



Pro gradu -tutkielma  
Fysiikan suuntautumisvaihtoehto

## **Entsyyntaattisen hydrolyysin vaikutuksista mikrokiteisen selluloosan rakenteeseen**

Paavo Penttilä  
28. syyskuuta 2009

Ohjaaja: Prof. Ritva Serimaa  
Tarkastajat: Prof. Ritva Serimaa  
Prof. Arto Annala

HELSINGIN YLIOPISTO  
FYSIKAN LAITOS

PL 64 (Gustaf Hällströmin katu 2)  
00014 Helsingin yliopisto

TiedekuntaOsasto — FakultetSektion — Faculty		Laitos — Institution — Department	
Matemaattis-luonnontieteellinen		Fysiikan laitos	
Tekijä — Författare — Author			
Paavo Aleks Penttilä			
Työn nimi — Arbetets titel — Title			
Entsymbaattisen hydrolyysin vaikutuksista mikrokiteisen selluloosan rakenteeseen			
Oppiaine — Läroämne — Subject			
Fysiikka			
Työn laji — Arbetets art — Level		Aika — Datum — Month and year	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages
Pro gradu -tutkielma		Syyskuu 2009	48
Tiivistelmä — Referat — Abstract			
<p>Selluloosaa voidaan käyttää energiatuotannon uusiutuvana raaka-aineena. Hyötykäyttö vaatii selluloosan hajottamista glukoosiksi, mikä voidaan tehdä entsyymien katalysoimien hydrolyysireaktioiden avulla. Tässä työssä tutkittiin entsyymien vaikutusta mikrokiteisen selluloosan mikrometritasoa pienempiin rakenteisiin. Samalla yritettiin selvittää hydrolyysin kulkua ja syitä sen vähittäiseen hidastumiseen. Tutkimuksessa käytettiin ensisijaisesti röntgenfysiikan menetelmiä, laajakulmasiron-taa (WAXS) ja pienkulmasiron-taa (SAXS) sekä röntgenmikrotomografiaa. Näiden lisäksi näytteitä tutkittiin läpäisyelektronimikroskoopilla (TEM).</p> <p>Työssä tutkittuja näytteitä oli hydrolysoitu <i>Trichoderma reesei</i> -lajin entsyymeillä 6, 24 ja 75 tuntia, jolloin ne vastasivat hydrolyysiasteita 31 %, 58 % ja 68 %. Pakaste-kuivatut hydrolyysin jäännökset mitattiin WAXS:lla, SAXS:lla ja mikrotomografial-la, minkä lisäksi osa näytteistä kasteltiin uudelleen SAXS- ja TEM-mittauksia varten.</p> <p>Tuloksissa korostuivat tutkimusmenetelmien erot. Mikrotomografiakuivissa näkyi selvä partikkelikoon pienentyminen kymmenien mikrometriä kokoluokassa. Kaik-kien näytteiden TEM-kuvissa havaittiin hydrolyysiajasta riippumatta samantapaisia sylinterimäisiä ja osittain haaroittuneita rakenteita. SAXS-tuloksia oli vaikea tulkita ja ne olivat osittain epätarkkoja, mutta märkien näytteiden rakenteessa nähtiin kuitenkin muutos 10–30 nm:n kokoluokassa. WAXS-tulosten perusteella kiteisyys-asteet ja kidekoot eivät muuttuneet.</p> <p>Työssä saadut tulokset tukevat käsitystä, jonka mukaan selluloosapartikkelit hydro-lysoituvat lähinnä pinnaltaan, koska entsyymit eivät pääse tunkeutumaan märän sel-luloosan nanohuokosiin. Hydrolyysi etenee nopeasti helppopääsyisissä partikkeleissa ja jättää vaikeapääsyisemmät lähes koskemattomiksi. SAXS-mittauksissa havaitut rakenteelliset muutokset voisivat viitata mikrofibrilliaggregaattien lievään löyhenty-miseen. Tämä havaittiin ainoastaan märissä näytteissä, koska niiden huokosrakenne poikkesi kuivista näytteistä.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords			
Selluloosa, MCC, entsymbaattinen hydrolyysi, WAXS, SAXS			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited			
Muita tietoja — övriga uppgifter — Additional information			

# Sisältö

<b>1</b>	<b>Johdanto</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Selluloosa ja sen entsyymaattinen hydrolyysi</b>	<b>2</b>
2.1	Selluloosa ja selluloosavalmisteet . . . . .	2
2.2	Selluloosan entsyymaattinen hydrolyysi . . . . .	4
<b>3</b>	<b>Röntgenfysiikan menetelmien teoriaa</b>	<b>8</b>
3.1	Röntgensäteily ja sen vuorovaikutus aineen kanssa . . . . .	8
3.2	Laajakulmasironnan teoriaa . . . . .	10
3.2.1	Röntgendiffraktion perusteita . . . . .	10
3.2.2	Intensiteettijakauman korjaukset . . . . .	11
3.2.3	Kidekoon ja kiteisyysasteen määrittäminen . . . . .	12
3.3	Pienkulmasironnan teoriaa . . . . .	13
3.3.1	Pienkulmasironnan perusteita . . . . .	13
3.3.2	Pienkulmasironnan avulla määritettävät suureet . . . . .	14
3.4	Röntgenmikrotomografian teoriaa . . . . .	17
<b>4</b>	<b>Näytteet, mittalaitteet ja mittaukset</b>	<b>20</b>
4.1	Näytteiden valmistus . . . . .	20
4.2	Laajakulmasironta . . . . .	21
4.3	Pienkulmasironta . . . . .	22
4.4	Mikrotomografia . . . . .	23
4.5	Läpäisyelektronimikroskopia . . . . .	23
<b>5</b>	<b>Tulokset</b>	<b>25</b>
5.1	Laajakulmasironnan tulokset . . . . .	25
5.2	Pienkulmasironnan tulokset . . . . .	28
5.3	Tomografia- ja mikroskooppikuvat . . . . .	32
<b>6</b>	<b>Johtopäätökset</b>	<b>36</b>
6.1	Hydrolysoidun Avicelin rakenne ilmassa ja vedessä . . . . .	36
6.2	Entsyymaattisen hydrolyysin vaikutus Avicelin rakenteeseen . . . . .	40
<b>7</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>44</b>

# 1 Johdanto

Uusiutuvien energialähteiden kehittäminen on tällä hetkellä yksi tieteen tutkimuksen tärkeimmistä tavoitteista. Meneillään oleva ilmastonmuutos ja fossiilisten polttoaineiden nopea hupeneminen vaativat kestävämpien ja ympäristöystävällisempien energiaratkaisujen kehittämistä. Mahdollisuuksia on monia, mutta niihin liittyy sekä hyviä että huonoja puolia. Tämän työn taustalla olevan tutkimuksen tavoitteena on tehostaa prosessia, jossa energiaa tuotetaan kasveista ja muusta biomassasta entsyymien katalysoimien kemiallisten reaktioiden avulla.

Maapallon kasveihin on varastoitunut suunnaton määrä auringon energiaa, jota muu eliökunta hyödyntää eri tavoin. Kasvit muodostavat yhteyttämällä hiilihydraatteja, joista glukoosi on rasvojen ja proteiinien ohella eläinten tärkein energialähde. Tuhansista glukoosiyksiköistä koostuva hiilihydraatti, selluloosa, on puolestaan kasvien pääasiallinen rakennuskomponentti. Se on samalla luonnon yleisin polymeeri, joten se on valtava uusiutuva energialähde.[1, 2]

Selluloosan käyttäminen polttoainetuotannossa edellyttää sen hajottamista glukoosiksi. Tämä onnistuu hydrolyysireaktioiden avulla. Glukoosista puolestaan voidaan tuottaa energiaa käymisreaktioilla, joita soluissakin tapahtuu hapettomissa oloissa. Käymisen lopputuotteena on etanoli, joka palaessaan vapauttaa runsaasti energiaa. Bioetanolia käytetään korvaamaan öljypohjaisia polttoaineita liikenteessä jo tänä päivänä, mutta sen tuotannossa käytettävät raaka-aineet rajoittuvat pääasiassa sokeriruokoon ja viljakasveihin. Kokonaisten puukasvien ja paperiteollisuuden sivutuotteiden hyödyntämisen uskotaan kuitenkin kasvattavan bioetanolin tuotantoa voimakkaasti jo lähivuosina.[3]

Selluloosaa voidaan hydrolysoida glukoosiksi entsyymien katalysoimissa reaktioissa, jolloin puhutaan entsyymaattisesta hydrolyysistä. Tähän prosessiin liittyy kuitenkin joitakin ongelmia, muun muassa entsyymien toimintaa, niiden katalysoimien reaktioiden lähtöaineita ja reaktioiden nopeuksia koskien. Selluloosan ja sitä hajottavien entsyymien vuorovaikutusta makromolekylaarisella tasolla on tutkittu jo ainakin 1980-luvun alusta lähtien[4] ja aihe on edelleen ajankohtainen.[3]

Tässä työssä käytetään eri röntgenfyysiikan menetelmiä selvittämään entsyymien vaikutusta mikrokiteisen selluloosavalmisteen rakenteeseen kidetasolta mikrometrien mittakaavaan. Koska kyseessä on fysiikan pro gradu -tutkielma, tarkoituksena on keskittyä ensisijaisesti työhön liittyvään röntgenfyysiikkaan ja sen menetelmien tuottamien tulosten analysoimiseen ja tulkintaan.

## 2 Selluloosa ja sen entsyymaattinen hydrolyysi

### 2.1 Selluloosa ja selluloosavalmisteet

Selluloosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> on keskimäärin 10 000 yksiköstä muodostunut ketjumainen polysakkaridi, jossa D-glukoosimolekyylit ovat liittyneet toisiinsa  $\beta$ -1,4-glykosididoksin (kuva 1)[2, 5, 6]. Luonnossa selluloosamolekyylit muodostavat niin sanottuja alkeiseli elementaarifibrillejä<sup>1</sup>, joissa kymmenet polymeeriketjut ovat järjestyneet karkeasti yhdensuuntaisiksi muodostaen vetysidosten ja van der Waalsin voimien avulla heterogeenisiä kimppuja.[6, 7, 8]

Alkeisfibrilleissä selluloosa on osittain kiteisessä eli järjestyneessä ja osittain amorfisessa eli epäjärjestyneessä faasissa, jotka vuorottelevat keskenään fibrillin pituussuunnassa. Fibrillien kiteisetkin osat voivat sisältää paljon ketjujen dislokaatioita ja muuta lievää epäjärjestystä. Siten yksittäinen polymeeriketju saattaa olla osa useampaa kiteistä aluetta, eikä tarkkaa rajaa eri alueiden välillä välttämättä ole erotettavissa.[7, 8]

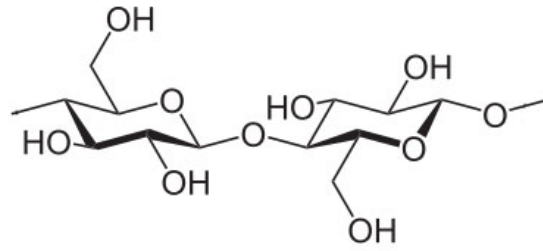
Kiteisessä muodossa selluloosalla esiintyy yleisesti kuutta eri kiderakennetta.<sup>2</sup> Luonnossa tavallisin muoto on kasveissa esiintyvä selluloosa I. Sitä on edelleen kahdenlaista, I $\alpha$  ja I $\beta$ , joista jälkimmäinen on yleisempi monissa kasveissa kuten puuvillassa ja puissa. Kumpaakin saattaa silti esiintyä jopa samassa mikrofibrillissä. Selluloosan I $\beta$ -kiderakenteen yksikkökoppi on monokliininen ja se on esitetty kuvassa 2.[10, 11]

Alkeisfibrillit voivat liittyä toisiinsa muodostaen näin suurempia, muodoltaan nauhamaisia kimppuja, joita kutsutaan mikrofibrilleiksi. Alkuperästä riippuen mikrofibrillien leveydet vaihtelevat yleensä välillä 10–30 nm ja niiden pituudet voivat olla useita mikrometrejä. Alkeisfibrillien väleissä saattaa olla ohuita 1 nm:n levyisiä kapillaareja, joissa vesi- ja muut pienet molekyylit kykenevät liikkumaan.[7, 8]

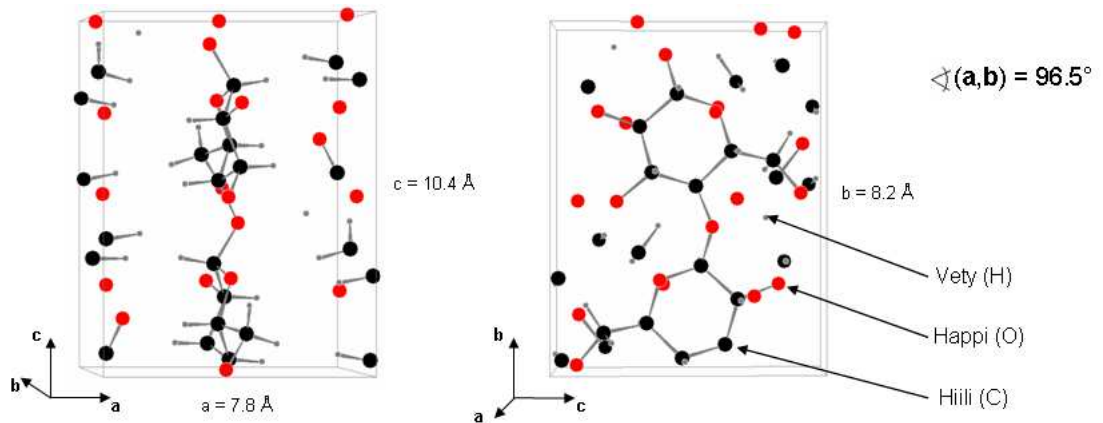
Mikrofibrillikimput kiertävät kasvin soluseinässä keskenään yhdensuuntaisesti. Fibrillien kulma solun pituussuuntaan nähden (mikrofibrillikulma, MFA) vaihtelee kerroksittain, jolloin niistä muodostuu pystysuunnassa luja lamellimainen rakenne. Mikrofibrillien välissä on leveydeltään noin 10 nm:n suuruisia kapeita käytäviä, jotka ovat täyttyneet hemiselluloosalla ja ligniinillä. Nämä suuret polymeerit muodostavat mik-

<sup>1</sup>Kirjallisuudessa esiintyy vaihtelevia nimityksiä alkeisfibrillejä ja mikrofibrillejä koskien. Tässä tutkielmassa noudatetaan yllä esitettyä terminologiaa, joka pohjautuu viitteeseen [7].

<sup>2</sup>Kiderakenne on järjestyneen eli kiteisen aineen atomien säännöllinen rakenne, joka rakentuu usean atomin toistuvista yksiköistä, niin sanotuista yksikkökopeista. Rakennetta kuvataan kidehilalla, jossa atomien paikat määritellään hilavektorien avulla. Atomit muodostavat yhdensuuntaisia hilatasoja, joita merkitään Millerin indekseihin  $h$ ,  $k$  ja  $l$ . Kutakin hilatasoa vastaan kohtisuoraa suuntaa merkitään samoilla indekseillä. Esimerkiksi selluloosassa kuvan 2 vektorin  $\mathbf{a}$  osoittama suunta, joka on samalla alkeisfibrillin poikkileikkauksen suunta, merkitään [200].[9]



Kuva 1: Kaksi glukoosirengasta selluloosamolekyylissä.



Kuva 2: Selluloosan I $\beta$ -kiderakenne ja siihen liittyvät parametrit[10].

rofibrilleille ikään kuin amorfisen matriisiin, joka lujittaa rakennetta entisestään.[7, 8]

Luonnon selluloosasta voidaan tuottaa teollisesti erilaisia selluloosavalmisteita, joista paperi lienee arkielämän kannalta tutuin. Erikoisempia selluloosavalmisteita voidaan valmistaa esimerkiksi hajottamalla puu- tai paperimassan selluloosaa hydrolyysi-reaktioilla. Hydrolyysissä osa selluloosan monomeerien välisistä happisilloista katkeaa ja vesimolekyylille liittyy vapaaksi jääviin sidoksiin muodostaen kumpaankin päähän yhden OH-ryhmän. Reaktio vaatii tapahtuakseen happoa, joka ei itse kulu reaktiossa. Vesiliukoiset oligosakkaridit eli pienet sokerimolekyylit ja glukoosi liukenevat hydrolyysin aikana vesiliuokseen, jolloin ne saadaan poistettua huuhtelemalla ja suodattamalla.[12] Valmistusprosessissa selluloosaketjut lyhenevät ja suurin osa hemiselluloosasta ja ligniinistä poistuu.[13]

Hydrolyysissä syntyvää kiteistä selluloosavalmistetta kutsutaan mikrokiteiseksi selluloosaksi (engl. *microcrystalline cellulose*, MCC). Sen hiukkaset voivat olla hyvin erikokoisia ja -muotoisia happokäsittelystä ja materiaalin alkuperästä riippuen. Joka tapauksessa ne ovat mitoiltaan pienempiä kuin niiden raaka-aineena käytetyt kuidut. Mikrokiteistä selluloosaa esiintyy myös luonnossa. Se on stabiilia, eikä se reagoi ihmiselimistössä. Siksi sitä käytetäänkin muun muassa lääketablettien sidosaineena ja monenlaisissa elintarvikkeissa.[12]

Tunnettu kaupp nimi kuivatetulle mikrokiteiselle selluloosalle on Avicel. Avicel on vaaleaa jauhetta, joka diffraktiokuvioiden perusteella muodostuu lähinnä huonosti järjestyneistä selluloosan I $\beta$ -kiteistä amorfissa matriisissa. Kiteisen aineen osuus Avicelissa on noin 60 % eli suurempi kuin natiivissa selluloosassa[14]. Avicelia on käyttösovellustensa vuoksi tutkittu paljon ja sen ominaisuuksia on karakterisoitu monenlaisilla menetelmillä. Seuraavassa esitellään ominaisuuksista ainoastaan tämän työn kannalta oleelliset.

Avicelin jauhehiukkaset koostuvat mikrofibrillien muodostamista aggregaateista, minkä vuoksi ne ovat melko huokoisia ja kykenevät hyvin absorboimaan ja varastoimaan vettä.[12] Yleisesti kuivissa selluloosamateriaaleissa esiintyvät huokokset ovat pitkulaisia ja fibrillien suuntaisia. Niiden leveydet vaihtelevat välillä 2–30 nm ja niitä esiintyy sekä mikrofibrillien sisällä että niiden väleissä. Veteen upotettaessa selluloosan nanometritason rakenne muuttuu, kun vesi tunkeutuu alkeisfibrillien tai niiden ryhmien väliin avaten mikrofibrillien sisäistä, kimppumaista rakennetta. Samalla syntyy runsaasti ohuita mutta pitkiä vesitäytteisiä huokosia, jotka paisuttavat mikrofibrillia ja hävittävät aiemmat suuret huokokset. Lopputuloksena huokosten suhteellinen tilavuusosuus kasvaa, vaikka huokosten poikkileikkauksien keskimääräiset mitat pienenevät.[15] Kuivatettaessa pienet huokokset sulkeutuvat jälleen.[13]

Avicelin huokoisuus näkyy sen suhteellisen suuressa spesifisessä pinta-alassa. Spesifisellä pinta-alalla kuvataan rakeisen tai huokoisen materiaalin sisältämää kokonaispinta-alaa makroskooppisessa massayksikössä ainetta ja sitä kutsutaan joskus myös aineen kokonaispinta-alaksi. Jauhemaiselle Avicelille mitatut spesifiset pinta-alat vaihtelevat suuresti, mutta ovat suuruusluokaltaan 0,1–10 m<sup>2</sup>/g [16, 17, 18]. Syynä arvojen suureen hajontaan on todennäköisesti vaihtelevat mittausten menetelmät. Usein spesifisiä pinta-aloja mitataan erilaisilla adsorptiomenetelmillä, jolloin mittauksen tuottaman pinta-alan suuruus riippuu pinnalle adsorboituvien hiukkasten tai molekyylien koosta. Siten esimerkiksi typpimolekyylien adsorptioon perustuva mittaus saattaa tuottaa suuremman pinta-alan kuin vesimolekyylien tai entsyymien adsorptiomittausten perusteella voitaisiin olettaa. Toisaalta typpiadsorptio vaatii kuivan näytteen, jolloin näytteen morfologia saattaa olla erilainen kuin vesiliuoksessa olevan.[16]

## 2.2 Selluloosan entsyymaattinen hydrolyysi

Entsyymit ovat proteiineja, jotka katalysoivat biokemiallisia reaktioita. Katalyytit vähentävät reaktion käynnistysenergiaa, jolloin reaktio nopeutuu ja helpottuu. Ne eivät itse kulu tai muutu reaktiossa eivätkä muuta sen tasapainoa. Entsyymejä voidaan tuottaa muun muassa luonnon mikrobien avulla ja niitä käytetään tehokkuutensa vuoksi runsaasti teollisuudessa.[1]

Entsyymien toiminnan kannalta oleellisin osa on entsyymien aktiivinen kohta. Kukin entsyymi kykenee katalysoimaan ainoastaan tiettyjen molekyylien reaktioita. Molekyylijä, jotka sopivat muodoltaan ja kooltaan tietyssä asennossa entsyymien aktiiviseen kohtaan, nimitetään entsyymien substraateiksi ja reaktion tuottamaa molekyyliä reaktiotuotteeksi. Entsyymi voi joko liittää useamman substraatin yhdeksi reaktiotuotteeksi tai hajottaa yhden substraatin useammaksi reaktiotuotteeksi. Reaktion nopeuteen voidaan vaikuttaa muun muassa lähtöaineiden tai entsyymien konsentraatioita, lämpötilaa tai liuoksen pH-arvoa säätelämällä.[1]

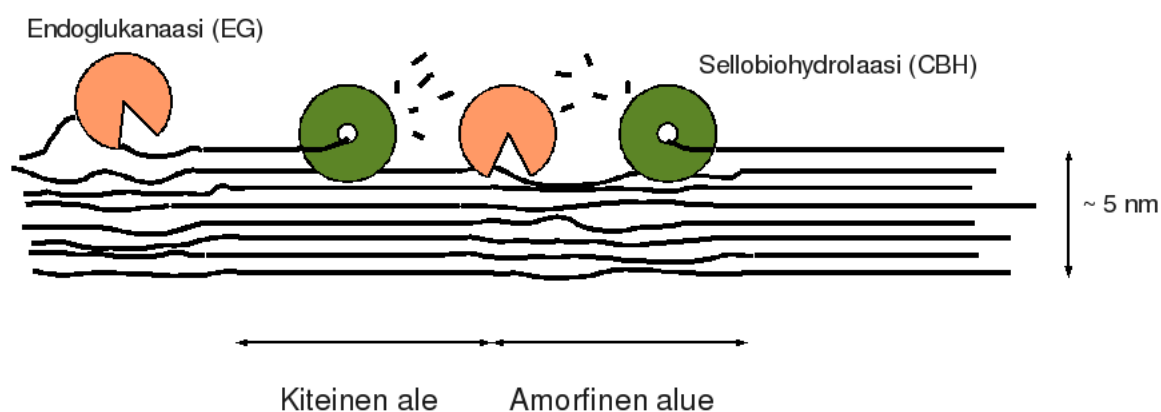
Selluloosan hajottamiseen käytetään sellulaasientsyymejä. Tällöin puhutaan selluloosan entsyymattisesta hydrolyysistä. Happohydrolyysiin verrattuna menetelmä toimii tarkemmin, kontrolloidummin ja miedommassa olosuhteissa, mikä puoltaa sen soveltamista teollisuudessakin. Lisäksi entsyymattinen hydrolyysi tuottaa happohydrolyysia vähemmän kasvihuonekaasuja.[3, 6, 19]

Hydrolyysissa saadaan parhaita tuloksia käyttämällä useiden entsyymien yhdistelmiä, jolloin entsyymit voivat toimia auttamalla toinen toistaan. Entsyymien välisen synergian syytä ei täysin tunneta, mutta todennäköisesti siihen vaikuttavat ainakin eri sellulaasientsyymityyppien erilaiset toimintatavat. Hydrolyysia edistävä tekijä on myös useille sellulaasientsyymeille tyypillinen selluloosaan sitoutuva päätealue (engl. *cellulose-binding domain*, CBD), entsyymien pieni alayksikkö, joka on kytköksissä pääyksikköön ja jonka avulla entsyymi tarttuu kiinni selluloosamolekyyliin.[3, 6]

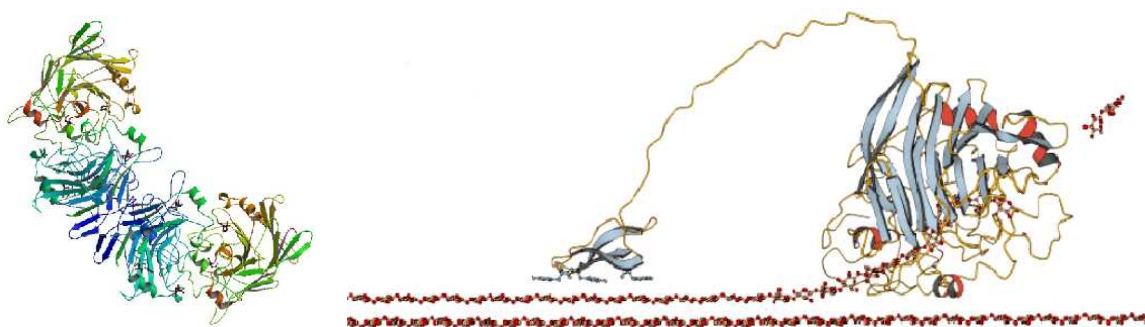
Sellulolyttisiä eli selluloosaa hydrolysoivia entsyymejä on kahta päätyyppiä. Endoglukanaasit (EG) katkovat sattumanvaraisesti selluloosan  $\beta$ -1,4-glykosididoksia, mikä havaitaan selluloosan polymerisaatioasteen (DP) pienenemisenä. Eksoglukanaasit eli sellobiohydrolaasit (CBH) puolestaan etenevät prosessiivisesti yksittäisiä polymeeriketjuja pitkin. Ne pilkkovat ketjua kahdesta glukoosimolekyylistä koostuviksi sellobiooseiksi tai suoraan glukoosiksi. Entsyymien toiminta on esitetty kaavamaisesti kuvassa 3 ja esimerkit niiden kolmiulotteisesta rakenteesta kuvassa 4. Lisäksi hydrolyysissa tarvitaan sellobioasientsyymiä hajottamaan sellobioosit glukosiksi. Tämä kolmas entsyymi on nimeltään  $\beta$ -glukosidaasi.[3, 6, 20]

Sellobiohydrolaasien aktiiviset kohdat sijaitsevat tunnelimaisen rakenteen sisäpinoilla, kun taas endoglukanaasilla ne ovat entsyymien ulkopinnalla. Tämän eron vuoksi sellobiohydrolaasit tarvitsevat vapaan polymeeriketjun pään aloittaakseen hydrolyysin, kun endoglukanaasit voivat liittyä ketjuun ja katkaista sen missä kohdassa tahansa. Ilmeisesti tästä syystä useamman erityyppisen entsyymien käyttäminen hydrolyysissa on hyödyllistä. Sellobiohydrolaasit pääsevät aloittamaan hydrolyysin endoglukanaasien katkomien ketjujen päistä. Lisäksi tiedetään, että endoglukanaasit katkovat ketjuja selluloosafibrillien amorfisessa osassa, kun sellobiohydrolaasit keskittyvät lä-





**Kuva 3:** Kaavakuva sellulaasientsyymien toiminnasta alkeisfibrillin kyljessä. Kuva ei ole mittakaavassa fibrillin pituussuunnassa.[6]



**Kuva 4:** Selluloosafibrillia hajottavia entsyymejä: endoglukanaasi I (vas.)[21] ja sellobiohydrolaasi[22].

hinnä kiteiseen osaan.[6]

Sellobiohydrolaaseja on kahdenlaisia ja niistä käytetään lyhenteitä CBHI ja CBHII. Niiden tärkein ero on kulkusuunta polymeeriketjussa, mutta lisäksi niiden tunnelit ovat eripituiset. CBHI, jolla tunneli on pidempi, sitoutuu paremmin hydrolysoimaansa ketjuun, jolloin se saattaa hydrolysoida sen yksin alusta loppuun. CBHII puolestaan ei aina saa yhtä hyvää otetta selluloosaketjusta, vaan irtoaa siitä välillä jättäen lopulta jälkeensä runsaasti teräväkärkisiä kiteitä. Selluloosaa hajottavan rihmasienen *Trichoderma reesei*n tuottamista sellulolyttisistä proteiineista CBHI:ä on 60 % ja CBHII:a 20 %. Ne kykenevät hajottamaan selluloosaa myös ilman endoglukanaasia, mutta prosessi on tällöin huomattavan hidas verrattuna sellobiohydrolaasin ja endoglukanaasin synergiseen toimintaan.[6]

Selluloosan entsyymaattisen hydrolyysin etenemiseen vaikuttavat monet tekijät. Käytettyjen entsyymien ja niiden konsentraatioiden, reaktio-olosuhteiden ja reaktion lähtöaineena toimivan selluloosan puhtauden lisäksi lähtöaineen fysikaalis-kemiallisilla ominaisuuksilla on suuri vaikutus hydrolyysin tehokkuuteen. Vaikuttavia ominaisuuks-

sia ovat muun muassa substraatin pinnan kemiallinen koostumus ja substraatin rakenteelliset ominaisuudet kuten kiteisyys, pinta-ala, huokoisuus ja polymerisaatioaste.[3, 19, 23, 24]

Selluloosan entsyymattisen hydrolyysin reaktionopeus pienenee yleisesti hydrolyysin edetessä. Käyttäytymiselle on tarjottu useita selityksiä, mutta hidastumisen lopullinen mekanismi ei ole vielä täysin selvillä. Selitysten joukossa ovat muun muassa lähtöaineen entsyymeille hankala fysikaalinen rakenne, entsyymien tukkeutuminen reaktiotuotteista tai substraateista ja niiden inaktivoituminen.[3, 24]

Selluloosafibrillien fysikaalisista ominaisuuksista esimerkiksi suuri kiteisyys hidastaa reaktioita. Tämä johtuu siitä, että kiteisillä substraateilla on vähemmän entsyymien sitoutumiseen sopivaa pinta-alaa kuin vähemmän järjestyneillä substraateilla. Substraatin rakenne voi olla muullakin tavalla epäedullinen entsyymeille tai muuttua sellaiseksi hydrolyysin edetessä. Reaktion nopeuttaminen entsyymikonsentraatiota nostamalla ei välttämättä auta, sillä entsyymit saattavat tällöin tukkeutua reaktiotuotteistaan. Lisäksi entsyymien lisääminen kasvattaa tuotantokustannuksia teollisissa sovelluksissa.[3, 24]

Entsyymattinen hydrolyysi vaikuttaa varmasti selluloosan rakenteeseen, mutta esimerkiksi kidekokojen ja kiteisyyksien muuttumisesta on saatu vaihtelevia tuloksia. Osassa tutkimuksista kiteisyysaste on noussut lievästi[19, 20] ja osassa säilynyt samana[23]. Samalla tavalla kidekoko [200]-suunnassa on toisinaan pienentynyt[19, 23], toisinaan säilynyt muuttumattomana[23]. Toisistaan poikkeavat tulokset voivat selittyä lähtöaineiden välisillä eroilla ja erilaisilla hydrolyysi- ja valmistusmenetelmillä. Niillä on ilmeisen suuri vaikutus entsyymien ja selluloosan vuorovaikutukseen ja siihen, missä osassa selluloosafibrilliä vuorovaikutus pääasiassa tapahtuu. Joskus myös mittaus- ja määritysmenetelmissä esiintyy eroja, jolloin eri menetelmillä saatujen tulosten tulkintaa ei voi tehdä samalla tavalla.

Sellulolyyttisten entsyymien keskimääräinen halkaisija on 5,9 nm[16], minkä vuoksi ne ovat yleensä liian suuria tunkeutuakseen mikrokiteisen selluloosan partikkelien sisälle. Avicelille ja muille selluloosavalmisteille saatujen adsorptioon perustuvien pintaalamittausten perusteella näyttää siltä, että entsyymit voivat hydrolysoida fibrillikimppuja ainoastaan niiden pinnasta, edeten kerros kerrokselta. Lisäksi pienemmät mikrometritason Avicel-hiukkaset hydrolysoituvat suurempia nopeammin.[16, 23]

## 3 Röntgenfysiikan menetelmien teoriaa

### 3.1 Röntgensäteily ja sen vuorovaikutus aineen kanssa

Aineen rakennetta voidaan tutkia sähkömagneettisen säteilyn avulla. Tutkittavien rakenteiden koko riippuu käytetyn säteilyn aallonpituudesta siten, että koon pienentyessä täytyy aallonpituuden pienentyä vastaavassa suhteessa. Näkyvän valon alueella, esimerkiksi optista mikroskooppia käytettäessä, voidaan erottaa suuruusluokaltaan mikrometrien rakenteita. Kun halutaan nähdä tätä pienempiä mittoja kuten aineen atomitaso rakennetta, on säteilyn oltava lyhytaaltoisempaa eli energialtaan suurempaa. Kun käytettävän säteilyn aallonpituus on Ångströmien ( $10^{-10}$  m) suuruusluokkaa, puhutaan röntgensäteilystä.

Röntgensäteilyä voidaan tuottaa esimerkiksi röntgenputkella, jossa elektroneja irroitetaan katodina toimivalta hehkulangalta ja kiihdytetään tyhjiöputkessa korkealla jännitteellä. Törmätessään positiiviseen anodiin elektronit sekä emittoivat jatkuv-spektristä jarrutus säteilyä että virittävät anodimateriaalin atomeita korkeammille viritystiloilta. Energiatilojen purkautuessa syntyy sähkömagneettista säteilyä, jonka aallonpituus riippuu anodimateriaalista ja joka muodostaa sille tyypillisen viivaspektrin. Syntyvä säteily on röntgensäteilyä anodimateriaalin karakteristisilla aallonpituuksilla.[25]

Aineen rakennetta tutkittaessa röntgensäteily suunnataan näytteeseen. Osuessaan näyteaineeseen tai kulkiessaan sen läpi säteily voi vuorovaikuttaa aineen atomien kanssa pääasiassa kahdella tavalla, siroamalla ja absorboitumalla. Aineessa kulkevan röntgensäteilyn intensiteetti heikkenee kummankin prosessin vuoksi Beer-Lambertin lain mukaisesti, jolloin sen intensiteetti  $I$  aineessa kuljetun matkan  $z$  funktiona saadaan kaavasta

$$I(z) = I_0 e^{-\mu z}, \quad (1)$$

missä  $I_0$  on aineeseen tulevan säteilyn intensiteetti ja  $\mu$  lineaarinen absorptiokerroin. Lineaarinen absorptiokerroin on absorption voimakkuutta kuvaava vakio, joka riippuu tutkittavasta aineesta, sen tiheydestä ja käytettävän säteilyn aallonpituudesta.[25, 26]

Röntgensironnassa pienillä energioilla<sup>3</sup> näytteeseen saapuva säteily saa aineen elektronit värähtelemään säteilyn sähkökentän taajuudella. Tämä saa elektronit Maxwellin yhtälöiden mukaisesti emittoimaan palloaallon muotoista sähkömagneettista säteilyä samalla taajuudella. Sähkömagneettisen säteilyn sanotaan sironneen elastisesti.[26]

<sup>3</sup>Pienellä energialla tarkoitetaan tässä röntgensäteilyä, jonka energia on pienempi kuin 10 keV, mikä vastaa aallonpituutta 1,2 Å. Suuremmilla energioilla muun muassa epäelastisen Comptonin sironnan osuus kasvaa.[26]

Useamman elektronin tai niiden muodostaman kokonaisen hilarakenteen sirottamat aallot interferoivat keskenään, jolloin siroavan säteilyn intensiteetti riippuu siron-tasuunnasta. Koska elektronien voidaan olettaa keskittyneen atomiydinten läheisyyteen, saadaan elektronirakenteen perusteella selville aineen atomirakenne. Tähän liit-tyvällä röntgensäteilyn diffraktiolla tarkoitetaan yksittäisten sironneiden säteiden kes-kinäisestä interferenssistä aiheutuvaa näennäistä säteen taittumista näytteessä. Täl-löin alkuperäisen säteen voidaan katsoa taittuneen järjestäytyneiden atomien muo-dostamista hilatasoista.[25, 26]

Röntgensironnassa syntyvien sironnamaksimien paikat ovat suoraan yhteydessä si-rottavan rakenteen dimensioihin kaavalla

$$q = \frac{2\pi}{d}, \quad (2)$$

missä  $d$  on sirottavien säännöllisten rakenteiden välinen etäisyys ja  $q$  siron-tavektorin pituus. Siron-tavektori  $\mathbf{q}$  määrittellään sironneen ja tulevan säteilyn aaltovektorien ero-tuksena. Sen itseisarvo saadaan säteen alkuperäiseen kulkusuuntaan nähden kulmaan  $2\theta$  sironneelle aallonpituuden  $\lambda$  säteilylle kaavasta[26]

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}. \quad (3)$$

Yksittäisen atomin sirottaman säteilyn amplitudi on pienillä kulmilla suoraan ver-rannollinen elektronien määrään atomissa eli käytännössä atomin järjestyslukuun  $Z$ . Tällöin atomin eri elektroneista sironneet aallot ovat lähes samassa vaiheessa. Suu-remmilla siron-takulmilla säteilyn amplitudi lähestyy nollaa. Säteilyn aallonpituus vai-kuttaa siten, että samalla siron-takulman arvolla aallonpituuden kasvattaminen eli sä-teilyn energian pienentäminen kasvattaa sironnan amplitudia.[25]

Absorptiossa, jolla tässä tarkoitetaan yksinomaan valosähköistä absorptiota, ato-miin osuva fotonin vapauttaa elektronin atomin sisemmältä kuorelta, jolloin kuorelle syntyy aukko. Syntynyt viritystila voi purkautua siten, että aukko täyttyy fluoresens-siemissiolla tai Auger-elektronin vapauttamisella. Kummassakin tapauksessa aineen läpi kulkenut säteily on intensiteetiltään heikompaa kuin siihen tullut säteily.[26]

Valosähköisen ilmiön ja sironnan yhdessä aiheuttaman absorptio-vaikutusala, jo-ka kuvaa absorptiotapahtuman todennäköisyyttä, riippuu sekä käytettävästä röntgen-säteilystä että tutkittavasta aineesta. Vaikutusala on karkeasti kääntäen verrannolli-nen säteilyn energian kuutioon lukuun ottamatta aineen absorptioreunojen muodos-tamia epäjatkuvuuksia. Tästä syystä absorptio on yleisesti voimakkaampaa pienem-millä energioilla. Sovellettaessa absorptiota esimerkiksi kuvantamiseen, voidaan rönt-gensäteilyn aallonpituus valita siten, että tutkittavan aineen absorptioreunat jäävät käytettävän aallonpituusalueen ulkopuolelle. Eri alkuaineiden absorptio-vaikutusalat

vaihtelevat toisaalta karkeasti aineen järjestysluvun neljännen potenssin  $Z^4$  mukaisesti. Absorptiokertoimen voimakas riippuvuus absorboivasta aineesta ja siitä johtuva kontrasti eri alkuaineiden välillä tekevät röntgensäteilystä toimivan kuvantamismenetelmän heterogeenisille näytteille.[26]

## 3.2 Laajakulmasironnan teoriaa

Laajakulmasironnalla (engl. *wide angle x-ray scattering*, WAXS), jota yleensä tarkoitetaan röntgendiffraktiosta puhuttaessa, voidaan tutkia aineen rakennetta Ångströmien mittakaavassa. Perinteisesti sen avulla on määritetty kiinteiden aineiden kiderakenteita, mutta sitä voidaan myös soveltaa karakterisoimaan osittain epäjärjestyneitä materiaaleja. Tässä työssä tutkittujen näytteiden kiteisen osuuden kiderakenne oli tunnettu, joten laajakulmasironnan avulla voitiin määrittää kiteisten alueiden keskimääräisiä kokoja ja niiden suhteellisia osuuksia näytteessä.[25]

### 3.2.1 Röntgendiffraktion perusteita

Kidetasoista heijastuvan röntgensäteilyn vahvistava eli konstruktiivinen interferenssi noudattaa Braggin lakia

$$\lambda = 2d \sin(\theta), \quad (4)$$

missä  $\lambda$  on säteilyn aallonpituus,  $d$  hilatasojen välinen välimatka ja  $\theta$  säteilyn tuloikulma hilatasoon nähden. Kun siirrytään normaalista tila-avaruudesta käänteisavaruuteen, voidaan kidetasojen välimatka ilmaista aiemmin määritellyn sirontavektorin  $\mathbf{q}$  itseisarvon (kaava 3) avulla. Tällöin Braggin laki voidaan esittää kaavan 2 muodossa.[25]

Sironnassa syntyvä diffraktiokuvio riippuu näytteen lisäksi myös käytetystä mittausmenetelmästä. Tässä työssä on käytetty niin sanottua jauhemenetelmää. Siinä näyte on hienojakoista jauhetta tai pieniä rakeita, joiden kiteet ovat asettuneet makroskooppisesti satunnaisesti suuntiin, ja käytetty säteily on mahdollisimman monokromaattista. Sirontakuvio esitettynä intensiteettinä sirontakulman  $2\theta$  funktiona muodostuu tällöin sisäkkäisistä renkaista. Kukin rengas vastaa heijastusta tietyistä hilatasosta.[25]

Laskuissa käytetään usein sirontakulman  $2\theta$  sijasta kaavalla 3 määritettyä sirontavektorin  $\mathbf{q}$  itseisarvoa, joka tarjoaa mahdollisuuden käsitellä diffraktiota röntgensäteilyn aallonpituudesta riippumatta. Sirontavektorin itseisarvot riippuvat suoraan mittauslaitteiston geometriasta, minkä vuoksi  $q$ -asteikko on kalibroitava vastaamaan

$2\theta$ -asteikko. Kohtisuoralla mittausgeometrialla ja kaksiulotteisella ilmaisimella kalibrointi voidaan tehdä sovittamalla  $2\theta$ -asteikko jonkin standardinäytteen tunnettuun diffraktiokuvioon ja käyttämällä kaavaa 3.

### 3.2.2 Intensiteettijakauman korjaukset

Röntgendiffraktiossa ilmaisimelle syntyneen kuvion käsittelyssä on aluksi tapana keskiarvoistaa eli integroida ja normittaa intensiteetti atsimutaalisesti jollain valitulla ilmaisimen sektorilla. Näin tulokset riippuvat vähemmän yksittäisistä koejärjestelyistä. Lopulliset integroidun intensiteetin arvot ovat mielivaltaisissa yksiköissä, mutta arvojen väliset keskinäiset suhteet eivät ole muuttuneet.

Ensimmäinen varsinainen korjaus syntyneeseen intensiteetti-sirontakulma-kuvaajaan saadaan vähentämällä siitä taustasironta. Tausta muodostuu ilman näytettä mitattavan ilmasironnan ja niin sanotun pimeän virran yhteisvaikutuksesta. Tässä työssä pimeä virta on suurimmaksi osaksi ilmaisimen lukuprosessissa syntyvää kohinaa, mutta sitä aiheuttavat myös ilmaisimeen osuvat kosmiset hiukkaset.

Taustan vähennyksen jälkeenkin voidaan huomata, että syntyneet renkaat ovat levinneet säteidensä suuntaisesti. Tämä johtuu usean eri tekijän yhteisvaikutuksesta. Niistä osa on tärkeitä analyysin kannalta ja osa vaatii korjauksen laskuissa. Korjauksen vaativista tekijöistä tämän työn kannalta tärkeimmät esitellään tässä lyhyesti. Säteilyn oletetaan kulkevan näytteen läpi ja tarkasteltavat sirontakulmat ovat suurempia kuin  $5^\circ$ , eli kyseessä on nimenomaan laajakumasironta.

Tasoilmaisimen geometriselle korjaustekijälle voidaan käyttää likimääräistä kaavaa

$$G(l) = \frac{\arctan\left(\frac{x_0}{R}\right)}{\arctan\left((l+1)\frac{x_0}{R}\right) - \arctan\left(l\frac{x_0}{R}\right)}, \quad (5)$$

missä  $x_0/R = \tan 2\theta$  on ilmaisimen keskikohtaa lähimmän pikselin leveys jaettuna näytteen ja ilmaisimen välisellä etäisyydellä ja  $l$  pikselin järjestysnumero. Korjaus ottaa huomioon ilmaisimen tasomaisen muodon ja laskee intensiteetin kussakin pikselissä pallomaiselle ilmaisimelle. Korjauksella on erityisesti merkitystä suuremmilla sirontakulmilla.[27]

Kulkiessaan näytteen läpi osa säteilystä absorboituu näytteeseen, jolloin sen intensiteetti pienenee Beer-Lambertin lain (kaava 1) mukaisesti. Kohtisuorassa läpäisysssä suurempiin kulmiin siroavat säteet joutuvat kulkemaan näytteessä pieniin kulmiin sironneita säteitä pidemmän matkan, jolloin niiden intensiteetti ehtii heikentyä enemmän. Ilmiötä vastaavan absorptio-geometrisen korjauksen kulmariippuvuus saadaan tällöin kaavasta

$$A(\theta) \propto \frac{\exp(-\frac{\mu a}{\cos 2\theta}) - \exp(-\mu a)}{1 - \frac{1}{\cos 2\theta}}, \quad (6)$$

missä  $a$  on näytteen paksuus ja  $\mu$  näyteaineen lineaarinen absorptiokerroin. Absorptiokertoimelle saadaan käytännössä arvo joko kirjallisuudesta tai kokeellisten tulosten perusteella.[28]

Laitevaikutuksella tarkoitetaan mittalaitteiston ominaisuuksista johtuvaa piikkien levenemistä. Laitevaikutuksen suuruus on laitteistokohtainen ja se saadaan mittamalla jokin suurista yhtenäiskiteistä koostuva tunnettu näyte, joka tuottaa teräviä diffraktiopiikkejä. Laitevaikutus saadaan mittamalla näiden piikkien leveneminen ja se on otettava huomioon myöhemmissä laskuissa.

Röntgensäteen polarisaatiolla on myös vaikutusta diffraktiokuvioon, mikä voidaan huomioida erityisellä polarisaatiokorjauksella. Tässä työssä näin ei tehty, sillä käytetystä monokromaattorista ja sen geometriasta johtuen korjauksen vaikutus olisi ollut pieni. Tarkoituksena ei myöskään ollut laskea absoluuttisia intensiteettejä.[25]

### 3.2.3 Kidekoon ja kiteisyysasteen määrittäminen

Aineen kidekoon ja diffraktiopiikkien leveyden yhteyden määrittää Scherrerin kaava

$$t = \frac{0,9\lambda}{B \cos \theta_B}, \quad (7)$$

missä  $t$  on kiteen pituus hilatason suuntavektorin eli heijastustason normaalin suunnassa,  $\lambda$  monokromaattisen säteilyn aallonpituus,  $B$  diffraktiopiikin puoliarvonleveys asteissa ja  $\theta_B$  hilatason Braggin kulma eli puolet piikin sirontakulmasta. Viivan leveneminen johtuu tässä tapauksessa siitä, että samansuuntaisten hilataseiden lukumäärän pienentyessä eri tasoista heijastuneiden säteiden interferenssi ei ole täysin destruktiivista Braggin kulman ympäristössä. Kidekoon lähestyessä hilan kokoon nähden suuria arvoja interferenssi tapahtuu täydellisesti ja interferenssikuvio muodostuu yksittäisistä terävistä  $\delta$ -piikeistä, mikä voidaan huomata myös Scherrerin kaavasta.[25]

Jos näyte sisältää epäjärjestyneessä faasissa olevaa ainetta, epäjärjestyneen osan sirottama säteily muodostaa diffraktiokuvioon jatkuvan taustan. Tämän niin sanotun amorfisen taustan muoto riippuu sirottavasta aineesta ja se on kidekokoanalyysin yhteydessä vähennettävä mitatusta intensiteettijakaumasta. Jos sitä ei voida mitata sellaisenaan, täytyy taustasirontaa approksimoida jollain perustellulla tavalla.

Taustan vähentämisen jälkeen voidaan intensiteetti-sirontakulma-kuvaajaan sovittaa diffraktiopiikkien paikalle esimerkiksi Gaussin funktiot, joiden parametreista saadaan piikkien puoliarvonleveydet ja paikat kulma-asteikolla. Tietojen perusteella on

yksinkertaista määrittää aineen keskimääräinen kidekoko eri suunnissa Scherrerin kaavan 7 avulla. Tässä vaiheessa on kuitenkin syytä huomioida laitevaikutus. Se onnistuu sijoittamalla Scherrerin kaavaan 7 puoliarvonleveyden  $B$  tilalle lauseke  $\sqrt{B^2 - B_{inst}^2}$ , missä  $B$  on alkuperäinen mittaustulokseen sovitettun Gaussin funktion puoliarvonleveys ja  $B_{inst}$  laitevaikutuksen aiheuttama piikin leveneminen asteissa. Tässä oletetaan sekä heijastuksen intensiteetin että laitevaikutuksen noudattavan normaalijakaumaa. Kuten aiemmin todettiin, suureen  $B_{inst}$  määrittämiseksi voidaan mitata suuresta yhtenäiskiteestä koostuva näyte, jolloin diffraktiopiikkien levenemisen voidaan olettaa johtuvan yksinomaan laitevaikutuksesta.

Kiteisyysasteella tarkoitetaan kiteisessä olomuodossa olevan aineen suhteellista määrää näytteessä. Se saadaan yksinkertaisesti kaavalla

$$K(\%) = \left(1 - \frac{I_A}{I_M}\right) \times 100\%, \quad (8)$$

missä  $K$  on kiteisyysaste prosenteissa,  $I_A$  amorfisen taustan kokonaisintensiteetti ja  $I_M$  mitattu kokonaisintensiteetti. Amorfisen taustan intensiteetti oletetaan tunnetuksi tai sille voidaan käyttää sopivaa approksimaatiota, kuten kidekokoja määritettäessä tehtiin. Tässä tapauksessa sitä ei luonnollisesti vähennetä mitatusta intensiteetistä.

### 3.3 Pienkulmasironnan teoriaa

#### 3.3.1 Pienkulmasironnan perusteita

Pienkulmasironta (engl. *small angle x-ray scattering*, SAXS) on röntgensironnan menetelmä, jolla voidaan tutkia aineen rakennetta kymmenien ja tuhansien Ångströmien välisessä pituusskaalassa. Perinteisen laajakulmasironnan tavoin pienkulmasironnassa röntgensäteilyn siroaminen aineessa tapahtuu lähinnä sen elektroneista. Menetelmien olennainen ero on kuitenkin se, että pienkulmasironnalla havaitaan ainoastaan elektronitiheyden vaihteluita tyypillisiä atomitasojen välimatkoja suuremmilla etäisyyksillä.[29]

Pienkulmasironnassa sirontakulmat ovat ainoastaan muutamien asteiden suuria, jolloin sen yhteydessä syntyvä diffraktiokuvio on olennaisesti erilainen kuin laajakulmasironnassa syntyvä. Kuvion analysoiminen on myös selvästi mutkikkaampaa kuin laajakulmasironnassa. Pienkulmasironnan etuna on kuitenkin tutkittavien rakenteiden suuri pituusskaala. Yhdestä pienkulmasirontakuvaajasta voidaan löytää useita erilaisia sirontakulma-alueita, jotka kuvaavat tutkittavan näytteen rakennetta eri koluokissa.

Pienkulmasirontaa käytetään usein kolloidisen suuruusluokan epähomogeenisuuksien tutkimiseen. Tällaisia ovat esimerkiksi proteiinit tai muut luonnon makromole-



kyylit vesiliuoksessa. Menetelmällä voidaan saada tilanteesta riippuen tietoa epähomogeenisuuksien koosta, muodosta, massasta ja jopa koostumuksesta. Joissain tapauksissa suureiden määrittäminen edellyttää absoluuttisten intensiteettien tuntemista.[29]

Yksi käyttökohde pienkulmasironnalle ovat huokoiset ja rakeiset materiaalit[30]. Niissä näyte on jauhetta, joka koostuu huokoisista mikrometrin rakeista. Rakeet voivat olla itse ilmassa tai nestemäisessä liuoksessa ja niiden huokokset voivat sisältää kaasua tai nestettä, jolloin aine muistuttaa makroskooppisesti vaahtoa tai geeliä. Tässä työssä tutkitut näytteet olivat kuivia tai veteen sekoitettuja rakeisia jauheita.

### 3.3.2 Pienkulmasironnan avulla määritettävät suureet

Pienkulmasironnalla tutkittavat rakenteet voivat muodostua erillisistä partikkeleista, jotka voivat olla selvästi irrallaan toisistaan tai kiinni toisissaan, tai jatkuvista saman elektronitiheyden alueista[31]. Erilaisten rakenteiden pienkulmasironnan analyysimenetelmät ja niillä saatavat suureet eroavat hieman toisistaan, mutta muutamat peruseriaatteen ovat silti samat.

Pienkulmasironnan intensiteetti–sironnakulma-kuvaajan perusteella voidaan määrittää niin sanottu invariantti  $Q$  kaavalla

$$Q = \int_0^\infty I(q)q^2 dq, \quad (9)$$

missä  $I$  on mitattu intensiteetti sironnavektorin itseisarvon (kaava 3) funktiona[31]. Integraalin laskemiseksi on integroitava funktio  $I(q)q^2$  ekstrapoloitava  $q$ :n arvoihin 0 ja  $\infty$ , mikä ei aina onnistu käytännössä. Invariantin yksikkönä käytetään yleensä yksikköä  $1/\text{cm}^4$ .

Invariantin avulla saadaan laskettua absoluuttisia suureita suoraan mitatusta pienkulmasironnan diffraktiokuvioista. Kahdesta faasista muodostuneelle sileäpintaiselle systeemille yksi tällainen suure on spesifinen pinta-ala

$$\frac{S}{V} = \frac{\pi\varphi_1\varphi_2}{Q} \lim_{q \rightarrow \infty} I(q)q^4, \quad (10)$$

missä  $\varphi_1$  ja  $\varphi_2$  ovat materiaalissa olevien kahden faasin tilavuusosuudet. Spesifinen pinta-ala  $S/V$  (yksikkö  $1/\text{m}$ ) kertoo kahden faasin välisen rajapinnan pinta-alan suuruuden tietyssä tilavuudessa. Usein spesifinen pinta-ala ilmoitetaan myös yksiköissä  $\text{m}^2/\text{g}$ , jolloin se kertoo pinta-alan yhdessä grammassa tarkasteltavaa ainetta. Tällöin kaavan 10 suure  $S/V$  on jaettava vielä aineen tiheydellä  $d_m$ . [30, 31]

Intensiteetti  $I(q)$  vastaa tässä differentiaalista sironnavaikutusalaa  $d\Sigma/d\Omega$ , jolloin sen yksikkö on  $1/\text{cm}$  ja yhden elektronin sirottama intensiteetti on suuruudeltaan 1. Tämän niin sanotun absoluuttisen intensiteetin ja ilmaisimessa havaitun pulssimäärän  $N(q)$  välillä on suora yhteys

$$I(q) = \frac{KN(q)}{lT}, \quad (11)$$

missä  $l$  on näytteen optinen paksuus,  $T$  sen transmissio ja  $K$  kalibrointinäytteen pienkulmasirontamittauksesta saatava dimensioton vakio. Transmissiolla tarkoitetaan näytteen läpäisevän ja siihen saapuvan intensiteetin suhdetta ja se voidaan määrittää kokeellisesti.[32]

Kaavan 11 optinen paksuus riippuu näyteaineen tarkemmasta koostumuksesta. Jos esimerkiksi huokoisen näytteen huokokset ovat täyttyneet jollain muulla aineella kuin ilmalla, täytyy ne laskea kiinteän osan lisäksi mukaan optiseen paksuuteen. Näytteen optinen paksuus  $l$  saadaan kaavasta

$$l = -\ln(T)/\mu, \quad (12)$$

missä  $\mu$  on näytteen lineaarinen absorptiokerroin, joka puolestaan lasketaan näytteen sisältämien komponenttien absorptiokertoimien painotettuna summana.[25]

Kaavassa 10 esiintyvän raja-arvon olemassaolo tunnetaan Porodin lakina. Se edellyttää, että kahden elektronitiheydeltään toisistaan eroavan faasin välinen rajapinta on tarkasti määritelty ja sileä. Laki on kuitenkin voimassa riippumatta siitä, muodostuuko tutkittava faasi erillisistä hiukkasista, tiheään pakatusta systeemistä tai jatkuvista alueista. Jos vastaava potenssilaki pätee jollain muulla  $q$ :n potenssilla kuin 4, voidaan sen perusteella tehdä päätelmiä hiukkasten pinnanmuodoista tai niiden sisäisestä rakenteesta. Näihin tapauksiin perehdytään myöhemmin.[31]

Kun oletetaan, että dispersi faasi muodostuu erillisistä hiukkasista, voidaan pienillä kulmilla käyttää Guinierin approksimaatiota. Tällöin intensiteetille pätee verrannollisuus

$$I(q) \propto \exp(-q^2 R_g^2/3), \quad (13)$$

missä  $R_g$  on hiukkasen muotoa karakterisoiva vakio (hitaussäde). Jos Guinierin lakia ei havaita diffraktiokuvion alkupäässä, saattaa se kertoa hiukkasten pakkautumisesta tai erittäin harvasta kaasumaisesta systeemistä. Guinierin approksimaation ja Porodin lain avulla voidaan suorittaa integrointi kaavan 9 invarianttia laskettaessa.[31]

Kaavan 9 ohella invariantti  $Q$  voidaan laskea myös kaavalla

$$Q = 2\pi^2 \varphi_1 \varphi_2 (\Delta\rho)^2, \quad (14)$$

missä  $\Delta\rho$  on faasien 1 ja 2 elektronitiheyksien erotus (engl. *scattering length density contrast*, yksikkö  $1/\text{cm}^2$ ). Jos siis tunnetaan absoluuttinen intensiteetti (kaava 11),

voidaan kaavat 10 ja 14 yhdistämällä laskea spesifinen pinta-ala elektronitiheyseron perusteella, jolloin välttyään integroinnilta.[32]

Tässä työssä toinen tarkastelun kohteena olevista tilanteista on sellainen, missä näyte koostuu nestemäisessä liuottimessa olevista huokoisista rakeista ja jossa myös huokokset sisältävät samaa nestettä. Tällöin kokonaispinta-ala massayksikössä kiinteää ainetta saadaan edellä esitetyn perusteella kaavasta

$$S_{S,m} = \frac{K}{2\pi l \varphi_S d_m (\Delta\rho)^2} \lim_{q \rightarrow \infty} \left[ \frac{N(q)}{T} - N_{bg}(q) \right] q^4, \quad (15)$$

missä  $K$  on kalibrointinäytteen mittauksesta saatava dimensioton vakio,  $l$  näytteen optinen paksuus kaavasta 12 (yksikkö cm),  $\varphi_S$  kiinteän aineen tilavuusosuus,  $d_m$  kiinteän aineen tiheys (yksikkö g/cm<sup>3</sup>),  $\Delta\rho$  kiinteän ja nestefaasin välinen elektronitiheysero (yksikkö 1/cm<sup>2</sup>),  $T$  mittaustulosta saatava näytteen transmissio ja  $N(q)$  ja  $N_{bg}(q)$  ilmaisimessa havaitut pulssimäärät  $q$ :n funktiona erikseen mitatuille näytteelle ja taustalle. Toisin sanoen kun tiedetään näytteen massa kuivana ja märkänä, saadaan kaavasta 15 sen nesteessä ollessaan sisältämä kokonaispinta-ala.[30, 32]

Toinen työssä tarkasteltava systeemi on näyte, jossa rakeiden välit ja huokokset ovat täyttyneet ilmalla. Tähän voidaan käyttää samaa kaavaa 15, jossa laskettavista suureista ainoastaan elektronitiheysero ja optinen paksuus muuttuvat. Massana käytetään tällöin yksinkertaisesti kiinteän aineen kuivamassaa.

Pienkulmasironnakuvioista voidaan Porodin lain avulla määrittää myös niin sanottuja Porodin pituuksia (engl. *Porod length* tai *average chord length*). Porodin pituus kuvaa kaksifaasisessa systeemissä rajapintojen keskimääräistä etäisyyttä. Sen avulla saadaan arvio faasien koista, mikä esimerkiksi huokoisissa materiaaleissa tarkoittaa näytteessä olevien huokosten ja kiinteän aineen alueiden keskimääräistä kokoa. Kaksifaasisessa systeemissä se saadaan laskettua kaavan 10 spesifisen pinta-alan  $S/V$  avulla kaavasta

$$l_c = 4\varphi_1\varphi_2 \frac{1}{S/V}, \quad (16)$$

missä  $\varphi_1$  ja  $\varphi_2$  ovat eri faasien tilavuusosuudet. Porodin pituuden avulla saadaan myös eri faasien keskimääräiset koot  $l_1$  ja  $l_2$  erikseen ratkaisemalla ne lausekkeesta[31, 33, 34]

$$l_c = \varphi_2 l_1 = \varphi_1 l_2. \quad (17)$$

Kuten Porodin lakia esiteltäessä todettiin, pienkulmasironnan  $I(q)$ -kuvaaja voi noudattaa potenssilakia  $q^{-\alpha}$  muullakin  $\alpha$ :n arvolla kuin 4. Potenssilakeja voi esiintyä millä tahansa  $q$ -alueella, jolle pätee  $qR_g \gg 1$ . Tässä  $R_g$  voi olla näytteen partikkelien

hitaussäde tai jokin muu faasien mittoja kuvaava tyypillinen pituus. Potenssilaki, jossa  $\alpha = 4$ , on voimassa makroskooppisesti isotrooppisille, kahden elektronitiheydeltään homogeenisen faasin muodostamille systeemeille, joissa faasien välinen rajapinta on tutkittavassa kokoluokassa sileä. Huonosti määriteltävissä oleva rajapinta, jossa elektronitiheys muuttuu jatkuvasti, tuottaa pienkulmasirontakuvioon potenssilain potenssin arvolla  $\alpha > 4$ . Porodin lainkin edellyttämä epäjatkuva elektronitiheyden muutos rajapinnalla tuottaa potenssilakeja arvoilla  $0 < \alpha < 4$ . [31, 35]

Potenssilait, joissa  $0 < \alpha < 4$ , kertovat elektronitiheysalueiden muodoista. Kokonaislukuarvo  $\alpha = 2$  vastaa ohuita tasoja tai levyjä ja arvo  $\alpha = 1$  ohuita sylintereitä tai säikeitä. Muut potenssin arvot kertovat näytteessä esiintyvien muotojen fraktaaliluonteesta. Fraktaalit ovat luonnossa ja matematiikassa esiintyviä rakenteita, jotka näyttävät samalta missä tahansa mittakaavassa katsottuina. Niiden kuvaamisessa saavutettava tarkkuus riippuu kuvaamiseen käytettävän mittatikun pituudesta. Tällöin esimerkiksi fraktaalisen viivan kuvaamiseen vaadittu mittatikkujen määrä on verrannollinen tikkujen pituuden negatiiviseen potenssiin. Tyypillinen esimerkki makroskooppisesta fraktaalirakenteesta on mantereen rantaviiva, joka aina vain lyhyemmillä mittatikuilla mitattaessa tuottaa suuremman pituuden. [31, 35]

Fraktaaleja kuvataan niin sanotulla fraktaalidimensiolla  $D$ . Pistekollimoidun röntgensäteen tapauksessa se saadaan kolmiulotteisessa avaruudessa erikseen massa- ja pintafraktaaleille yhtälöillä

$$D_m = \alpha$$

ja

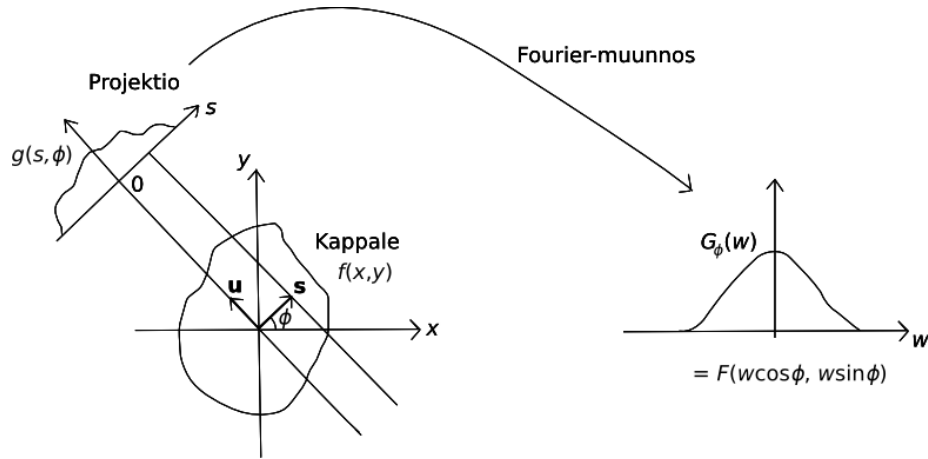
$$D_s = 6 - \alpha. \quad (18)$$

Massafraktaaleissa rakenteen fraktaaliluonne näkyy sen sisäisessä rakenteessa, kun taas pintafraktaaleissa se rajoittuu rakenteiden pintaan. Pienkulmasironnassa potenssilaki, jossa  $\alpha \leq 3$  tarkoittaa massafraktaaleja ja  $3 < \alpha < 4$  pintafraktaaleja. [35]

### 3.4 Röntgenmikrotomografian teoriaa

Tietokonetomografia (engl. *computerized tomography* tai *computed tomography*, CT) on kuvantamismenetelmä, joka perustuu jonkin aineen ominaisuuden muuttumiseen paikan funktiona. Ominaisuuden vaihtelu tutkittavassa näytteessä kartoitetaan kuvaamalla näyte useasta suunnasta ja muodostamalla saaduista kuvista eli projektioista kolmiulotteinen malli, rekonstruktio. [36]

Röntgentomografian tavallisimmassa menetelmässä näytettä karakterisoiva ominaisuus on sen kyky absorboida röntgensäteilyä. Näytteen läpi kulkeva röntgensäteily



**Kuva 5:** Tomografiakuvan muodostaminen. Vasemmalla funktion  $f(x, y)$  kuvaama kappale ja sen synnyttämä projektio  $g(s, \phi)$ . Röntgensäde on vektorin  $\mathbf{u}$  suuntainen. Oikealla projektion Fourier'n muunnos.

absorboituu tietyllä todennäköisyydellä näytteen eri pisteissä. Kuvan 5 mukaisessa mittausgeometriassa tiettyyn ilmaisimen pisteeseen tuleva säteily on kulkenut suoraan näytteen läpi. Samalla sen intensiteetti on heikentynyt absorptio-ominaisuuksien mukaisesti.

Seuraavassa käydään läpi tietokonetomografiakuvan muodostamisen perinteinen menetelmä. Käsittely pätee yleisesti tomografiakuvien muodostamiseen, kunhan mittauksen geometria vastaa kuvan 5 tilannetta.

Kun tutkittavan aineen ominaisuuksia kuvataan kaksiulotteisella funktiolla  $f(x, y)$ , saadaan kullekin ilmaisimen pisteelle muodostuva  $f$ :n projektio  $g(s, \theta)$  viivaintegraalista

$$g(s, \phi) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \delta(x \cos \phi + y \sin \phi - s) dx dy, \quad (19)$$

missä esiintyvät muuttujat on määritelty kuvassa 5. Kaava 19 tunnetaan funktion  $f(x, y)$  Radon-muunnoksena.[36]

Kaksiulotteisen rekonstruktion muodostaminen kulmissa  $\phi$  tuotetuista projektioista onnistuu projektiteoreeman (engl. *projection theorem* tai *Fourier slice theorem*) avulla. Sen mukaan projektion  $g(s, \phi)$  yksiulotteinen Fourier'n muunnos muuttujan  $s$  suhteen

$$G_\phi(w) = \int_{-\infty}^{+\infty} g(s, \phi) e^{-i2\pi ws} ds \quad (20)$$

antaa kulmassa  $\phi$  tehdyn poikkileikkauksen funktion  $f(x, y)$  kaksiulotteisesta Fourier'n muunnoksesta  $F(u, v) = F(w \cos \phi, w \sin \phi)$ . Siten funktio  $f(x, y)$  voidaan ratkaista laskemalla käänteismuunnos

$$f(x, y) = \int \int_{-\infty}^{+\infty} F(u, v) e^{i2\pi(ux+vy)} du dv, \quad (21)$$

suurelle määrälle kulmia välillä  $\phi \in [0, \pi]$ . [36]

Kolmiulotteinen kuva saadaan aikaan, kun kaksiulotteiset vaakatasossa kuvatut rekonstruktiosiihut pinotaan päällekkäin. Tuloksena on kuva näytteestä ja sen sisäisestä rakenteesta, jota voidaan leikata halutuissa suunnissa ja josta voidaan visuaalisesti tai laskennallisesti johtaa näytteen rakennetta kuvaavia suureita. [36]

Tässä työssä käytetty röntgensädekeila ei ollut yhdensuuntainen vaan ennemminkin kartion muotoinen, jolloin sillä oli myös äärellinen korkeus pystysuunnassa. Sen vuoksi yllä esitettyä rekonstruktion muodostamismallia ei voitu soveltaa sellaiseenaan, vaan sen tilalla käytettiin Feldkamp ym.:n vuonna 1984 esittämää rekonstruktioalgoritmia kartionmuotoiselle säteilykeilalle [37]. Perusteiltaan menetelmä noudattaa edellä esitettyä. Ainoastaan viimeinen käänteismuunnos korvattiin käyttämällä suodatetun takaisinprojisoinnin menetelmää, joka on nopeampi tapa kuin kaavan 21 laskeminen. [36]

## 4 Näytteet, mittalaitteet ja mittaukset

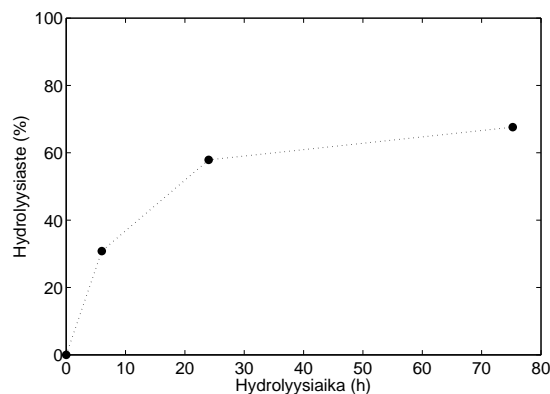
### 4.1 Näytteiden valmistus

Entsyymikäsittelyn lähtöaineena käytettiin kaupallista mikrokiteistä selluloosaa (SERVA Electrophoresis), jonka hiukkaskoko oli 0,05 mm ja joka vastaa Avicel PH 101:ä. Sitä hydrolysoitiin rihmasienestä (*Trichoderma reesei*) peräisin olevilla kaupallisilla entsyymiseoksilla Celluclast (aktiivisuus 10 FPU/g kuivamassaa kohti) ja Novozym 188 (aktiivisuus 100 nkat/g kuivamassaa kohti) 45°C:n lämpötilassa jatkuvasti sekoittaen. Entsyymit inaktivoitiin keittämällä, minkä jälkeen liuos suodatettiin 60  $\mu\text{m}$ :n suodattimella. Suodattimeen jäänyt hydrolyysin jäännös pakastekuivattiin röntgen-tutkimuksia varten.

Suodattimen läpäissyt hydrolysaatti suodatettiin edelleen 5  $\mu\text{m}$ :n suodattimella ja liuenneet hiilihydraatit analysoitiin liuenneina pelkistävinä sokereina DNS-menetelmällä[38]. Tällä tavalla saatiin määritettyä kunkin näytteen hydrolyysiaste, joka tässä tapauksessa tarkoittaa reaktiossa vapautuneiden sokereiden massan ja lähtöaineen alkuperäisen massan suhdetta.

Näytteitä valmistettiin röntgentutkimuksia varten kolme kappaletta, joiden hydrolyysiajat olivat 6, 24 ja 75 tuntia. Näyteaineiden hydrolyysiasteiksi määritettiin 31 %, 58 % ja 68 %. Hydrolyysiaste on myös esitetty ajan funktiona kuvassa 6. Kuvaaja on tyypillinen selluloosan entsyymaattiselle hydrolyysille ja reaktion asteittainen hidastuminen näkyy siinä selvästi[19].

Laajakulmasirontamittauksia varten jauhemaista näyteainetta puristettiin käsin alumiinisiin aluslevyihin, joiden reiän halkaisija oli 4 mm ja paksuus noin 1 mm. Aluslevyt päällystettiin kummaltakin puolelta 2,5  $\mu\text{m}$  paksulla Mylar-kalvolla. Samat näytteet mitattiin myös pienkulmasirontalaitteistolla.



**Kuva 6:** Avicelin hydrolyysiaste hydrolyysiajan funktiona. Katkoviiva datapisteiden välillä on piirretty yksinomaan visuaalisista syistä.

Hydrolyysi- aika (h)	Liuos	Massa (mg)	Avicel- pitoisuus (%)	Tutkimus- menetelmä
6	Kuiva	10	100	WAXS, SAXS
24	Kuiva	12	100	WAXS, SAXS
75	Kuiva	16	100	WAXS, SAXS
6	Vesi	29	24	SAXS
24	Vesi	30	25	SAXS
75	Vesi	28	27	SAXS
6	Kuiva	-	100	Tomografia
24	Kuiva	-	100	Tomografia
75	Kuiva	-	100	Tomografia

**Taulukko 1:** Mitatut näytteet ja niiden tiedot.

Pienkulmasirontaa mitattiin lisäksi kastelluista näytteistä. Niiden valmistamiseksi kertaalleen pakastekuivattua hydrolysoitua Avicelia liotettiin viikon ajan puhtaassa vesijohtovedessä, jossa sen pitoisuus oli noin 3 massaprosenttia. Juuri ennen mittauksia osa vedestä poistettiin pipetillä ja vedessä turvonnutta näytejauhetta asetettiin aluslevyyn. Aluslevy suljettiin Mylar-kalvojen väliin vastaavalla tavalla kuin kuivia näytteitä mitattaessa. Veden ei todettu haihtuvan merkittävästi mittauksen aikana.

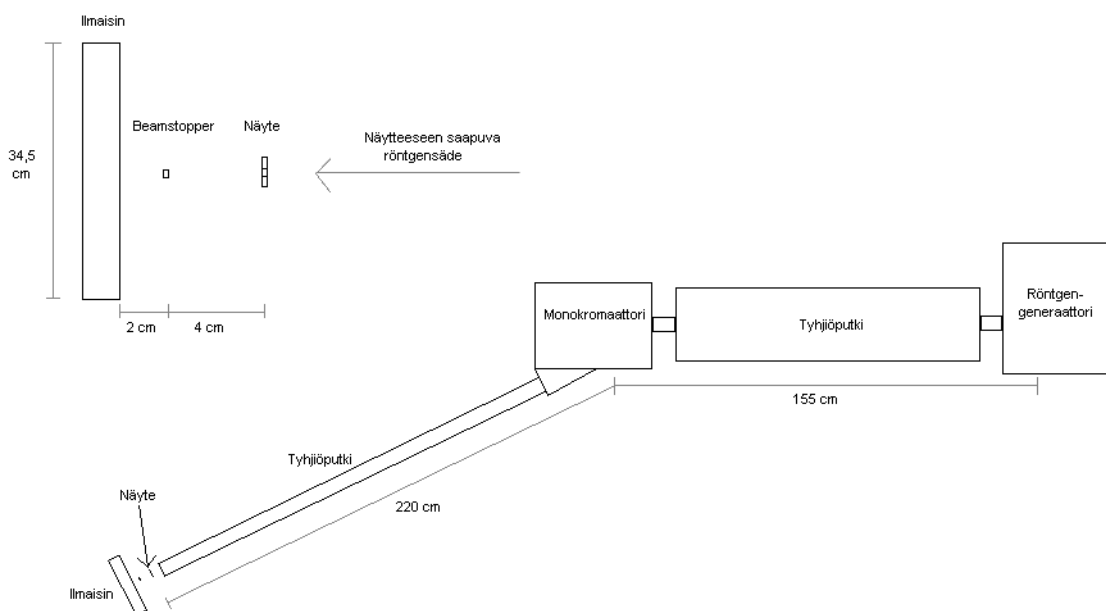
Mikrotomografiamittauksia varten Avicel-jauhetta puristettiin käsin 200  $\mu\text{l}$ :n Eppendorf-putken pohjalle ja putki suljettiin mehiläisvahalla. Jos varsinaista näyteainetta ei ollut riittävästi, näytteen ja mehiläisvahan väliin lisättiin pumpulia. Näyte asetettiin mittauksen ajaksi siten, että ainoastaan näyteaine ja sitä ympäröivä Eppendorf-putken muovikuori osuivat röntgensäteiden sädekeilaan.

Kootut tiedot työssä mitatuista näytteistä on esitetty taulukossa 1. Taulukkoon on lisäksi merkitty kunkin näytteen mittaamisessa käytetty menetelmä.

## 4.2 Laajakulmasironta

Laajakulmasirontalaitteiston kaavakuva näkyy kuvassa 7. Röntgensäteily tuotettiin pyöriväänodisella röntgengeneraattorilla (UltraX18S, Rikagu). Röntgenputken käyttöjännitteen ja -virran arvot olivat 50 kV ja 80 mA ja BIAS:in arvo 3. Säteily kulki aluksi tyhjiöputken läpi Si (111) -kidemonokromaattoriin. Siitä kuparin  $K_{\alpha}$ -säteily (aallonpituus  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) jatkoi edelleen toisen tyhjiöputken läpi säteilyn etene-  
missuuntaan nähden kohtisuoraan näytteeseen. Näytetelineeseen kiinnitetyn näytteen läpi sironnut säteily havaittiin kaksikulotteisella kuvalevyilmaisimella (MAR345, Marresearch). Ilmaisimen vahingoittumisen välttämiseksi primäärisäde pysäytettiin kap-





**Kuva 7:** Laajakulmasirontalaitteiston kaavakuva (ylhäältä katsottuna).

paleella puoliläpäisevää kuparikalvoa (beamstopper).

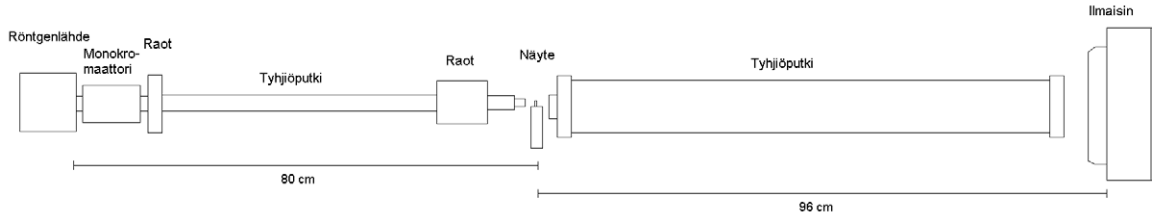
Taulukon 1 laajakulmasirontanäytteiden lisäksi mitattiin ilmasironnat tyhjälle Mylar-kalvoilla päällystetylle aluslevylle ja tyhjälle näytetelineelle sekä pimeä virta kokonaan ilman röntgensädettä. Kaikkia mitattiin 30 minuutin ajan.

Laajakulmasirontan  $q$ -asteikko määritettiin käyttämällä aiemmin mitattuja hopeabeheenaatin, piin ja kuparin sirontakuviota. Näytteiden amorfista taustaa approksimoitiin sulfaattiliginiin tuottamalla sirontakuviolla, joka on aiemmin todettu toimivaksi runsaasti selluloosaa sisältävien näytteiden yhteydessä.[14]

### 4.3 Pienkulmasironta

Pienkulmasirontalaitteisto on esitetty kuvassa 8. Röntgensäteily tuotettiin röntgen-generaattorilla (K710H, Siemens) ja siihen kytketyllä kuparianodisella röntgenputkella (PW 2213/20, Panalytical). Generaattorin käyttöjännitteen ja -virran arvot olivat 36 kV ja 25 mA. Röntgensäde monokromatisoitiin, minkä jälkeen se kulki rakojen ja tyhjiöputken läpi näytteeseen pistekollimoituna ja kohtisuoran läpäisyn geometrian mukaisesti. Näytteen jälkeen säteily kulki vielä noin metrin matkan tyhjiöputkessa, minkä jälkeen se havaittiin kaksikulotteisella monilankalaskurilla (HI-STAR, Bruker AXS).

Ilmaisim oli kytketty mittaustietokoneeseen, johon oli asennettu ilmaisimen yhteyteen kuuluva mittaushjelma (SAXS, Bruker AXS). Ohjelma suoritti mittausdatalle automaattisesti korjaukset mittaushjelman (spatial correction) ja kuvan tasaisuus-



**Kuva 8:** Pienkulmasirontalaitteiston kaavakuva (sivulta katsottuna).

den suhteen (flood-field correction). Kelvollisia tuloksia saatiin sirontakulma-alueelta  $2\theta = 0,2 - 3,1^\circ$ , mikä vastaa  $q$ -asteikolla väliä  $q = 0,014 - 0,22 \text{ 1/\AA}$ .

Pienkulmasirontamittauksia tehtiin sekä märille että kuiville Avicel-näytteille, joiden analyysia varten mitattiin myös taustasironta Mylar-kalvoista. Mittausaika oli 60 minuuttia. Lisäksi mitattiin hopeabehenaattinäyte  $q$ -asteikon kalibroimiseksi ja Lupolen-näyte ja tämän taustasironta absoluuttisen intensiteettiasteikon kalibroimiseksi. Lupolen on teollisesti tuotettu polyetyleni, jota käytetään pienkulmasirontan absoluuttisten intensiteettien standardina[39]. Näytteiden transmissioita ei mitattu erikseen, vaan ne saatiin mittausdatasta summaamalla kunkin näytteen intensiteetti primäärisäteen alueella ja jakamalla se taustan vastaavalla intensiteettien summalla.

#### 4.4 Mikrotomografia

Mittauslaitteisto koostui kaupallisesta röntgenmikrotomografialaitteesta (nanotom, Phoenix|x-ray Systems + Services), johon sisältyi litteä  $234 \times 234$  pikselin CMOS-ilmaisim (Hamamatsu). Rekonstruktioit tehtiin tomografialaitteeseen kuuluneella tietokoneohjelmalla datos|x (versio 1.3.2.11).

Volframianodisen röntgenputken käyttöjännite oli kaikissa mittauksissa 60 kV ja käyttövirta 400 mA. Röntgensäteiden tarkka energiaspektri ei ollut tiedossa, mutta säteilykeila saatettiin approksimoida kartion muotoiseksi. Kussakin mittauksessa otettiin 1440 projektiota kulma-alueella  $0-360^\circ$ , ja niistä jokainen muodostettiin viiden kuvan keskiarvosta. Kunkin yksittäisen kuvan mittausaika oli 750 ms. Yhden vokselin sivun pituus lopullisessa kolmiulotteisessa kuvassa vastasi  $1,00 \mu\text{m}$ :ä. Ilmaisimen erotuskyky oli ainoastaan  $50 \mu\text{m}$ , mutta lopullisen kuvan erotuskyky selittyy mittausgeometrian suurentavalla vaikutuksella.

#### 4.5 Lämpäiselektronimikroskopia

Edellisissä osioissa lueteltujen röntgenfysiikan menetelmien lisäksi näytteitä tutkittiin lämpäiselektronimikroskopiolla (engl. *transmission electron microscopy*, TEM). Lämpäi-

syelektronimikroskoopissa kuva muodostuu näytteen läpäisevistä elektroneista, jotka on kiihdytetty voimakkaalla jännitteellä. Elektronisäteen ohjaus ja kuvan muodostaminen tapahtuvat magneettilinssien avulla. Elektronit absorboituvat ja siroavat näytteessä sen koostumuksesta riipuen, jolloin kuvaan saadaan kontrasti eri alkuaineiden välille. Koska aine absorboi helposti elektroneita, täytyy näytteen olla erittäin ohut ja jäähdytetty.[9]

Tämän työn TEM-mittauksia varten Avicel-näytteet sekoitettiin veteen (konsentraatiot välillä 0,2–2%) ja jäähdytettiin noin 88 K:n lämpötilaan. Mikroskoopissa (Technai 12, FEI) elektronit kiihdytettiin 120 kV:n jännitteellä ja havaittiin näytteen jälkeen fosforinäytöllä. Saadut suurennokset vaihtelivat 440-kertaisesta 49 000-kertaiseen.

## 5 Tulokset

### 5.1 Laajakulmasironnan tulokset

Laajakulmasironnan tuottamille integroiduille intensiteeteille tehtiin taustan vähennys ja tarvittavat korjaukset. Absorptiokorjauksessa tarvittava lineaarinen absorptio-kerroin määritettiin suoraan kokeellisesta datasta. Intensiteetin integrointisektori oli kaikille näytteille  $40^\circ$  ilmaisimen tasossa. Työssä tutkittu kelvallinen sirontakulma-alue oli  $2\theta = 9 - 52^\circ$ , mikä vastaa  $q$ -asteikon väliä  $q = 0,6 - 3,6 \text{ 1/\AA}$ .

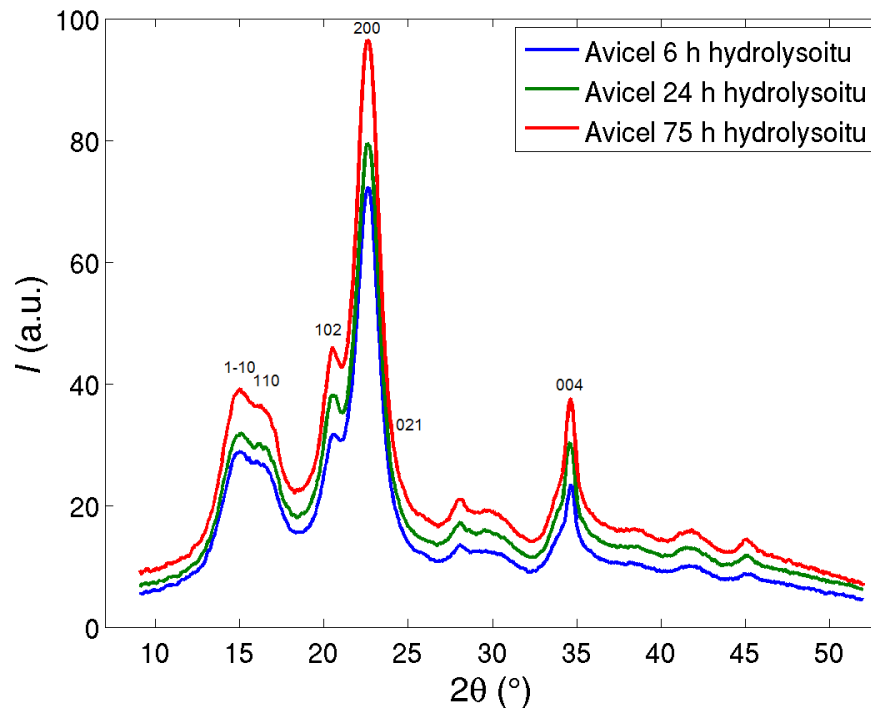
Avicel-näytteille saadut kidekoot ja kiteisyysasteet on esitetty taulukossa 2. Lisäksi kaikkien kolmen näytteen integroidut intensiteetit on piirretty kuvaan 9. Siinä mittausdatalle on suoritettu taustan vähennys ja kaikki korjaukset. Intensiteetin arvot ovat käytetystä ilmaisimesta johtuen mielivaltaisissa yksiköissä (a.u.).

Kidekokoja laskettaessa amorfinen tausta sovitettiin havaittuun intensiteettiin  $2\theta$ -asteikon arvojen  $18^\circ$  ja  $19^\circ$  välillä, mutta huomiota kiinnitettiin myös mittausdatan ja tausta-approksimaation yhteensopivuuteen tutkitun alueen ( $2\theta = 12 - 27^\circ$ ) päissä. Amorfisen taustan vähentämisen jälkeen intensiteetti–sirontakulma-kuvaajissa näkyi 5 diffraktiopiikkiä, joiden tiedettiin syntyneen selluloosa I $\beta$ :n heijastuksista  $1\bar{1}0$ , 110, 102, 200 ja 021. Piikkeihin sovitettiin Gaussin funktiot, joiden paikkojen ja puoliarvonleveyksien perusteella määritettiin näytteen keskimääräiset kidekoot käyttäen Scherrerin kaavaa 7. Sovitusten hyvyyden arvioinnissa painotettiin erityisesti piikkien vastaavuutta mitatun datan ja sovitusten välillä. Kaikki heijastukset eivät olleet yhtä voimakkaita ja erityisesti 021-heijastuksen kohdalla sovitukset ei ollut erityisen luotettavia, mistä johtuvat tämän heijastuksen suuret virhearviot.

Kidekoille laskettiin aluksi karkeat virhearviot pienimmän neliösumman menetelmällä. Lopulta realistisemmaksi osoittautui määrittää ne tekemällä useita sovituksia samaan kuvaajaan ja tutkimalla sovitusten eroja. Tämä tehtiin käytännössä tarkkailemalla sovitusten perusteella laskettujen kidekokojen vaihtelua ja vertailemalla eri näytteen intensiteetti–sirontakulma-kuvaajia silmämääräisesti. Huomiota kiinnitettiin myös siihen, kuinka hyvin sovitukset vastasi mitattua käyrää.

Hydrolyysi- aika (h)	Kidekoko ( $\text{\AA}$ )					Kiteisyys- aste (%)
	suunnassa $[\bar{1}\bar{1}0]$	$[110]$	$[102]$	$[200]$	$[021]$	
6	$47 \pm 3$	$55 \pm 4$	$58 \pm 5$	$53,6 \pm 1,0$	$52 \pm 12$	$49 \pm 3$
24	$48 \pm 3$	$56 \pm 4$	$62 \pm 5$	$52,4 \pm 1,0$	$37 \pm 12$	$50 \pm 3$
75	$48 \pm 3$	$57 \pm 4$	$62 \pm 5$	$52,7 \pm 1,0$	$31 \pm 12$	$49 \pm 3$

**Taulukko 2:** Laajakulmasironnalla määritetyt kidekoot ja kiteisyysasteet.



**Kuva 9:** Eri aikoja hydrolysoitujen Avicel-näytteiden laajakulmasironnan intensiteetti-sirontakulma-kuvaajat. Kuvaan on merkitty piikkejä vastaavat heijastukset.

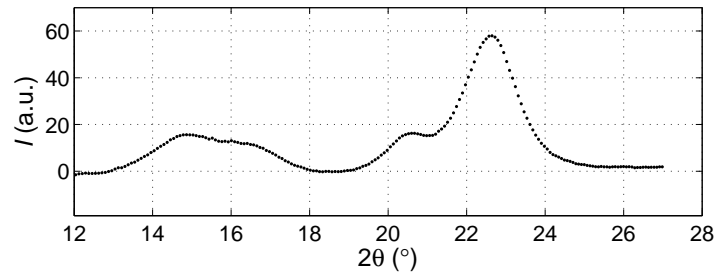
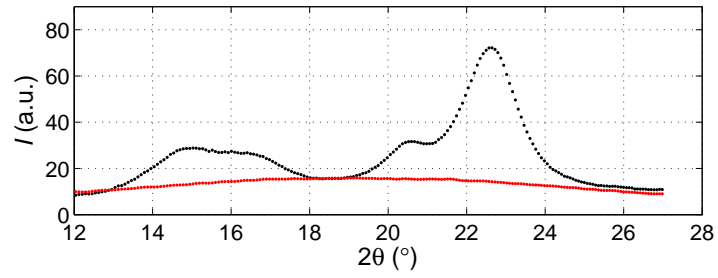
Kiteisyysasteita määritettäessä kuhunkin kuvaajaan sovitettiin yhteensä 24:ää seluloosan heijastusta vastaavaa Gaussin funktiota, minkä jälkeen kiteisyysasteet laskettiin kaavalla 8. Tuloksina saatujen kiteisyysasteiden todettiin riippuvan voimakkaasti sovitusten parametreista, mistä seuraa niiden suhteellisen suuri virhemarginaali.

Kuvassa 10a näkyy esimerkinomaisesti amorfisen taustan vähentäminen mittausdatasta intensiteetistä ja tuloksena saatu korjattu intensiteetti. Kidekoon määrittämiseksi tehty sovitus näkyy kuvassa 10b ja kiteisyysanalyysia varten tehty sovitus kuvassa 10c. Jälkimmäisessä kuvassa on esitetty lisäksi amorfisen tausta, intensiteetti täysin kiteiselle aineelle ja heijastusten teoreettiset paikat.

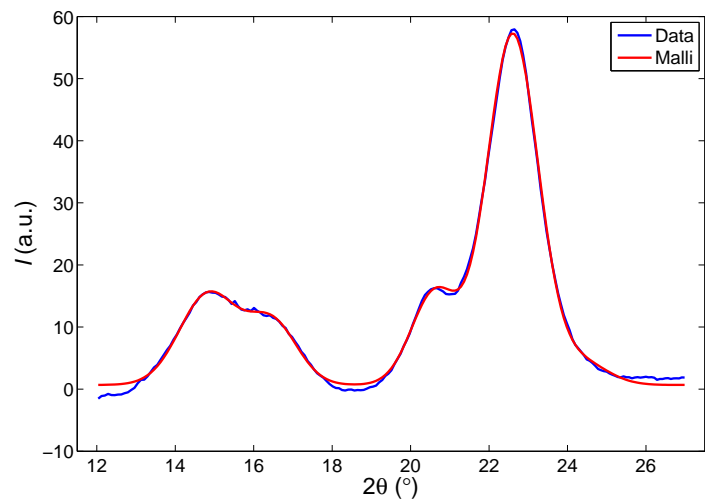
Näytteille laskettiin myös kiteisten alueiden pitoudet käyttämällä Scherrerin kaavaa (kaava 7) [004]-suunnan heijastukselle, joka oli erikseen mitattu nelikehägonio-

**Kuva 10:** (Seuraavalla sivulla) Esimerkkikuvia laajakulmasironnan analyysistä. a) Amorfisen sirontataustan (punaisella) vähentäminen intensiteetti-sirontakulma-kuvaajassa. b) Kidekokojen laskemista varten tehty viiden Gaussin funktion sovitus mittausdataan. c) Kiteisyysasteen laskemista varten tehty heijastusten sovitus ja approksimaatio amorfiselle taustalle.

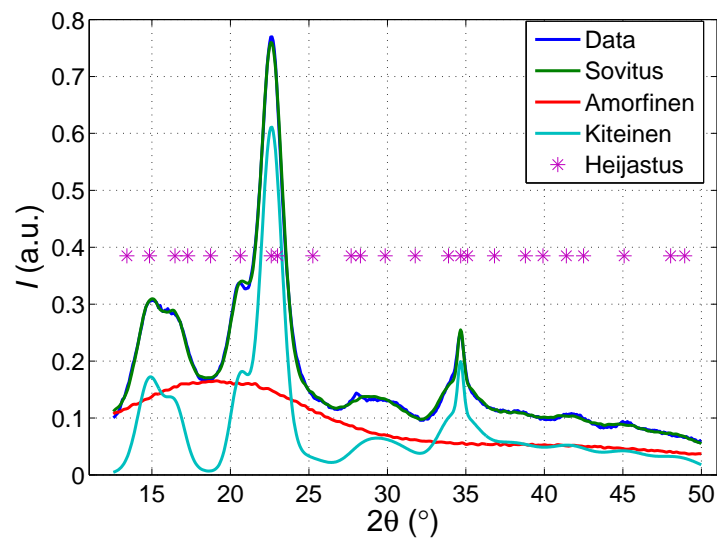
a)



b)



c)



metrillä. Kyseistä laitteistoa tai sillä tehtyjä mittauksia ei tässä esitellä tarkemmin, vaan tulokset annetaan suoraan ja viitataan laitteiston esittelyn osalta viitteeseen [40]. Kiteiden keskimääräisiksi pituuksiksi saatiin 6, 24 ja 75 tuntia hydrolysoituille näytteille arvot  $21 \pm 2$  nm,  $22 \pm 2$  nm ja  $24 \pm 2$  nm.

## 5.2 Pienkulmasironnan tulokset

Pienkulmasironnan tulosten analyysissä pyrittiin aluksi laskemaan absoluuttiset intensiteetit sirontavektorin itseisarvon funktiona ja spesifiset pinta-alat kaavojen 11 ja 15 avulla. Lupolen- ja Avicel-näytteiden intensiteettikuviot integroitiin atsimutaalisesti ja normitettiin transmissiolla, minkä jälkeen niistä vähennettiin ilmasta ja Mylar-kalvoista syntynyt sirontatausta. Intensiteetit jaettiin näytteiden optisilla paksuuksilla ja kaavan 11 vakio  $K$  laskettiin Lupolenin sirottaman intensiteetin perusteella. Tämä tapahtui siten, että Lupolenin sirontakuviassa kohdassa  $q = 0,03$  1/Å näkyvät sirontapiikin maksimi normitettiin arvoon 5,5 1/cm, joka oli määritetty aiemmin[32].

Näytteiden optiset paksuudet laskettiin kaavalla 12 käyttämällä lineaarisen absorptiokertoimen  $\mu$  arvoja 3,33 1/cm Lupolenille[32], 12 1/cm selluloosalle ja 10,4 1/cm vedelle[41]. Kuivien näytteiden oletettiin sisältävän ainoastaan selluloosaa ja ilmaa ( $\mu \approx 0$ ) ja märkien näytteiden ainoastaan selluloosaa ja vettä, jolloin absorptiokerroin laskettiin näiden tiheyksien ja massaosuuksien avulla[25].

Näytteiden kokonaistiheydet arvioitiin niiden sisältämien komponenttien massojen ja aluslevyn reiälle karkeasti mitatun tilavuuden ( $0,026$  cm<sup>3</sup>) avulla. Selluloosan tiheydelle käytettiin kiteisen selluloosan arvoa 1,6 g/cm<sup>3</sup>. Tämän arvon käyttö katsottiin järkeväksi sekä märille että kuiville näytteille, vaikka todellisuudessa kumpienkin tiheys oli luultavasti hieman tätä arvoa pienempi. Pienemmän tiheyden arvon (1,4 g/cm<sup>3</sup> [42]) todettiin kasvattavan spesifisiä pinta-aloja voimakkaasti varsinkin märillä näytteillä ja laskevan niiden Porodin pituuksia kymmenillä prosenteilla. Todellinen tiheyden arvo asettuu todennäköisesti näiden ääripäiden väliin, eikä sen vaikutusta pidetty tämän työn tavoitteiden kannalta merkittävänä.[34]

Työssä mitatut pienkulmasirontakuvaajat on esitetty kuvissa 11a ja 11b. Niistä voidaan välittömästi nähdä, että kuivien näytteiden pienkulmasironnat ovat lähes identtiset koko alueella mutta märkien näytteiden kuviot poikkeavat toisistaan pienillä  $q$ -arvoilla. Kaavalla 2 arvioituna muutoksia hydrolyysin aikana on tapahtunut rakenteissa, jotka ovat nanometriä ja kymmenien nanometriä kokoluokkaa.

Guinierin lain sovittaminen pienkulmasirontadataan ei onnistunut, koska mitattu kulma-asteikko ei yltänyt riittävän pienille sirontakulmille eikä lain voimassaolosta ollut siksi täyttä varmuutta. Tästä johtuen myöskään invarianttia ei voitu laskea kaavan 9 avulla. Spesifistä pinta-alaa laskettaessa invariantti korvattiin kaavalla 14. Elektro-

nitihyysrolle  $\Delta\rho$  laskettiin arvot  $1,44 \times 10^{11}$   $1/\text{cm}^2$  selluloosa–ilma-rajapinnalla ja  $4,98 \times 10^{10}$   $1/\text{cm}^2$  selluloosa–vesi-rajapinnalla[43].

Guinierin lain olemassaoloa testattiin piirtämällä mittausdatat ( $q^2$ ,  $\ln I(q)$ )-kuvaajaan, joka näkyy kuvassa 11c. Kuvasta nähdään suoraan, ettei yksikäsitteisen suoran sovittaminen pienimmille sirontakulmille onnistu millään näytteistä. Kuvion muoto, jyrkkä epälineaarinen nousu nolaa lähestyttäessä, viittaa partikkelien aggregoitumiseen.[31]

Porodin  $q^{-4}$ -lain sovittaminen tehtiin kaikille näytteille. Sovitusalueet olivat märille näytteille  $q = 0,140 - 0,218$   $1/\text{Å}$  ja kuiville  $q = 0,170 - 0,218$   $1/\text{Å}$ . Sovitusalueiden valinnassa kriteereinä sovellettiin viitteessä [34] esitettyjä ehtoja. Niiden mukaan Porodin alueella ( $q$ ,  $I$ )-kuvaaja laskee, ( $\log q$ ,  $\log I$ )-kuvaajassa näkyy noin kulmaker-toimen  $-4$  suora ja se on ensimmäinen tasainen alue jyrkän nousun jälkeen ( $q^4$ ,  $Iq^4$ )-kuvaajassa. Parhaiten ehdot toteutuivat märillä näytteillä, mutta myös kuivat näyt-teet pakotettiin noudattamaan Porodin lakia. Sovitukset kaikille näytteille on esitetty kuvassa 11d. Kuvassa näkyvä nousu suurimmilla kulmilla johtuu mahdollisesti hyvin pienistä epäjärjestyneen aineen alueista[34].

Porodin lain perusteella saatuja raja-arvoja suurilla kulmilla käytettiin kaavan 15 mukaiseen spesifisen pinta-alan laskemiseen. Sen avulla laskettiin edelleen kaavoista 16 ja 17 Porodin pituudet keskimääräisesti ja kummallekin faasille erikseen. Kaikille saadut arvot näkyvät taulukossa 3.

Edellä esitettyjen, muun muassa näytteiden tiheyteen liittyvien epätarkkuuksien vuoksi esitetyt arvot eivät välttämättä ole absoluuttisen oikeita, ja pienilläkin vir-heillä laskujen lähtöarvoissa saattaa olla suuri vaikutus niihin. Tuloksia voidaan siis pitää oikeina lähes yksinomaan suuruusluokaltaan ja ne ovat vertailukelpoisia lähinnä keskenään. Tästä syystä niille ei myöskään ole annettu erillisiä virhearvioita.

	6 h märkä	24 h märkä	75 h märkä	6 h kuiva	24 h kuiva	75 h kuiva
$S_{S,m}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	330	410	220	14	13	9
$l_c$ (nm)	6,4	5,2	9,0	140	140	160
$l_p$ (nm)	41	39	43	570	510	430
$l_s$ (nm)	7,5	6,0	11	180	200	270

**Taulukko 3:** Eri aikoja hydrolysoiduille märille ja kuiville Avicel-näytteille pienkulmasiron-nalla määritetyt kiinteän aineen spesifiset pinta-alat ( $S_{S,m}$ ), keskimääräiset Porodin pituudet ( $l_c$ ) ja faasien Porodin pituudet huokosille ( $l_p$ ) ja kiinteälle aineelle ( $l_s$ ).



Myös toisenlaista lähestymistapaa pienkulmasironnan tuloksiin kokeiltiin. Siinä oletettiin, etteivät veden ja selluloosan tai veden ja ilman väliset rajapinnat olleet sileitä edes suurilla sirontakulmilla, mikä vastaa noin 3 nm:n ja sitä suurempia etäisyyksiä. Tämä tarkoitti sitä, ettei Porodin  $q^{-4}$ -lain oletettu olevan voimassa, vaan intensiteetti–sirontakulma-kuvaajissa näkyviä potenssilakeja tutkittiin sellaisinaan. Kuten kuvasta 11b näkyy, kaikkien näytteiden kuvaajat noudattavat ainakin karkeasti jotain potenssilakia kahdella eri  $q$ -alueella (alueet I ja II kuvassa 12).

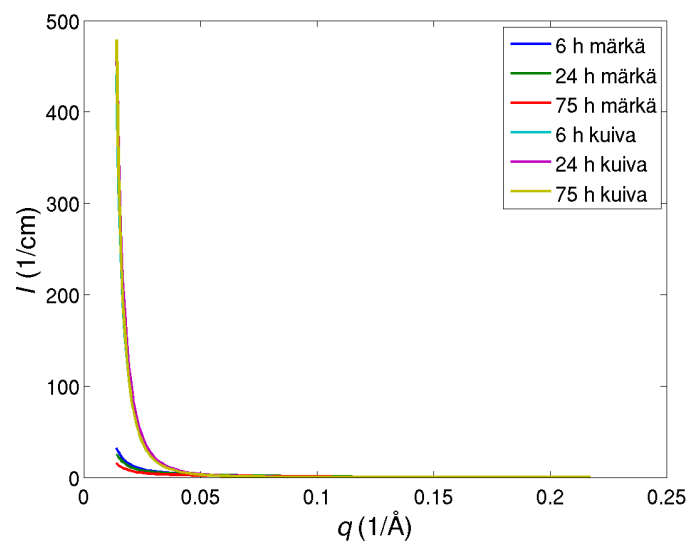
Potenssit laskettiin sovittamalla suorat kummallekin alueelle pienimmän neliösumman menetelmällä. Löydetyt potenssilait alueineen näkyvät taulukossa 4. Arvojen virheeksi arvioitiin  $\pm 0,1$ , mikä perustuu potenssin riippuvuuteen sovitusalueesta. Taulukkoon on myös merkitty kullekin sovitukselle kaavoilla 18 laskettu fraktaalidimensio ja sen laatu. Esimerkit potenssilakisovituksista on esitetty myös kuvassa 12.

	6 h märkä	24 h märkä	75 h märkä	6 h kuiva	24 h kuiva	75 h kuiva
$q_{min,I}$ ( $1/\text{\AA}$ )	0,027	0,027	0,027	0,019	0,019	0,019
$q_{max,I}$ ( $1/\text{\AA}$ )	0,077	0,077	0,077	0,074	0,071	0,071
$\alpha_I$	1,5	1,3	1,2	3,5	3,7	3,6
$D_I$	1,5 (m)	1,3 (m)	1,2 (m)	2,5 (s)	2,3 (s)	2,4 (s)
$q_{min,II}$ ( $1/\text{\AA}$ )	0,13	0,13	0,13	0,12	0,12	0,12
$q_{max,II}$ ( $1/\text{\AA}$ )	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
$\alpha_{II}$	3,7	3,7	3,6	2,5	2,4	2,3
$D_{II}$	2,3 (s)	2,3 (s)	2,4 (s)	2,5 (m)	2,4 (m)	2,3 (m)

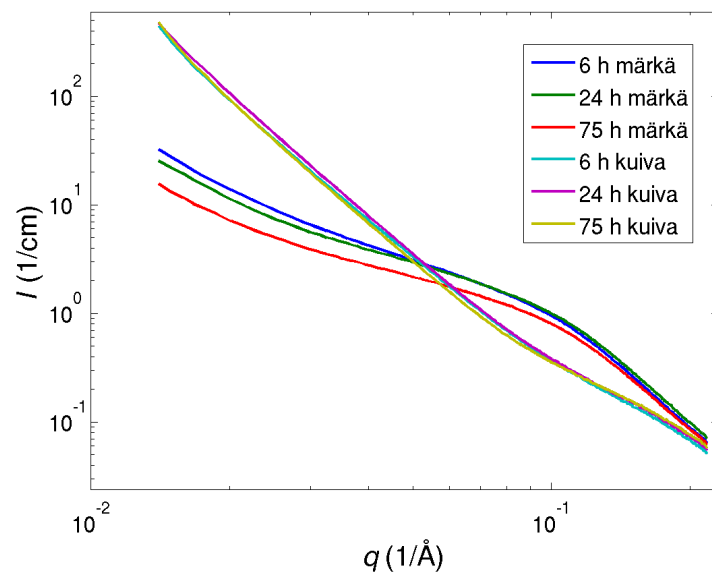
**Taulukko 4:** Pienkulmasirontakuvioihin tehtyjen potenssilakisovitusten sovitusalueet [ $q_{min}$ ,  $q_{max}$ ], saadut potenssit  $\alpha$  ja niiden avulla lasketut fraktaalidimensiot  $D$ . Suluissa oleva m-kirjain tarkoittaa massafraktaalia ja s-kirjain pintafraktaalia.

**Kuva 11:** (Seuraavalla sivulla) a) Eri aikoja hydrolysoitujen Avicel-näytteiden pienkulmasirontakuvaajat. b) Kuvan a kuvaajat logaritmiasteikoilla. c) Pienkulmasironnan intensiteetin luonnollinen logaritmi pienillä sirontavektorin neliön arvoilla. Kuvassa ei nähdä Guinierin approksimaation edellyttämiä suoria alueita käyrien alkupäissä. d) Pienkulmasironnan ( $q^4$ ,  $Iq^4$ )-kuvaaja, jossa merkittyinä mustalla Porodin  $q^{-4}$ -sovitukset kaikille näytteille.

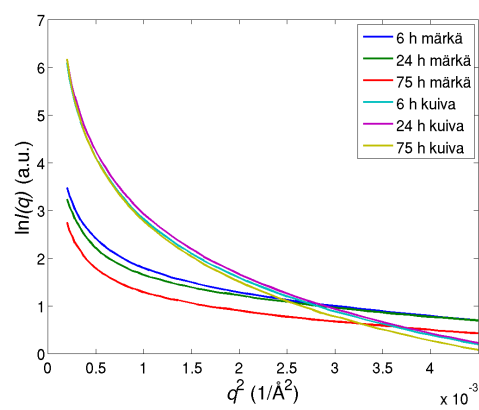
a)



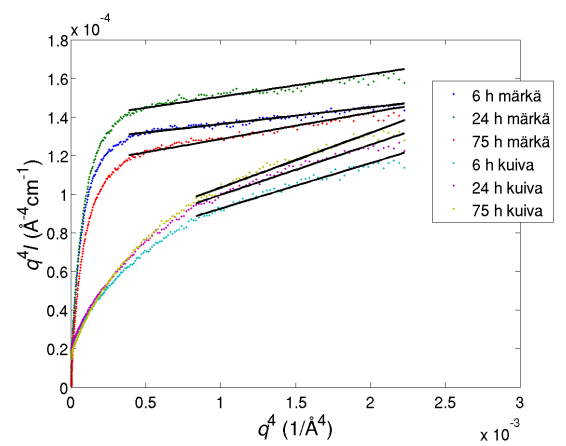
b)

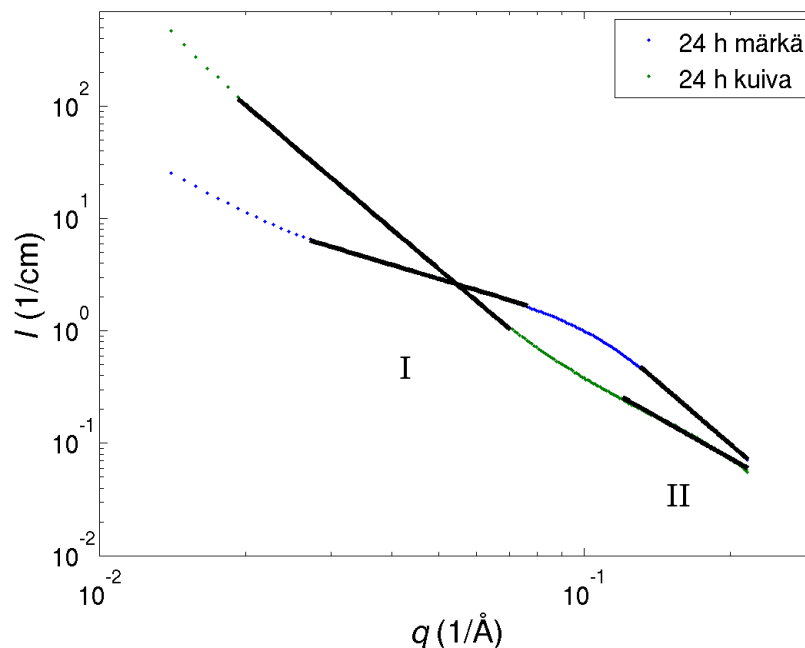


c)



d)





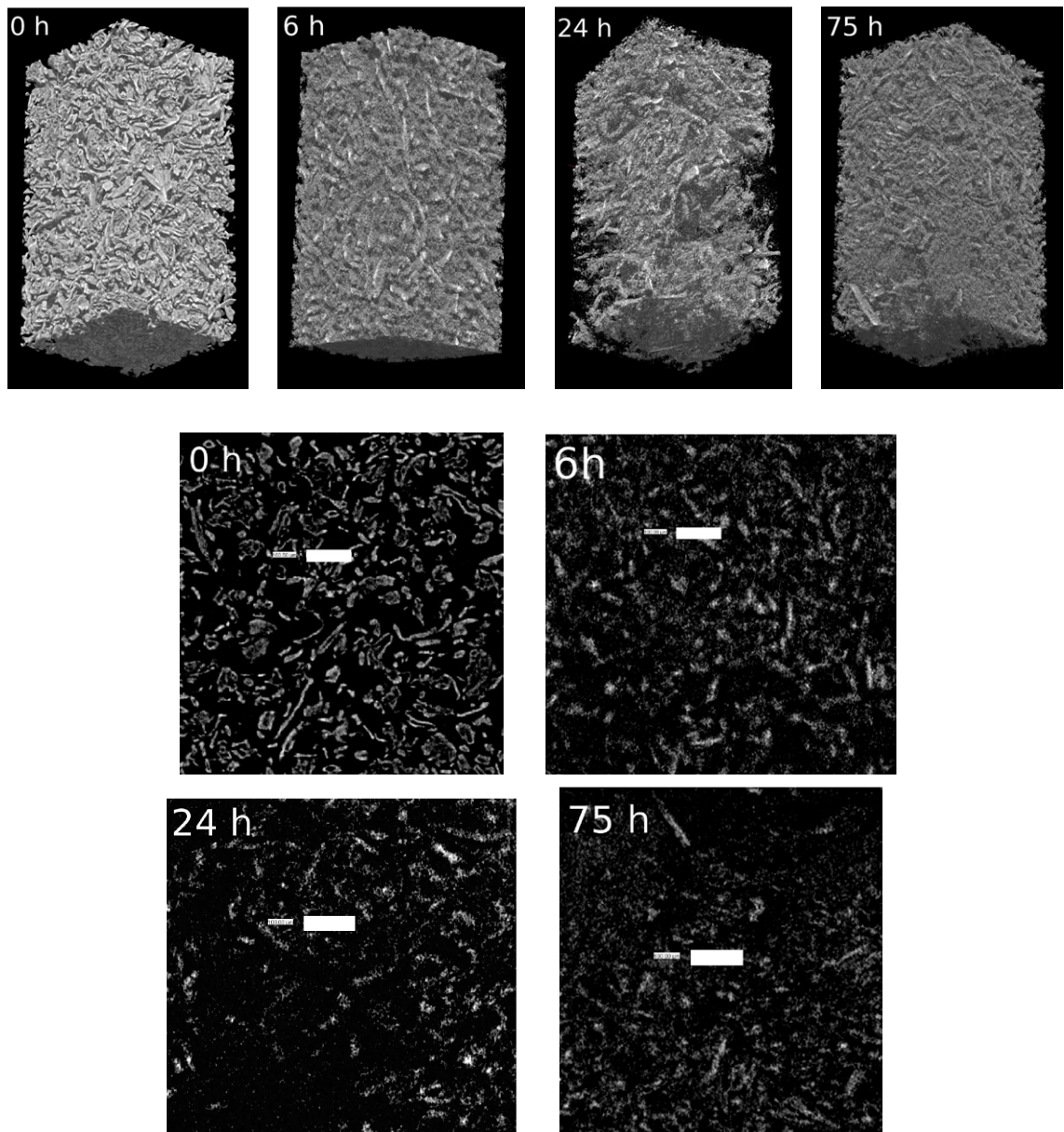
**Kuva 12:** Pienkulmasironnalla mitatuille 24 tuntia hydrolysoituille Avicel-näytteille tehdyt potenssilakisovitukset. Kuvaan on merkitty myös sovitusalueita vastaavat tunnuksat I ja II.

### 5.3 Tomografia- ja mikroskooppikuvat

Esimerkit mikrotomografiakuvien rekonstruktioista on esitetty kuvassa 13. Ylhäällä näkyvät kuvat ovat kolmiulotteisia rekonstruktioita ja alhaalla olevat näiden poikkileikkauksia. Kolmiulotteisissa rekonstruktio kuvissa näkyvän näyteaineen massa ei ole vakio, vaan näytteiden makroskooppista tiheyttä kasvatettiin hiukkaskoon pienentyessä.

Kuvista voidaan nähdä, että Avicel-hiukkasten koko on pienentynyt hydrolyysin kuluessa. Koska kuvien vokselikoko on  $1 \mu\text{m}$ , eivät tätä pienemmät rakenteet näy kuvissa. Tästä syystä hiukkasten koon tai muodon päättelemine on hankalaa varsinkin pidempään hydrolysoitujen näytteiden tapauksessa. Kuvista kuitenkin nähdään, että hydrolyysin alussa näyte muodostui kymmenien mikrometrien hiutaleista, jotka ovat myöhemmin hajonneet mikrometriluokan hiukkasista koostuvaksi jauheeksi.

Läpäisyelektronimikroskooppilla (TEM) otetuissa kuvissa havaittiin karkeasti sylinterimäisiä rakenteita useassa eri kokoluokassa. Pienimmillä suurennoksilla voitiin havaita halkaisijaltaan mikrometrin luokkaa olevia sylinterimäisiä kappaleita, joiden pituudet olivat halkaisijaan nähden arviolta kymmenkertaisia. Kappaleet tulkittiin useiden yhdensuuntaisten mikrofibrillien muodostamiksi kimpuiksi eli aggregaateiksi.



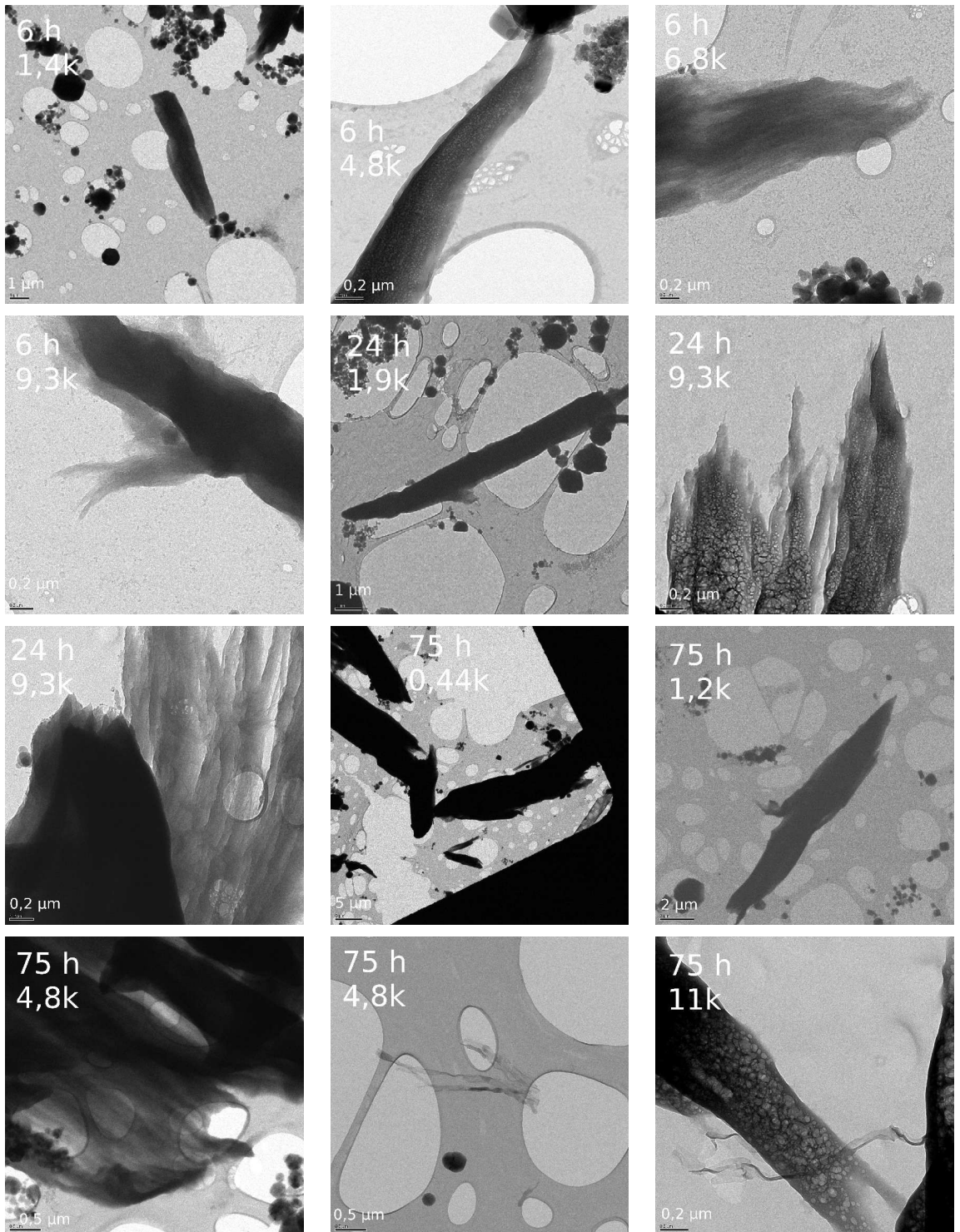
**Kuva 13:** Tomografiakuvia eri aikoja hydrolysoidusta Avicelistä. Vertailun vuoksi esitettynä on myös natiivi Avicel, jonka tomografiakuvaus oli tehty aiemmin. Ylhäällä: Kolmiulotteiset kuvat, joissa mitat ovat  $0,5 \times 0,5 \times 1,0 \text{ mm}^3$ . Alhaalla: Kaksiulotteiset siivut kolmiulotteisista kuvista. Valkoisen mittatikun pituus on  $100 \mu\text{m}$ .

Osa kimpuista näytti päistään rispaantuneilta sisältäen teräväkärkisiä haarautumia. Yksittäiset haarautumet olivat pienimmillään yhden mikrofibrillin paksuisia ja niiden väliset onkalot saattoivat jatkua usean mikrometrin matkan fibrillien pituus-suunnassa. Joissakin kuvissa yksittäiset mikrofibrillit erottuivat koko kimpun matkalla, kun taas toisissa saman suurennoksen kuvissa näkyneet kimput olivat käytännössä

täysin läpinäkymättömiä. Tämän tulkittiin kertovan kimppujen vaihtelevista tiheyksistä.

Myös mikrofibrillikimppuja pienempiä hiukkasia havaittiin joissakin kuvissa. Pienimmät näistä olivat yksittäisiä mikrofibrillejä, jotka joko ulkonivat kimpun kyljestä, muodostivat muutaman mikrofibrillin yksittäisiä kimppuja tai olivat näytteessä täysin irrallaan. Mahdollisimman edustava kooste TEM-kuvista on esitetty kuvassa 14. Varsinaisia johdonmukaisia eroja eri aikoja hydrolysoitujen näytteiden välillä ei havaittu, mikä saattaa johtua menetelmän luonteesta. Mikroskooppikuviin sattuu aina jokin yksityiskohta koko näytteestä, jolloin useammankaan kuvan otosta samasta näytteestä ei voida pitää luotettavana otoksena koko näytteestä.

**Kuva 14:** (Seuraavalla sivulla) Lämpäisyelektronimikroskooppikuvia eri aikoja hydrolysoidusta Avicelistä. Kuviin on merkitty hydrolyysiaika, suurennos ja mittatikun pituus. Suurennoksessa k-tarkoittaa 1000-kertaista, jolloin esimerkiksi 1,4k tarkoittaa 1400-kertaista suurennosta. Kuvissa näkyvät tummat pallot ovat vesijäätä ja vaaleat suuret pallot kuplia siinä. Mikrofibrillikimput näkyvät haarautuneina tai sileäpintaisina ja teräväkärkinä pitkulaisina kappaleina. Niiden sisältämät pyöreät kuplat ovat aiheutuneet kuvauksen aikana. Yksittäisiä mikrofibrillejä on nähtävissä kahdessa viimeisimmässä kuvassa.



## 6 Johtopäätökset

Työtä varten tehdyt mittaukset ja niistä saadut tulokset olivat kokonaisuudessaan onnistuneita. Vaikkei kaikilla menetelmillä nähtykään eroja eri aikoja hydrolysoitujen näytteiden välillä, voidaan mittauksia silti pitää onnistuneina. Se, ettei toisilla menetelmillä havaittua selkeää muutosta voitu havaita ollenkaan muilla menetelmillä, on jo tulos sinänsä. Tällainen näennäinen ristiriita on myös omiaan lisäämään mielenkiintoa tutkittavaa ongelmaa kohtaan.

Tässä osiossa tutkitaan työssä saatuja tuloksia tarkemmin, kootaan ne yhteen ja yritetään selvittää, mitä ne kertovat. Eri menetelmillä tuotettuja tuloksia Avicelin rakenteesta vedessä ja ilmassa analysoidaan ensimmäisessä kohdassa ja toisessa keskitytään entsyymaattisen hydrolyysin vaikutuksiin.

### 6.1 Hydrolysoidun Avicelin rakenne ilmassa ja vedessä

Laajakulmasirontatulosten perusteella Avicel oli kaikissa näytteissä osittain kiteisessä muodossa. Kiteiden keskimääräiset leveydet vaihtelivat [200]-suunnassa välillä 5,2–5,4 nm (taulukko 2). Hydrolyysillä ei havaittu olevan vaikutusta määritettyihin suureisiin.

Tulosten perusteella myös kaikkien näytteiden kiteisyysaste oli noin 50 %, mikä vastaa kohtuullisesti Avicelille vastaavalla tavalla aiemmin määritettyä kiteisyyttä 57 % [44]. Nämä kiteisyysasteet ovat selvästi pienempiä kuin monissa muissa tutkimuksissa mitatut 60–80 % [12, 24, 42], mikä johtuu kaikista todennäköisimmin erilaisesta kiteisyysasteen määrittäytavasta. Useissa tutkimuksissa kiteisyysasteet on laskettu kaavalla 8 siten, että  $I_A$ :lle ja  $I_M$ :lle on otettu arvot ainoastaan kahdesta yksittäisestä pisteestä. Näistä amorfista osaa vastaava on tavallisesti 200-heijastusta edeltävän kuopan kohdalla ( $2\theta \approx 19^\circ$ ) ja kiteistä osaa vastaava 200-heijastuksen huipulla. Tällä tavalla lasketut kiteisyysasteet ovat ainoastaan suhteellisia ja ne saatiin tässäkin lähelle 80 %:a. Työssä varsinaisesti käytettyä, koko mitattuun dataan perustuvaa laskutapaa pidettiin kuitenkin luotettavampana kuvaamaan todellista kiteisen aineen määrää näytteessä.

Pienkulmasirontamittausten tulosten analysoimiseen liittyi runsaasti epävarmuutta. Koska Guinierin lain paikkansapitävyydestä ei ollut täyttä varmuutta, sen soveltaminen pienille sirontakulmille jouduttiin jättämään tekemättä. Näin ei saatu myöskään määritettyä invarianttia  $Q$ , josta olisi ollut hyötyä analyysin myöhemmissä vaiheissa. Laskuissa jouduttiin siksi käyttämään tilavuusosuuksia, joiden määrittämiseen liittyi runsaasti käytännön syistä johtuvaa epävarmuutta. Määritetyt spesifiset pinta-alat ja Porodin pituudet perustuivat siis käytännössä Porodin lain tuottamiin

raja-arvoihin ja todennäköisesti ainoastaan suuruusluokaltaan oikeisiin absoluuttisiin intensiteetteihin. Kaikista epävarmuustekijöistä huolimatta lasketut spesifiset pinta-alat samoin kuin Porodin pituudet ovat suurin piirtein järkevän suuruisia.

Porodin lain perusteella lasketuissa tuloksissa (taulukko 3) voidaan selvästi nähdä veden vaikutus Aviceliin. Märkien näytteiden spesifiset pinta-alat ovat noin 30-kertaisia kuiviin näytteisiin verrattuna. Lisäksi vesi näyttää pienentäneen sekä selluloosan että huokosten tyypillisiä mittoja. Kummatkin tulokset sopivat yhteen aiempien tutkimuksien kanssa[15]. Ne tukevat käsitystä, että vesi tunkeutuu mikrofibrillien ja joidenkin alkeisfibrillien väliin muodostaen runsaasti kapeita fibrillien suuntaisia huokosia. Huokosten kokonaispinta-ala on paljon suurempi kuin kuivassa Avicelissa esiintyvien suurempien ilmataskujen. Vastaavasti sekä huokosten koot että niiden keskinäiset välimatkat pienenevät Avicelin kastuessa.

Pienkulmasirontatulosten pakottaminen Porodin lakiin ei osoittautunut järkevimmäksi tavaksi tarkastella kaikkia tuloksia. Sovitus tuotti erityisesti vaikeuksia kuivilla näytteillä. Tästä syystä tuloksia tutkittiin myös ilman Porodin sovitusta, joka edellyttäisi sileitä rajapintoja. Uusi lähestymistapa johti fraktaaleihin, joita on aiemminkin käytetty kuvaamaan selluloosanäytteitä[45, 46].

Potenssilakeja löytyi kaikista näytteistä kaksi kappaletta. Ne voivat kuvata joko näytteille ominaisen saman rakenteen muotoa kahdessa eri kokoluokassa tai kahta fyysisesti täysin erillään olevaa rakennetta[47]. Jälkimmäisiä voisivat olla esimerkiksi ehjän ja hydrolyysissa osittain hajonneen mikrofibrillikimpun rakenteet. Muissakin tutkimuksissa[46] on havaittu selluloosapohjaisten näytteiden pienkulmasirontakuvion jakautuvan kahteen osaan, joten se on tuskin aiheutunut hydrolyysista.

Potenssilakitulosten mukaan kaikissa näytteissä esiintyi sekä massa- että pintafraktaaleita. Märissä näytteissä massafraktaalien  $q$ -alue vastasi karkeasti etäisyyksiä 10–20 nm ja pintafraktaalien alue etäisyyksiä 3–5 nm. Kuivissa näytteissä pintafraktaalit esiintyivät suuremmilla etäisyyksillä (10–30 nm) ja massafraktaalit pienemmillä (3–5 nm). Potenssilakisovitususten  $q$ -alueet eivät olleet erityisen laajoja, joten fraktaalimaiset rakenteet ovat todennäköisesti rajoittuneita niin kapeisiin kokoluokkiin, ettei niistä tiukkoja määritelmiä noudattaen olisi luontevaa edes puhua fraktaaleina.

Potenssilakisovitususten avulla lasketuissa taulukon 4 fraktaalidimensioissa on nähtävissä ainakin ero märän ja kuivan Avicelin rakenteessa. Molemmissa pintafraktaalien fraktaalidimensiot ovat välillä 2,3–2,5, mikä viittaa melko sileisiin rajapintoihin[45]. Pintafraktaalit esiintyvät kuitenkin eri suuruusluokissa. Kuivien näytteiden II-alueen massafraktaalit fraktaalidimensioilla 2,3–2,5 ovat todennäköisesti merkki tiiviistä aggregoitumisesta[45, 46]. Aggregaatit eivät kuitenkaan muodostu sisäpuoleltaan täysin yhtenäisestä faasista samalla tavalla kuin pintafraktaalien kuvaamat kappaleet. Mär-



kien näytteiden I-alueella esiintyvät massafraktaalidimensiot 1,2–1,5 aiheutuvat luultavasti löyhien aggregaattien muodostamasta avoimemmasta rakenteesta[46].

Saadut fraktaalidimensiot sopivat kohtuullisen hyvin yhteen aiempien tulosten[48] kanssa. Kyseisessä tutkimuksessa kuiville mikrokiteisen selluloosan (Avicel PH 102) näytteille saatiin typpiadsorptiolla massafraktaalidimensio 2,4, joka vastaa suoraan tässä työssä saatuja kuivien näytteiden fraktaalidimensioita alueella II. Vesiadsorptiolla saatu vastaava fraktaalidimensio 1,4 puolestaan vastaa märkien näytteiden fraktaalidimensioita alueella I. Tässä tapauksessa massafraktaalien näkyminen eri alueilla sattuisi selittyä typpi- ja vesimolekyylien kokoerolla, mutta todennäköisemmin se johtuu todellisesta rakenteiden erilaisuudesta kuivien ja märkien näytteiden välillä.

Koska pienkulmasironta perustuu kahden faasin välisellä rajapinnalla näkyvään elektronitiheyseroon, on sen tuottamien puhtaiden intensiteettikuvioiden avulla mahdollista sanoa kummalle faasille kuvioista lasketut ominaisuudet kuuluvat. Tämä on muistettava muun muassa potenssilakituloksia tulkittaessa. Massafraktaalien kuvaamat muodot voivat esimerkiksi olla erikokoisia huokosia kiinteässä aineessa tai likimäärin samankokoisten huokosten erottamia erikokoisia kiinteän aineen hiukkasia tai aggregaatteja.

Pienkulmasirontatuloksia analysoitaessa törmättiin myös kysymykseen siitä, mitkä osat selluloosafibrilleissä muodostavat yhtenäisen faasin. Kuivissa näytteissä asia on melko yksinkertainen, sillä amorfisen osan elektronitiheys on ilmaan verrattuna lähes yhtä suuri kuin kiteisen osan. Kuivissa näytteissä siis kiinteä aine ja ilma muodostavat omat faasinsa, jolloin systeemi muodostuu pienkulmasirontan kannalta ilmahuokosista selluloosamatriisissa.

Märissä näytteissä tilanne on monimutkaisempi. Kyse on käytännössä siitä, pääseekö vesi tunkeutumaan alkeisfibrillien amorfiseen osaan ja riittääkö se muodostamaan näkyvän elektronitiheyskontrastin selluloosan kiteisen ja amorfisen osan välille. Parhaiten tilannetta kuvaisi kolmifaasinen systeemi, mutta sen käsitteleminen olisi ollut hankalaa tai mahdotonta. Siten määrät näytteet päädyttiin approksimoimaan kiteisen selluloosan ja veden muodostamaksi kaksifaasiseksi systeemiksi, jossa suurin osa amorfisista osista sisältyy veden kanssa samaan faasiin. Mahdollisten ilmataskujen ja kuivan amorfisen osan aiheuttama sironta katsottiin niin pieneksi, että se voitiin jättää huomioimatta[34]. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että pienkulmasironnalle näkyvän systeemin oletettiin muodostuvan kiteisistä ja pitkulaisista selluloosapartikkeleista vesimatriisissa.

Märille näytteille tehdystä faasien koostumuksiin liittyvästä oletuksesta johtuen näytteille lasketut tilavuusosuudet vaikuttavat entistäkin epäluotettavammilta. Ne laskettiin punnitsemalla sama näyte märkänä ja myöhemmin kuivana, jolloin saa-

tiin veden massa ja tiheyden avulla sen tilavuus. Kiinteän faasin tilavuus saatiin tämän jälkeen kokonaistilavuuden ja veden tilavuuden erotuksena. Kun todellisuudessa osa vedestä on ollut selluloosan amorfisten osien sisällä, aiheutuu tästä laskutavasta epäilemättä virhettä tilavuusosuuksiin.

Kahdesta eri lähestymistavasta huolimatta pienkulmasironnan tulokset ovat yhdistettävissä yhtenäiseksi kokonaisuudeksi. Ainoastaan kuiville näytteille tehty Porodin lain sovitukset ja sen avulla lasketut spesifiset pinta-alat ja Porodin pituudet vaikuttavat epäpäteviltä. Siksi kuivien näytteiden Porodin laki saatettiin hyvin korvata potenssilailailla. Märkien näytteiden suurilla  $q$ -arvoilla näkynyt rajapinta on potenssilakisovituksenkin perusteella melko sileä, joten Porodin lain pitäisi olla tällä alueella voimassa. Märille näytteille Porodin lain perusteella laskettujen spesifisten pinta-alojen ja Porodin pituuksien katsottiin siis olevan melko luotettavia, lukuun ottamatta tilavuusosuuksista johtuvia epätarkkuuksia. Seuraavassa esitellään näiden olettamusten ja aiempien tutkimustulosten perusteella luotu kuva kuivista ja märistä Avicel-näytteistä.

Kuivissa näytteissä näyttää olevan suurehkoja, halkaisijaltaan luokkaa 10 nm olevia ohuehkoja pitkulaisia huokosia, joilla on halkaisijaansa nähden melko sileä pinta. Näistä seuraa I-alueen potenssilaki pintafraktaalidimensiolla  $D_s \approx 2,5$ . Huokosia ympäröi niiden kanssa yhdensuuntaiset alkeis- ja mikrofibrillit, jotka ovat pakkautuneet keskenään tiiviisti yhteen. Nämä aiheuttavat alueen II potenssilain massafraktaalidimensiolla  $D_m \approx 2,5$ . Huokosten väliset välimatkat ovat riittävän suuria erottamaan huokokset selkeästi toisistaan.

Märissä näytteissä alkeisfibrillien aggregoituminen mikrofibrilleiksi ja näiden kimpuntuuminen suuremmiksi rakenteiksi on huomattavasti löyhempää. Tämän vuoksi massafraktaalidimensio  $D_m \approx 1,5$  näkyy potenssilakialueella I eli noin 10–20 nm:n kokoluokassa. Fibrillien väliin tunkeutuneen veden lisäksi myös fibrillien amorfiset alueet, jotka näkyvät veden kanssa samassa faasissa, lisäävät kimppujen näennäistä avoimuutta. Samalla ne kasvattavat vesihuokosten Porodin pituutta, joka on lähes kymmenkertainen kiteisen aineen Porodin pituuteen verrattuna. Samasta syystä spesifinen pinta-ala on märillä näytteillä suhteellisen suuri, vaikka useiden pienten huokosten siihen tuoma lisäys otettaisiin huomioon. Kiteisten alueiden mitat eri suunnissa vaihtelevat laajakulmasirontatulosten perusteella välillä 5–24 nm, mikä sopii hämmästyttävän hyvin yhteen kiinteän aineen Porodin pituuksien 6–11 nm kanssa. Lisäksi pienet keskimääräiset Porodin pituudet  $l_c$  kertovat pitkien ja suorien yhtenäisen faasin alueiden olevan harvinaisia. Saadut tulokset siis tukevat oletusta, että märkien näytteiden fibrillikimput sisältävät runsaasti pitkulaisia ja ohuita vesitäytteisiä huokosia, joiden välimatkat ovat lyhyitä tai jotka ovat osittain yhteydessä toisiinsa.

## 6.2 Entsymaattisen hydrolyysin vaikutus Avicelin rakenteeseen

Entsymaattisen hydrolyysin vaikutus Avicelin rakenteeseen näkyy kaikista selvimmin tomografiakuvissa. Niistä nähdään, kuinka kymmenien mikrometrien Avicel-hiukkaset ovat pienentyneet ja pakkautuneet tiheämmin pidemmällä hydrolyysiajoilla. Vaikka kuvia katsoessa näyttää, että suuremmat hiukkaset ovat hydrolysoituneet pienempiä nopeammin, ei tällaista johtopäätöstä voida tomografiakuvien rajoittuneen erotuskyvyn vuoksi tehdä. On siis mahdollista, että pienemmät hiukkaset ovat hydrolysoituneet suurempia nopeammin, kuten muissa tutkimuksissa[23] on havaittu.

TEM-kuvissa ei varsinaisesti nähty muutosta eri hydrolysointiaikojen välillä, mikä saattaa toki selittyä menetelmän luonteella. Silti vaikka yksittäiset TEM-kuvat eivät anna röntgensirontamenetelmien tapaan keskimääräistä kuvaa suuresta osasta näytettä, voidaan niistä silti huomata mielenkiintoisia asioita. Kaikissa näytteissä esiintyi hydrolyysiajasta riippumatta samanmuotoisia ja -kokoisia mikrofibrillikimppuja, jotka olivat päästään ja osittain sivuiltaan haaroittuneita. Tämä viittaisi ainakin siihen, että kaikki kimpot eivät hajoa hydrolyysissa yhtä nopeasti, vaan osa säilyy lähes ehjinä selvästi muita pidempään. Muissa tutkimuksissa[19, 24] havaittua mikro fibrillikimppujen pinnan muuttumista epätasaisemmaksi ei voida näiden kuvien perusteella sanoa tapahtuneen. Viitteen [19] tutkimuksessa muutos erottui selvästi pyyhkäisyelektronija atomivoimamikroskoopeilla otetuissa kuvissa

Laajakulmasirontatulokset istuvat hyvin yhteen muiden tutkimusten kanssa. Kiteisyysasteen säilymistä samana[23] tai sen lievää nousemista[19, 20] ei voida tämän työn virherajoilla erottaa toisistaan. Kiteisyysasteen nouseminen olisi luontevaa siksi, että entsyymeillä on enemmän tartuntapintaa amorfisessa kuin kiteisessä osassa[24]. Toisaalta kiteisiä osia hydrolysoivat entsyymit tekevät fibrillikimppun pinnasta karkeamman[19, 24], joka taas lisää selluloosan pinta-alaa. Samalla ne muuttavat hieman kiteistä osuutta amorfiseksi.

Entsyymaattisen hydrolyysin vaikutus Avicelin kidekokoihinkaan ei ole aivan selvää. Kidekoko [200]-suunnassa saattaa pienentyä hiukan, mutta muutos sisältyy annettuihin virherajoihin. Suurimmassa osassa tutkimuksista selluloosan kiteiden leveys on joko pienentynyt[19, 23] tai säilynyt muuttumattomana[23]. Jälkimmäisessä tapauksessa tutkittu näyte oli Avicel PH 101:ä.

Pienkulmasirontatuloksissa hydrolyysin vaikutus nähtiin käytännössä ainoastaan määrällä näytteillä. Niiden logaritmisissa pienkulmasirontakuvioissa (kuva 11b) näkyy selkeä näytteiden välinen ero kuvaajan alkupäässä. Ero näkyy myös osittain tälle alueelle sovitetuissa potenssilaeissa (taulukko 4). Alueen I fraktaalidimensiot pienenevät johdonmukaisesti, mikä viittaa edellisen osion perusteella muutoksiin alkeis- ja mikrofibrillien kimppuuntumisessa. Tämä voisi tarkoittaa esimerkiksi fibrillikimppujen

haaroittumista ja entistä selvempää aukeamista.

Märkien näytteiden spesifisessä pinta-alassa ei havaittu johdonmukaista muutosta, mikä voi hyvinkin johtua arvojen suuresta epätarkkuudesta. Muutosta ei siis voida sulkea poiskaan. Muiden tutkimusten[19, 24] perusteella spesifisen pinta-alan olisi voinut odottaa kasvavan mikrofibrillien pinnan karkeutumisen myötä. Kuivilla näytteillä pieni kasvu voisi olla juuri ja juuri havaittavissa, mutta koska pinta-alan laskemiseen käytettiin Porodin lakia, ei sitä voitu katsoa päteväksi tulokseksi.

Työssä saadut tulokset tukevat kokonaisuudessaan käsitystä, jonka mukaan mikrokiteisen selluloosan hydrolyysi tapahtuu pääasiassa suurten mikrofibrillikimppujen pinnalla[16, 19]. Vasta kun kimput hajoavat tarpeeksi, entsyymit pääsevät liikkumaan vapaasti kimppujen sisällä ja niille sopiva kiinnittymispinta-ala kasvaa nopeasti. Tämä kuva sopii hyvin yhteen kiteisyyden ja kidekokojen säilymisen kanssa. Arvot eivät muutu, kun jokainen näyte sisältää suurimmaksi osaksi koostumukseltaan yhdenmuukaisia, lähes ehjiä mikrofibrillikimppuja. Hydrolyysi siis toimii tehokkaammin helposti hajoaviin ja jo hajoavissa oleviin kimppuihin, jolloin nämä myös hydrolysoituvat pois nopeammin. Myös TEM-kuvien voidaan jossain määrin katsoa tukevan tätä käsitystä.

Avicel-hiukkasten pinnalla tapahtuva hydrolyysi vaikuttaa järkevältä myös entsyymien välisen synergian näkökulmasta. Eri entsyymien kokoeroista johtuen ne voivat toimia synergiassa ainoastaan silloin, kun ne kaikki mahtuvat samalle pinnalle tai samoihin huokosiin. Toteutuessaan synergia puolestaan nopeuttaa hydrolyysia voimakkaasti.[16, 19]

Vaikka märissä näytteissä havaitut hydrolyysin aiheuttamat muutokset ovat johdonmukaisia ja järkeviä, voidaan kysyä, miksi kuivien näytteiden pienkulmasironnakuvaajat ovat käytännössä identtiset? Tälle on ainakin kaksi selitystä. Kuten edellisessä osiossa todettiin, pienkulmasironnalle kuivissa ja märissä näytteissä näkyvät faasit muodostuvat todellisuudessa eri komponenteista. Lisäksi samalla  $q$ -alueella, missä massafraktaalidimension muutos näkyy märillä näytteillä, on kuivilla näytteillä pinta-fraktaaleita. Niiden fraktaalidimensiot eivät puolestaan muutu johdonmukaisesti. Samalla alueella näkyvät pienkulmasirontakäyrät saattavat siis kuvata täysin eri rakenteita, eikä märkien näytteiden pienkulmasironnan I-alueita vastaavaa rakennetta yksinkertaisesti näy kuivien näytteiden sirontakuvaajissa.

Uskottavampi selitys muutosten häviämislle kuivien näytteiden pienkulmasironnassa on kuivan ja märän Avicelin rakenteiden todellinen erilaisuus. Kuten aiemmin on todettu, vedessä selluloosapartikkeliin muodostuu runsaasti kapeita huokosia, joiden tilalle kasvaa paljon suurempia ja harvemmassa olevia huokosia sen kuivuessa. Märkkää näytettä valmistettaessa vesi siis väljentää fibrillien välejä ja muuttaa hiukkasten huokosrakennetta. Tällöin on mahdollista, että alunperin vesiliuoksessa tapahtunees-

sa hydrolyysissa syntyneet rakenteelliset muutokset tulevat näkyviin märän näytteen pienkulmasirontakuviossa. Kuivissa näytteissä ohuet huokokset ovat puolestaan kutistuneet ja hävinneet muutoksineen yhtenäiseen kiinteään selluloosan faasiin, joka ympäröi suuria huokosia. Todelliset muutokset saattaisivat siis selvitä vasta tekemällä pienkulmasirontamittaukset näytteille, joita ei ole kuivatettu hydrolyysikäsitteilyn jälkeen.

Muutosten häviämislle rakenteiden muuttuessa märän ja kuivan näytteen välillä saadaan myös pientä tukea, kun katsotaan kuivien näytteiden pienkulmasirontan potenssilakia II-alueella. Taulukosta 4 nähdään, että niiden fraktaalidimensio pienenee tällä alueella vähän mutta johdonmukaisesti. Edellisessä osiossa todettiin, että kyseinen fraktaalidimensio viittaa tiiviisti pakkautuneisiin fibrillikimppuihin, jotka vastaavat todennäköisesti märkien näytteiden I-alueen kimppuja. Tällöin voidaan siis osoittaa jonkinlainen, mahdollisesti fibrillikimppujen harvenemista todistava muutos myös kuivissa näytteissä. Tulos ei luonnollisestikaan ole kaikin puolin luotettava, mutta se sopii yhteen muiden kanssa.

Työssä saadut tulokset antavat myös vihjeitä selluloosan entsyymaattisen hydrolyysin vähittäisen hidastumisen syistä. Aiempien tietojen perusteella tärkeimmät reaktiota hidastavat tai sen lopulta pysäyttävät tekijät liittyvät selluloosan rakenteeseen ja sellulaasientsyymien ja selluloosan väliseen vuorovaikutukseen. Vuonna 2006 julkaistussa kiinalaisessa tutkimuksessa[19] etsittiin tarkempia syitä puuvillakuitujen hydrolyysin hidastumiseen ja päädyttiin seuraaviin tuloksiin. Sellobiohydrolaasien aktiivisuus vähenee hydrolyysin kuluessa, sillä sille helpommin hydrolysoitavissa olevat alueet tulevat hydrolysoitua nopeammin. Tämä aiheuttaa epätasapainon entsyymien välille ja hävittää vähitellen näiden keskinäisen synergian. Tällöin jäljelle voisi jäädä lähes täysin koskemattomia selluloosa-alueita, jotka säilyvät ehjinä selvästi muita pidempään. Toisaalta myös rakenteelliset muutokset voivat hidastaa hydrolyysia. Mikrofiibrillien pakkautumisessa ja järjestymisessä jo pienikin muutos voi estää entsyymien pääsyn selluloosahiukkasen sisään. Myös selluloosapartikkelien pinnan karkeutuminen heikentää entsyymien kykyä kiinnittyä siihen ja liikkua sen päällä. Lisäksi kidetasolla tapahtuvat, infrapunaspektroskopialla havaitut vetysidosten ja siten myös I $\alpha$ - ja I $\beta$ -kidemuotojen keskinäisen suhteen muutokset saattavat vaikuttaa reaktion nopeuteen. Tämä johtuu siitä, että I $\alpha$ -muodon havaittiin hydrolysoituvan I $\beta$ -muotoa nopeammin. Kuten voidaan huomata, lähes kaikki tässä työssä saadut tulokset vastaavat erinomaisesti näitä tuloksia.

Hyvistä tuloksista huolimatta työssä, siihen liittyvissä mittauksissa ja näytteiden valmistelussa olisi ollut parantamisen varaa. Kuten aiemminkin mainittiin, hydrolysoidut näytteet olisi ollut hyvä mitata vesiliuoksessa suoraan hydrolyysin jälkeen.

Tällöin fibrillikimppujen rakenne ei olisi päässyt välillä palautumaan kuivaan muotoonsa, mikä pakastekuivaamisesta huolimatta näyttää tapahtuneen. Vastaavasti laajakulmasironta olisi ollut järkevää mitata myös määristä näytteistä, ehkä sekin suoraan hydrolyysin jälkeen. Samalla oltaisiin varmistuttu siitä, etteivät hydrolyysissa mahdollisesti hajonneet kiteet päässeet yhdistymään toisiinsa kuivumisen aikana. Tämä ei kuitenkaan käytännön syistä ollut mahdollista. Myös entsyymien inaktivoimista varten tehty hydrolyysiliuoksen keittäminen on saattanut vaikuttaa näytteisiin. Nämä mahdolliset ongelmat voitaisiin parhaiten välttää toteuttamalla mittaukset reaaliaikaisesti hydrolyysin ollessa jatkuvasti käynnissä.

Yksittäisistä mittauksista pienkulmasironta osoittautui haastavimmaksi ja siinäkin olisi voitu tehdä joitain asioita toisin. Näytteitä valmistettaessa olisi pitänyt kiinnittää enemmän huomiota massojen ja tilavuusosuuksien määrittämiseen. Niissä esiintyneiden epätarkkuuksien vuoksi spesifisten pinta-alojen avulla ei käytännössä saatu minkäänlaista tietoa hydrolyysin vaikutuksista. Toisaalta käytössä olleilla laitteilla esimerkiksi tarkempi tilavuuksien määrittely olisi luultavasti ollut mahdotonta. Näytteitä olisi myös voitu valmistaa useampia kappaleita, jolloin oltaisiin suljettu pois moninkertaisen sironnan mahdollisuus[35]. Pienkulmasironnan analyysia olisi myös helpottanut suurempi kulma-alue, jolloin suurempien kulmien potenssilakisovitukset olisivat olleet luotettavampia.

## 7 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli selvittää eri röntgenfysiikan menetelmien avulla, minkälaisia muutoksia mikrokiteisen selluloosan rakenteessa tapahtuu, kun sitä hydrolysoidaan entsyymeillä. Apuna käytettiin myös läpäisyelektronimikroskopiaa. Tulokset olivat kokonaisuudessaan onnistuneita, vaikka käytettyjen menetelmien avulla olisi saattanut olla mahdollista saada tarkempaakin informaatiota näytteistä.

Lähes kaikki saadut tulokset vahvistavat aiemmissä tutkimuksissa esitettyä käsitystä, jonka mukaan sellulaasientsyymit eivät pääse tunkeutumaan mikrofibrillikimppujen sisälle. Sen sijaan ne hajottavat kimppuja pinnalta käsin, edeten ikään kuin kerros kerrokselta. Ensimmäisenä hydrolysoituvat alueet, joihin entsyymien on helppointa kiinnittyä, kun taas vaikeapääsyisemmät tai sellaisiksi muuttuneet rakenteet voivat säilyä lähes koskemattomina. Tämä selittää ainakin osittain hydrolyysireaktion vähittäisen hidastumisen.

Kun entsyymit pääsevät osittain tunkeutumaan fibrillien välisiin huokosiin, voi syntyä päistään ja sivuiltaan haaroittuneita rakenteita, jollaisia havaittiin TEM-kuvissa. Avoimempia huokosia reunustavat fibrillit hydrolysoituvat kerros kerrallaan, mikä mahdollisesti lisää alkeis- ja mikrofibrilliaggregaattien avoimuutta. Tämän tapainen muutos havaittiin märkien näytteiden pienkulmasirontakuvioiden potenssilaissa. Kuivilla näytteillä muutosta ei havaittu, koska kuivuessaan selluloosapartikkelit palautuvat erilaiseen, suurempia huokosia sisältävään rakenteeseen. Jos entsyymit pääsevät tunkeutumaan edelleen syvälle hiukkaseen, hydrolyysi etenee nopeasti ja kyseiset hiukkaset hydrolysoituvat kokonaan tai lähes kokonaan, eikä niitä näin ollen havaittu TEM-kuvissa.

Hydrolyysin aiheuttamaa muutosta ei havaittu laajakulmasironnassa, koska kaikissa näytteissä suurin osa jäljellä olevista alkeis- ja mikrofibrilleistä oli ehjiä. Elektronimikroskooppikuvissa nähtiin aina vain pieni osa näytettä, mutta ne todistivat, että osa partikkeleista säilyy lähes ehjinä hydrolyysin edetessä. Vasta kuivista näytteistä otetuissa tomografiakuvissa nähtiin selvä partikkelikoon pienentyminen kymmenien mikrometrien tasolla, mikä puolestaan osoitti hydrolyysin todellisen vaikutuksen makroskooppisella tasolla.

## Viitteet

- [1] J. Valste, S. Airamo, M. Holopainen, I. Koivisto, T. Suominen ja P. Viitanen. *Biologia: Elämä*. WSOY, 2000.
- [2] T. Yui ja K. Ogawa. X-ray diffraction study of polysaccharides. Julkaistu kirjassa *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*, toim. S. Dumitriu. Marcel Dekker, 2005.
- [3] H. Jørgensen, J.B. Kristensen ja C. Felby. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 1:119 – 134, 2007.
- [4] A.R. White ja R.M. Brown, Jr. Enzymatic hydrolysis of cellulose: Visual characterization of the process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78:1047 – 1051, 1981.
- [5] K. Lehtiniemi, L. Turpeenoja ja J. Vaskuri. *Mooli 2 Lukion kemia: Orgaanisen kemian perusteet*. Otava, 2002.
- [6] T.T. Teeri. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Tibtech*, 15:160 – 167, 1997.
- [7] M.-S. Ilvessalo-Pfäffli. Puun rakenne. Julkaistu kirjassa *Puukemia*, toim. W. Jensen. Polytypos, 1997.
- [8] H. Sihtola ja H. Makkonen. Selluloosa. Julkaistu kirjassa *Puukemia*, toim. W. Jensen. Polytypos, 1997.
- [9] W.D. Callister, Jr. *Materials Science and Engineering: An Introduction*. John Wiley & Sons, 2003.
- [10] Y. Nishiyama, P. Langan ja H. Chanzy. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron x-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 124:9074 – 9082, 2002.
- [11] Y. Nishiyama, J. Sugiyama, H. Chanzy ja P. Langan. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I $\alpha$  from synchrotron x-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 125:14300 – 14306, 2003.
- [12] H. Iijima ja K. Takeo. Microcrystalline cellulose: an overview. Julkaistu kirjassa *Handbook of Hydrocolloids*, toim. G.O. Phillips ja P.A. Williams. Woodhead Publishing Ltd., 2000.
- [13] P. Luukkonen, T. Maloney, J. Rantanen, H. Paulapuro ja J. Yliruusi. Microcrystalline cellulose-water interaction - a novel approach using thermoporosimetry. *Pharmaceutical Research*, 318:1562 – 1569, 2001.



- 
- [14] S. Andersson, R. Serimaa, T. Paakkari, P. Saranpää ja E. Pesonen. Crystallinity of wood and the size of cellulose crystallites in Norway spruce (*Picea abies*). *Journal of Wood Science*, 49:531 – 537, 2003.
- [15] J. Crawshaw, W. Bras, G.R. Mant ja R.E. Cameron. Simultaneous SAXS and WAXS investigations of changes in native cellulose fiber microstructure on swelling in aqueous sodium hydroxide. *Journal of Applied Polymer Science*, 83:1209 – 1218, 2002.
- [16] F.M. Gama, J.A. Teixeira ja M. Mota. Cellulose morphology and enzymatic reactivity: A modified solute exclusion technique. *Biotechnology and Bioengineering*, 43:381 – 387, 1994.
- [17] E. Papirer, E. Brendle, H. Balard ja C. Vergelati. Inverse gas chromatography investigation of the surface properties of cellulose. *Journal of Adhesion Science & Technology*, 14:321 – 337, 2000.
- [18] X. Yu ja R.H. Atalla. A staining technique for evaluating the pore structure variations of microcrystalline cellulose powders. *Powder Technology*, 98:135 – 138, 1998.
- [19] L. Wang, Y. Zhang, P. Gao, D. Shi, H. Liu ja H. Gao. Changes in the structural properties and rate of hydrolysis of cotton fibers during extended enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 93:443 – 456, 2006.
- [20] Y. Cao ja H. Tan. Study on crystal structures of enzyme-hydrolyzed cellulosic materials by x-ray diffraction. *Enzyme and Microbial Technology*, 36:314 – 317, 2005.
- [21] G.J. Kleywegt, J.Y. Zou, C. Divne, G.J. Davies, I. Sinning, J. Ståhlberg, T. Reinikainen, M. Srisodsuk, T.T. Teeri ja T.A. Jones. The crystal structure of the catalytic core domain of endoglucanase I from *Trichoderma reesei* at 3.6 Å resolution, and a comparison with related enzymes. PDB ID: 1eg1. *Journal of Molecular Biology*, 272:383 – 397, 1997.
- [22] C. Divne. Kuva julkaistu tekijän luvalla.
- [23] F.M. Gama ja M. Mota. Enzymatic hydrolysis of cellulose (I): relationship between kinetics and physico-chemical parameters. *Biocatalysis and Biotransformation*, 15:221 – 236, 1997.
- [24] R. Gupta ja Y.Y. Lee. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 102:1570 – 1581, 2009.
- [25] B.D. Cullity ja S.R. Stock. *Elements of X-Ray Diffraction*. Prentice Hall, 2001.
- [26] J. Als-Nielsen ja D. MacMorrow. *Elements of Modern X-Ray Physics*. John Wiley & Sons, 2001.

- 
- [27] U. Vainio. *Ligniininien morfologiasta*. Pro gradu, Helsingin yliopisto, 2003.
- [28] A. Guinier. *X-Ray Diffraction: In Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*. W.H. Freeman and Company, 1963.
- [29] O. Kratky. A survey. Julkaistu kirjassa *Small Angle X-ray Scattering*, toim. O. Glatter ja O. Kratky. Academic Press, 1982.
- [30] O. Spalla, S. Lyonnard ja F. Testard. Analysis of the small-angle intensity scattered by a porous and granular medium. *Journal of Applied Crystallography*, 36:338 – 347, 2003.
- [31] G. Porod. General theory. Julkaistu kirjassa *Small Angle X-ray Scattering*, toim. O. Glatter ja O. Kratky. Academic Press, 1982.
- [32] U. Vainio, N. Maximova, B. Hortling, J. Laine, P. Stenius, L.K. Simola, J. Gravitis ja R. Serimaa. Morphology of dry lignins and size and shape of dissolved kraft lignin particles by x-ray scattering. *Langmuir*, 20:9736 – 9744, 2004.
- [33] D. Ishii, Y. Kanazawa, D. Tatsumi ja T. Matsumoto. Effect of solvent exchange on the pore structure and dissolution behavior of cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 103:3976 – 3984, 2007.
- [34] M.E. Vickers, N.P. Briggs, R.N. Ibbett, J.J. Payne ja S.B. Smith. Small angle x-ray scattering studies on lyocell cellulosic fibres: the effects of drying, re-wetting and changing coagulation temperature. *Polymer*, 42:8241 – 8248, 2001.
- [35] P.W. Schmidt. Small-angle scattering studies of disordered, porous and fractal systems. *Journal of Applied Crystallography*, 24:414 – 435, 1991.
- [36] A.C. Kak ja M. Slaney. *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. IEEE Press, 1988.
- [37] L.A. Feldkamp, L.C. Davis ja J.W. Kress. Practical cone-beam algorithm. *Journal of the Optical Society of America A*, 1:612 – 619, 1984.
- [38] G.L. Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426 – 428, 1959.
- [39] L.A. Feigin ja D.I. Svergun. *Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering*. Plenum Press, 1987.
- [40] K. Leppänen, S. Andersson, M. Torkkeli, M. Knaapila, N. Kotelnikova ja R. Serimaa. Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by x-ray scattering. *Cellulose*, DOI 10.1007/s10570-009-9298-9.
- [41] NIST. National Institute of Standards and Technology, Physics Laboratory. <http://physics.nist.gov/>, 4.8.2009.

- [42] C.C. Sun. Mechanism of moisture induced variations in true density and compaction properties of microcrystalline cellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, 346:93 – 101, 2008.
- [43] H.B. Stuhrmann. Contrast variation. Julkaistu kirjassa *Small Angle X-ray Scattering*, toim. O. Glatter ja O. Kratky. Academic Press, 1982.
- [44] S. Andersson, H. Wikberg, E. Pesonen, S.L. Maunu ja R. Serimaa. Studies of crystallinity of Scots pine and Norway spruce cellulose. *Trees*, 18:346 – 353, 2004.
- [45] D. Ishii, D. Tatsumi ja T. Matsumoto. Effect of solvent exchange on the solid structure and dissolution behavior of cellulose. *Biomacromolecules*, 4:1238 – 1243, 2003.
- [46] J. Lenz ja J. Schurz. Fractal analysis of cellulosic fibers by small-angle x-ray scattering. *Holzforschung*, 44:227 – 228, 1990.
- [47] D. Winslow, J.M. Bukowski ja J.F. Young. The fractal arrangement of hydrated cement paste. *Cement and Concrete Research*, 25:147 – 156, 1995.
- [48] M. Strømme, A. Mihranyan, R. Ek ja G.A. Niklasson. Fractal dimension of cellulose powders analyzed by multilayer BET adsorption of water and nitrogen. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107:14378 – 14382, 2003.