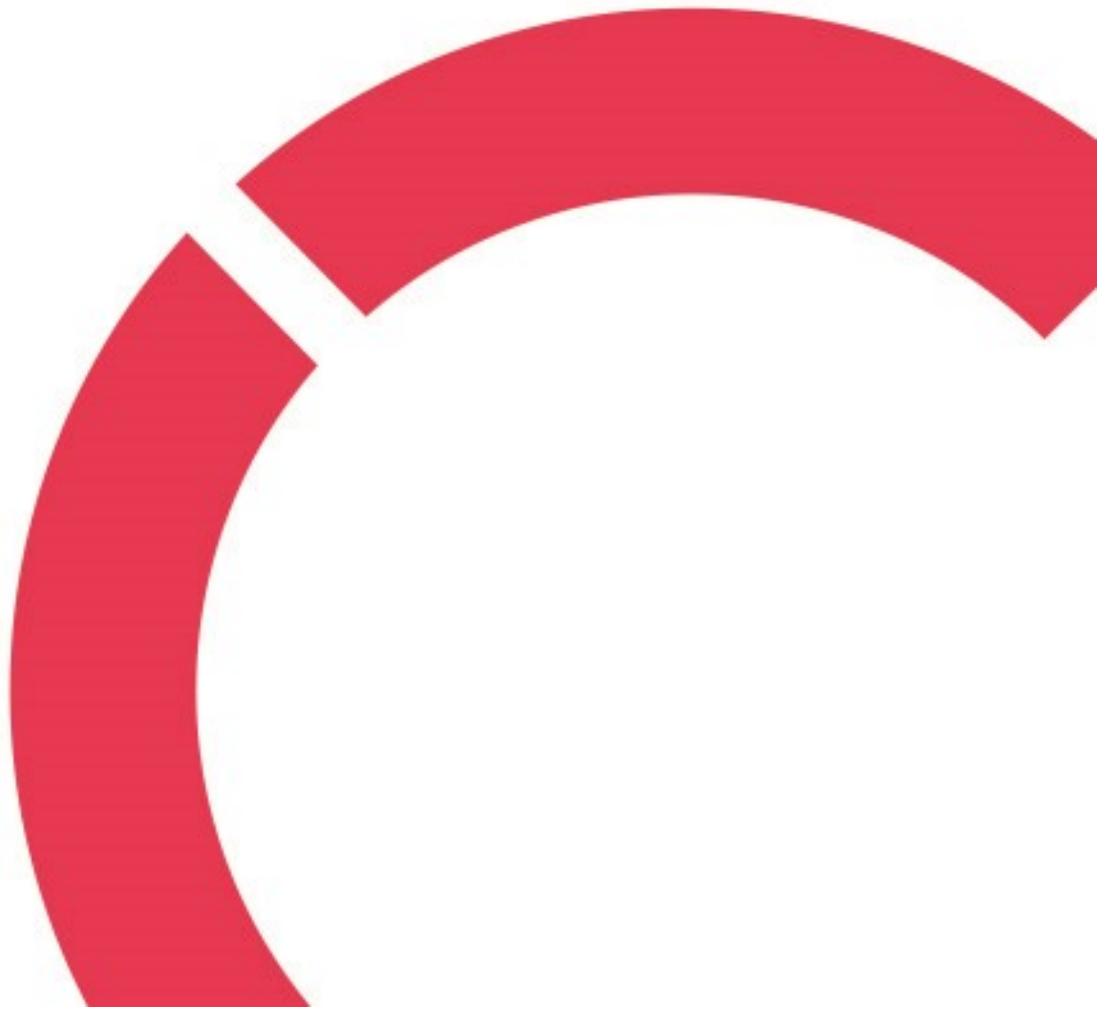


**Marjo Puro**

# **PAINEISTETUN KUUMAVESIUUTON OPTIMOINTI**

**Kuusen kuoren uutto ASE-laitteella**

**Opinnäytetyö  
CENTRIA-AMMATTIKORKEAKOULU  
Kemiantekniikan koulutus  
Joulukuu 2023**



|   |                              |  |
|---|------------------------------|--|
| <b>Centria-ammattikorkeakoulu</b>   | <b>Aika</b><br>Joulukuu 2023 | <b>Tekijä/tekijät</b><br>Marjo Puro                                      |
| <b>Koulutus</b><br>Kemiantekniikan insinööri  |                              | <input checked="" type="checkbox"/> AMK<br><input type="checkbox"/> YAMK |
| <b>Työn nimi</b><br>PAINEISTETUN KUUMAVESIUUTON OPTIMOINTI. Kuusen kuoren uutto ASE-laitteella.   |                              |  |
| <b>Työn ohjaaja</b><br>Staffan Borg   |                              | <b>Sivumäärä</b><br>31 + 4   |
| <b>Työelämäohjaaja</b><br>Tatu Hiltunen, Leif Hed   |                              |  |
| <p>Opinnäytetyön aiheena oli optimoida fenolisten yhdisteiden erottaminen kuusen kuoresta paineistettua kuumavesiuuttoa käyttäen. Paineistettu liotinuutto tehtiin ASE-laitteella käyttäen liuottimena ultra-puhdasta vettä ja lämpötilaa 90–140 °C. Uuttoaika oli 10–30 minuuttia ja kiintoaine-liuotinsuhde g ka/10–40 ml. Fenoliset yhdisteet mitattiin spektrofotometrisesti Folin Ciocalteu -menetelmällä. Optimointiin käytettiin MODDE-ohjelmistoa. Työn tilaajana oli Centrian tutkimus-, kehitys- ja innovaatioyksikkö liittyen kansainväliseen CEforestry-hankkeeseen.</p> <p>Kirjallisuuslähteinä käytettiin lähinnä englanninkielisiä tutkimusartikkeleita. Kemian alan kirjallisuudesta löytyi tietoa perusanalytiikasta ja käytetyistä metodeista.</p> <p>Korkeampi uuttolämpötila oli tehokkaampi fenolisten yhdisteiden saannossa. Uuttoajan lisäys nosti kokonaisfenolipitoisuutta, mutta kiintoaineen pitoisuus suhteessa liuotintilavuuteen ei saanut olla liian korkea.</p> |                              |  |
| <b>Asiasanat</b><br>ASE, fenoliset yhdisteet, kiertotalous, kuusen kuori, MODDE, paineistettu kuumavesiuutto  |                              |  |

## ABSTRACT

|   |                              |                             |
|---|------------------------------|-----------------------------|
| <b>Centria University of Applied Sciences</b>   | <b>Date</b><br>December 2023 | <b>Author</b><br>Marjo Puro |
| <b>Degree programme</b><br>Chemical engineering   |                              |                             |
| <b>Name of thesis</b><br>OPTIMIZATION OF PRESSURIZED HOT WATER EXTRACTION. Spruce bark extraction with an ASE device.   |                              |                             |
| <b>Centria supervisor</b><br>Staffan Borg   | <b>Pages</b><br>31 + 4       |                             |
| <b>Instructor representing commissioning institution or company</b><br>Tatu Hiltunen, Leif Hed  |                              |                             |
| <p>The topic of the thesis was to optimize the separation of phenolic compounds from spruce bark using pressurized hot water extraction. Pressurized solvent extraction was performed with an ASE device using ultra pure water as a solvent and a temperature of 90–140 °C. The extraction time was 10–30 minutes and the sample-to-solvent ratio was g dw/10–40 ml. Phenolic compounds were measured spectrophotometrically using the Folin Ciocalteu method. MODDE software was used for optimization. This thesis was commissioned by Centria's research, development and innovation unit in connection with the international CEforestry project.</p> <p>Literature sources were mostly research articles in English. Information about basic analysis and the methods used was found in the literature in the field of chemistry.</p> <p>A higher extraction temperature was more effective in yielding phenolic compounds. Increasing the extraction time increased the total phenol content, but the solid-to-solvent ratio should not be too high.</p> |                              |                             |
| <b>Key words</b><br>ASE, circular economy, phenolic compounds, pressurized hot water extraction, MODDE, spruce bark   |                              |                             |

## **KÄSITTEIDEN MÄÄRITTELY**

### **ASE**

(Accelerated Solvent Extractor) Nopeutettu ja tehokas liuotinuutto orgaanisille yhdisteille kiinteistä ja puolikiinteistä näytteistä

### **MAILLARDIN REAKTIO**

Pelkistävien monosakkaridien ja aminohappojen tai proteiinien välinen kemiallinen reaktio, joka tapahtuu lämmön vaikutuksesta

### **MODDE**

Japanilaiseen Taguchi-menetelmään perustuva tilastollisen koesuunnittelun ohjelmisto

### **ORTOGONAALIMATRIISI**

Tilastollinen menetelmä, jolla pyritään löytämään useita vaikuttavia tekijöitä käyttäen pienintä mahdollista koemäärää

### **TPC**

(Total phenolic compounds) Fenolisten yhdisteiden kokonaissaanto

### **TDS**

(Total dissolved solids) Näytteestä liuenneiden kiintoaineiden pitoisuus

**TIIVISTELMÄ**  
**ABSTRACT**  
**KÄSITTEIDEN MÄÄRITTELY**  
**SISÄLLYS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 JOHDANTO</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>2 METSÄTEOLLISUUDEN SIVUVIRRAT</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>2.1 CEforestry-hanke</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>2.2 Kuusen kuoren kemialliset yhdisteet</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>2.2.1 Fenoliset yhdisteet</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>2.2.2 Muut yhdisteet</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>3 PAINEISTETTU KUUMAVESIUUTTO</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>3.1 Uuttoparametrit ja niiden vaikutuksia</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>3.2 Uuton optimointi</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>4 KOKEELLINEN OSA</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>4.1 Työn tarkoitus</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>4.2 Analysointilaitteistot ja käytetyt menet</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>4.3 Optimointivaihe</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>4.4 Laboratoriotyön suoritus</b> .....  | <b>15</b> |
| <b>5 TULOKSET</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>6 JOHTOPÄÄTÖKSET</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>LÄHTEET</b> .....   | <b>29</b> |
| <b>LIITTEET</b>  |           |
| <b>KUVIOT</b>  |           |
| KUVIO 1 Tyypillinen paineistetun uuton järjestelmä .....   | 7         |
| <b>KUVAT</b>   |           |
| KUVA 1. Muutamien fenolisten yhdisteiden molekyyli rakenne, -massa ja liukoisuus .....                         | 4         |
| KUVA 2. Muuttujat parametriavaruudessa .....   | 10        |
| KUVA 3. ASE-uuton toimintakaavio .....   | 12        |
| KUVA 4. ASE-uuttolaitteisto .....  | 12        |
| KUVA 5. Koeajopisteiden sijainnit parametriavaruudessa .....   | 14        |
| KUVA 6. Fritsch-jauhatusmylly .....  | 15        |
| KUVA 7. Jauhettu kuusen kuori .....  | 15        |
| KUVA 8. ASE-uuttolaitteen näyteastiat ja asetin .....  | 17        |
| KUVA 9. Uuttoliuokset .....  | 17        |
| KUVA 10. Imusuodatus kertakäyttöruiskulla.....   | 18        |
| KUVA 11. Jäännösmassat uunissa.....  | 18        |
| KUVA 12. Parametrien kerroinkuvaajat MODDEssa TDS:n suhteen .....  | 21        |
| KUVA 13. Käytetyn mallin sopivuus fenolisten yhdisteiden saannossa ja liuenneiden kiintoaineiden määrässä..... | 21        |
| KUVA 14. Kaikkien vaikuttavuuskertoimien kaavakuva.....  | 22        |
| KUVA 15. Merkitsevimmät vaikuttavuuskertoimet .....  | 23        |

|  |    |
|--|----|
| KUVA 16. Residuaalien todennäköisyysjakauma .....  | 23 |
| KUVA 17. Fenolisten yhdisteiden saanto .....   | 24 |
| KUVA 18. TPC-saanto kolmiulotteisessa kuvaajassa .....                                   | 24 |
| KUVA 19. Fenolisten yhdisteiden saanto suhteessa liuenneiden kiintoaineiden määrään..... | 25 |
| KUVA 20. Fenoliset yhdisteet uuttoliuoksessa suhteessa kiintoaineiden määrään.....       | 25 |
| KUVA 21. Fenolisten yhdisteiden pitoisuus eri uuttoaajoilla .....                        | 26 |

## **TAULUKOT**

|  |    |
|--|----|
| TAULUKKO 1. Valitut ajoparametrit .....                          | 11 |
| TAULUKKO 2. Koesuunnitelma .....                                 | 14 |
| TAULUKKO 3. Kuiva-ainepitoisuuden määrittämisen punnitukset..... | 16 |
| TAULUKKO 4. Koeajot uuttoparametreineen .....                    | 19 |
| TAULUKKO 5. Saadut tulokset.....                                 | 20 |
| TAULUKKO 6. Optimointivaiheen uutot .....                        | 22 |
| TAULUKKO 7. Validointiuutot .....                                | 26 |

## 1 JOHDANTO

Havupuiden kuorten tutkimus on viimeisen vuosikymmenen aikana herättänyt laajaa kiinnostusta. Pohjoismaissa puiden kuorta on runsaasti saatavilla metsä- ja sahateollisuuden sivutuotteena. Kuoren sisältämistä pienimolekyylisistä yhdisteistä suurella osalla on positiivisia terveysvaikutteita. Lisäksi kuoresta uutettavia biokemikaaleja voitaisiin hyödyntää korvaamalla niillä ehtyviä fossiilisia raaka-aineita lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa sekä elektroniikkateollisuudessa.

EU:n rahoittamassa CEforestry-hankkeessa tutkitaan metsäteollisuuden sivuvirtojen jalostamista korkean lisäarvon tuotteiksi laajalla yhteistyöllä Baltian maiden ja useiden yhteistyökumppanien kesken. Hankkeen tarkoituksena on luoda uusia kiertotalousmalleja ja edistää kestävästi valmistettujen tuotteiden prosesseja ja kiertometsätaloutta. Centrian tutkimus, kehitys ja palvelut -yksikkö on mukana hankkeessa.

Teoriaosuudessa käsitellään metsäteollisuuden sivuvirtoja ja niiden hyödyntämisen mahdollisuuksia. Sivutuotteena saatavan kuusen kuoren yhdisteistä etenkin fenoliset yhdisteet ovat useiden viimeaikaisen tutkimusten kohteena. Paineistetun kuumavesiuuton käyttämistä biomassan yhdisteiden yleisenä erotusmenetelmänä perustellaan veden ympäristöystävällisyydellä, hyvällä saatavuudella ja myrkyttömyydellä. Paineistetun kuumavesiuuton parametrien valinnasta ja niiden vaikutuksista etsittiin tietoa kirjallisuuslähteistä.

Opinnäytetyön kokeellisessa osuudessa paineistettua kuumavesiuuttoa käytettiin erottamaan kuusen kuoresta terveysvaikutteisia fenolisia yhdisteitä CEforestry-hankkeeseen liittyen. Paineistetussa kuumavesiuutossa liuottimena on ultrapuhdas vesi. Paineen ja korkean lämpötilan vaikutuksesta veden fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet muuttuvat mahdollistaen tehokkaan liukenemisen. Uuttoparametrit valittiin kirjallisuuden ja opinnäytetyön ohjaajien aiemman kokemuksen perusteella ja uuttoprosessia optimoitiin saatujen tulosten perusteella tilastolliseen koesuunnitteluun perustuvalla MODDE-ohjelmalla. Fenolisten yhdisteiden määrittäminen uuttoliuoksista tehtiin spektrofotometrisesti käyttäen Folin Ciocalteu -menetelmää. Kirjallisuuslähteinä olivat enimmäkseen englanninkieliset verkossa saatavilla olevat tutkimusartikkelit.

## 2 METSÄTEOLLISUUDEN SIVUVIRRAT

Metsäteollisuuden käyttämästä puusta syntyy suuri määrä hyödyntämättä jääviä sivuvirtoja kuten kuorta, oksia, kantoja ja käpyjä. Erityisesti havupuun kuoressa on runsaasti pienimolekyylisiä yhdisteitä, joita voidaan uuttamalla eristää kuoresta. Osan näistä yhdisteistä on havaittu olevan terveyttä edistäviä tai muutoin käytettävissä kaupallisesti ja siksi niitä on tutkittu viimeisen vuosikymmenen aikana runsaasti. (Routa, Brännström, Anttila, Mäkinen, Jänis & Asikainen 2017.)

Puun pääkomponenttien (selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini) ohella olisi taloudellisesti järkevää hyödyntää myös muut kemialliset ainesosat. Puubiomassaa hyödynnetään laajasti uusiutuviissa materiaaleissa, biokemikaaleina, polttoaineina ja erilaisina biojalostustuotteina. Raaka-aineiden käyttöä monipuolistamalla olisi mahdollista parantaa hyödyntämistä. Synteettisten kemikaalien korvaaminen luonnollista alkuperää olevilla ainesosilla sekä luonnonmukaisten terveystuotteiden valmistus olisi mahdollista uuteaineyhdisteiden avulla. Useissa kemikaaleissa, lääkinnällisissä tai ravitsemuksellisissa tuotteissa, kosmetiikassa, juomissa, puuliimoissa, maaleissa, puunsuoja-aineissa, kasvinsuojeluaineissa ja pesuaineissa voitaisiin hyödyntää puun uutteista saatavia arvokkaita yhdisteitä. (Routa ym. 2017.)

Useita suomalaisia yrityksiä on perustettu hyödyntämään puu-, paperi- ja sahteollisuuden sivuvirtoja. Metsäteollisuuden sivuvirroista valmistetuilla maanparannuskuiduilla voidaan parantaa peltojen maaperää ja lisätä kierrätysravinteiden käyttöä. Espoolaisen Soilfood Oy:n käyttämässä sellulietteessä on runsaasti fosforia ja muita ravinteita. Kuusesta uutettua elintarvikeparannetta, kuhmolaisen Montinutran patentoimaa kuusikumia, voitaisiin käyttää ulkomailta tuodun guarkumin sijasta elintarviketuotannossa. Kuusen sahanpurusta uutettua antioksidanttista kuusisokeria hyödynnetään Montinutralla jo kuluttajatuotteissa. Kuhmossa sijaitseva Biocoil Oy kehittää teknisen hiilen valmistusmenetelmää. Havupuiden kuoresta voitaisiin uuttaa esimerkiksi tanniineja ja lopuksi hyödyntää kuori teknisen hiilen valmistukseen. Kokkolalaisella Innomost Oy:llä on kehitetty useita koivun kuoresta peräisin olevia kosmetiikkaan hyödynnettävissä olevia terveysvaikutteisia ainesosia kuten öljyä, hiilijauhetta ja atselaiinihappoa. (CircWaste; Innomost; Montinutra; Uusi puu; Soilfood.)

Itä-Suomen yliopiston puumateriaalitieteen tutkija Haapalan (2017) mukaan sivuvirtojen jatkojalostamisen haasteina ovat lainsäädäntö direktiiveineen, laitteiden suuret investointikustannukset, erilaiset tuotteiden ja tuotannon lupaprosessit ja uusien prosessien kehittäminen ja testaus. Vaikka tieteelliset



tutkimukset ja teknologia luovat mahdollisuuksia, on uusien prosessien ja tuotteiden kehittäminen hidadista ja kallista. Kaupallistaminen vaatii laajaa yhteistyötä yli toimialarajojen. Lisäksi haasteita aiheuttavat markkinoiden tunteminen, sivutuotepuomassan epätasalaatuisuus ja raaka-aineen varastointi. (Haapala 2017.)

## 2.1 CEforestry-hanke

CEforestry-hankkeen tavoitteena on luoda uusia kiertotalousmalleja metsäteollisuuden sivuvirtoina syntyvästä biojätteestä. Esimerkiksi puiden kuorta, neulasia ja käpyjä voitaisiin hyödyntää eristämällä niistä arvokkaita ainesosia ja tuottamalla näistä ainesosista korkean lisäarvon tuotteita sen sijaan, että metsäbiojäte päättyisi vain bioenergian tuotantoon tai jäisi kokonaan hyödyntämättä. Hankkeesta saatujen tulosten on tarkoitus edistää ekologisesti kestävästi luotujen tuotteiden valmistusta ja kiertometsätaloutta. Hankkeessa on mukana 12 hankekumppania ja 17 yhteistyökumppania eri maista Baltian alueelta sekä kohderyhmiä Itämeren alueen maista. Pääkoordinaattorina toimii Ruotsin maataloustieteellinen yliopisto (SLU) ja rahoittajana EU:n Interreg Baltic Sea Region -ohjelma. (Metsäkeskus 2023.)

Kestävän kehityksen kantavana ajatuksena on, että sosiaalinen, ekologinen ja taloudellinen näkökulma otetaan huomioon yhteiskunnallisissa muutoksissa. Biologinen monimuotoisuus ja ekosysteemien toimivuus pyritään säilyttämään seuraaville sukupolville. Luonnon kestävyys otetaan huomioon päätöksenteossa ja toiminnassa siten, että taloudelliset ja aineelliset toimintatavat eivät heikennä ympäristön tilaa. Ekologisen kestävyuden toteuttamisessa sekä kansallinen että globaali yhteistyö on merkittävässä asemassa. (Ympäristöministeriö 2023.)

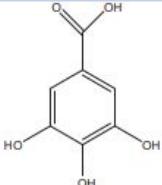
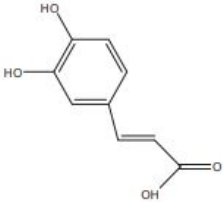
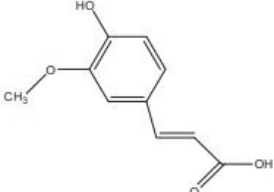
## 2.2 Kuusen kuoren kemialliset yhdisteet

Kuusen kuoren, kuten muidenkin puiden kuorten, kemiallinen koostumus poikkeaa puun rungon koostumuksesta. Myös saman puulajin sisällä yksilöiden kuoret ovat erilaisia eri-ikäisissä puissa kasvupaikan mukaan. Puun kokonaispainosta kuorta on noin 10–15 prosenttia. Kuoressa uuteainepitoisuus on korkeampi kuin runkopuussa ja mineraaleja eli epäorgaanisia yhdisteitä on enemmän. Pääosin kuori sisältää samoja uuteaineita kuin runko, mutta esimerkiksi marjakuusen kuoresta löytyvää syöpälääkkeenä käytettävää taksolia ei puun rungossa ole. Kuorelle ominaisia uuteaineita ovat muun muassa tan-

niinit ja flavonoidit, jotka kuuluvat fenolisiin yhdisteisiin. Kuituaines koostuu pääosin polysakkariideista. Tavallisimmat epäorgaaniset yhdisteet ovat kalsium ja kalium, ja yhdisteiden koostumus on yleensä oksalaatteja, silikaatteja sekä fosfaatteja. (Jääskeläinen & Sundqvist 2007, 107–111.)

### 2.2.1 Fenoliset yhdisteet

Holmbom (2011, 178) kertoo puiden sisältävän paljon pienimolekyylisiä yhdisteitä, joilla on useita fysiologisia vaikutuksia ja puolustuksellisia mekanismeja. Tutkijat Mojzer, Hrnčič, Škerget, Knez ja Bren (2016) ovat todenneet fenolisten yhdisteiden olevan laaja joukko kasvien sekundaarisia aineenvaihduntatuotteita, joilla on hapettumista estäviä ja syöpää ehkäiseviä ominaisuuksia. Fenoleihin ja fenolisiin yhdisteisiin kuuluu useita aromaattisia yhdisteitä, joita ovat esimerkiksi lignaanit, stilbeenit, tanniinit ja flavonoidit (KUVA 1). Fenoliset yhdisteet sisältävät ainakin yhden bentseenirenkaan antaen puulle väriä ja toimien fungisideina suojaten puuta mikrobiologisilta hyökkäyksiltä. (Jääskeläinen & Sundqvist 2007, 104.)

| NIMI          |  | MOLEKYYLIPAINO<br>(g/mol) | LIUKOISUUS             |
|---------------|---|---------------------------|------------------------|
| Gallushappo   |   | 170                       | Kuuma H <sub>2</sub> O |
| Kofeiinihappo |  | 180                       | Kuuma H <sub>2</sub> O |
| Ferulihappo   |  | 194                       | Kuuma H <sub>2</sub> O |

KUVA 1. Muutamien fenolisten yhdisteiden molekyyli rakenne, -massa ja liukoisuus (mukaihen Saldaña & Valdivieso-Ramírez 2014)

Fenolisia yhdisteitä on tutkittu laajasti niiden antioksidatiivisten, homeilta ja mikrobeilta suojaavien ja muiden hyödyllisten vaikutusten vuoksi. Elintarvike-, lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa fenolisia yhdisteitä on hyödynnetty UV-säteilyltä ja mikro-organismeilta suojautumisessa, ravintolisissä, terveyttä edistävissä elintarvikkeissa ja johdannaisina elektroniikkateollisuudessa. Suomessa tutkittua ja ravintolisäksi kehitettyä lignaanihydroksimatairesinolia käytetään naisten vaihdevuosisoireiden lieventämiseen. (Latva-Mäenpää 2017.)

Tutkimusten mukaan fenolit eivät ainoastaan suojaa erilaisilta sairauksilta, vaan voivat vaikuttaa myös sairauksien etenemiseen tai estää etenemisen kokonaan tai edistää paranemista. Joillakin polyfenoleilla on hormonaalisia vaikutuksia. Syöpätutkimuksen kannalta fenoleita tutkitaan pahanlaatuisten kasvainten hoidossa ja estämisessä. Fenolit auttavat vahvistamaan elimistön omia puolustautumismekanismia ja estävät kasvainten verisuonten muodostumista. Niillä on havaittu voivan olla kemoterapian ja sädehoidon haitallisilta sivuvaikutuksilta suojaavia ominaisuuksia. (Mojzer ym. 2016.)

### **2.2.2 Muut yhdisteet**

Havupuiden kuoren kuituaines koostuu polysakkarideista eli hemiselluloosasta, joka on pääosin glukomannaania ja ksylaania (Jääskeläinen & Sundqvist 2007, 73, 111). Aalto-yliopiston tutkija Bhattarain (2020) mukaan lääke- ja elintarviketeollisuudessa hemiselluloosia voitaisiin käyttää muun muassa stabilointiaineena tai pakkausmateriaalina. Kuori sisältää myös terveysvaikutteisen pihkan ainesosia triterpenoideja eli triterpenyylialkoholeja. Epäorgaanisten yhdisteiden eli mineraalien osuus on kuorella isompi kuin rungossa; pitoisuus vaihtelee kahdesta kymmeneen prosenttiin (Jääskeläinen & Sundqvist 2007, 98–99, 110).

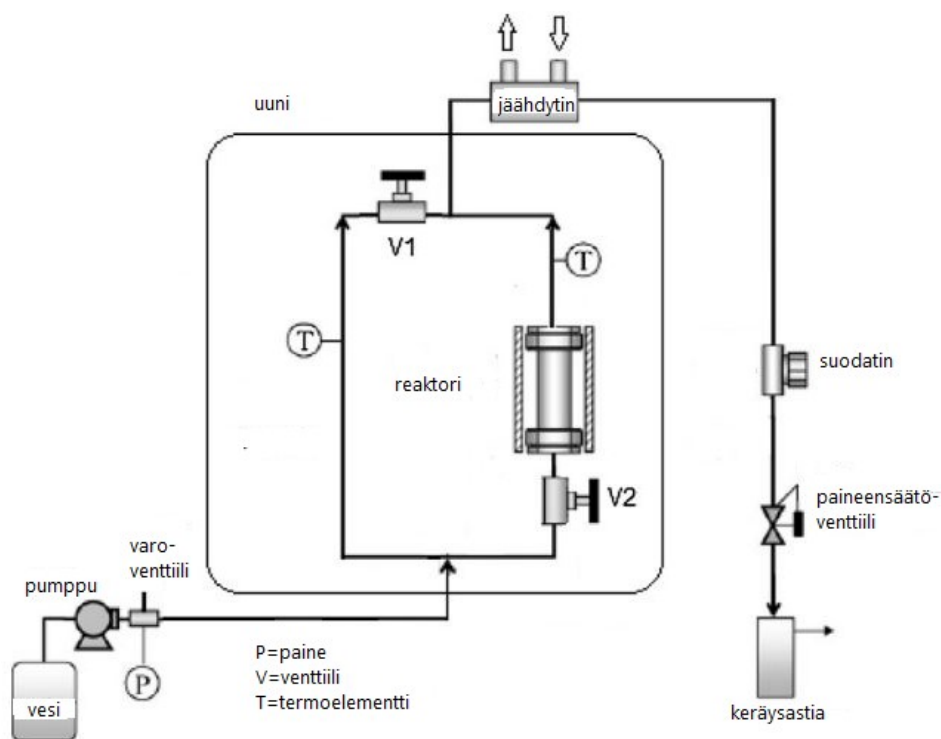
### 3 PAINEISTETTU KUUMAVESIUUTTO

Kirjallisuuslähteiden mukaan liuotinuuttojen parametrit vaihtelevat sen mukaan, mitä kasvia tai kasvinosaa halutaan uuttaa ja mitä uutettavat komponentit ovat. Kilpeläinen, Liski ja Saranpää (2023) käyttivät kuusen ja männyn kuoren tanniinien kuumavesiuuttoon 60–140 °C lämpötilaa ja 120 minuutin aikaa. Dou, Sui, Malinen, Pesonen, Isohanni ja Vuorinen (2022) uuttivat kuusen kuoresta stilbeenejä käyttäen 45–75 °C lämpötilaa ja 5–60 minuutin aikaa ultraääniavusteisessa uutossa. Chmelová, Škulcová, Legerská, Horník ja Ondrejovič (2020) erottivat antioksidanteja sekä fenolisia yhdisteitä kuusen kuoresta käyttäen nesteuuttoa ja 20–60 asteen lämpötilaa, 24 tunnin uuttoaikaa sekä liuottimena metanolia ja metanoli-vesiseosta. Erilaisten biomassojen uuttamista on tutkittu paljon, mutta havupuiden kuorten uutosta paineistetulla kuumavesiuutolla juuri fenolisten yhdisteiden uuttamiseksi tietoa on vaikea löytää. Fenolisia yhdisteitä on uutettu esimerkiksi intialaisen jakkipuun hedelmistä (Cruz-Casillas, García-Cayuela & Rodriguez-Martinez 2021) ja perunan kuorista (Singh & Saldaña 2011).

Plaza & Turner (2015) ovat selvittäneet artikkelissaan laajasti erilaisten paineistettujen kuumavesiuuttojen ominaisuuksia ja niiden käyttöä bioaktiivisten yhdisteiden erottamiseen eri kasveista ja niiden osista. Erilaisia kuumavesiuuttoja ovat esimerkiksi alikriittinen vesiuutto (SWE), tulistettu nesteuutto, ultraääniavusteinen uutto (UAE), sekä paineistettu nesteuutto (PLE), johon kuuluu myös nopeutettu liuotinuutto (ASE).

Paineistettua kuumavesiuuttoa käytetään pääosin kiinteiden tai jauhemaisten näytteiden uuttamiseen. Kuumavesiuuttoa sovelletaan elintarvikkeiden tai kasvimateriaalien makua tai tuoksua antavien yhdisteiden uuttamiseen sekä bioaktiivisten yhdisteiden uuttamiseen. Elintarvikeanalyseissä uuttoa voidaan käyttää myös orgaanisten epäpuhtauksien erottamiseen elintarvikkeista. Myös polaarittomien orgaanisten aineiden, kuten polysyklisen aromaattisten hiilivetyjen (PAH) ja polykloorattujen bifenyylin (PCB), erottaminen maaperä- ja sedimenttinäytteistä uuttamalla on mahdollista veden ominaisuuksien muuttuessa uuttoparametrien vaikutuksesta. Biopuhdistusprosesseissa paineistettua kuumavesiuuttoa on käytetty poistamaan maaperänäytteiden kasvinsuojeluaineita ja rikkaruohojen torjunta-aineita. (Teo, Tan, Yong, Hew & Ong 2010.)

Vedellä on liuottimena ainutkertaisia ominaisuuksia. Sen kemialliset ja fysikaaliset ominaispiirteet muuttuvat paineen ja lämpötilan funktiona siten, että korkea lämpötila ja paine mahdollistavat vähemmän polaaristen aineiden liukenemisen. Esimerkiksi tiheys, viskositeetti, pintajännitys ja veden diffuusiokerroin muuttuvat lämpötilan vaikutuksesta. Lisäksi vettä on yleensä saatavilla joka paikassa ja se on täysin myrkytön liuotin, eli sitä ei tarvitse prosessien myöhemmissä vaiheissa poistaa tai erottaa haitallisena osana haluttua tuotetta. Vesi on myös ympäristöystävällinen, edullinen ja korroosiota aiheuttamaton liuotin. Paineistetussa kuumavesiuutossa (KUVIO 1) painetta käytetään pääasiassa pitämään vesi nestemäisenä korkeissa lämpötiloissa. (Plaza & Turner 2015.) Veden lisäksi paineistetuissa uutoissa voidaan kirjallisuuden mukaan käyttää muitakin orgaanisia liuottimia kuten etanolia, asetonia, bentseeniä ja edellä mainittujen yhdistelmiä.



KUVIO 1. Tyypillinen paineistetun uuton järjestelmä (mukaillen Saldaña & Valdivieso-Ramírez 2015)

Jatkuvatoimiseen uuttoon tarvitaan pumppu, uuttoastia, lämmityslaite, paineenrajoitin ja keräysastia. Dynaamisessa eli jatkuvatoimisessa uutossa yhdisteiden hajoamisen ja uuton kinetiikkaa on helpompi hallita jatkuvan nestevirtauksen vuoksi mutta laitteisto on kalliimpi ja letkujen tukkeutumisvaara suurempi. Liian nopea uuttoliuoksen virtaus voi johtaa laimeaan uuttoliuokseen ja liuosta täytyy väkivoimalla uuttamisen jälkeen. Staattisen eli panostoimisen uuton ongelmia on joissakin laitteistoissa kor-

jattu uuttojaksoilla, joissa puhdasta vettä syöttämällä estetään uuttoastian tasapainotilan muodostuminen. Kaikkia laitteistoja käytettäessä tulee ottaa huomioon suurin sallittu käyttölämpötila ja -paine, asioiden materiaalien soveltuvuus käyttötarkoitukseen ja yleiset turvallisuutta koskevat määräykset ja toimenpiteet. (Plaza & Turner 2015.)

### 3.1 Uuttoparametrit ja niiden vaikutuksia

Puubiomassan uutossa voidaan käyttää sahanpurua, haketta tai puulastuja. Liuotettavan puumateriaalin kokovaihtelulla voidaan vaikuttaa uuttonopeuteen ja ainakin hemiselluloosaa uutettaessa myös sen molekyylipainoon. Pienemmällä hiukkaskoolla liuottimen ja kiinteän näytteen kosketuspintaa saadaan lisääntymään. Kiinteitä uuttojäännöksiä voidaan hyödyntää sellun tai paperin valmistuksessa sekä erilaisina teknisinä puutuotteina kuten puumuovikomposiitteina, lastulevyinä tai OSB-levyinä. Kuumavesiuuttoja voidaan käyttää myös massiivipuun muokkaukseen, koska se parantaa massiivipuun sitkeyttä ja lujuutta sekä lahonkestävyyttä liuottamalla hemiselluloosia. (Kyyrö, Altgen & Rautkari 2020.)

Kuumavesiuuttojen lämpötila valitaan yleensä 100 ja 240 °C:n väliltä. Antioksidantteja ja muita lämpötilaherkkiä yhdisteitä uutetaan myös matalammissa lämpötiloissa. Korkeampi lämpötila vaikuttaa näytteen nopeampaan kostumiseen ja desorptioon sekä parantaa liukoisuutta ja diffuusiota. Toisaalta uuton selektiivisyys vähenee eli myös muita kuin haluttuja yhdisteitä liukenee enemmän. Saatujen yhdisteiden pilkkoutuminen lisääntyy sekä epätoivottuja kemiallisia reaktioita näytematriisissa voi tapahtua enemmän, mikä voi johtaa vääristyneisiin analysointituloksiin. Mitä korkeampaa lämpötilaa käytetään, sitä enemmän lämpöhajoamista ja haitallisia reaktioita tapahtuu, mikä lisää puhdistuskäsittelyjen tarvetta uuton jälkeen. Lämpötilan optimaalinen valinta minimoi yhdisteiden hajoamisvaikutukset ja maksimoi liukoisuuden silti mahdollistaen tehokkaan aineensiirron näytteen ja uuttoliuoksen välillä. (Plaza & Turner 2015.)

Kemiallisten reaktioiden vähentämiseksi voidaan käyttää liuottimen jatkuvaa virtausta, jolloin näytteiden ja liuottimen kontaktiaika vähenee ja uuttonopeus paranee. Tämä vähentää myös liuottimen saavuttaman kylläisyystilan riskiä. Kylläiseen liuokseen ei voi tapahtua liukenemistä. Jos liukenemiseen vaikuttaa lähinnä näytteen desorptio ja diffuusio näytematriisissa, nopeampi liuottimen virtaus ei nosta uuttonopeutta. Valitulla uuttoajalla pyritään saavuttamaan mahdollisimman suuri saanto haluttuja yhdisteitä. Panostoimisissa uutoissa on oleellista huomioida optimaalinen liuotin-kiintoainesuhde uutto-

ajan suhteen. Liuottimen ja kiintoaineen suhde tulisi olla pienin mahdollinen liuottimen vähäisen kuluksen ja lämmityksen vuoksi, mutta riittävän suuri takaamaan mahdollisimman suuren saannon. Näytteen korkealla kosteuspitoisuudella on havaittu olevan positiivisia vaikutuksia uuttosaantoon verrattuna kuivattuihin näytteisiin fenolisia yhdisteitä uutettaessa. (Plaza & Turner 2015.)

Sopivan liuottimen valinta perustuu näytteiden ominaisuuksiin. Jos näyte on heterogeeninen poolisuuden osalta, uuttoliuotin voi olla poolisten ja poolittomien liuosten seos. Tällöin vesiliukoinen liuotin uuttaa hydrofiiliset orgaaniset yhdisteet eikä näytteessä oleva kosteus vaikuta liuottimen toimintaan, ja hydrofobinen liuotin uuttaa poolisuudeltaan samankaltaiset orgaaniset yhdisteet. Liuottimien määrät täytyy optimoida, jotta saavutetaan paras mahdollinen lopputulos. Myös näytematriisin ja myöhempien käsittelyjen sopivuus uuttoliuoksen kanssa on muistettava varmistaa. Käytettävän liuottimen määrä sovitetaan näytteen kokoon. (Suomi 2009, 63.)

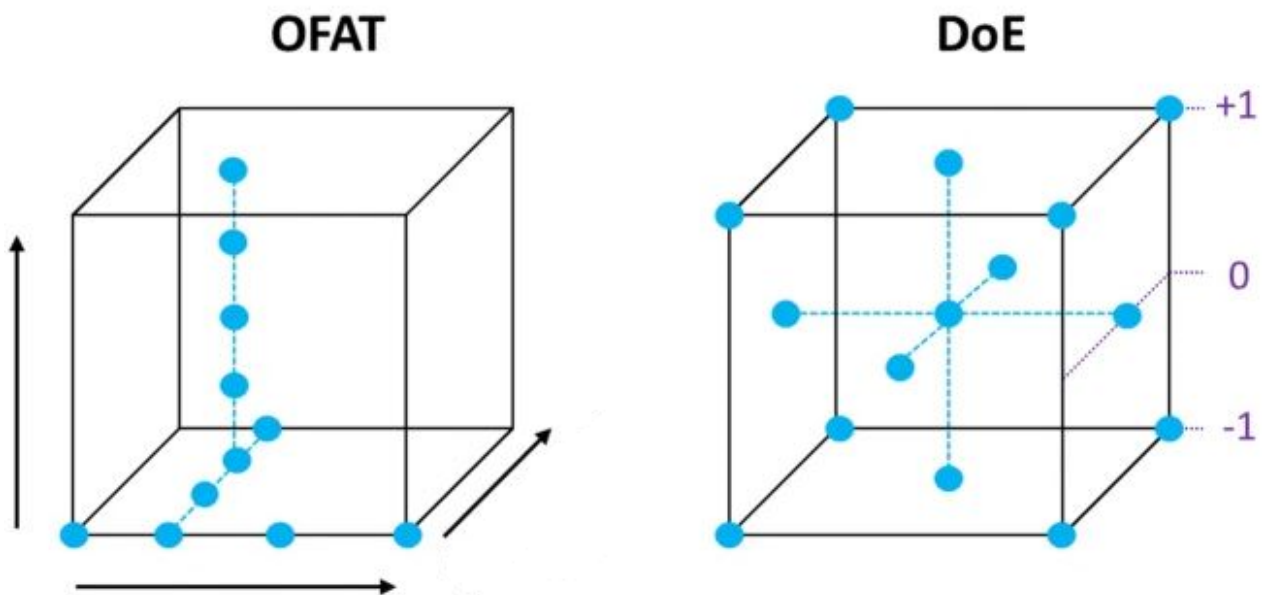
### 3.2 Uuton optimointi

Koesuunnittelussa käytettiin MODDE-ohjelmistoa, joka perustuu Japanissa kehitettyyn Taguchi-menetelmään. Menetelmä kehitettiin tuote- ja prosessisuunnitteluun optimoimaan laatua, alentamaan kustannuksia sekä auttamaan yrityksiä, yhteisöjä ja yksityisiä henkilöitä tehostamalla kokeellista toimintaa ja kokeellisen tiedon hyödyntämistä (Karjalainen 1999, 3). Parametrisuunnittelu on oleellisin osa Taguchi-menetelmää. Ne parametrit, joiden valintaan ja ohjaukseen voidaan vaikuttaa, määritellään siten, että saadaan mahdollisimman suuri tavoitearvo ja minimoidaan häiritsevät tekijät sekä kustannukset. Suunnittelussa pystytään huomioimaan parametrien keskinäiset tekijät ja niiden epälineaariset vaikutukset. Perinteisestä tuotesuunnittelusta poiketen tarkastellaan niin keskiarvoja kuin poikkeamiakin ja pyritään pienentämään tuotteen ominaisuuksien vaihtelua poistamatta sen syytä. Laatua pyritään parantamaan lisäämättä kustannuksia muuttamalla useita parametreja yhtä aikaa, käyttämällä ortogonaalimatriiseja ja käsittelemällä tuloksia tilastollisesti. (Karjalainen 1990, 45–47.)

Koesuunnittelu (Design of Experiment, DOE) perustuu Karjalaisen (2007) mukaan prosessimuuttujien arvojen muuttamiseen siten, että vaste voidaan maksimoida ja prosessimuuttujien keskinäiset vaikutukset otetaan huomioon. Tekijät voivat olla joko määrällisiä tai laadullisia. Koeajojen aikana parametreja muutetaan eri tasoille ja mitataan saadut tulokset. Yleensä koesuunnittelun tarkoitus ei ole niinkään ymmärtää saatua tietoa vaan hakea ratkaisua koko tutkittavaan asiaan tai ilmiöön. Koesuunnitte-

lun avulla saavutetaan järkevä näytteenotto ja tehokas tulosten käsittelydatan analysointi. Koesuunnittelutyypit voidaan jakaa yksimuuttujakokeisiin, haravointikokeisiin (screening), karakterisointikokeisiin ja optimointikokeisiin (optimizing). Yksimuuttujakokeista optimointikokeisiin edeten menetelmät vaativat enemmän näytteitä ja ovat monimutkaisempia sekä kalliimpia toteuttaa. Yleensä pelkillä haravointikokeilla saadaan nopeasti selvitettyä eri tekijöiden vaikutukset ja riittävä määrä tietoa prosessista. (Karjalainen 2007.)

MODDE on Sartoriuksen kehittämä tilastollista koesuunnittelumenetelmää hyödyntävä ohjelmisto. Sen luoma kokeellisista vastauksista saatu malli ennustaa tuloksia painottaen tiettyjä koemuuttujia. Muuttujien painotuksessa voidaan käyttää annettuja tekijöitä tai näiden neliövaikutuksia ja lisäksi myös eri tekijöiden välisiä vuorovaikutuksia. Käyttäjän valitsemat parametrit ja niiden vuorovaikutukset antavat ohjelman avulla kattavan kuvan parametriavaruudesta (KUVA 2) verrattuna yksimuuttujakokeisiin (OFAT). Luodun mallin avulla pystytään valitsemaan optimaaliset käyttöolosuhteet. (Taylor, Baker, Chapman, Reynolds, Jolley, Clemens, Smith, Blacker, Chamberlain, Christie, Taylor & Bourne 2021.)



KUVA 2. Muuttujat parametriavaruudessa (mukaillen Taylor ym. 2021)



## 4 KOKEELLINEN OSA

Tässä opinnäytetyössä oli tavoitteena saada uutettua paineistetulla kuumavesiuutolla kuusen kuoresta kokonaisfenoliset yhdisteet. Näytteet analysoitiin Centria-ammattikorkeakoulun Kokkolan kampuksella ja Innogate Oy:n laboratorioissa. Uutot tehtiin Dionexin ASE 350 Accelerated Solvent Extractor (ASE) -laitteella ja kokonaisfenolipitoisuuden määrittäykset Agilentin Cary 60 UV -spektrofotometrillä Folin Ciocalteu -menetelmällä.

### 4.1 Työn tarkoitus

Työn tarkoituksena oli optimoida paineistetun kuumavesiuuton parametrit siten, että tuloksena olisi mahdollisimman suuri määrä fenolisia yhdisteitä. Optimointiin käytettiin MODDE 13 Pro -ohjelmistoa. MODDEen syötettiin valitut ajoparametrit (TAULUKKO 1), minkä jälkeen ohjelma arpoi satunnaisen koejärjestyksen 11 uutolle. Kaikki uutot suoritettiin optimointi- ja validointiuuttoja lukuunottamatta kahteen kertaan.

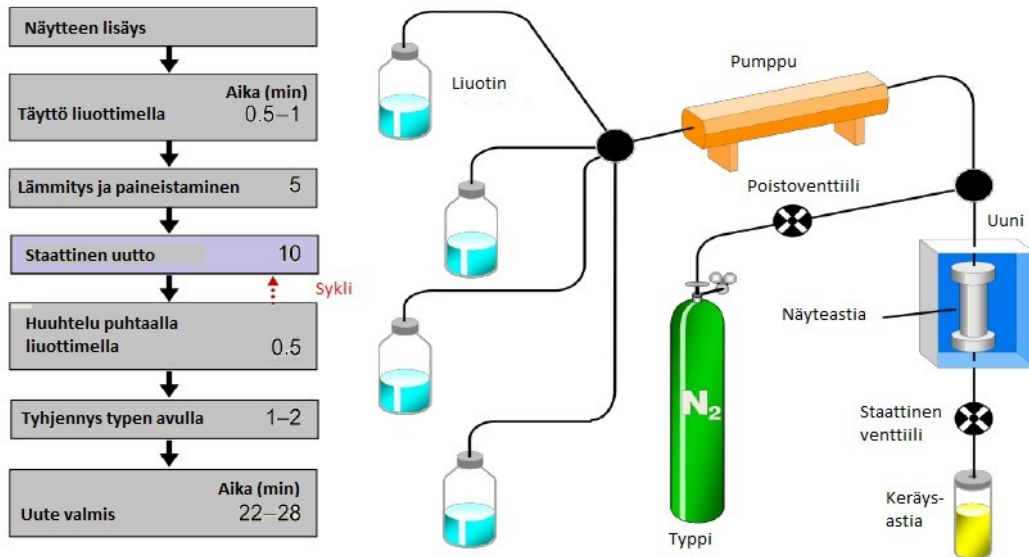
TAULUKKO 1. Valitut ajoparametrit

| Name        | Abbreviation | Units | Type         | Settings  |
|-------------|--------------|-------|--------------|-----------|
| Temperature | Temp         | C     | Quantitative | 90 to 140 |
| Time        | Time         | min   | Quantitative | 10 to 30  |
| Ratio       | Rat          | ml/g  | Quantitative | 10 to 40  |

### 4.2 Analysointilaitteistot ja käytetyt metodit

ASE-uutto on nopeasti yleistynyt menetelmä sen tehokkuuden, nopeuden ja pienen liuotinmäärän vuoksi (KUVA 3). Kuvassa 4 olevassa Dionexin valmistamassa ASE 350 -uuttolaitteessa voidaan käyttää eri liuottimia. Lämpötila valitaan väliltä 50–200 °C ja paine 10–15 MPa. Korkea lämpötila nopeuttaa uutumista ja paine pitää liuottimen nestemäisessä olomuodossa sekä pakottaa nesteen näyttekammioon ja kosketuksiin kiinteän tai puolikiinteän näytteen kanssa. Yleensä käytetään orgaanisia

liuottimia, mutta myös pelkkä ultrapuhdas vesi toimii liuottimena. Perinteiseen kasvimateriaalien aineosien erottamiseen käytettävään Soxhlet-uuttoon verrattuna käytetty aika sekä liuottimen määrä vähenvät huomattavasti. Molempien menetelmien riskinä on lämmölle herkkien yhdisteiden hajoaminen korkeissa lämpötiloissa. (Tandon & Rane 2008, 102–104.)



KUVA 3. ASE-uuton toimintakaavio (mukaillen Baldursdóttir 2011)



KUVA 4. ASE-uuttolaitteisto

Kokonaisfenolipitoisuuden määrittäminen saaduista uutuksista tehtiin Agilent Cary 60 UV-Vis spektrofotometrillä Folin Ciocalteu -menetelmällä käyttäen 760 nm:n aallonpituutta. Spektrofotometri mittaa aineiden sähkömagneettisen säteilyn absorbointikykyä joko näkyvän tai ultraviolettivalon alueella (Saarinen & Lajunen 2004, 194). Käytetyn määrittämissä laskennallisuus perustuu ulkoisen standardin menetelmään, jossa käytetään viittä kalibrointipistettä. Määrittämiseen tarvittiin valmiita Folin Ciocalteu -reagenssia, gallushappoa ja natriumkarbonaattia. Standardisuurassa käytettiin gallushapon laimennoksia väliltä 0,01–0,1 mg/ml. Analysoitavat näytteet säilytettiin jääkaapissa tai pakastimessa riippuen analysointiajankohdasta. Uuttoliuosten laimennossuhteet selvitettiin kokeilemalla. Yleisesti kuusenhavujen ja kuoren laimennoskerroin löytyy väliltä 10–20. (Hed & Mäkelä 2022.) Saatujen tulosten yksikkö mg GAE/g kuiva-ainetta perustuu gallushapon standardikäyrään ja ilmaistaan gallushappoekvivalenteina punnittua alkuperäisen näytteen kuiva-ainegrammaa kohti (Zucoloto, Ku, Kushad & Sawan 2015).

### 4.3 Optimointivaihe

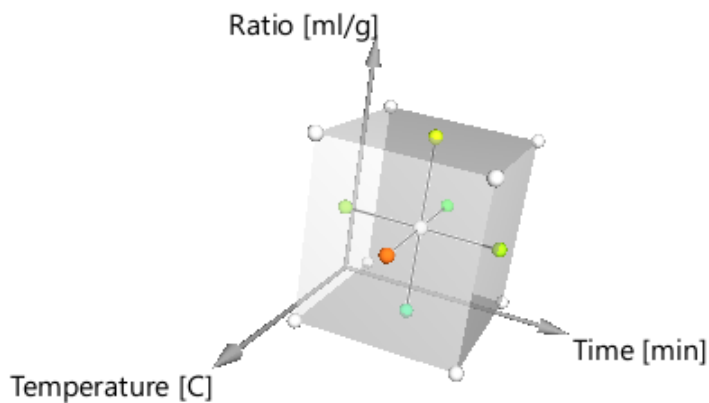
Koesuunnittelussa käytettiin MODDE 13 Pro -ohjelmistoa. Valitut ajoparametrit etsittiin kirjallisuuslähteistä paineistetun kuumavesiuuton muuttujista sekä soveltuvien kasvien ja niiden osien uuttoprosesseista. Myös opinnäytetyön ohjaajien aiempi kokemus vastaavista uutoista huomioitiin. Tutkittaviksi muuttujiksi valittiin lämpötila 90–140 °C, uuttoaika 10–30 min sekä kiintoaine-liuotinsuhde yksi gramma näytteen kuiva-ainetta (dry weight) /10–40 ml vettä. Kuumavesiuutossa paineen merkitys on lähinnä pitää liuotin nestemäisessä olomuodossa, joten sitä ei muuttujana huomioitu vaan paine pidettiin vakiona (100 bar).

Kaikkien annettujen arvojen koeajot suoritettiin kahteen kertaan onnistuneen lopputuloksen varmistamiseksi. Keskipisteiden arvojen uutot tulivat siksi suoritettua kuusi kertaa. Alla olevassa taulukossa 2 näkyy valittujen muuttujien ylä- ja ala-arvojen perusteella luotu faktoriaalinen koesuunnitelma (full factorial). Mahdollisten inhimillisten virheiden minimoimiseksi koeajojen järjestys oli satunnainen.

## TAULUKKO 2. Koesuunnitelma

| NO | NAME | TEMP [°C] | TIME [min] | RATIO [g dw/ml] |
|----|------|-----------|------------|-----------------|
| 1  | [1]  | 90        | 10         | 1/10            |
| 2  | A    | 140       | 10         | 1/10            |
| 3  | B    | 90        | 30         | 1/10            |
| 4  | AB   | 140       | 30         | 1/10            |
| 5  | C    | 90        | 10         | 1/40            |
| 6  | AC   | 140       | 10         | 1/40            |
| 7  | BC   | 90        | 30         | 1/40            |
| 8  | ABC  | 140       | 30         | 1/40            |
| 9  | 1    | 115       | 20         | 1/25            |
| 10 | 2    | 115       | 20         | 1/25            |
| 11 | 3    | 115       | 20         | 1/25            |

Koesuunnitelman ajojen jälkeen saadut tulokset syötettiin MODDE-ohjelmaan ja ajettiin ohjelman antamat optimointituotot (optimizing), joita oli yhdeksän, mutta jo saatuihin tuloksiin sisältyi niistä kolme. Kuvassa 5 on esitetty koesuunnitelman mittauspisteet parametriavaruuteen sijoitettuna.



KUVA 5. Koeajopisteiden sijainnit parametriavaruudessa

Optimoinnin validointia varten valittiin saatujen tulosten pohjalta pisteitä, joille saatu malli ennusti fenolisten yhdisteiden saannon sekä näytteestä liuenneiden kiintoaineiden pitoisuuden. Yksi validointipiste valittiin mallin määrittämissä rajojen ulkopuolelta, jotta nähtäisiin, onko malli luotettava myös rajojen ulkopuolella. Aika oli validointiuutoissa 20 minuuttia.

#### 4.4 Laboratoriotyön suoritus

Kokeissa käytetty lähtömateriaali oli Ruotsin maataloustieteellisen yliopiston (SLU) lähettämää pakastettua ja esijauhettua kuusen kuorta. Kuorimateriaali jauhettiin pienempään partikkelikokoon leikkaavalla Fritsch Pulverisette 19 -myllyllä (KUVA 6). Jauhamiseen käytettiin 6 mm<sup>2</sup>:n reikäkoon viiraa. Karkean aineksen jauhaminen hienojakoisemmaksi oli tarpeellista, jotta liuottimen ja näytteen kontaktipinnasta saatiin mahdollisimman suuri. Lisäksi tasalaatuisella materiaalilla tehdyt uutot ovat edustavia ja tulokset toistettavia.



KUVA 6. Fritsch-jauhatusmylly

Esikäsitellystä raaka-aineesta (KUVA 7) määritettiin kuiva-ainepitoisuus kaavalla (1). Punnitut näytteet alustoineen laitettiin Memmert-kuivausuuniin lämpötilaan 105 °C yön ajaksi ja aamulla näytteet siirrettiin eksikaattoriin jäähtymään huoneenlämpöiseksi. Huoneenlämpöiset näytteet punnittiin analyysivaalilla. Kuiva-ainepitoisuus määritettiin kolmen näytteen keskiarvona näytteestä haihtuneen kosteuden eli massan perusteella (TAULUKKO 3).



KUVA 7. Jauhettu kuusen kuori

TAULUKKO 3. Kuiva-ainepitoisuuden määrittämisen punnitukset

|         | m (astia) | m (näyte) | kuivattu m (näyte + astia) |
|---------|-----------|-----------|----------------------------|
| Näyte 1 | 2,4805 g  | 2,4050 g  | 3,6675 g                   |
| Näyte 2 | 2,5032 g  | 2,4551 g  | 3,6958 g                   |
| Näyte 3 | 2,4908 g  | 2,7231 g  | 3,8523 g                   |

Kuiva-ainepitoisuus laskettiin kaavalla

$$\frac{\text{kuivattu } m (\text{näyte} + \text{astia}) - m (\text{astia})}{m(\text{näyte})} = \frac{3,6675 \text{ g} - 2,4805 \text{ g}}{2,4050 \text{ g}} = 0,494 = 49,4 \% \quad (1)$$

jossa m = massa (g).

Kuiva-ainepitoisuudeksi saatiin keskimäärin 49,3 %.

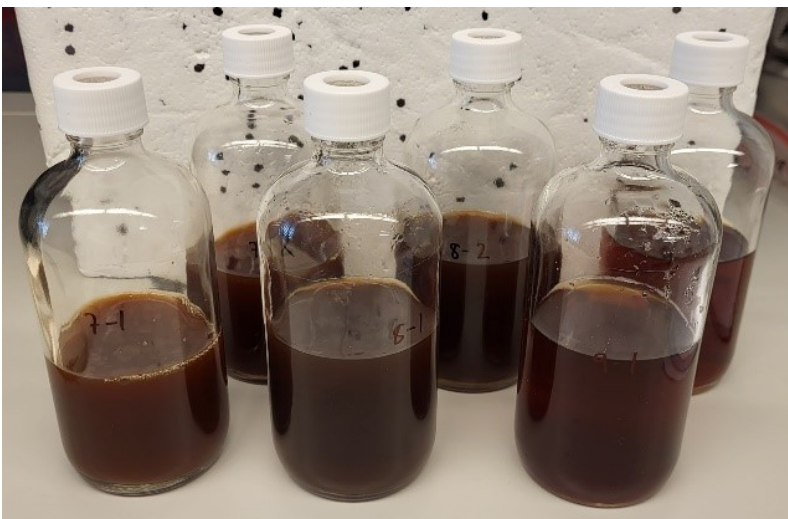
Kuiva-ainepitoisuuden perusteella laskettiin tarvittavat massat näytteille suhteilla yksi gramma kuiva-ainetta 40 ml:n liuotinmäärää kohti sekä 25 ml:n ja 10 ml:n liuotinmäärillä. Punnittaviksi massoiksi saatiin joko 4,94 g (1/40), 7,8 g (1/25) tai 18,4 g (1/10). Näytteet sekä näyteastioihin kuvassa 4 näkyvän asettimen avulla laitettavat selluloosasuodatinpaperit punnittiin tarkasti analyysiväällä.

Jokaisessa uutossa käytettiin 100 ml:n ruostumattomasta teräksestä valmistettuja näyteastioita (KUVA 8), joita oli kuusi kappaletta. Tämän vuoksi uuttoa voitiin tehdä vain kolme kerrallaan rinnakkaisnäytteenä. Näyteastioihin asetettiin suodatinpaperit ja punnitut näytteet siirrettiin suppiloa käyttäen näyteastioihin. Valmiiksi panostetut näyteastiat kuljetettiin kampukselle, jossa uuttoaajot voitiin suorittaa. ASE-uuttolaitteen kaasuhana avattiin, ja laitteeseen kytkettiin virta päälle. Ennen uuttoa tyhjennettiin laitteen jäteastiat R<sub>1</sub> ja R<sub>2</sub> sekä tarkistettiin että huuhteluputket olivat puhtaita. Laitteen ohjaustaulusta valittiin metodin muokkausohjelma. Uutoille asetettiin metodit eli lämpötila, huuhteluvien määrä, näytteen staattinen uuttamisaika, sykli, huuhtelu-aika typpikaasulle ja valittu liuotin. Käyttöohjeen mukaisesti 100 ml:n kapselille valittiin huuhteluajaksi 250 s, minkä aikana näyteputkista painetaan liuos ulos paineistetun tyypin avulla. Syklejä kaikissa uutoissa oli yksi ja huuhteluliuksena käytetyn veden määrä oli 30 %. Sekvenssin muokkausvaiheessa valittiin uutolle käytettävä metodi ja näyteastioiden sekä liuospullon paikat. Näyteastiat sekä laitteen omat liuospullot asetettiin paikoilleen karuselleihin huomioiden sekvenssissä niille ohjelmoidut paikat. Ohjelma aloitettiin käynnistysnäppäimellä.



KUVA 8. ASE-uuttolaitteen näyteastiat ja asetin

Valmiiden uuttoliuosten (KUVA 9) tilavuudet mitattiin 250 ml:n mittalaseilla. Osa jokaisesta liuoksesta suodatettiin sameuden vuoksi jatkokäsittelyä varten ja suurin osa liuoksesta pakastettiin mahdollista jatkokäyttöä varten. Silminnähden sakkaisimmat uutokset laitettiin sentrifugiin käyttäen 18 000-kertaista g-voimaa kymmenen minuutin ajan sakan erottamiseksi nesteestä. Osa imusuodatettiin VWR European Cat. 55 mm 0,7 µm lasimembraanin läpi ja viimeisenä kaikki näytteet suodatettiin Phenex GF 0,45 µm suodattimilla käyttäen kertakäyttöruiskua (KUVA 10).



KUVA 9. Uuttoliuokset





KUVA 10. Imusuodatus kertakäyttöruiskulla

Suodatetut näytteet analysoitiin spektrofotometrin avulla. Laite piti käynnistää vähintään puoli tuntia ennen mittausta. Näytteet laitettiin 50 °C lämpöhauteeseen 30 minuutin ajaksi, minkä jälkeen näytteet jäädytettiin nopeasti jäähäuteessa 10 minuutin ajan. Standardisuoran ja nollanäytteen mittausten jälkeen vedellä laimennetut näytteet asetettiin mittauskammioon kertakäyttöisissä akryylikyveteissä. Laite laski tulokset automaattisesti kokonaisfenolipitoisuuden standardikäyrän perusteella. Tuloksia laskettaessa tuli huomioida näytteiden laimennuskertoimet sekä lähtöaineiden punnitukset ja liuotintilavuudet.

Näytekapseleihin jääneet massat otettiin tarkasti astioista asettimen ja pensselin avulla punnituille alustoille ja laitettiin uuniin kuivumaan 105 °C lämpötilaan. Kuvassa 11 näkyy kiinteän jäännösmassan vasemmalta oikealle enenevä tummuminen korkeamman uuttolämpötilan vuoksi.



KUVA 11. Jäännösmassat uunissa



Kuivauksen jälkeen näytteet laitettiin eksikaattoriin jäähtymään ja punnittiin huoneenlämpöisenä liuenneiden kuiva-aineiden pitoisuuden määrittystä varten. Jokaisen uuton liuenneet kiintoaineet laskettiin erikseen käyttäen yhtälöä

$$\frac{m(\text{kuiva näyte}) - m(\text{kuiva jäännös})}{m(\text{kuiva näyte})} = \frac{7,8005 \text{ g} * 0,493 - 3,13845 \text{ g}}{3,8456465 \text{ g}} = 0,183895 \approx 18,4\% \quad (2)$$

Lopuksi kuivat jäännökset siirrettiin muovisiin säilytysastioihin mahdollista jatkokäyttöä varten. Taulukosta 4 ilmenee kaikkien koeajojen uuttoparametrit.

TAULUKKO 4. Koeajot uuttoparametreineen

| NO | NAME | TEMP [°C] | TIME [min] | RATIO [g dw/ml] |
|----|------|-----------|------------|-----------------|
| 1  | [1]  | 90        | 10         | 1/10            |
| 2  | A    | 140       | 10         | 1/10            |
| 3  | B    | 90        | 30         | 1/10            |
| 4  | AB   | 140       | 30         | 1/10            |
| 5  | C    | 90        | 10         | 1/40            |
| 6  | AC   | 140       | 10         | 1/40            |
| 7  | BC   | 90        | 30         | 1/40            |
| 8  | ABC  | 140       | 30         | 1/40            |
| 9  | 1    | 115       | 20         | 1/25            |
| 10 | 2    | 115       | 20         | 1/25            |
| 11 | 3    | 115       | 20         | 1/25            |
| 12 | N9   | 90        | 20         | 1/25            |
| 13 | N10  | 140       | 20         | 1/25            |
| 14 | N11  | 115       | 10         | 1/25            |
| 15 | N12  | 115       | 30         | 1/25            |
| 16 | N13  | 115       | 20         | 1/10            |
| 17 | N14  | 115       | 20         | 1/40            |
| 18 | V1   | 115       | 20         | 1/25            |
| 19 | V2   | 130       | 20         | 1/25            |
| 20 | V3   | 160       | 20         | 1/25            |

## 5 TULOKSET

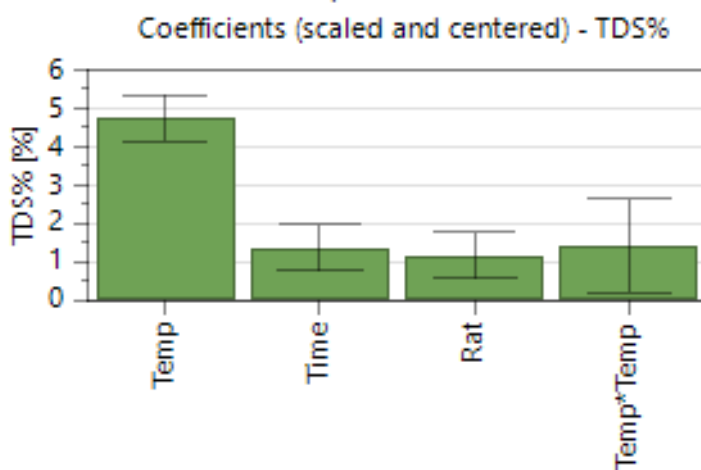
UV-Vis-analyysien tulokset syötettiin Exceeliin (TAULUKKO 5), ja laskettiin kosteuden, punnitun näytteen massan ja saadun liuoksen tilavuuden perusteella fenolisten yhdisteiden kokonaispitoisuus (TPC) sekä näytteestä liuenneiden kiinteiden aineiden osuus (TDS). Korkeimmat fenolisten yhdisteiden saannot (69,4 ja 73,4 mg GAE/g dw) mitattiin näytteille AC1 ja AC2, joissa lämpötila oli 140 °C, uuttoaika 10 min ja kiintoaine-liuotinsuhde g dw/40 ml. Punnitusta näytteestä liuenneiden kiintoaineiden suurimmat osuudet 33,5 % ja 32,1 % saavutettiin uutoissa ABC1 ja ABC2 muutoin samoilla uutto-parametreilla, mutta uuttoaika oli 30 minuuttia.

TAULUKKO 5. Saadut tulokset

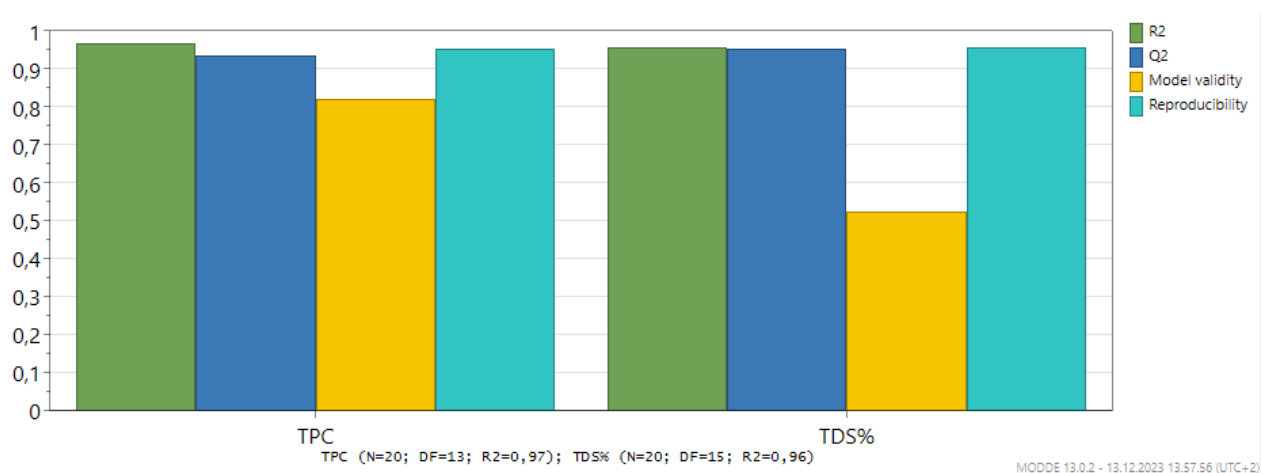
| Exp Name | TPC [mg GAE/g ka] | TDS % ka |
|----------|-------------------|----------|
| (1)1     | 42,150            | 15,0     |
| A1       | 55,499            | 26,0     |
| B1       | 46,730            | 19,5     |
| AB1      | 54,160            | 29,9     |
| C1       | 58,693            | 19,3     |
| AC1      | 69,393            | 28,8     |
| BC1      | 60,761            | 21,0     |
| ABC1     | 69,898            | 33,5     |
| 01       | 68,506            | 21,0     |
| 02       | 59,793            | 20,6     |
| 03       | 64,710            | 22,1     |
| (1)2     | 40,115            | 16,7     |
| A2       | 54,856            | 25,2     |
| B2       | 44,398            | 18,3     |
| AB2      | 50,426            | 27,5     |
| C2       | 52,011            | 18,5     |
| AC2      | 73,392            | 26,8     |
| BC2      | 58,459            | 18,7     |
| ABC2     | 69,329            | 32,1     |
| 04       | 67,922            | 22,5     |
| 05       | 58,294            | 20,9     |
| 06       | 67,964            | 21,0     |

Tulokset lisättiin MODDEen, jossa edettiin optimointivaiheen suunnitteluun. Kaksi poikkeavaa seurantakokeiden tulosta muuttujien keskiarvojen uutoista poistettiin, koska ne poikkesivat selkeästi

muista. Optimointiohjelma kertoo saatujen tulosten asettumisesta lineaarisesti vastaavasti kuin kuvassa 16 sekä käytettyjen parametrien merkityksen näytteiden käsittelyssä virherajoihin (KUVA 12). Virherajat näkyvät mustina viivakuvioina palkeissa. Merkittävyys on sitä suurempi, mitä kauempana arvo on x-akselista. Biologisille systeemeille suositeltu logaritminen parametrien muunnos on tehty. Kuvassa 13 näkyy käytetyn mallin sopivuus. Kahden ensimmäisen palkin,  $R_2$  ja  $Q_2$ , eroavuus tulisi olla korkeintaan 20 prosenttia. Nämä kuvaavat käytetyn mallin sopivuutta ja ennustettavuuden tarkkuutta.  $Q_2$  tulee olla suurempi kuin 0,1, jotta malli katsotaan merkittäväksi ja suurempi kuin 0,5 hyvälle mallille. Oranssi palkki kuvaa mallin paikkansapitävyyttä ja vaaleansininen toistettavuutta. Kuva kertoo, että käytetyt mallit ovat hyviä ja sopivia ja ennustettavuus on tarkka.



KUVA 12. Parametrien kerroinkuvaajat MODDEssa TDS:n suhteen



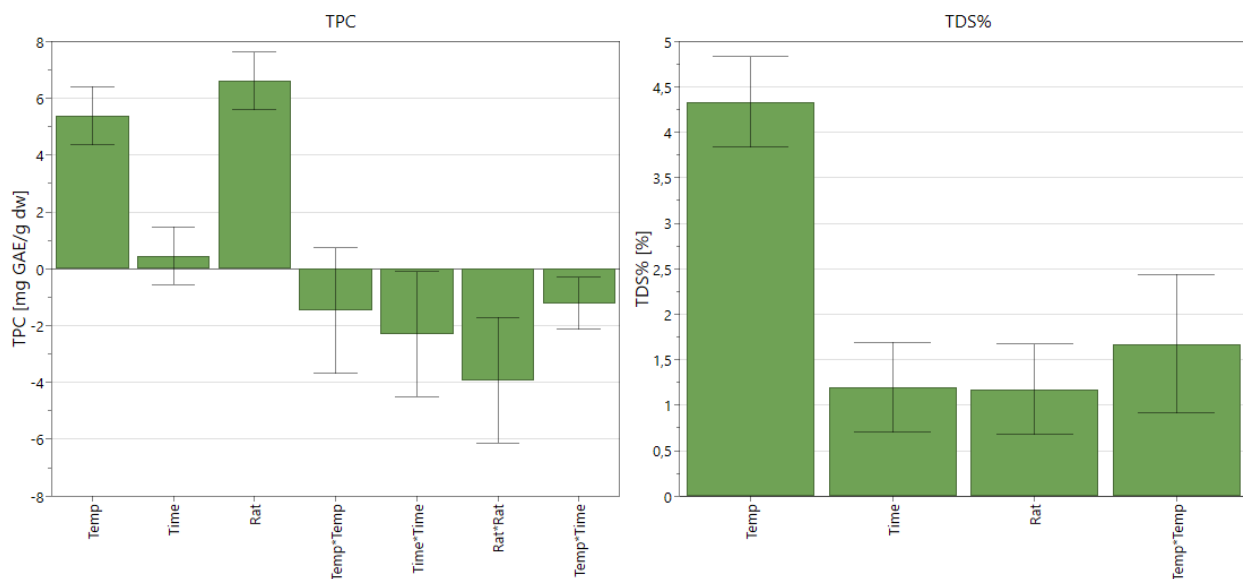
KUVA 13. Käytetyn mallin sopivuus fenolisten yhdisteiden saannossa ja liuenneiden kiintoaineiden määrässä

Optimointivaiheessa valittiin MODDEssa optimointimenetelmäksi CCF (Central Composite Face Design), jonka perusteella tehtiin seitsemän erilaista uuttoa lämpötilassa 115 °C (TAULUKKO 6), joissa kuiva-aineen ja liuottimen suhde sekä aika vaihtelevat ja lisäksi kaksi ääriämpötilojen uuttoa suhteella 1 g kuiva-ainetta/20 ml liuotinta ja 20 minuutin uuttoaajalla. Kolme näistä oli jo suoritettu, joten niitä ei tehty uudestaan. Suurin kokonaisfenolisten yhdisteiden pitoisuus 76,1 mg GAE/g kuiva-ainetta saavutettiin uutossa N10 140 °C lämpötilassa 20 minuutin uuttoaajalla suhteella 1/25. Liuenneita kiintoaineita oli prosentuaalisesti eniten samassa uutossa, 27,6 %.

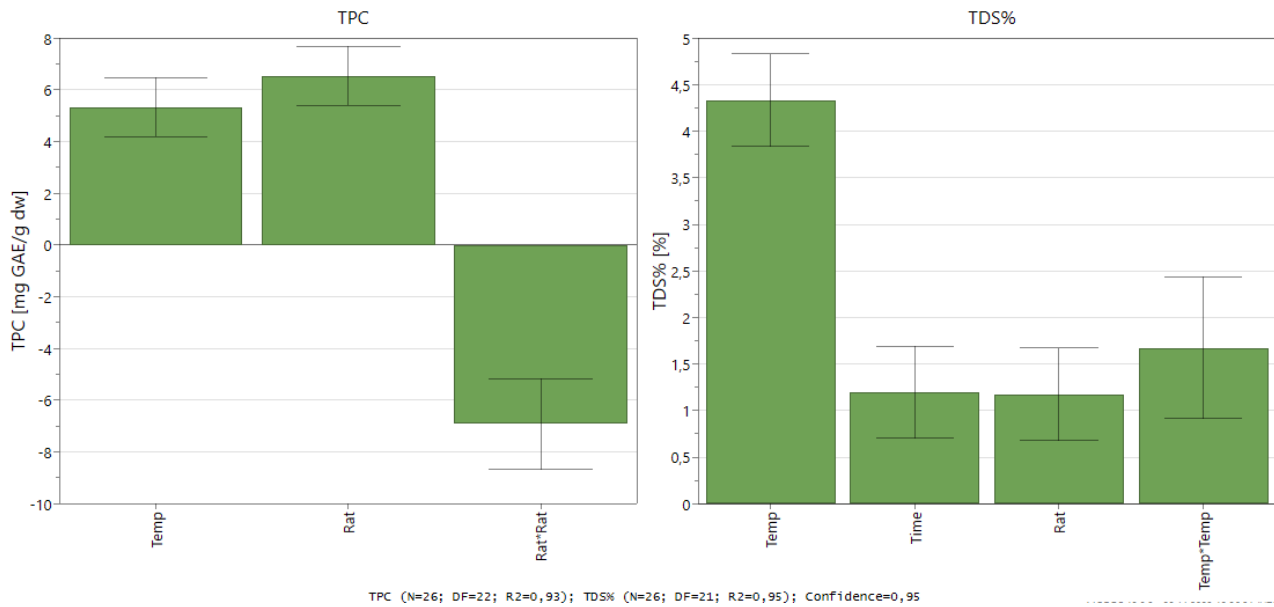
TAULUKKO 6. Optimointivaiheen uutot

| Exp no | Temp [°C] | Time [min] | Ratio [g dw/ml] |
|--------|-----------|------------|-----------------|
| N9     | 90        | 20         | 1/25            |
| N10    | 140       | 20         | 1/25            |
| N11    | 115       | 10         | 1/25            |
| N12    | 115       | 30         | 1/25            |
| N13    | 115       | 20         | 1/10            |
| N14    | 115       | 20         | 1/40            |

Uutoista saadut tulokset syötettiin MODDEen edellisten tulosten lisäksi ja tuloksia analysoitiin ohjelman tarjoamilla työkaluilla. Vaikuttavuuskerrointen kartalta (KUVA 14) poistettiin vähemmän merkitseviä kertoimia, jotta ne eivät häiritsisi optimoinnin lopputulosta (KUVA 15).

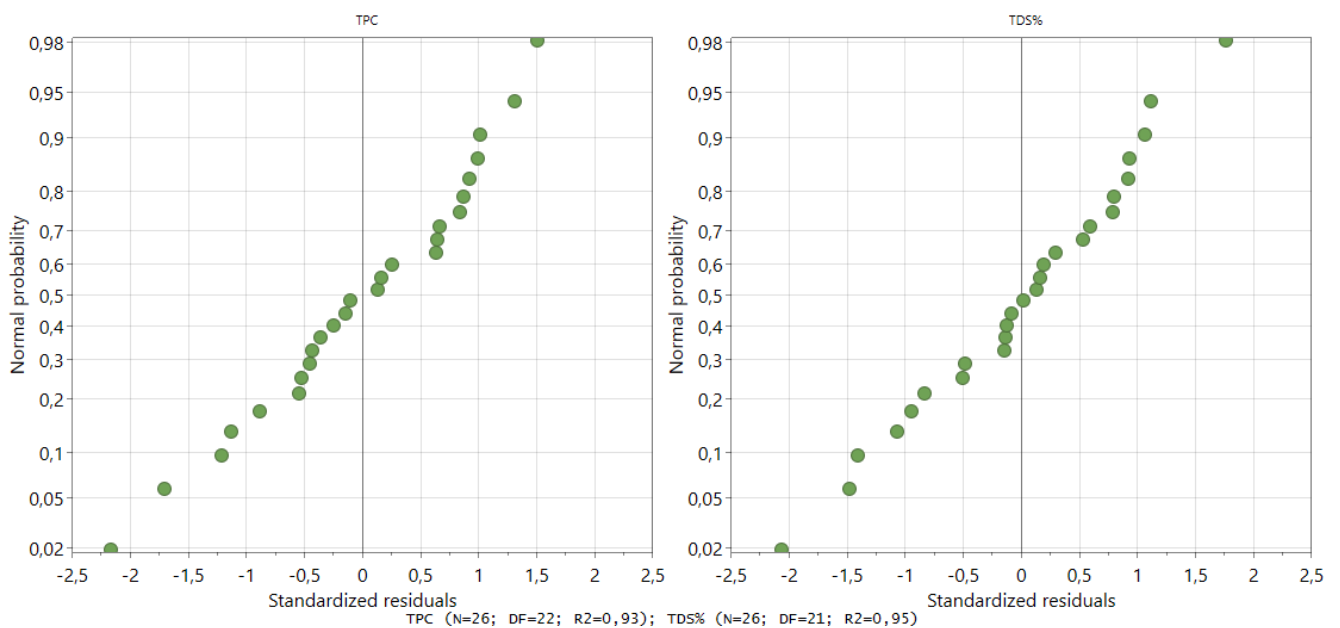


KUVA 14. Kaikkien vaikuttavuuskertoimien kaavakuva



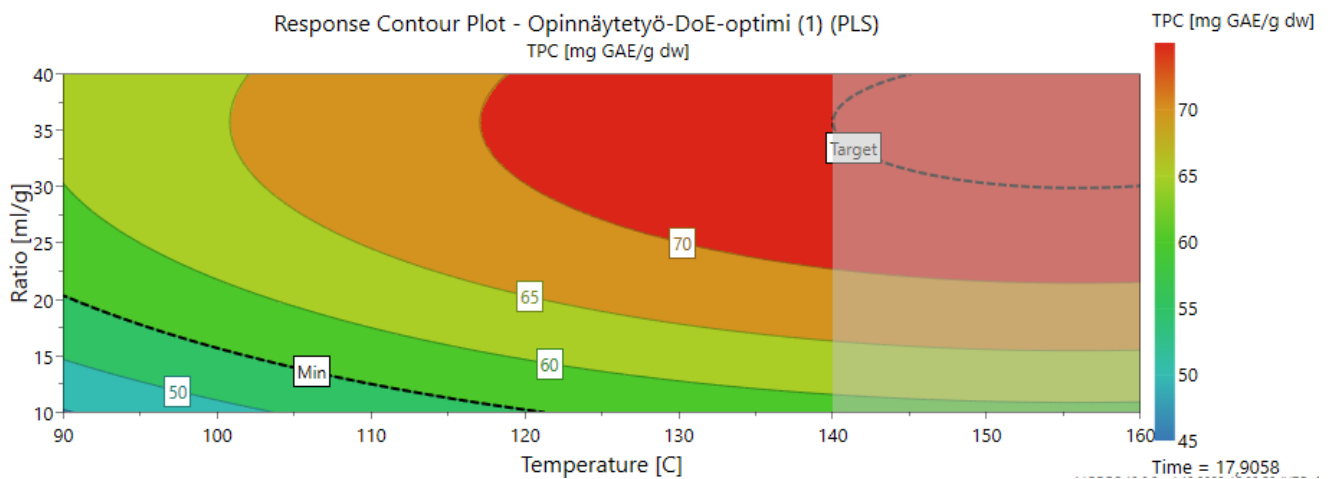
KUVA 15. Merkitsevimmät vaikuttavuuskertoimet

Kaikkien saatujen tulosten perusteella tehtiin erilaisia kaavioita ja kuvaajia, joissa tulokset saataisiin havainnollisesti ja loogisesti esitettyä. Kuvassa 16 näkyy residuaalien normaali todennäköisyysjakauma asettuneena lineaarisesti koordinaatistoon. Standardoidut residuaalit on määritetty raakajäännösten suhteena jäännöskeskijahontaan. Jos kaikki pisteet ovat lähellä diagonaalisen lävistäjän suoraa viivaa, normaalijakauma toteutuu ja lopputulos on ideaalinen.

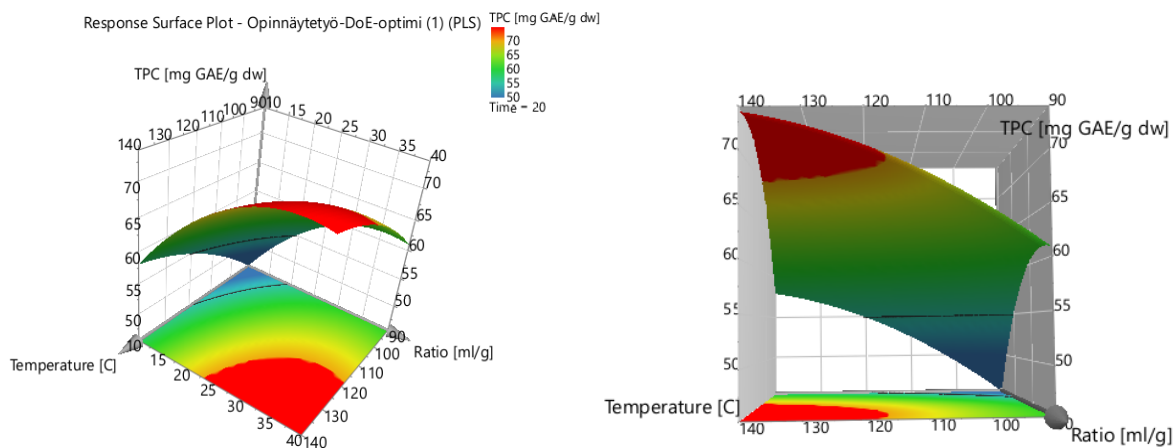


KUVA 16. Residuaalien todennäköisyysjakauma

Parhaat saannot fenolisissa yhdisteissä näkyvät havainnollisimmin vyöhykekaavioissa ja 3D-kuvaajissa. Analysointiin käytetty malli on PLS (Partial Least Squares regression) eli osittainen pienimmän neliösumman regressio. Kuvista 17 ja 18 ilmenee fenolisten yhdisteiden saanto testatulla lämpötila-alueella 90–140 °C ja kuvasta 17 lisäksi ennustettu saanto 140–160 asteen alueella suhteessa kiintoaine-liuotin-pitoisuuteen. X-akselilla on lämpötila, y-akselilla kiintoaine-liuotinsuhde ja aika on vakio 17,9 minuuttia.



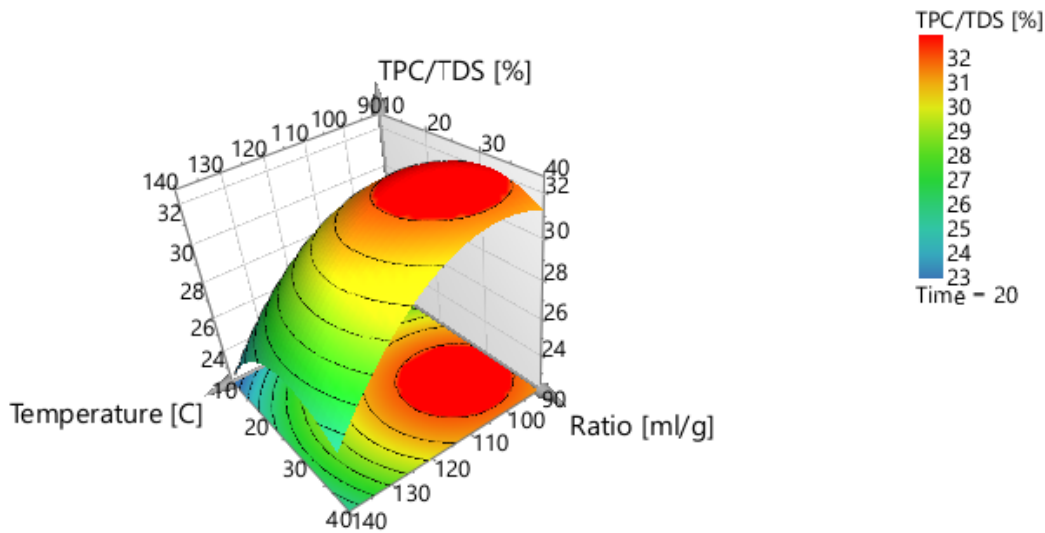
KUVA 17. Fenolisten yhdisteiden saanto



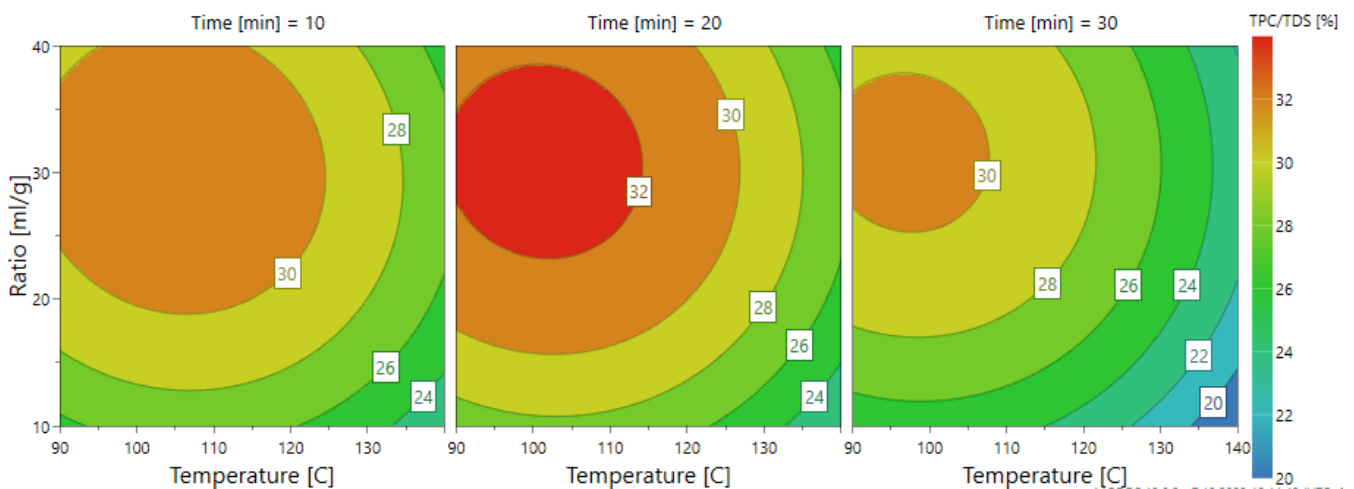
KUVA 18. TPC-saanto kolmiulotteisessa kuvaajassa

Kuvissa 19 ja 20 fenolisten yhdisteiden saanto on jaettu liuenneiden kiintoaineiden pitoisuudella puh-taimman saannon määrittämiseksi. Kokonaisfenolisia yhdisteitä haluttiin suurin mahdollinen määrä siten, että muita liuenneita uuteaineita olisi mahdollisimman vähän. Aika on vakioitu 20 minuuttiin,

koska kuten kuvasta 14 voi havaita, uuttoajalla on parametreista vähiten vaikutusta fenolisten yhdisteiden saantoon.



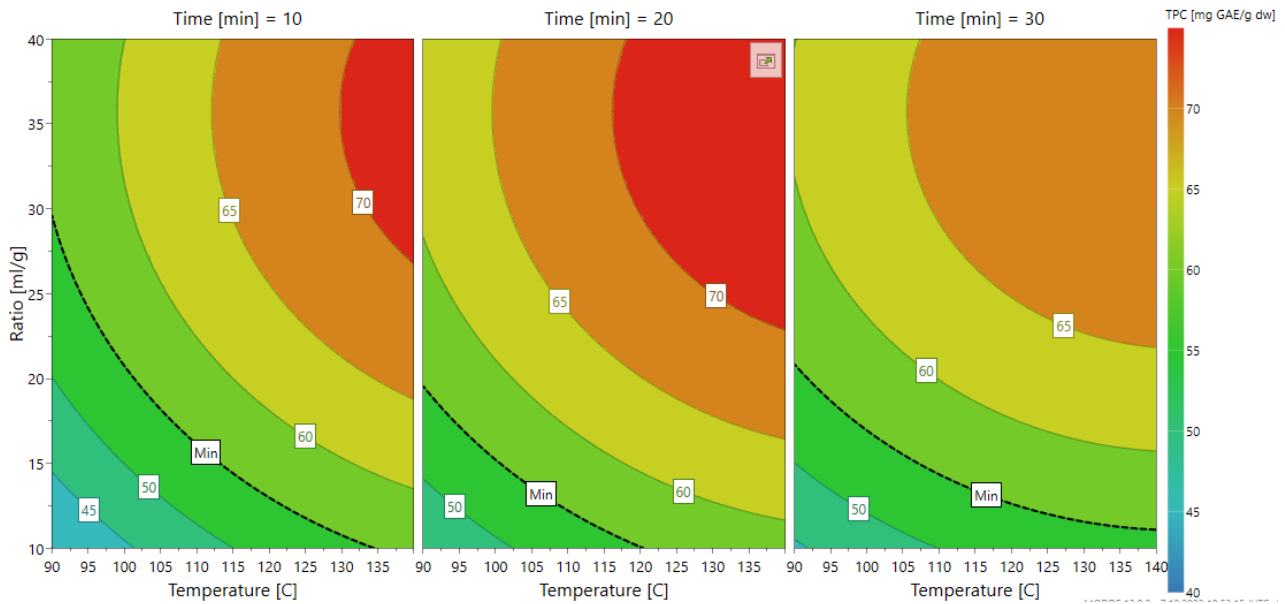
KUVA 19. Fenolisten yhdisteiden saanto suhteessa liuenneiden kiintoaineiden määrään



KUVA 20. Fenoliset yhdisteet uuttoliuoksessa suhteessa muiden kiintoaineiden määrään

Kuvissa 20 ja 21 ilmenee puhtaimman saannon punainen alue ja samoin punaisena alueet, joissa fenolisten yhdisteiden saanto on suurin. 20 minuutin uuttoajalla on saavutettu molemmissa suurimmat pitoisuudet, mutta puhtain saanto on noin 90–110 °C:ssa ja kiintoaine-liuotinsuhteen ollessa 1 g dw/25–40 ml. Fenolisten yhdisteiden saanto oli korkeimmillaan yli 70 mg GAE/g dw, kun uuttolämpötila oli yli 120 °C ja kiintoaine-liuotinsuhde on yli 1 g dw/25 ml. Tavoiteltaessa puhtainta saantoa, jossa TPC

on myös mahdollisimman korkea, on mahdollista saavuttaa pitoisuus 65 mg GAE/g dw lämpötilassa 110 °C ja suhteella 1/30.



KUVA 21. Fenolisten yhdisteiden pitoisuus eri uuttoajoilla

Optimointitulosten ennustettavuuden vuoksi tehdyt mallin validointiutot osoittivat ennustettujen TPC saantojen olevan hieman matalampia kuin todellisissa uutoissa saatavat määrät. Liuenneiden kiintoainemäärä erosi noin yhden prosenttiyksikön ennustettua arvoa ja todellista uuttoa verrattaessa.

Mittausalueen yläpuolelta valitussa lämpötilassa tehdyn uuton ennuste ei ollut TPC:n osalta täsmällinen. Käytetty malli ei ole kovin tarkka, jos valitulta mittausalueelta poiketaan. Validointiutujen ajo-parametrit ja tulokset ovat nähtävillä taulukossa 7.

TAULUKKO 7. Validointiutot

| Exp Name | Temp. [°C] | Time [min] | Ratio [g dw/ml] | Predicted TPC [mg GAE/g dw] | Analyzed TPC [mg GAE/g dw] | Predicted TDS [%] | Analyzed TDS [%] |
|----------|------------|------------|-----------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------|
| V1       | 115        | 20         | 1/25            | 67,0                        | 70,4                       | 21,1              | 22,8             |
| V2       | 130        | 20         | 1/25            | 70,1                        | 73,7                       | 25,1              | 26,4             |
| V3       | 160        | 20         | 1/25            | 71,8                        | 81,9                       | 37,7              | 36,3             |



## 6 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyön tavoitteena oli optimoida paineistettu kuumavesiuutto fenolisten yhdisteiden erottamiseksi kuusen kuoresta. Uuttoihin käytettiin nopeutettua liuotinuuttoa hyödyntävää ASE-laitteistoa ja uuttoliuosten kokonaisfenolipitoisuudet analysoitiin Cary 60 UV -spektrofotometrillä Folin Ciocalteu -menetelmällä. Prosessin optimoinnissa hyödynnettiin MODDE Pro -ohjelmistoa. Luodun mallin perusteella voitiin ennustaa kokonaisfenolipitoisuudet sekä liuenneen kiintoaineen määrä myös sellaisissa uutto-olosuhteissa, joita ei kokeellisesti mitattu. Mallin testaamiseksi tehtiin kolme validointiuuttoa, joiden tuloksista analysoitiin kokonaisfenoliset yhdisteet ja laskettiin liuenneiden kiintoaineiden määrä. Tulokset poikkesivat hienoisesti ennustetuista määristä, mutta olivat oikeansuuntaisia. Poikkeama saannossa mittausalueella oli viisi prosenttia ja lämpötilan ylittäessä mittausalueen yli kymmenen prosenttia. TDS:n määrä poikkesi ennusteesta 4–8 prosenttia. Tämä voi johtua esimerkiksi käytettyjen menetelmien epätarkkuudesta, kuiva-ainepitoisuuden vaihtelusta tai alkuperäisen näytteen epätaalaatuisuudesta.

Analyysien perusteella suurimmat pitoisuudet fenolisten yhdisteiden saannossa saatiin yli 120 °C lämpötilaa käyttäen ja kiintoaine-liuotinsuhteen ollessa yli 1/25 g dw/ml. Korkeammassa uuttolämpötiloissa fenolisten yhdisteiden saanto oli yli 60 mg GAE/gramma kuiva-ainetta. Tutkituista uuttoparametreista uuttoaika oli vähiten merkitsevä. Fenolisten yhdisteiden saanto vaihteli käytetyillä parametreilla 40–73 mg GAE/g kuiva-ainetta. Puhtain saanto verraten fenolisten yhdisteiden saantoa liuenneiden kiintoaineiden määrään saatiin 1 g dw/25–40 ml liuotinta kohden ja lämpötilan ollessa noin 90–110 °C. Näiden tulosten perusteella paineistettu kuumavesiuutto kannattaisi tehdä noin 30 ml:n liuotinmäärällä näytteen eli kuivatun kuusen kuoren yhtä grammaa kohti. Uuttoaikana kannattaisi käyttää 20 minuuttia sekä lämpötilana noin 110 °C, jotta fenolisten yhdisteiden saanto olisi mahdollisimman korkea, noin 65 mg GAE/g dw, mutta muita uuteyhdisteitä olisi liuoksessa mahdollisimman vähän.

Slovakialaisessa yliopistossa tehdyssä vertailussa eri uuttometodien välillä saatiin kuusen kuoren uutossa ASE-laitteella 136,2–230,3 mg GAE/100 g kuivaa kuorta. Liuottimena käytettiin 96,6 % etanolia ja kaikki näytteet käsiteltiin höyryllä ennen uuttamista. (Haz, Jablonsky, Majová, Skulcova & Stržincová 2018.) Kilpeläinen ym. (2023) uuttivat eri lämpötiloissa ASE-uuttolaitteistolla kuivatusta kuusen kuoresta fenolisiin yhdisteisiin kuuluvia tanniineja saaden korkeimman määrän liuenneita kiintoaineita 140 °C lämpötilassa tuloksella 117 mg/g, josta tanniineja oli 47 mg/g. Tulosten merkittäväkin vaihtelu saattaa johtua esimerkiksi erilaisista kuorimismenetelmistä ja kuoren säilytysolosuhteista ennen uuttoa.

Kokonaisfenolisten yhdisteiden määrittämisessä käytetty Folin Ciocalteu -menetelmä perustuu spektrofotometrisesti havaittavien sinisten kompleksien muodostumisen mittaamiseen. Komplekseja voivat kuitenkin muodostaa fenolisten yhdisteiden lisäksi muutkin pelkistävät kemialliset komponentit kuten monosakkaridit tai niiden reaktiot aminohappojen tai proteiinien kanssa. Luvussa 3.1 mainitut tekijät voivat johtaa siihen, että virheellisen korkea saanto korkeimmissa lämpötiloissa johtuu antioksidanttiyhdisteiden muodostumisesta Maillardin reaktion, lämpöhapettumisen ja karamellisoitumisen eli pelkistävien sokereiden välisten kemiallisten reaktioiden seurauksena. Määrittämisessä käytetty spektrofotometrinen analyysi saattaa siis virheellisesti aiheuttaa suurimman saannon, kun kuumavesiuutto tehdään korkeimpia lämpötiloja käyttäen.

## LÄHTEET

- Baldursdóttir, V. 2011. *Occurrence of different persistent organic pollutants in Atlantic cod (Gadus morhua L.) in Icelandic waters*. Akureyri: University of Akureyri. Master of Science in Natural Resource Sciences. Master of Science Thesis. Saatavissa: <https://skemman.is/bitstream/1946/9047/1/Occurrence%20of%20different%20POPs%20in%20Atlantic%20cod.pdf>. Viitattu 16.11.2023.
- Bhattarai, M. 2020. *Associative behavior of spruce galactoglucomannans in aqueous solutions and emulsions*. Helsinki: Helsingin yliopisto. Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta. Väitöskirja. Saatavissa: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-51-6704-0>. Viitattu 15.11.2023.
- Circwaste. *Uusia tuotteita kotimaisen puuntuotannon sivuvirroista*. Saatavissa: [https://www.materiaalitkiertoon.fi/fi-FI/Ajankohtaista/Uusia\\_tuotteita\\_kotimaisen\\_puuntuotannon\(50442\)](https://www.materiaalitkiertoon.fi/fi-FI/Ajankohtaista/Uusia_tuotteita_kotimaisen_puuntuotannon(50442)). Viitattu 23.11.2023.
- Chmelová, D., Škulcová, D., Legerská, B., Horník, M. & Ondrejovič, M. 2020. Ultrasonic-assisted extraction of polyphenols and antioxidants from *Picea abies* bark. *Journal of Biotechnology*, 314–315, 3, 25–33. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.003>. Viitattu 28.11.2023.
- Cruz-Casillas, F., García-Cayuela, T. & Rodriguez-Martinez, V. Application of Conventional and Non-Conventional Extraction Methods to Obtain Functional Ingredients from Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) Tissues and By-Products. *Applied Sciences*, 11, 16, 7303. Saatavissa: <https://doi.org/10.3390/app11167303>. Viitattu 28.11.2023.
- Dou, J., Sui, M., Malinen, K., Pesonen, T., Isohanni, T. & Vuorinen, T. 2022. Spruce bark stilbenes as a nature-inspired sun blocker for sunscreens. *Green Chemistry*, 24, 7, 2962–2974. Saatavissa: <https://doi.org/10.1039/D2GC00287F>. Viitattu 26.11.2023.
- Haapala, A. 2017. *Sivuvirtojen hyödyntäminen - näkymiä tutkimusmaailmasta*. Saatavissa: <https://puumies.fi/wp-content/uploads/2017/09/PUUMI-Sivuvirrat-Haapala2017.pdf>. Viitattu 24.11.2023.
- Haz, A., Jablonsky, M., Majová, V., Skulcova, A. & Strižincová, P. 2018. Comparison of different extraction methods for the extraction of total phenolic compounds from spruce bark. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 22, 72–75. Saatavissa: <https://keypublishing.org/jhed/wp-content/uploads/2020/07/06.-Full-paper-Ales-Haz.pdf>. Viitattu 8.12.2023.
- Hed, L. & Mäkelä, R. 2022. *Kokonaisfenolipitoisuuden määrittäminen UV-spektrofotometrillä Folin Ciocalteu menetelmällä*. Centria TKI: analyysimenetelmäohje.
- Holmbom, B. 2011. Extraction and utilisation of non-structural wood and bark components. Teoksessa R. Alén (toim.) *Papermaking Science and Technology: Book 20, Biorefining of Forest Resources*. Helsinki: Paper Engineers' Association: Paperi ja Puu., 176–224.
- Innomost. *Products*. Saatavissa: <https://www.innomost.com/innomost-products/>. Viitattu 23.11.2023.
- Jääskeläinen, A-S. & Sundqvist H. 2007. *Puun rakenne ja kemia*. Helsinki: Hakapaino Oy.

- Karjalainen, E. 1990. *Tuotteen ja prosessin optimointi koesuunnittelulla Taguchi-menetelmä*. Helsinki: Metalliteollisuuden Kustannus Oy.
- Karjalainen, T. 2007. *Koesuunnittelu – Tehokas prosessin sekä datankeräys- ja analysointimenetelmä*. Saatavissa: <https://qkk.fi/tehokas-koesuunnittelu/>. Viitattu 26.11.2023.
- Kilpeläinen, P., Liski, E. & Saranpää, P. 2023. Optimising and scaling up hot water extraction of tannins from Norway spruce and Scots pine bark. *Industrial Crops and Products*, 192, 116089. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116089>. Viitattu 27.11.2023.
- Kyyrö, S., Altgen, M. & Rautkari, L. 2020. Pressurized hot water extraction of Scots pine sapwood: effect of wood size on obtained treatment products. *Biomass Conv. Bioref.*, 12, 5019–5029. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00927-3>. Viitattu 26.11.2023.
- Latva-Mäenpää, H. 2017. *Bioactive and protective polyphenols from roots and stumps of conifer trees (Norway spruce and Scots pine)*. Helsinki: Helsingin yliopisto. Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta. Väitöskirja. Saatavissa: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-951-51-3466-0>. Viitattu 15.11.2023.
- Metsäkeskus. 2023. *CEforestry*. Saatavissa: <https://www.metsakeskus.fi/fi/hankkeet/ceforestry>. Viitattu 15.11.2023.
- Mojzer, E., Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž. & Bren, U. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21, 7, 901. Saatavissa: <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>. Viitattu 23.11.2023.
- Montinutra. *From forest to valuable ingredients*. Saatavissa: <https://montinutra.com/>. Viitattu 23.11.2023.
- Plaza, M. & Turner, C. 2015. Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 39–54. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.022>. Viitattu 16.11.2023.
- Routa, J., Brännström, H., Anttila, P., Mäkinen, M., Jänis, J. & Asikainen, A. 2017. Wood extractives of Finnish pine, spruce and birch – availability and optimal sources of compounds. Helsinki: Luonnonvarakeskus. *Natural resources and bioeconomy studies*, 73. Saatavissa: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-326-495-3>. Viitattu 23.11.2023.
- Saldaña, M. & Valdivieso-Ramírez, C. 2015. Pressurized fluid systems: Phytochemical production from biomass. *The Journal on Supercritical Fluids*, 96, 228–244. Saatavissa: <https://doi.org.ezproxy.centria.fi/10.1016/j.supflu.2014.09.037>. Viitattu 26.11.2023.
- Singh, P. & Saldaña, M. Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel. *Food Research International*, 44, 8, 2452–2458. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.006>. Viitattu 26.11.2023.
- Soilfood. *Ravinnekuidut ja Nollakuidut*. Saatavissa: <https://soilfood.fi/tuotekategoria/maanparannuskuidut/>. Viitattu 23.11.2023.
- Suomi, J. 2009. *Kemiallisen näytteen esikäsitteily*. Helsinki: Otavan Kirjapaino Oy.

- Tandon, S. & Rane, S. 2008. Decoction and Hot Continuous Extraction Techniques. Teoksessa S. Handa, S. Khanuja, G. Longo & D. Rakesh (toim.) *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste: International Centre for Science and High Technology, 93–106. Saatavissa: [https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction\\_technologies\\_for\\_medicinal\\_and\\_aromatic\\_plants\\_0.pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf). Viitattu 16.11.2023.
- Taylor, C., Baker, A., Chapman, M., Reynolds, W., Jolley, K., Clemens, G., Smith, G., Blacker, A., Chamberlain, T., Christie, S., Taylor, B. & Bourne, R. 2021. Flow chemistry for process optimisation using design of experiments. *Journal of Flow Chemistry*, 11, 75–86. Saatavissa: <https://doi.org/10.1007/s41981-020-00135-0>. Viitattu 27.11.2023.
- Teo, C., Tan, S., Yong, J., Hew, C. & Ong, E. 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217, 16, 2484–2494. Saatavissa: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.050>. Viitattu 16.11.2023.
- Uusi puu. *Maanparannuskuidut metsäteollisuuden sivuvirroista*. Saatavissa: <https://www.uusi-puu.fi/ratkaisut/maanparannuskuidut/>. Viitattu 23.11.2023.
- Ympäristöministeriö. 2023. *Mitä on kestävä kehitys?* Saatavissa: <https://ym.fi/mita-on-kestava-kehitys>. Viitattu 16.11.2023.
- Zucoloto, M., Ku, K., Kushad, M. & Sawwan, J. 2015. Bioactive compounds and quality characteristics of five apples cultivars. *Ciência Rural*, 45, 11, 1972–1979. Saatavissa: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141160>. Viitattu 5.12.2023.

| CE Forestry Kokonaisfenolit Marjon ja Tatun näytteet |               |                               |                        |                 |               |                |                |                   |                   |                     |
|--|---------------|-------------------------------|------------------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Kuusen kuori   |               |                               |                        |                 |               |                |                |                   |                   |                     |
| Kokonaisfenolit 18.10.2023                           |               |                               |                        |                 |               |                |                |                   |                   |                     |
| Näyte  | Kosteus (m-%) | Näytteen punnitus uuttoon (g) | Kuivapaino uuttoon (g) | uuttoliuos (ml) | TPC laimennos | 1. TPC (mg/ml) | 2. TPC (mg/ml) | 1. TPC (mg GAE/g) | 2. TPC (mg GAE/g) | TPC Mean (mg GAE/g) |
| 1-1  | 50,7          | 18,4045                       | 9,07342                | 106             | 100           | 0,04           | 0,04           | 46,73             | 46,73             | 46,73               |
| 1-2  | 50,7          | 18,4028                       | 9,07258                | 106             | 50            | 0,075          | 0,077          | 43,813            | 44,982            | 44,398              |
| 2-1  | 50,7          | 18,4021                       | 9,07224                | 106             | 100           | 0,047          | 0,048          | 54,915            | 56,083            | 55,499              |
| 2-2  | 50,7          | 18,4051                       | 9,07371                | 110             | 50            | 0,09           | 0,091          | 54,553            | 55,159            | 54,856              |
| 3-1  | 50,7          | 18,4039                       | 9,07312                | 108             | 100           | 0,045          | 0,046          | 53,565            | 54,755            | 54,16               |
| 3-2  | 50,7          | 18,4002                       | 9,0713                 | 107             | 50            | 0,086          | 0,085          | 50,72             | 50,131            | 50,426              |
| 4-1  | 50,7          | 7,8008                        | 3,84579                | 126             | 50            | 0,036          | 0,037          | 58,974            | 60,612            | 59,793              |
| 4-2  | 50,7          | 7,804                         | 3,84737                | 126             | 20            | 0,088          | 0,09           | 57,639            | 58,949            | 58,294              |
| 5-1  | 50,7          | 4,94                          | 2,43542                | 130             | 100           | 0,013          | 0,013          | 69,393            | 69,393            | 69,393              |
| 5-2  | 50,7          | 4,9403                        | 2,43557                | 130             | 50            | 0,027          | 0,028          | 72,057            | 74,726            | 73,392              |
| 6-1  | 50,7          | 4,942                         | 2,43641                | 131             | 100           | 0,013          | 0,013          | 69,898            | 69,898            | 69,898              |
| 6-2  | 50,7          | 4,9445                        | 2,43764                | 130             | 50            | 0,026          | 0,026          | 69,329            | 69,329            | 69,329              |
| 7-1  | 50,7          | 18,407                        | 9,07465                | 102             | 100           | 0,037          | 0,038          | 41,588            | 42,712            | 42,15               |
| 7-2  | 50,7          | 18,407                        | 9,07465                | 102             | 50            | 0,075          | 0,076          | 42,15             | 42,712            | 42,431              |
| 7-2  | 50,7          | 18,4056                       | 9,07396                | 104             | 100           | 0,035          | 0,035          | 40,115            | 40,115            | 40,115              |
| 7-2  | 50,7          | 18,4056                       | 9,07396                | 104             | 50            | 0,071          | 0,073          | 40,688            | 41,834            | 41,261              |
| 8-1  | 50,7          | 7,802                         | 3,84639                | 124             | 100           | 0,018          | 0,018          | 58,028            | 58,028            | 58,028              |
| 8-1  | 50,7          | 7,802                         | 3,84639                | 124             | 50            | 0,042          | 0,043          | 67,7              | 69,312            | 68,506              |
| 8-1  | 50,7          | 7,802                         | 3,84639                | 124             | 20            | 0,096          | 0,095          | 61,897            | 61,252            | 61,575              |
| 8-2  | 50,7          | 7,8079                        | 3,84929                | 126             | 100           | 0,018          | 0,018          | 58,92             | 58,92             | 58,92               |
| 8-2  | 50,7          | 7,8079                        | 3,84929                | 126             | 50            | 0,041          | 0,042          | 67,103            | 68,74             | 67,922              |
| 8-2  | 50,7          | 7,8079                        | 3,84929                | 126             | 20            | 0,092          | 0,094          | 60,229            | 61,539            | 60,884              |
| 9-1  | 50,7          | 4,942                         | 2,43641                | 130             | 50            | 0,022          | 0,023          | 58,693            | 61,361            | 60,027              |
| 9-1  | 50,7          | 4,942                         | 2,43641                | 130             | 20            | 0,054          | 0,056          | 57,626            | 59,76             | 58,693              |
| 9-2  | 50,7          | 4,942                         | 2,43641                | 132             | 50            | 0,02           | 0,02           | 54,178            | 54,178            | 54,178              |
| 9-2  | 50,7          | 4,942                         | 2,43641                | 132             | 20            | 0,048          | 0,048          | 52,011            | 52,011            | 52,011              |
| 10-1   | 50,7          | 4,9474                        | 2,43907                | 130             | 50            | 0,022          | 0,023          | 58,629            | 61,294            | 59,961              |
| 10-1   | 50,7          | 4,9474                        | 2,43907                | 130             | 20            | 0,056          | 0,058          | 59,695            | 61,827            | 60,761              |
| 10-2   | 50,7          | 4,9465                        | 2,43862                | 132             | 50            | 0,023          | 0,023          | 62,248            | 62,248            | 62,248              |
| 10-2   | 50,7          | 4,9465                        | 2,43862                | 132             | 20            | 0,053          | 0,055          | 57,377            | 59,542            | 58,459              |
| 11-1   | 50,7          | 7,8004                        | 3,8456                 | 126             | 100           | 0,19           | 0,19           | 622,53            | 622,53            | 622,53              |
| 11-1   | 50,7          | 7,8004                        | 3,8456                 | 126             | 50            | 0,039          | 0,04           | 63,891            | 65,529            | 64,71               |
| 11-1   | 50,7          | 7,8004                        | 3,8456                 | 126             | 20            | 0,093          | 0,094          | 60,942            | 61,598            | 61,27               |
| 11-2   | 50,7          | 7,803                         | 3,84688                | 126             | 100           | 0,019          | 0,018          | 62,232            | 58,957            | 60,595              |
| 11-2   | 50,7          | 7,803                         | 3,84688                | 126             | 50            | 0,041          | 0,042          | 67,145            | 68,783            | 67,964              |
| 11-2   | 50,7          | 7,803                         | 3,84688                | 126             | 20            | 0,093          | 0,094          | 60,922            | 61,577            | 61,25               |
| N9   | 50,7          | 7,8005                        | 3,84565                | 126             | 50            | 0,034          | 0,035          | 55,699            | 57,338            | 56,518              |
| N10  | 50,7          | 7,808                         | 3,84934                | 126             | 50            | 0,047          | 0,046          | 76,922            | 75,286            | 76,104              |
| N11  | 50,7          | 7,803                         | 3,84688                | 126             | 50            | 0,038          | 0,039          | 62,232            | 63,87             | 63,051              |
| N12  | 50,7          | 7,8068                        | 3,84875                | 126             | 50            | 0,039          | 0,04           | 63,839            | 65,476            | 64,657              |
| N13  | 50,7          | 18,4068                       | 9,07455                | 106             | 50            | 0,088          | 0,088          | 51,396            | 51,396            | 51,396              |
| N14  | 50,7          | 4,9419                        | 2,43636                | 130             | 50            | 0,025          | 0,025          | 66,698            | 66,698            | 66,698              |
| V1   | 50,7          | 7,8023                        | 3,84653                | 126             | 50            | 0,043          | 0,043          | 70,427            | 70,427            | 70,427              |
| V2   | 50,7          | 7,8077                        | 3,8492                 | 126             | 50            | 0,045          | 0,045          | 73,652            | 73,652            | 73,652              |
| V3   | 50,7          | 7,8026                        | 3,84668                | 126             | 100           | 0,025          | 0,025          | 81,889            | 81,889            | 81,889              |

| <b>13.11.2023 CEForestry</b> |                               |                          |                |                 |                      |
|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------|-----------------|----------------------|
| <b>Exp Name</b>              | <b>Kuivapaino uuttoon (g)</b> | <b>TPC [mg GAE/g ka]</b> | <b>TDS% ka</b> | <b>TDS mg/g</b> | <b>TPC/TDS Ratio</b> |
| (1) 1-1                      | 9,075                         | 42,150                   | 15,0           | 150,0           | 28,10                |
| A 1-1                        | 9,072                         | 55,499                   | 26,0           | 260,0           | 21,35                |
| B 1-1                        | 9,073                         | 46,730                   | 19,5           | 195,0           | 23,96                |
| AB 1-1                       | 9,073                         | 54,160                   | 29,9           | 299,0           | 18,11                |
| C 1-1                        | 2,436                         | 58,693                   | 19,3           | 193,0           | 30,41                |
| AC 1-1                       | 2,435                         | 69,393                   | 28,8           | 288,0           | 24,09                |
| BC 1-1                       | 2,439                         | 60,761                   | 21,0           | 210,0           | 28,93                |
| ABC 1-1                      | 2,436                         | 69,898                   | 33,5           | 335,0           | 20,87                |
| O 1 1-1                      | 3,846                         | 68,506                   | 21,0           | 210,0           | 32,62                |
| O 2 1-1                      | 3,846                         | 59,793                   | 20,6           | 206,0           | 29,03                |
| O 3 1-1                      | 3,846                         | 64,710                   | 22,1           | 221,0           | 29,28                |
| (1) 1-2                      | 9,074                         | 40,115                   | 16,7           | 167,0           | 24,02                |
| A 1-2                        | 9,074                         | 54,856                   | 25,2           | 252,0           | 21,77                |
| B 1-2                        | 9,073                         | 44,398                   | 18,3           | 183,0           | 24,26                |
| AB 1-2                       | 9,071                         | 50,426                   | 27,5           | 275,0           | 18,34                |
| C 1-2                        | 2,436                         | 52,011                   | 18,5           | 185,0           | 28,11                |
| AC 1-2                       | 2,436                         | 73,392                   | 26,8           | 268,0           | 27,39                |
| BC 1-2                       | 2,439                         | 58,459                   | 18,7           | 187,0           | 31,26                |
| ABC 1-2                      | 2,438                         | 69,329                   | 32,1           | 321,0           | 21,60                |
| O 1 1-2                      | 3,849                         | 67,922                   | 22,5           | 225,0           | 30,19                |
| O 2 1-2                      | 3,847                         | 58,294                   | 20,9           | 209,0           | 27,89                |
| O 3 1-2                      | 3,847                         | 67,964                   | 21,0           | 210,0           | 32,36                |
| N9                           | 3,846                         | 56,518                   | 18,4           | 184,0           | 30,72                |
| N10                          | 3,849                         | 76,104                   | 27,6           | 276,0           | 27,57                |
| N11                          | 3,847                         | 63,051                   | 20,1           | 201,0           | 31,37                |
| N12                          | 3,849                         | 64,657                   | 21,3           | 213,0           | 30,36                |
| N13                          | 9,075                         | 51,396                   | 18,1           | 181,0           | 28,40                |
| N14                          | 2,436                         | 66,698                   | 22,4           | 224,0           | 29,78                |

|            |                       |       |        |           |
|------------|-----------------------|-------|--------|-----------|
| 20.10.2023 | <b>Fenolit</b>        |       |        |           |
|            | <b>ASE-utto , H2O</b> |       |        |           |
|            |                       | mg/ml | abs    |           |
|            | std1                  | 0,01  | 0,1381 |           |
|            | std2                  | 0,03  | 0,3668 |           |
|            | std3                  | 0,05  | 0,587  |           |
|            | std4                  | 0,07  | 0,8194 |           |
|            | std5                  | 0,1   | 1,1399 |           |
|            |                       |       |        |           |
|            |                       | mg/ml | abs    | laimennos |
|            | 7-1_1                 | 0,037 | 0,441  | 100x      |
|            | 7-1_2                 | 0,038 | 0,452  | 100x      |
|            | 7-1_1                 | 0,075 | 0,8614 | 50x       |
|            | 7-1_2                 | 0,076 | 0,9783 | 50x       |
|            | 7-2_1                 | 0,035 | 0,4224 | 100x      |
|            | 7-2_2                 | 0,035 | 0,4239 | 100x      |
|            | 7-2_1                 | 0,071 | 0,8208 | 50x       |
|            | 7-2_2                 | 0,073 | 0,8398 | 50x       |
|            | 8-1_1                 | 0,018 | 0,2353 | 100x      |
|            | 8-1_2                 | 0,018 | 0,233  | 100x      |
|            | 8-1_1                 | 0,042 | 0,504  | 50x       |
|            | 8-1_2                 | 0,043 | 0,5049 | 50x       |
|            | 8-1_1                 | 0,096 | 1,0976 | 20x       |
|            | 8-1_2                 | 0,095 | 1,0943 | 20x       |
|            | 8-2_1                 | 0,018 | 0,2268 | 100x      |
|            | 8-2_2                 | 0,018 | 0,2331 | 100x      |
|            | 8-2_1                 | 0,041 | 0,4842 | 50x       |
|            | 8-2_2                 | 0,042 | 0,4941 | 50x       |
|            | 8-2_1                 | 0,092 | 1,0617 | 20x       |
|            | 8-2_2                 | 0,094 | 1,0765 | 20x       |
|            | 9-1_1                 | 0,022 | 0,2729 | 50x       |
|            | 9-1_2                 | 0,023 | 0,2871 | 50x       |
|            | 9-1_1                 | 0,054 | 0,6369 | 20x       |
|            | 9-1_2                 | 0,056 | 0,6582 | 20x       |



| 30.10.2023 MODDE |      |           |           |            |                 |            |  |
|------------------|------|-----------|-----------|------------|-----------------|------------|--|
| NO               | NAME | RUN ORDER | TEMP [°C] | TIME [min] | RATIO [g dw/ml] | ANALYSES   |  |
| 1                | [1]  | 7         | 90        | 10         | 1/10            | 7-1, 7-2   |  |
| 2                | A    | 2         | 140       | 10         | 1/10            | 2-1, 2-2   |  |
| 3                | B    | 1         | 90        | 30         | 1/10            | 1-1, 1-2   |  |
| 4                | AB   | 3         | 140       | 30         | 1/10            | 3-1, 3-2   |  |
| 5                | C    | 9         | 90        | 10         | 1/40            | 9-1, 9-2   |  |
| 6                | AC   | 5         | 140       | 10         | 1/40            | 5-1, 5-2   |  |
| 7                | BC   | 10        | 90        | 30         | 1/40            | 10-1, 10-2 |  |
| 8                | ABC  | 6         | 140       | 30         | 1/40            | 6-1, 6-2   |  |
| 9                | 1    | 8         | 115       | 20         | 1/25            | 8-1, 8-2   |  |
| 10               | 2    | 4         | 115       | 20         | 1/25            | 4-1, 4-2   |  |
| 11               | 3    | 11        | 115       | 20         | 1/25            | 11-1, 11-2 |  |
| 12               | N9   | 17        | 90        | 20         | 1/25            | N9         |  |
| 13               | N10  | 13        | 140       | 20         | 1/25            | N10        |  |
| 14               | N11  | 14        | 115       | 10         | 1/25            | N11        |  |
| 15               | N12  | 15        | 115       | 30         | 1/25            | N12        |  |
| 16               | N13  | 12        | 115       | 20         | 1/10            | N13        |  |
| 17               | N14  | 16        | 115       | 20         | 1/40            | N14        |  |
| 18               | V1   | 18        | 115       | 20         | 1/25            | V1         |  |
| 19               | V2   | 19        | 130       | 20         | 1/25            | V2         |  |
| 20               | V3   | 20        | 160       | 20         | 1/25            | V3         |  |