Pitoisuudet ja lämpötilat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 40 °C, suolaliuos ja kokonaiset lehdet.

$x, \text{g/kg}_{\text{ka}}$	$T, \text{°C}$
1,917	35,0
1,988	33,0
1,194	33,0
0,414	32,0
0,390	31,0
0,306	30,0
0,442	29,0
0,322	27,0
0,328	26,0
0,359	26,0
0,151	25,0
0,265	24,0
0,667	23,0



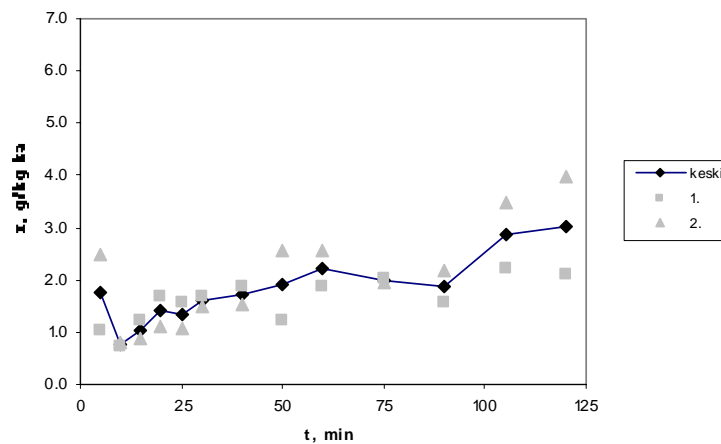
Kuva 5. Taulukossa esitetyn kokeen saannot.



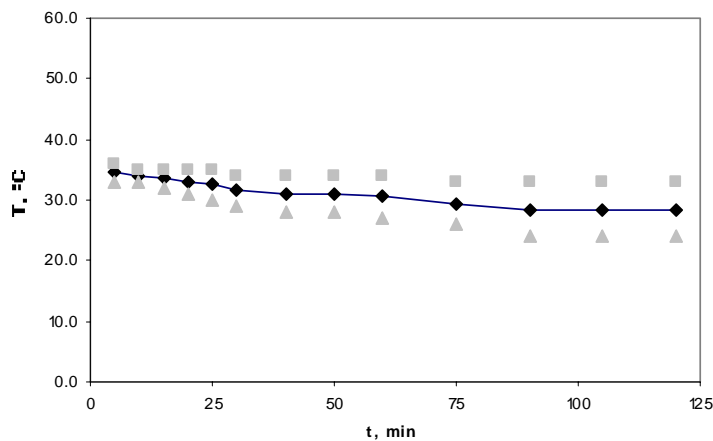
Kuva 6. Taulukossa esitetystä kokeesta mitatut lämpötilat.

Taulukko IV. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 40 °C, puhdas vesi ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
1,744	1,026	34,5	2,1
0,771	0,060	34,0	1,4
1,039	0,243	33,5	2,1
1,408	0,403	33,0	2,8
1,333	0,349	32,5	3,5
1,589	0,158	31,5	3,5
1,707	0,260	31,0	4,2
1,894	0,936	31,0	4,2
2,226	0,485	30,5	4,9
1,983	0,046	29,5	4,9
1,878	0,429	28,5	6,4
2,864	0,889	28,5	6,4
3,031	1,333	28,5	6,4



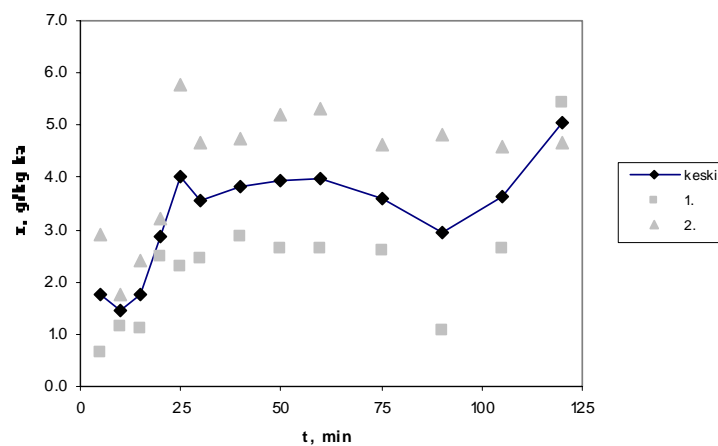
Kuva 7. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



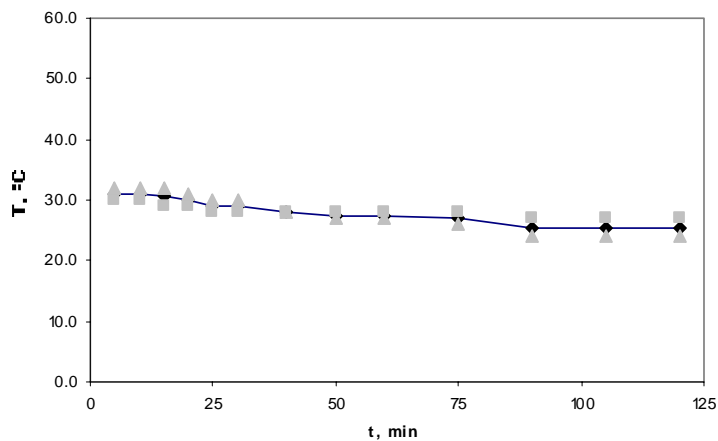
Kuva 8. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko V. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 40 °C, hapan liuos ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
1,778	1,620	31,0	1,4
1,460	0,418	31,0	1,4
1,754	0,912	30,5	2,1
2,850	0,518	30,0	1,4
4,033	2,469	29,0	1,4
3,549	1,579	29,0	1,4
3,807	1,342	28,0	0,0
3,932	1,803	27,5	0,7
3,974	1,877	27,5	0,7
3,614	1,459	27,0	1,4
2,955	2,643	25,5	2,1
3,629	1,374	25,5	2,1
5,054	0,542	25,5	2,1



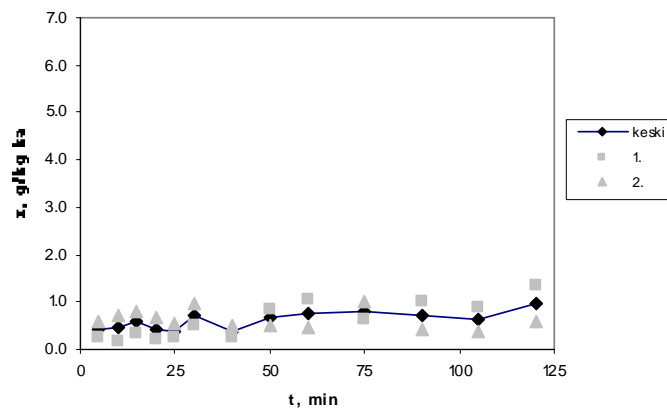
Kuva 9. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



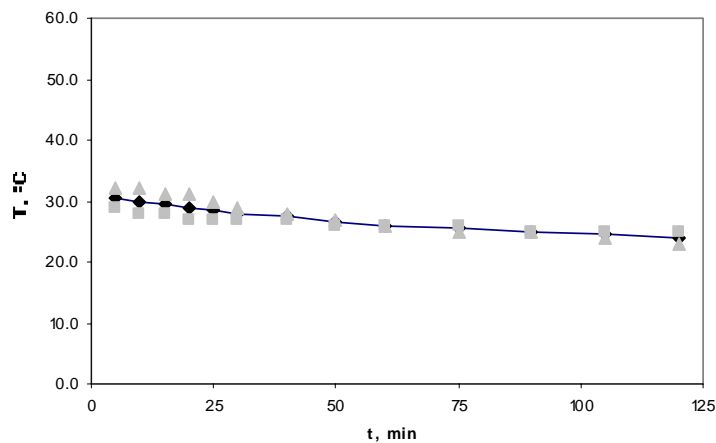
Kuva 10. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko VI. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 40 °C, suolaliuos ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
0,421	0,252	30,5	2,1
0,453	0,378	30,0	2,8
0,569	0,326	29,5	2,1
0,439	0,336	29,0	2,8
0,392	0,206	28,5	2,1
0,732	0,318	28,0	1,4
0,372	0,197	27,5	0,7
0,667	0,234	26,5	0,7
0,767	0,414	26,0	0,0
0,820	0,250	25,5	0,7
0,713	0,439	25,0	0,0
0,642	0,374	24,5	0,7
0,986	0,537	24,0	1,4



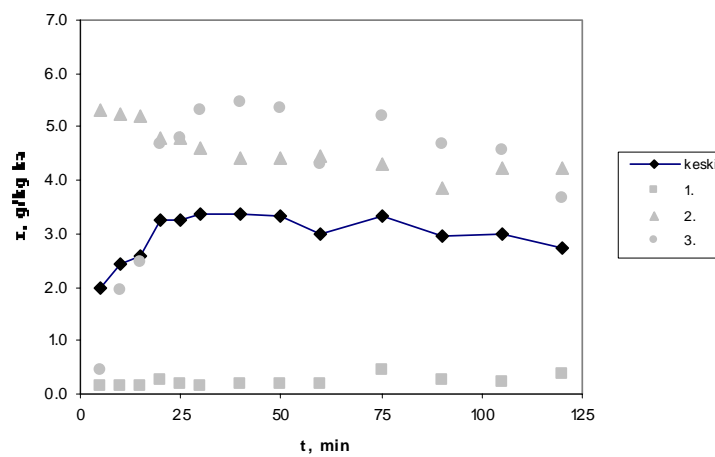
Kuva 11. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



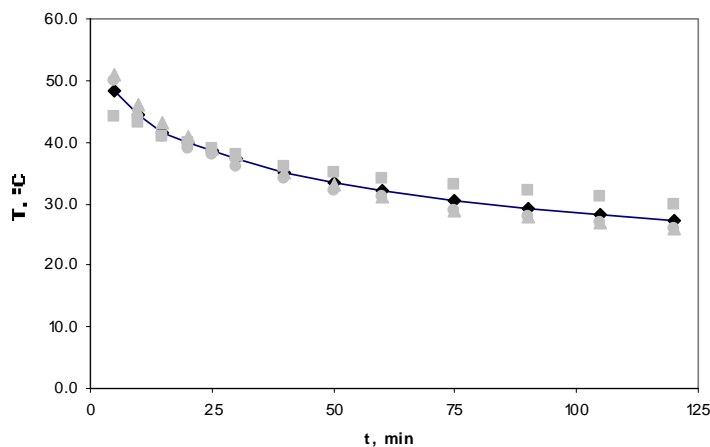
Kuva 12. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko VII. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 60 °C, puhdas vesi ja kokonaiset lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
1,973	2,893	48,3	3,8
2,442	2,587	44,3	1,5
2,595	2,532	41,7	1,2
3,254	2,590	40,0	1,0
3,251	2,643	38,7	0,6
3,365	2,794	37,3	1,2
3,366	2,807	35,0	1,0
3,323	2,749	33,3	1,5
2,995	2,417	32,0	1,7
3,327	2,535	30,3	2,3
2,941	2,354	29,3	2,3
3,006	2,399	28,3	2,3
2,747	2,082	27,3	2,3



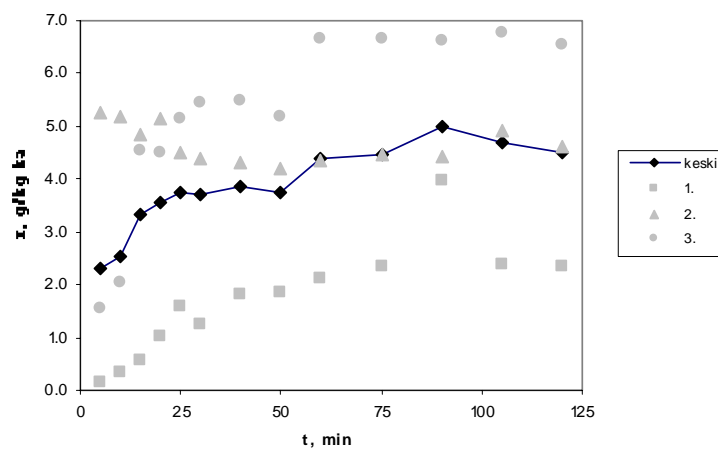
Kuva 13. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



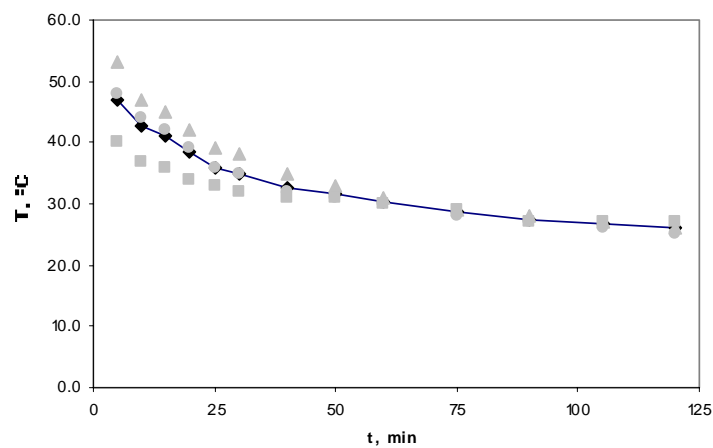
Kuva 14. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko VIII. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 60 °C, hapan liuos ja kokonaiset lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
2,322	2,641	47,0	6,6
2,523	2,466	42,7	5,1
3,321	2,390	41,0	4,6
3,551	2,221	38,3	4,0
3,747	1,904	36,0	3,0
3,705	2,188	35,0	3,0
3,867	1,871	32,7	2,1
3,747	1,716	31,7	1,2
4,380	2,269	30,3	0,6
4,483	2,159	28,7	0,6
5,011	1,411	27,3	0,6
4,693	2,202	26,7	0,6
4,507	2,116	26,0	1,0



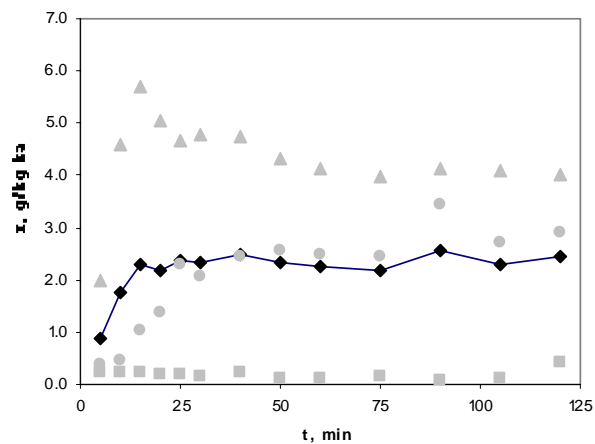
Kuva 15. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



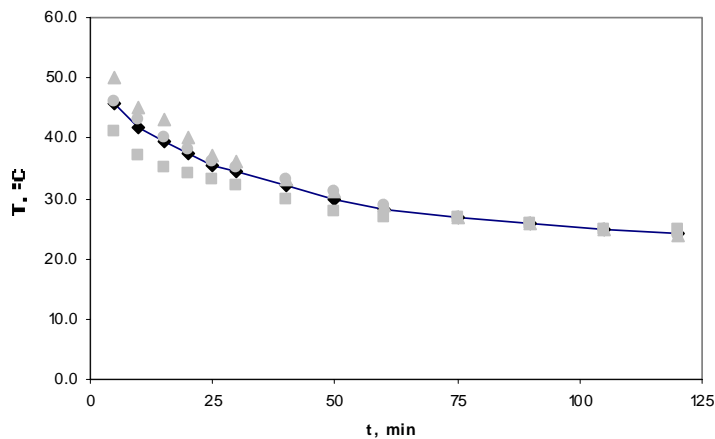
Kuva 16. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko IX. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 60 °C, suolaliuos ja kokonaiset lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
0,870	0,982	45,7	4,5
1,770	2,457	41,7	4,2
2,311	2,953	39,3	4,0
2,196	2,531	37,3	3,1
2,389	2,244	35,3	2,1
2,327	2,322	34,3	2,1
2,470	2,250	32,0	1,7
2,326	2,106	30,0	1,7
2,239	2,022	28,3	1,2
2,184	1,920	27,0	0,0
2,559	2,161	26,0	0,0
2,310	2,025	25,0	0,0
2,453	1,846	24,3	0,6



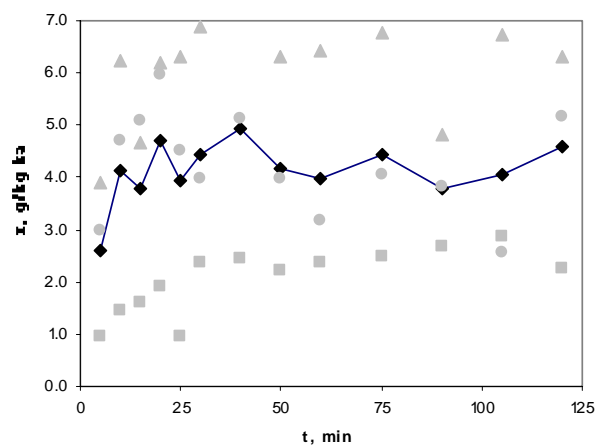
Kuva 17. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



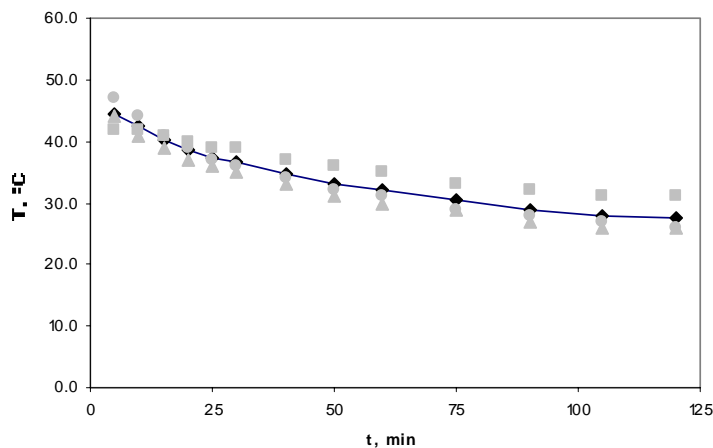
Kuva 18. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko X. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 60 °C, puhdas vesi ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
2,613	1,499	44,3	2,5
4,140	2,444	42,3	1,5
3,786	1,904	40,3	1,2
4,688	2,394	38,7	1,5
3,927	2,709	37,3	1,5
4,420	2,273	36,7	2,1
4,926	2,382	34,7	2,1
4,166	2,066	33,0	2,6
3,996	2,156	32,0	2,6
4,450	2,165	30,3	2,3
3,778	1,073	29,0	2,6
4,064	2,313	28,0	2,6
4,580	2,091	27,7	2,9



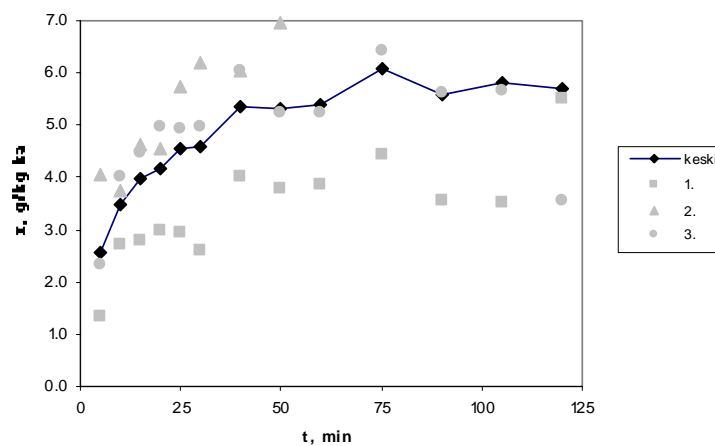
Kuva 19. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



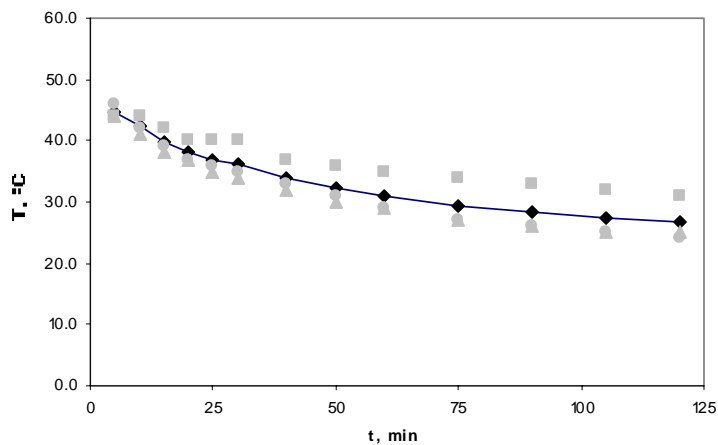
Kuva 20. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XI. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 60 °C, hapan liuos ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
2,579	1,359	44,7	1,2
3,487	0,691	42,3	1,5
3,960	1,016	39,7	2,1
4,175	1,052	38,0	1,7
4,537	1,448	37,0	2,6
4,586	1,841	36,3	3,2
5,369	1,169	34,0	2,6
5,331	1,591	32,3	3,2
5,398	1,603	31,0	3,5
6,089	1,500	29,3	4,0
5,589	1,993	28,3	4,0
5,831	2,411	27,3	4,0
5,701	2,250	26,7	3,8



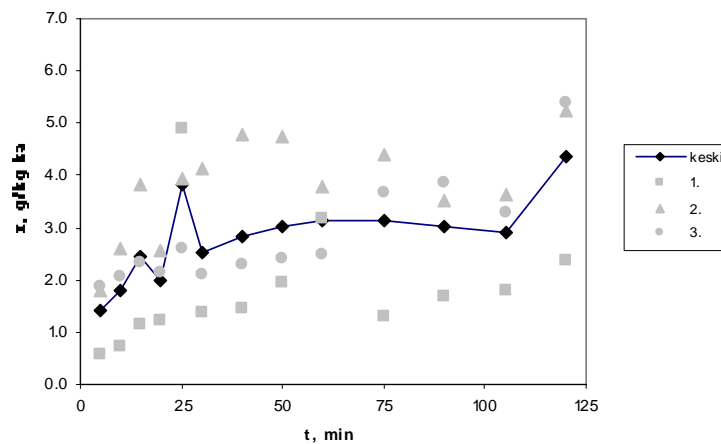
Kuva 21. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



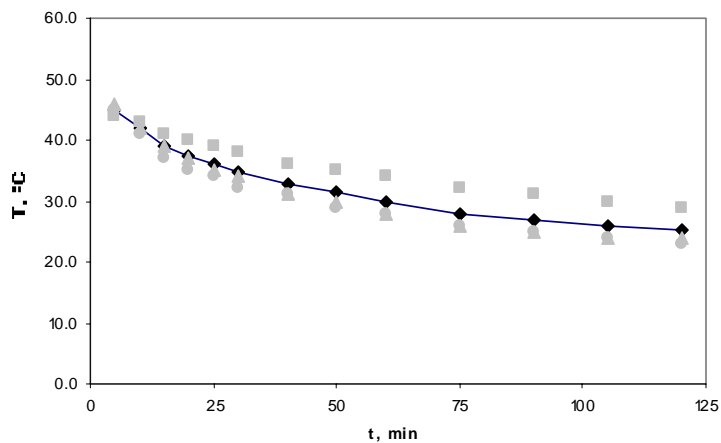
Kuva 22. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XII. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 60 °C, suolaliuos ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
1,413	0,719	45,0	1,0
1,791	0,962	42,0	1,0
2,442	1,341	39,0	2,0
1,971	0,680	37,3	2,5
3,809	1,159	36,0	2,6
2,530	1,420	34,7	3,1
2,847	1,739	32,7	2,9
3,031	1,499	31,3	3,2
3,148	0,647	30,0	3,5
3,128	1,633	28,0	3,5
3,031	1,171	27,0	3,5
2,908	0,971	26,0	3,5
4,342	1,694	25,3	3,2



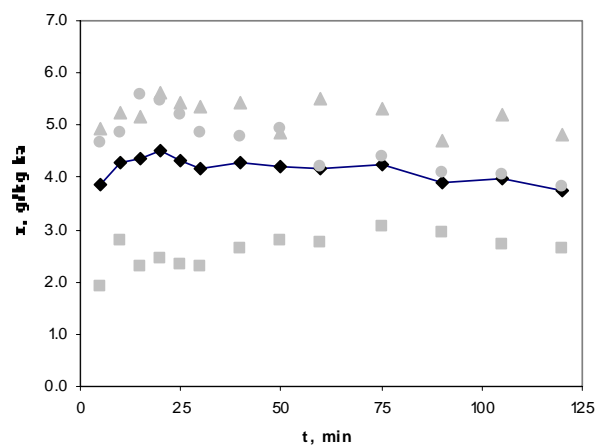
Kuva 23. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



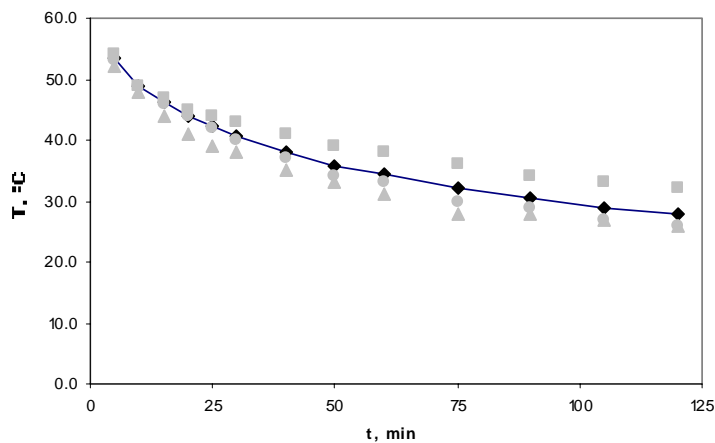
Kuva 24. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XIII. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 80 °C, puhdas vesi ja kokonaiset lehdet.

$x, \text{g/kg}_{\text{ka}}$		$T, ^\circ\text{C}$	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
3,850	1,670	53,3	0,6
4,294	1,325	49,0	0,0
4,353	1,790	46,3	0,6
4,515	1,787	44,0	1,0
4,313	1,722	42,3	1,5
4,172	1,640	40,7	2,1
4,276	1,466	38,0	2,6
4,202	1,217	35,7	2,9
4,160	1,367	34,3	3,2
4,249	1,140	32,0	3,5
3,913	0,895	30,3	3,2
3,988	1,246	29,0	3,5
3,760	1,091	28,0	3,5



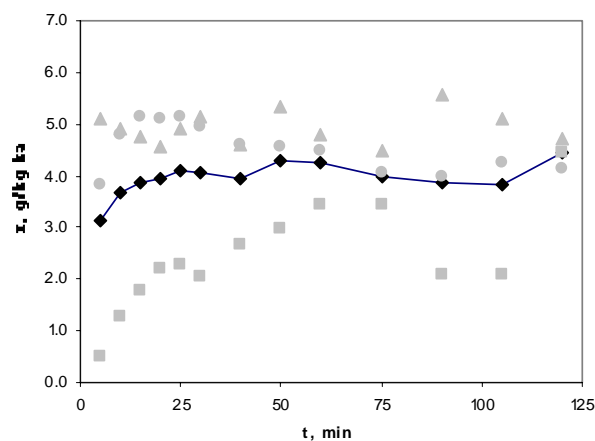
Kuva 25. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



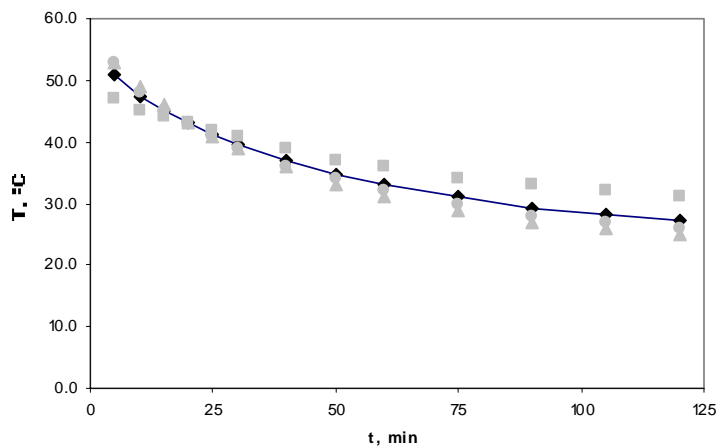
Kuva 26. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XIV. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 80 °C, hapan liuos ja kokonaiset lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
3,140	2,373	51,0	3,5
3,673	2,074	47,3	2,1
3,883	1,831	45,0	1,0
3,957	1,549	43,0	0,0
4,110	1,598	41,3	0,6
4,048	1,744	39,7	1,2
3,953	1,102	37,0	1,7
4,300	1,190	34,7	2,1
4,236	0,717	33,0	2,6
3,995	0,516	31,0	2,6
3,882	1,733	29,3	3,2
3,812	1,564	28,3	3,2
4,444	0,296	27,3	3,2



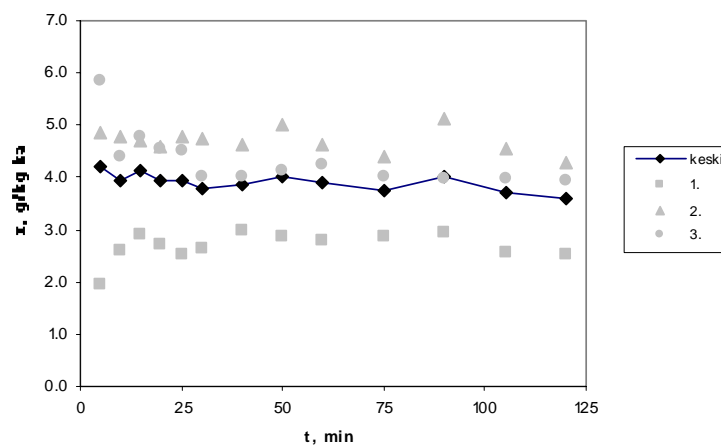
Kuva 27. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



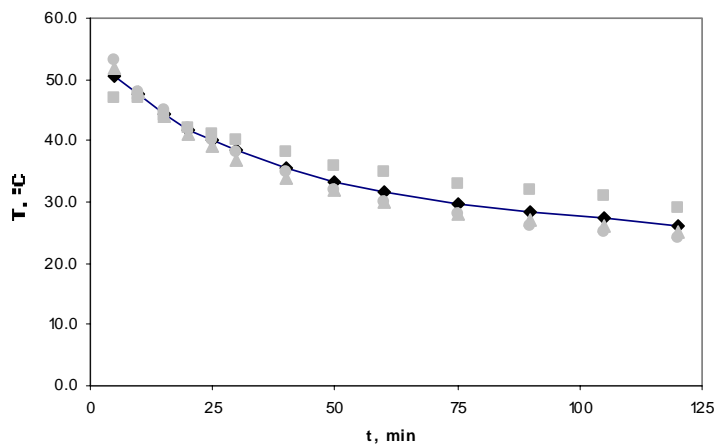
Kuva 28. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XV. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 80 °C, suolaliuos ja kokonaiset lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
4,212	2,038	50,7	3,2
3,924	1,154	47,7	0,6
4,140	1,054	44,3	0,6
3,948	1,057	41,7	0,6
3,935	1,236	40,0	1,0
3,805	1,057	38,3	1,5
3,869	0,828	35,7	2,1
3,999	1,081	33,3	2,3
3,896	0,976	31,7	2,9
3,746	0,793	29,7	2,9
4,001	1,092	28,3	3,2
3,702	1,012	27,3	3,2
3,580	0,936	26,0	2,6



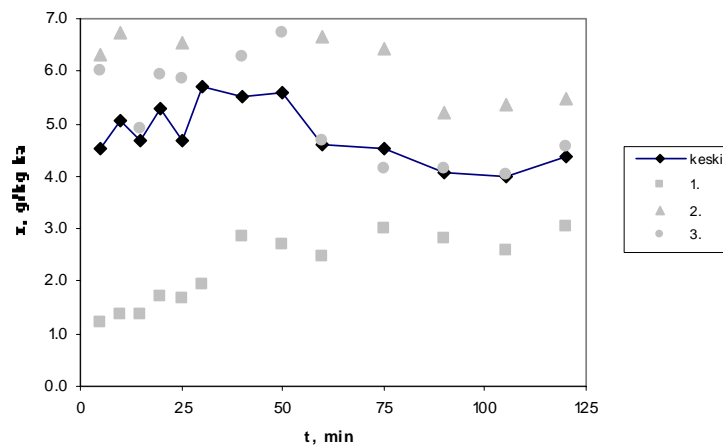
Kuva 29. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



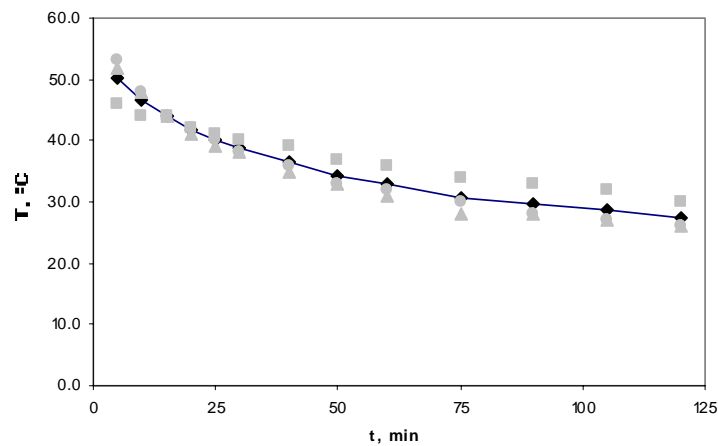
Kuva 30. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XVI. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 80 °C, puhdas vesi ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
4,509	2,864	50,3	3,8
5,052	3,183	46,7	2,3
4,663	3,179	44,0	0,0
5,273	3,271	41,7	0,6
4,691	2,629	40,0	1,0
5,708	3,255	38,7	1,2
5,519	2,374	36,7	2,1
5,574	2,503	34,3	2,3
4,597	2,094	33,0	2,6
4,527	1,739	30,7	3,1
4,059	1,195	29,7	2,9
3,985	1,391	28,7	2,9
4,371	1,222	27,3	2,3



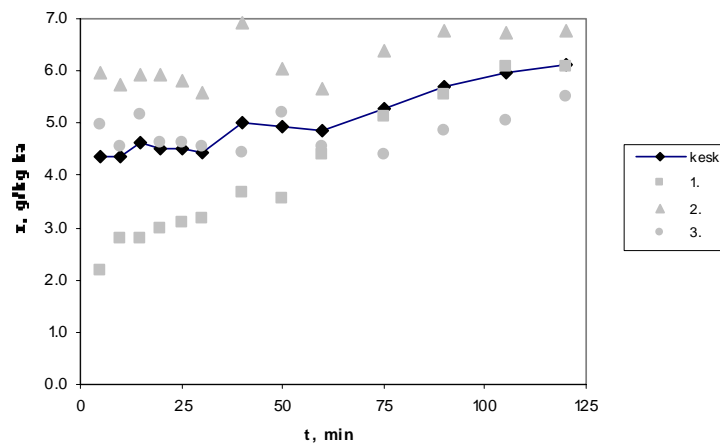
Kuva 31. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



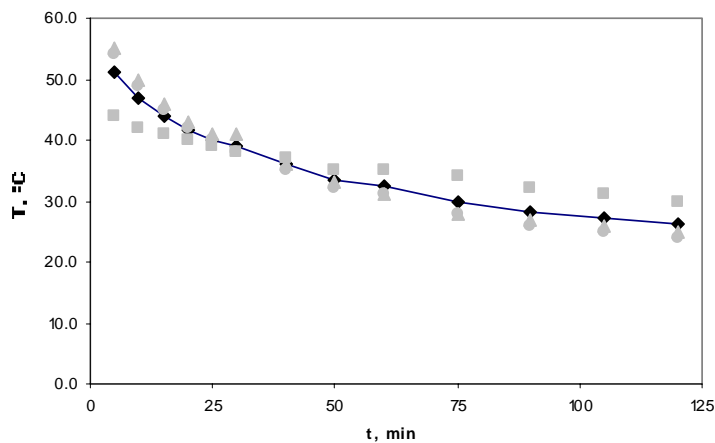
Kuva 32. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XVII. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 80 °C, hapan liuos ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
4,370	1,966	51,0	6,1
4,366	1,479	47,0	4,4
4,631	1,641	44,0	2,6
4,508	1,480	41,7	1,5
4,514	1,354	40,0	1,0
4,436	1,218	39,0	1,7
5,020	1,704	36,0	1,0
4,944	1,258	33,3	1,5
4,875	0,688	32,3	2,3
5,298	1,013	30,0	3,5
5,717	0,960	28,3	3,2
5,951	0,851	27,3	3,2
6,115	0,637	26,3	3,2



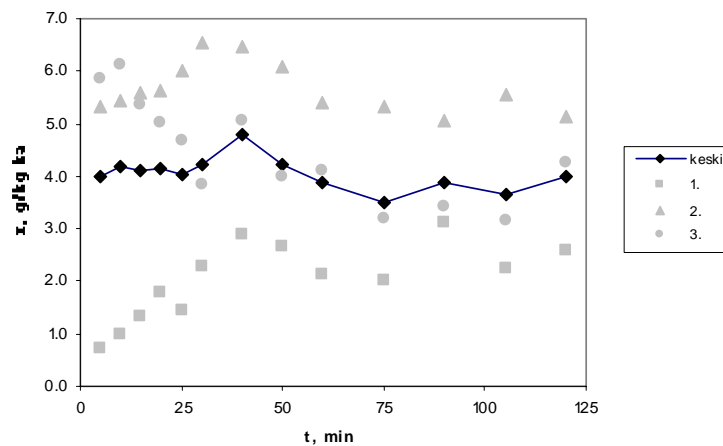
Kuva 33. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



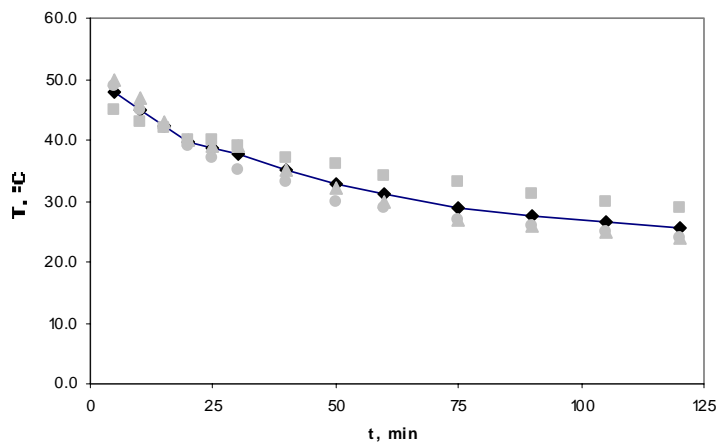
Kuva 34. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

Taulukko XVIII. Pitoisuuksien ja lämpötilojen keskiarvot ja keskihajonnat, kun koemuuttujina: alkulämpötila 80 °C, suolaliuos ja pilkotut lehdet.

x, g/kg _{ka}		T, °C	
keskiarvo	keskihajonta	keskiarvo	keskihajonta
3,982	2,818	48,0	2,6
4,180	2,798	45,0	2,0
4,094	2,393	42,3	0,6
4,144	2,055	39,7	0,6
4,041	2,340	38,7	1,5
4,213	2,155	37,7	2,3
4,810	1,801	35,0	2,0
4,236	1,727	32,7	3,1
3,884	1,642	31,0	2,6
3,512	1,677	29,0	3,5
3,862	1,054	27,7	2,9
3,657	1,722	26,7	2,9
3,995	1,295	25,7	2,9



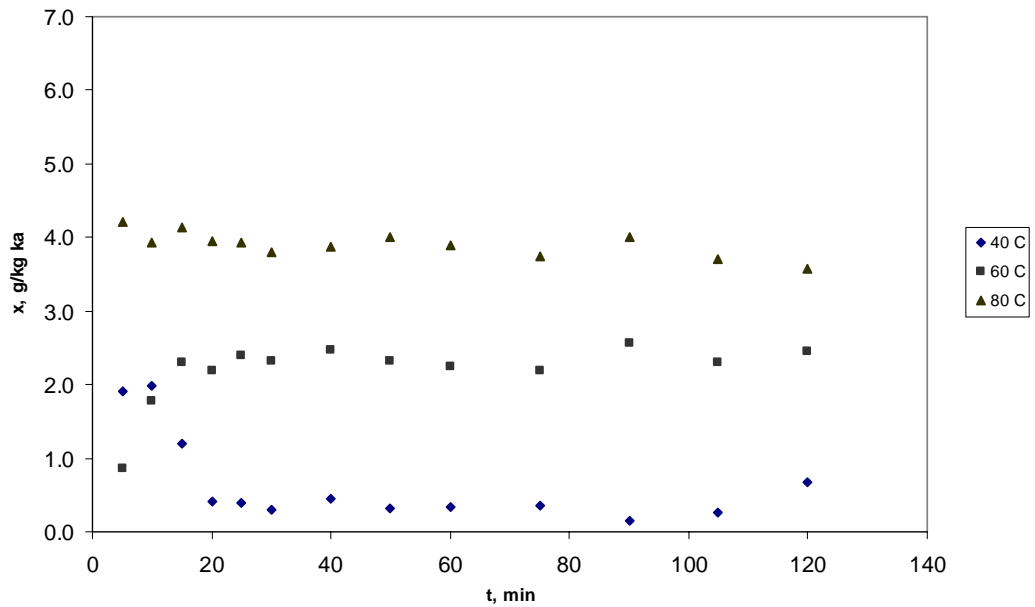
Kuva 35. Rinnakkaiskokeiden saannot ja niiden keskiarvo.



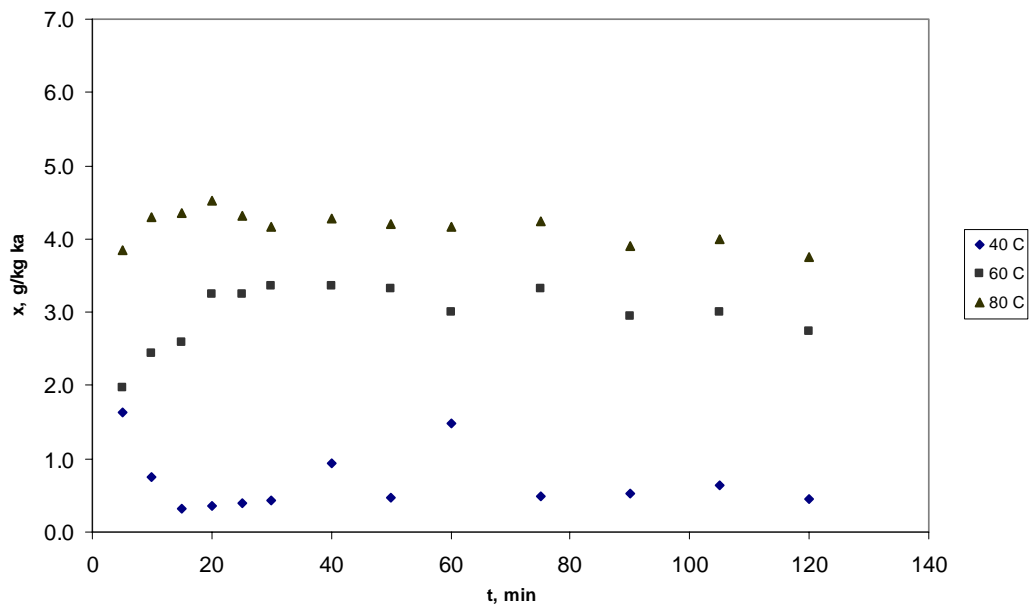
Kuva 36. Rinnakkaiskokeissa mitatut lämpötilat ja niiden keskiarvo.

LIITE III

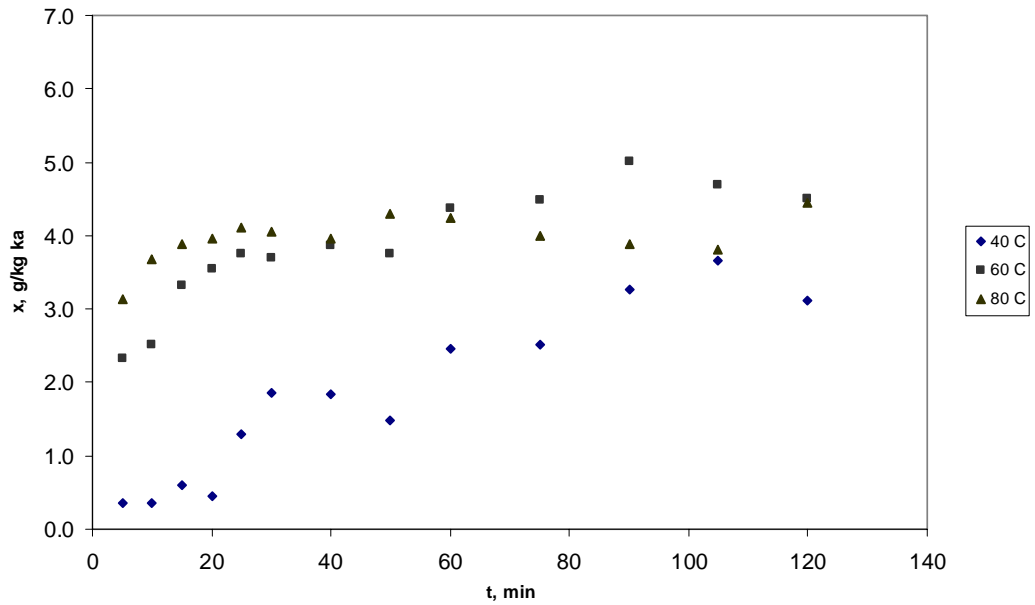
**Uuttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa jaettuna lehtien käsittelyn ja uutto-
liuoksen mukaan.**



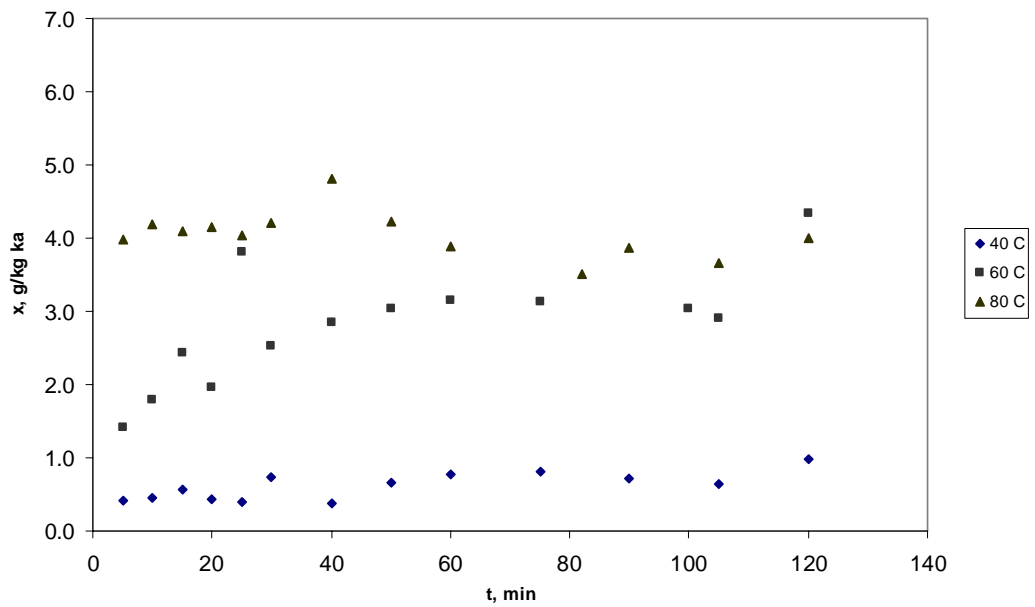
Kuva 1. Uuttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa suolaliuoksella ja kokonaisilla lehdillä.



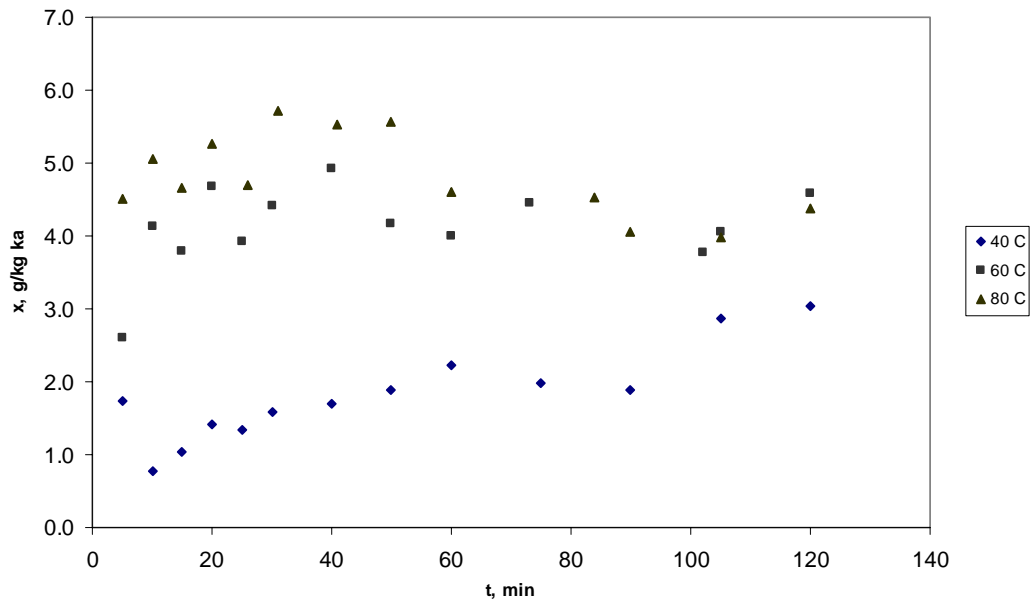
Kuva 2. Uuttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa puhtaalla vedellä ja kokonaisilla lehdillä.



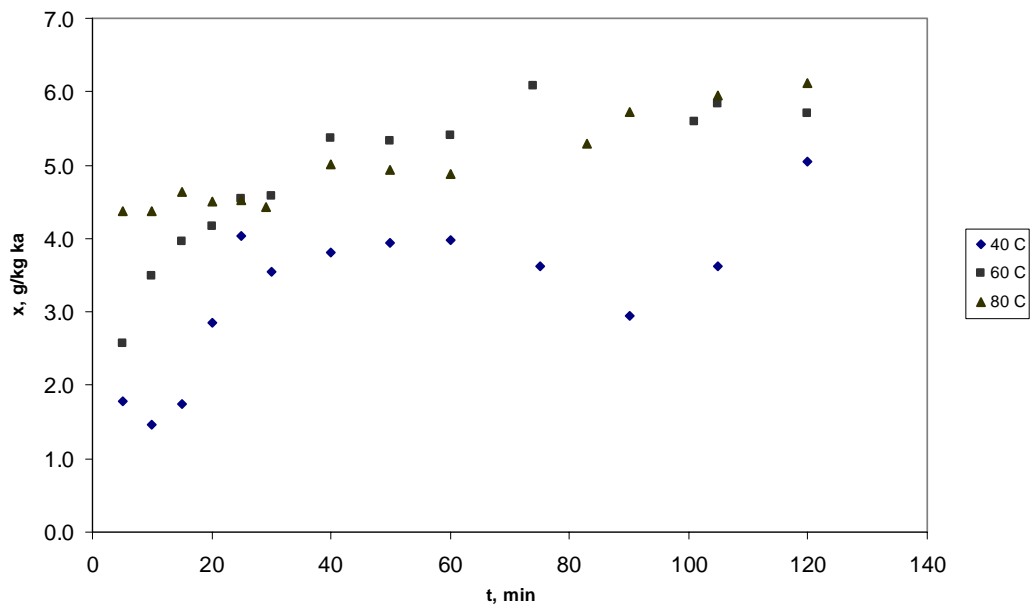
Kuva 3. Uttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa happamalla liuoksella ja kokonaisilla lehdillä.



Kuva 4. Uttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa suolaliuoksella ja pilkoetuilla lehdillä.



Kuva 5. Uttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa puhtaalla vedellä ja pilko-tuilla lehdillä.



Kuva 6. Uttokokeiden tulokset eri lämpötiloissa happamalla liuoksella ja pilko-tuilla lehdillä.