View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by University of Oulu Repository - Jultika

TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

ENTSYYMIT SELLULOOSAVALMISTEIDEN MUOKKAUKSESSA

Jenna Hahtola

PROSESSITEKNIIKKA

Kandidaatintyö

Kesäkuu 2021

TIIVISTELMÄ

Entsyymit selluloosavalmisteiden muokkauksessa

Jenna Hahtola

Oulun yliopisto, Prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö 2021, 33 s.

Työn ohjaajat yliopistolla: Juha Ahola, Ville-Hermanni Sotaniemi

Tämän kandidaatintyön aiheena on entsymaattisten käsittelyjen hyödyntäminen selluloosavalmisteiden muokkaamisessa. Lisääntynyt huoli maapallon tilasta ja pyrkimys vähentää kemikaalien kulutusta ovat nopeuttaneet yrityksiä kehittämään selluloosavalmisteiden prosessointia ympäristöystävällisemmäksi. Entsyymejä pidetään potentiaalisena ratkaisuna myrkyllisten kemikaalien korvaajina.

Työ on toteutettu kirjallisuuskatsauksena. Työssä tarkastellaan eri entsyymien vaikutusta selluloosavalmisteiden ominaisuuksiin, kuten viskositeettiin ja reaktiivisuuteen. Työssä käytetyt entsyymit ovat pääasiassa sellulaaseja ja hemisellulaaseja. Sellulaasit, kuten endoglukanaasit ja sellobiohydrolaasit, hydrolysoivat selluloosakuidun selluloosaa. Hemisellulaaseihin kuuluvat ksylanaasit hydrolysoivat hemiselluloosan ksylaania. Lisäksi työssä tarkastellaan lyyttisiä polysakkaridimono-oksigenaaseja eli LPMO:ja, joiden toimintamekanismi perustuu hapetukseen.

Entsymaattisten käsittelyjen tuloksia tarkastellaan useiden eri tutkimustulosten pohjalta. Työssä entsymaattiset käsittelyt on jaettu liukosellun ja muiden selluloosapohjaisten valmisteiden sellulaasi- ja hemisellulaasikäsittelyihin. Työssä muut selluloosapohjaiset valmisteet käsittää selluloosananomateriaalit ja mikrokiteisen selluloosan. Liukosellun sellulaasikäsittely vaikuttaa molekyylipainon pienenemiseen, josta seuraa muutokset liukosellun viskositeettiin ja alkaliliukoisuuteen. Hydrolysoinnin seurauksena liukosellun reaktiivisuus parantuu, kun kuiturakenteen reaktiopinta-ala kasvaa. Sellulaasikäsittely tekee selluloosakuidun rakenteesta huokoisemman, mikä kasvattaa selluloosan saatavuutta viskoosikuidun tuotantoprosessin ksantaatioreaktiossa. Saatavuuden parantuminen kasvattaa regeneroituneen selluloosan määrää kuvaavaa Fock-reaktiivisuutta. Hemisellulaasikäsittely puhdistaa liukosellua, edesauttaen sen sisältämän selluloosan saatavuutta ja reaktiivisuutta selluloosajohdannaisten valmistuksessa. Selluloosananomateriaalien entsymaattisilla käsittelyillä voidaan saavuttaa selluloosananomateriaalilta haluttuja ominaisuuksia tai toiminnallisuuksia. Työn lopussa tarkastellaan entsymaattisten käsittelyjen hyödynnettävyyttä ja mahdollisuuksia.

Asiasanat: Selluloosa, entsyymit, sellulaasit, liukosellu

ABSTRACT

Enzymes in modification of cellulosic products

Jenna Hahtola

University of Oulu, Process Engineering

Bachelor's thesis 2021, 33 p.

Supervisors at the university: Juha Ahola, Ville-Hermanni Sotaniemi

The subject of this bachelor's thesis is utilization of enzymatic treatments within modifying cellulosic products. Increased concern of earth's state aswell as aspiration to reduce consumption of chemicals have hasted companies to advance cellulosic products processing towards more environment friendly direction. Enzymes are kept as a potential solution in replacing toxic chemicals.

This thesis is implemented as a literature review. It studies the effects different enzymes have what comes to properties of cellulosic products as viscosity and reactivity. Cellulase and hemicellulase are two major enzymes used for this study. Cellulases, as endoglucanases and cellobiohydrolases, hydrolize the cellulose within cellulose fiber. Xylanases, which fall under hemicellulases hydrolize the xylan of hemicellulose. The thesis also studies lytic polysaccharide monooxygenases, LPMO's whose mechanism of action is based on oxidation.

Results of enzymatic treatments are reviewed based on results of several different researches. Enzymatic treatments have been divided into dissolving pulp as well as other cellulose-based product's cellulase- and hemicellulase treatments. In this thesis other cellulose-based products addresses cellulose nanomaterials and microcrystalline cellulose. Cellulase treatments of dissolving pulp reduces the molecular weight resulting in changes of viscosity and alkali solubility. As a result of the hydrolysis, the reaction area of the fiber structure increases, which improves the reactivity of the dissolving pulp. Cellulase treatments of dissolving pulp also results in a more porous fiber structure which increases cellulose availability within xanthation reaction of viscose production process. This increase in availability enhances the Fock-reactivity which represents the amount of regenerated cellulose. Hemicellulase treatments of dissolving pulp purify dissolving pulp, improving cellulose availability and reactivity within manufacturing of cellulosic derivatives. Enzymatic treatments of cellulose nanomaterials also allow for achieving desired properties or functionalities. The thesis closes by viewing the usability and possibilities of enzymatic treatments.

Keywords: Cellulose, enzymes, cellulases, dissolving pulp

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ
ABSTRACT
SISÄLLYSLUETTELO
1 Johdanto 5
2 Selluloosa 7
2.1 Selluloosan rakenne 7
2.2 Selluloosan lähteet 8
3 Entsyymit 10
3.1 Sellulaasit 10
3.2 Hemisellulaasit 12
3.3 Lyyttiset polysakkaridimono-oksigenaasit 12
4 Liukosellu 14
4.1 Liukosellun valmistusmenetelmät 14
4.2 Liukosellun ominaisuudet 15
5 Muut selluloosapohjaiset valmisteet 17
5.1 Nanoselluloosa 17
5.2 Mikrokiteinen selluloosa 19
6 Entsyymit liukosellun ja muiden selluloosapohjaisten valmisteiden muokkauksessa. 20
6.1 Liukosellun entsymaattiset käsittelyt 20
6.1.1 Liukosellun sellulaasikäsittely 21
6.1.2 Liukosellun hemisellulaasikäsittely 23
6.1.3 Liukosellun mekaaninen esikäsittely 24
6.2 Muiden selluloosapohjaisten valmisteiden entsymaattiset käsittelyt 25
6.3 Entsymaattisten käsittelyjen hyödynnettävyys 26
7 Yhteenveto 28
LÄHDELUETTELO 30

1 JOHDANTO

Maailman yleisin luonnossa esiintyvä biopolymeeri on selluloosa, jonka hyviin ominaisuuksiin kuuluu sen uusiutuvuus ja biohajoavuus. Yhdessä hemiselluloosan ja ligniinin kanssa selluloosa muodostaa rakenteeltaan monimutkaisen matriisin omaavan lignoselluloosan. (Wahlström 2014, s.19) Maapallon väestön kasvu ja uusiutumattomien fossiilisten resurssien rajoittuminen ovat kasvattaneet lignoselluloosamateriaaleista valmistettujen johdannaisten määrää. Liukosellu, selluloosananomateriaalit ja mikrokiteinen selluloosa ovat lignoselluloosasta valmistettuja selluloosapohjaisia valmisteita, joita voidaan hyödyntää useissa käyttökohteissa. (Zhao et al. 2017) Käyttökohteeseensa sopivalta valmisteelta vaaditaan erityisominaisuuksia, joita voidaan saavuttaa fysikaalisilla, kemiallisilla ja biologisilla käsittelyillä. Biologisiin käsittelyihin kuuluvat entsymaattiset käsittelyt ovat nostaneet merkitystään ympäristöystävällisyytensä vuoksi. (Yang et al. 2019) Kemiallisia reaktioita katalysoivia entsyymejä on hyödynnetty jo vuosikymmenten ajan erilaisissa prosesseissa elintarvike- , tekstiili-, paperi- ja selluteollisuudessa. Esimerkiksi paperi- ja selluteollisuudessa, sellulaasien ja hemisellulaasien käyttö on vakiintunutta sellun valkaisussa ja vedenpoistossa paperikoneella. (Aittomäki et al. 2002, s. 113)

Selluloosapohjaisten valmisteiden, kuten liukosellun kysyntä on kasvanut viime vuosina erityisesti viskoosikuidun kulutuksen ansiosta (Knowpulp 2021). Kasvavan kysynnän myötä tuotantoprosesseissa käytettyjen kemikaalien kulutus lisääntyy. Kemikaalien korvaajiksi on alettu tutkia ympäristöystävällisempiä vaihtoehtoja. Entsyymien nähdään olevan potentiaalinen kemikaalien korvaaja ympäristöystävällisyyden ja tehokkuutensa vuoksi. Entsyymeillä ja entsymaattisilla käsittelyillä voidaan vähentää kemikaalien käyttöä tuotantoprosesseissa ja siten vähentää maapallon kemikaalikuormaa. (Yang et al. 2019)

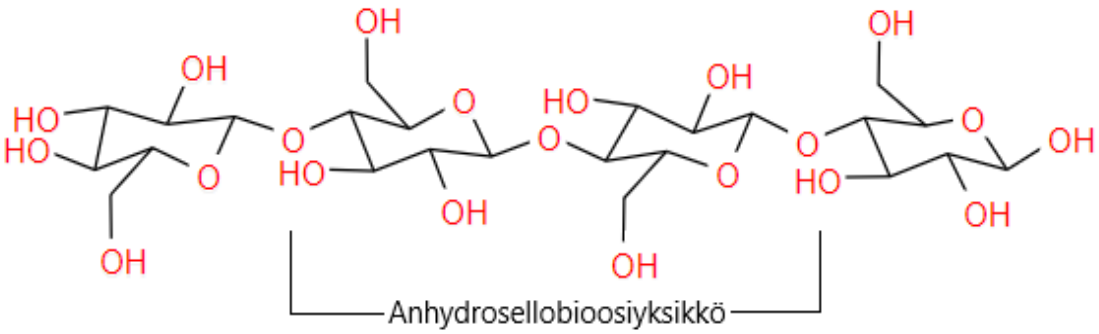
Tässä kandidaatintyössä tutustutaan entsymaattisten käsittelyjen hyödyntämiseen selluloosavalmisteiden muokkauksessa. Työssä tarkastellaan liukosellun, selluloosananomateriaalien ja mikrokiteisen selluloosan valmistusmenetelmiä ja ominaisuuksia. Työn varsinaisena tarkastelun kohteena on hydrolaasien, kuten sellulaasien ja hemisellulaasien hyödyntäminen näissä selluloosapohjaisissa valmisteissa.

Lisäksi työssä tarkastellaan äskettäin löydetyn lyyttisen polysakkaridimono-oksigenaasin (LPMO) hyödyntämistä selluloosavalmisteiden muokkauksessa. Työssä halutaan selvittää, miten eri entsyymeillä toteutetut entsymaattiset käsittelyt vaikuttavat selluloosavalmisteen rakenteeseen ja sen ominaisuuksiin. Oletuksena on, että entsyymit vaikuttavat selluloosavalmisteiden sekä fyysisiin että kemiallisiin ominaisuuksiin.

2 SELLULOOSA

2.1 Selluloosan rakenne

Selluloosa on rakenteeltaan lineaarinen, haaroittumaton polysakkaridi. Se rakentuu polymeroituneista β-D-glukopyranoosiyksiköistä, jotka on sidottu toisiinsa (1–4) - β-glykosidisin sidoksin. Selluloosan polymeroitumisaste (eng. the degree of polymerization, DB) voi vaihdella 1000 ja 15 000 välillä biologisesta lähteestä riippuen. (Wüstenberg 2014, s. 96:111) Selluloosan glukoosiyksiköt ovat 180˚kulmassa toisiinsa nähden, jolloin ne muodostavat kierteisen akselin (Wahlström 2014, s. 21). Selluloosaketjun toiminnallisena ryhmänä toimivat hydroksyyliryhmät eli OH-ryhmät, jotka muodostavat vetysidoksia (Palonen 2004, s. 15). Kuvassa 1 nähdään glukoosimolekyyleistä muodostuneen selluloosan rakennekaava.



Kuva 1. Selluloosan rakennekaava (mukaillen Wahlström 2014, s. 22).

Selluloosaketjun pienin toistuva rakenneosa on anhydrosellobioosiyksikkö, joka on muodostunut kahdesta glukoosiyksiköstä. Yhteen keräytyessään selluloosaketjut muodostavat selluloosakristalliitteja eli elementaarifibrillejä, jotka sisältävät kiteisiä eli järjestäytyneitä alueita ja amorfisia eli huonommin järjestyneitä alueita. Elementaarifibrillit ovat ominaisuuksiltaan erittäin jäykkiä, sillä selluloosaketjut muodostavat sekä molekyylien sisäisiä että molekyylien välisiä vetysidoksia. Kiteisiä ja amorfisia alueita sisältävät elementaarifibrillit muodostavat mikrofibrillejä. Yhteen kerääntyneet mikrofibrillikimput muodostavat makrofibrillin. Kasvin soluseinässä

selluloosaa on makrofibrilleistä muodostuvina kuitumaisina rakenteina yhdessä hemiselluloosan, ligniinin, pektiinin ja proteiinien kanssa. (Wahlström 2014, s. 21–22; Wüstenberg 2014, s. 103)

Kasvin soluseinässä esiintyvä hemiselluloosa on monimutkainen, useista erilaisista sakkarideista koostuva heterogeeninen polysakkaridi. Hemiselluloosan tyyppi vaihtelee eri puulajien välillä. Hemiselluloosan tyyppejä ovat esimerkiksi ksylaani, ksyloglukaani ja galaktoglukomannaani. (de Souza 2013, s. 215) Puumatriisista hemiselluloosa saadaan eristettyä uuttamalla (Palonen 2004, s. 16). Ligniini on monimutkainen aromaattinen yhdiste, joka koostuu fenyylipropanoidi monomeereistä. Ligniinin fenyylipropaaniyksiköt ovat liitettyinä toisiinsa eetteri- ja hiili-hiili -sidoksilla muodostaen laajan verkon kasvin soluseinämän sisällä. Ligniinin ominaisuudet antavat kasville jäykkyyden ja suojan mekaaniselta rasitukselta. Pektiinit ovat suuria molekyylejä, jotka esiintyvät kasveissa heteropolysakkarideina. Pektiinit muodostuvat 1,4-sitoutuneiden α-D-galakturonihappoyksiköistä, jotka sisältävät niin sanottuja sileitä ja karvaisia alueita. (de Souza 2013, s. 208–210)

2.2 Selluloosan lähteet

Lignoselluloosalla tarkoitetaan kasvien biomassaa, joka koostuu selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä. Lignoselluloosabiomassaa sisältäviä materiaaleja ovat maatalouden jäännökset, kuten vehnän oljet sekä metsänhoidossa muodostuvat jäännökset, kuten sahanpuru ja harvennushakkuun tähteet. Lignoselluloosan komponenteista selluloosa on kasvien soluseinän pääkomponentti. (Palonen 2004, s. 11)

Selluloosalla on useita eri lähteitä, joista tärkeimpinä lähteinä ovat kasvit, kuten erilaiset puulajit. Puulajista riippuen selluloosaa on noin 40–50 % puun koostumuksesta. Kasveissa selluloosan kanssa esiintyviä aineosia ligniinin ja hemiselluloosan lisäksi ovat uuteaineet ja erilaiset orgaaniset yhdisteet. Teollisuudessa selluloosan raaka-ainelähteenä käytetään yleisimmin erilaisia lehti- ja havupuita, kuten kuusta, mäntyä, koivua, pyökkiä ja haapaa. Selluloosaa on myös puuvilloissa, viherlevissä, sienten kalvoilla, niinikasveissa, lehtikuiduissa, viljoissa ja bambuissa. Lisäksi eräät bakteerit voivat tuottaa

selluloosaa. (Krässig et al. 2004, s. 294) Taulukossa 1 nähdään eri kasvien kemialliset koostumukset.

Taulukko 1. Selluloosaa sisältävien materiaalien kemialliset koostumukset (mukaillen Hon 1996).

Lähde	**Kemiallinen koostumus (%)**			
	Selluloosa	**Hemiselluloosa**	**Ligniini**	**Uuteaineet**
Lehtipuut	43–47	25–35	16–24	2–8
Havupuut	40–44	25–29	25–31	1–5
Puuvilla	95	2	0,9	0,4
Vehnän olki	30	50	15	5
Hamppu	70,2	22,4	5,7	1,7
Bagassi [1]	40	30	20	10

[1] Sokeriruo'on puristusjäte

3 ENTSYYMIT

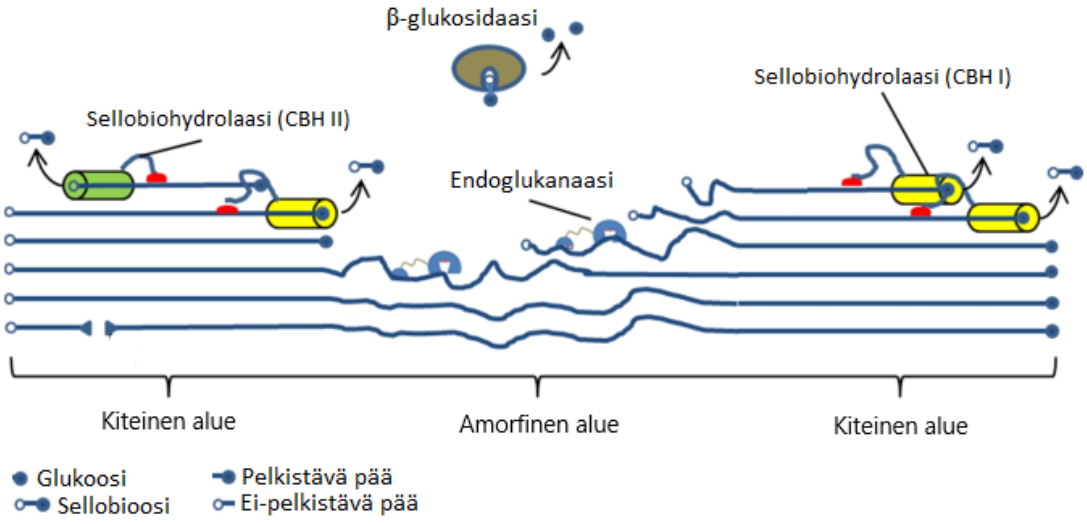
Entsyymit ovat molekyylejä, yleensä proteiineja, jotka koostuvat kiertyneistä aminohappoketjuista. Prosesseissa entsyymit toimivat katalyytteinä kiihdyttäen kemiallisten reaktioiden reaktionopeutta pienentämällä reaktion käynnistymiseen tarvittavaa aktivointienergiaa. Entsyymien katalysoinnin ansiosta kemialliset reaktiot tapahtuvat suuremmalla reaktionopeudella samassa lämpötilassa, kuin ilman entsyymejä. Entsyymit eivät kulu tai muutu katalysoimissaan reaktioissa. (Hellner 2011, s.11) Entsyymit ovat substraattispesifisiä katalyyttejä, mikä tarkoittaa sitä, että ne vaikuttavat pääasiassa vain tietyn tyyppisen substraatin toimintaan (Vehviläinen 2015, s. 9). Entsyymit jaetaan katalysoimiensa reaktioiden perusteella kuuteen pääluokkaan. Pääluokassa on alaluokkia, jotka kertovat entsyymien käyttämät substraatit ja katalysoimansa reaktiot. Näin jokaisella entsyymillä on oma määrittelevä EC-numeronsa. Teollisuuden käyttöön entsyymejä saadaan joko mikrobien tuottamista entsyymeistä tai eristämällä entsyymejä tuottavia soluja kasveista ja eläinmateriaaleista. (Aittomäki et al. 2002, s. 55:112)

3.1 Sellulaasit

Sellulaasit ovat merkittäviä entsyymejä teollisuudessa. Niitä hyödynnetään muun muassa tekstiili-, lääke-, sellu- ja elintarviketeollisuudessa erilaisissa reaktioissa. Sellulaasit ovat entsyymejä, jotka kykenevät hydrolysoimaan selluloosaa hajottamalla niiden glukoosiyksiköiden välillä olevia β-1,4-sidoksia (Vehviläinen 2015, s. 9). Sellulaasit jaetaan EC-luokituksen mukaan kolmeen ryhmään: endoglukanaasit (EC 3.2.1.4), sellobiohydrolaasit (EC 3.2.1.91) ja β-glukosidaasit (EC 3.2.1.21). Eri sellulaaseilla on erilaiset toimintamekanismit: endoglukanaasit (eng. endoglucanases, EG) hydrolysoivat satunnaisesti selluloosaketjun amorfisia alueita, jolloin syntyy lyhyempiä ketjuja ja uusia ketjun päitä. Sellobiohydrolaasit (eng. cellobiohydrolases, CBH) hydrolysoivat selluloosaketjun päitä vapauttaen sellobioosiyksiköitä, kun taas β-glukosidaasit (eng. β- glucosidases, BG) hydrolysoivat sellobioosiyksiköitä glukooseiksi. (Viikari et al. 2010, s.388)

Useimmat selluloosaa hajottavat sellulaasit, kuten endoglukanaasit, muodostuvat kahdesta domeenirakenteesta. Domeenirakenne koostuu katalyyttisestä domeenista (eng. catalytic domein, CD) ja selluloosaa sitovasta domeenista (eng. cellulose-binding domein, CBD), jotka ovat kytkettynä toisiinsa ns. linkkerialueella. Näiden kahden domeenin linkityksellä ja niiden välisellä vuorovaikutuksella on iso rooli entsyymien toimintaan. (Linder et al. 1996)

Kuvassa 2 nähdään eräiden sellulaasien toimintaperiaate. Selluloosan entsymaattisen hydrolysoinnin aloittavat endoglukanaasit, jotka hydrolysoivat eli pilkkovat sattumanvaraisesti selluloosaketjun amorfisen alueen β-1,4-sidoksia glukoosiyksiköiden väliltä. Hydrolysoinnin ansiosta syntyy lyhyempiä ketjuja ja uusia ketjun päitä. Sellobiohydrolaasit (CBH) hydrolysoivat selluloosaketjun pelkistäviä ja ei-pelkistäviä päitä sellobiooseiksi. *Trichoderma reesei* -sienen sellobiohydrolaasit tunnetaan nimillä CBH I ja CBH II. Lopuksi β-glukosidaasit pilkkovat sellobioosit glukoosiyksiköiksi. (Kamppuri et al. 2016; Yang et al. 2019)



Kuva 2. Sellulaasien toimintaperiaate (mukaillen Wahlström 2014, s.25).

Luonnossa sienet ja bakteerit käyttävät entsyymejä, sellulaaseja, selluloosan hajottamiseen ravinnokseen. Näin ollen sellulaaseja voidaan tuottaa eri sieni- ja bakteerilajien avulla. Teollisuuteen valmistettavat entsyymit valmistetaan useimmiten rihmamaisten *Trichoderma*- ja *Aspergillus*- suvun sienten avulla, sillä niiden avulla

selluloosaa saadaan kustannustehokkaimmin. *Trichoderma reesei* – sieni on tehokkain selluloosaa hajottava sieni ja siksi se onkin yksi tärkeimmistä sellulolyyttisistä sienistä. *Trichoderma reesei* – sieni tuottaa ainakin kuusi geneettisesti erilaista sellulaasia ja kaksi β-glukosidaasia. *Aspergillus Niger* -sieni tuottaa laajan valikoiman hemiselluloosaa hajottavia entsyymejä. (de Souza 2013, s. 211; Vehviläinen 2015, s. 10)

3.2 Hemisellulaasit

Hemiselluloosa on heterogeeninen polysakkaridi, jonka tyyppi vaihtelee eri puulajin mukaan. Lehtipuissa ja eräissä kasveissa hemiselluloosa esiintyy pääosin ksylaanina. Havupuiden hemiselluloosa koostuu pääosin galaktoglukomannaanista sekä osaksi ksylaanista. Muun muassa hemiselluloosan heterogeenisen rakenteen vuoksi hemiselluloosan hajotukseen tarvitaan useita entsyymejä, joita kutsutaan hemisellulaaseiksi. Hemisellulaasit kuuluvat hydrolaaseihin (EC 3.2.1.x). (Palonen 2004, s. 16:22)

Ksylaanin hajotukseen tarvitaan endoksylanaaseja, jotka ovat hydrolyyttisiä entsyymejä (EC 3.2.1.8). Endoksylanaasit katalysoivat ksylaanissa β-D-1,4-ksylosidisten sidosten hydrolyysiä. Hydrolyysissä substraattina toimii ksylaanin hiilihydraatit, jolloin reaktiossa muodostuu ksylobiooseja, ksylotriooseja tai substituoituja oligomeereja. (Suurnäkki et al. 1997, s. 267)

Galaktoglukomannaanin hajotuksessa tarvitaan endomannanaaseja, jotka ovat hydrolyyttisiä entsyymejä (EC 3.2.1.78). Endomannanaasit katalysoivat β-D-1,4-mannopyranosyylisidosten hydrolyysiä glukomannaanissa. Hydrolyysissä tuotteena muodostuu mannobiooseja, mannotriooseja tai erilaisia oligosakkarideja. (Suurnäkki et al. 1997, s. 269)

3.3 Lyyttiset polysakkaridimono-oksigenaasit

LPMO:t eli lyyttiset polysakkaridimono-oksigenaasit ovat vuosikymmenen alussa löydetty entsyymiryhmä. LPMO:t ovat osoittautuneet merkittäviksi entsyymeiksi selluloosavalmisteiden käsittelyprosesseissa, sillä ne ovat voimakkaita oksidatiivisia eli

hapettavia entsyymejä, jotka hajottavat polysakkarideja. Hapettavina entsyymeinä LPMO:t voivat edistää sellulaasien entsymaattisen hydrolyysin tehokkuutta selluloosassa. (Villares et al. 2017)

Läpimurto LPMO:ista tehtiin vuonna 2010, kun havaittiin kitiiniä sitovan *Serratia marcescens* -proteiinin olevan entsyymi, joka katalysoi hapettumisreaktiota sidosten välillä (Kont et al. 2019). Koska LPMO:ja on tutkittu vasta yksi vuosikymmen, on niiden toimintatapa vielä osittain selvittämättä. On kuitenkin tutkittu, että LPMO:ien toimintatapa perustuu selluloosamolekyylin glukosidisidosten hapettumisreaktioiden katalysointiin. Lisäksi on tutkittu, että LPMO:ien aktiivisuus kasvaa merkittävästi vetyperoksidin (H_2O_2) läsnä ollessa. LPMO:t ovat kuparista riippuvaisia entsyymejä, joiden litteä pinta mahdollistaa kiteisen substraatin tarttumisen entsyymien pinnalle. Tällä hetkellä tiedetään, että LPMO:ja tuottavat bakteerit, sienet ja virukset. (Johansen 2016; Kont et al. 2019)

4 LIUKOSELLU

Liukosellu on yksi pitkään suosiossa ollut raaka-aine, jota voidaan käyttää erilaisten selluloosapohjaisten tuotteiden valmistuksessa tekstiili-, lääke-, muovi- ja elintarviketeollisuudessa. Liukosellua käytetään kemiallisesti johdettujen selluloosapohjaisten tuotteiden valmistukseen, joista suurimpana käyttökohteena on viskoosikuidun valmistus tekstiiliteollisuudelle. (Knowpulp 2021) Yang et al. (2019) mukaan, vuonna 2019 noin 70 % liukosellun tuotannosta käytettiin viskoosikuidun tuotantoon. Viskoosikuitua valmistetaan monivaiheisella viskoosiprosessilla rikkihiilen (CS_2) ja natriumhydroksidin (NaOH) avulla. Viskoosiprosessissa liukosellumassa kyllästetään natriumhydroksidiliuoksella, mikä saa selluloosakuidut turpoamaan ja tällöin muodostuu alkaliselluloosaa. Ksantaatiossa alkaliselluloosa ja rikkihiili reagoivat keskenään muodostaen selluloosaksantaattia. Selluloosaksantaatti liuotetaan uudelleen natriumhydroksidilla, jonka seurauksena muodostuu siirappimainen viskoosiliuos. Lopullinen viskoosikuitu saadaan, kun siirappinen viskoosiliuos kypsytetään, suodatetaan ja kehrätään. (Wilkes 2001, s. 37) Viskoosikuidun valmistusprosessissa ongelmana on ympäristölle ja terveydelle vaarallinen rikkihiili, jota käytettäessä vapautuu myrkyllisiä yhdisteitä, kuten rikkivetyä (H_2S) (Krässig et al. 2004, s. 311–312). Viskoosikuidun lisäksi liukosellusta voidaan valmistaa muita johdannaisia, kuten selluloosa-asetaattia, selluloosapohjaisia esterijohdannaisia ja Lyocell-muuntokuitua. Johdannaisten valmistus on merkittävää, sillä niillä voidaan korvata öljynjalostuksella valmistettuja tuotteita, kuten polyesteriä. (Knowpulp 2021)

4.1 Liukosellun valmistusmenetelmät

Liukosellu on kemiallisesti valkaistua massaa, joka sisältää korkealaatuista, puhdasta α-selluloosaa. Tyypillisesti liukosellun selluloosapitoisuus on yli 90 %. Liukosellua voidaan valmistaa esihydrolyysi-sulfaattiprosessilla (eng. Pre-hydrolysis Kraft, PHK) ja happosulfiittiprosessilla (eng. Acid sulfite, AS). Esihydrolyysi-sulfaattiprosessissa varsinaista sulfaattikeitto-vaihetta edeltää esihydrolyysivaihe. Esihydrolyysivaiheessa raaka-aineena käytetty puuhake käsitellään höyryllä tai laimealla rikkihapolla (H_2SO_4) hemiselluloosan liuottamiseksi puuhakkeesta. Käsittely vapauttaa puuhakkeen sisältämiä

orgaanisia happoja, jotka hydrolysoivat hemiselluloosaa vesiliukoisiksi hiilihydraateiksi. (Sixta 2006a) Esihydrolyysivaihetta seuraa sulfaattikeitto-vaihe, jossa liuotetaan puuhakkeen sisältämä ligniini (Knowpulp 2021). Toinen liukosellun valmistusmenetelmä perustuu happamaan sulfiittimenetelmään, jossa keittokemikaaleina voivat toimia bisulfaatti-ionit (H_2SO_3) ja rikkidioksidi (SO_2). Sulfiittimenetelmän keittoliuoksessa suosituin käytetty emäs eli alkali on magnesium. Muita vaihtoehtoisia emäksiä ovat kalsium, natrium tai ammonium kationi. (Sixta 2006b, s. 392–393) Happosulfiittiprosessilla valmistetun liukosellun selluloosapitoisuus on 90–92 %, kun taas esihydrolyysisulfaattiprosessilla valmistetun liukosellun selluloosapitoisuus on 94–96 % (Sixta 2006a).

Keittomenetelmästä riippumatta, liukosellumassa valkaistaan keiton jälkeen happidelignifioinnin sekä joko TCF- tai EFC-valkaisun avulla halutun liukosellun vaaleuden ja puhtauden saamiseksi. Valkaisun tavoitteena on parantaa liukosellumassan laatua poistamalla jäännösligniini. Happidelignifioinnissa liukosellumassasta poistetaan jäännösligniiniä hapen ja alkalin avulla. Happikemikaalivalkaisussa (eng. Totally Chlorine Free, TCF) valkaisu suoritetaan täysin ilman kloorikemikaaleja. Klooridioksidivalkaisussa (eng. Elementary Chlorine Free, ECF) käytetään klooridioksidia, mutta ei kaasuklooria. Eräs valkaisussa käytettävä valkaisukemikaali on hypokloriitti (H). (Knowpulp 2021)

4.2 Liukosellun ominaisuudet

Liukosellulta vaaditaan erityisominaisuuksia siitä valmistettavia johdannaisia varten. Liukosellun tärkein ominaisuus on sen korkea α-selluloosapitoisuus, jota edistetään liukosellun tuotantoprosessissa keitto- ja valkaisuvaiheiden avulla. Muita liukosellun erityisominaisuuksia ovat sen korkea reaktiivisuus, mahdollisimman alhaiset hemiselluloosa-, ligniini-, ja uuteainepitoisuudet, käyttökohteeseen sopiva viskositeetti sekä tasainen molekyylipainojakauma. (Yang et al. 2019)

Liukosellun prosessoitavuutta kuvataan sen reaktiivisuudella kemikaaleihin ja liuottimiin. Reaktiivisuus yksinkertaisuudessaan kuvaa sitä, kuinka helposti liukosellu ja kemikaalit tai liuottimet reagoivat keskenään. Reaktiivisuudella on yhteys saatavuuteen,

sillä reaktiivisuus kertoo sen, kuinka kemikaalit saavuttavat selluloosaketjussa olevat vapaat hydroksyyliryhmät ja muodostavat sidoksia niiden kanssa. (Sixta 2006c, s.1023) Yleisesti liukosellun hiilihydraattien reaktiivisuus riippuu sen rakenteellisista ominaisuuksista, kuten morfologiasta, kiteisyydestä tai polymeroitumisasteesta. Esimerkiksi liukosellun sisältämä selluloosa on vastustuskykyisempi alkalisille aineille ja hajoamiselle kuin hemiselluloosa. (Sixta et al. 2006, s.174)

Reaktiivisuuden parannuttua liukosellun kemiallinen muokattavuus helpottuu, mikä edesauttaa liukosellun prosessoitavuutta selluloosajohdannaisten valmistuksessa. Esimerkiksi viskoosikuidun valmistuksessa liukosellun selluloosa reagoi käytettävien kemikaalien kanssa sitä helpommin, mitä korkeampi on liukosellun reaktiivisuus. (Yang et al. 2019) Reaktiivisuuden suuruudella on siis merkittävä vaikutus prosesseissa tarvittavien kemikaalien määrään. Eräs tapa arvioida liukosellun reaktiivisuutta on Fock-reaktiivisuuskoe. Se on mikroskaalainen mallinnusmenetelmä teollisesta viskoosiprosessista. Fock-reaktiivisuus ilmaistaan regeneroidun selluloosan määrällä. (Miao et al. 2015) Käytännössä Fock-reaktiivisuuskoe toteutetaan sekoittamalla liukosellun massanäyte natriumhydroksidiin (NaOH) ja lisäämällä joukkoon rikkihiiltä (CS_2) ylimäärin selluloosaksantaattiliuoksen muodostamiseksi. Selluloosan reagoidessa rikkihiilen kanssa selluloosa regeneroituu. Lopullinen prosentteina ilmaistu liukosellun massanäytteen Fock-reaktiivisuus saadaan määritettyä regeneroituneen selluloosan määrän perusteella. (Fock 1959, Tian 2013 mukaan)

Liukosellun tuotantoprosessissa tärkeimmät laatuun vaikuttavat säätöparametrit ovat ligniinipitoisuutta indikoiva kappaluku, keskimääräinen polymeroitumisaste (DP) ja molekyylipaino. Keskimääräinen polymeroitumisaste ja molekyylipaino voidaan kuvata liukosellun viskositeetin avulla. (Sixta et al. 2006, s. 188:193) Tuotantovaiheessa liukosellun viskositeettiin vaikuttavat keitto- ja valkaisuvaiheiden olosuhteet, joissa hyödynnetään kemikaaleja. Mitä enemmän tuotantovaiheessa liukosellumassan sisältämiä hiilihydraatteja pilkkoutuu, sitä alhaisempi on massan viskositeetti. Esimerkiksi liukosellun tyypillinen haluttu viskositeetti viskoosikuidun valmistusta varten on 400–600 ml/g. (Yang et al. 2019)

5 MUUT SELLULOOSAPOHJAISET VALMISTEET

Liukosellun lisäksi selluloosananomateriaalit ja mikrokiteinen selluloosa ovat eräitä selluloosapohjaisia valmisteita. Ominaisuuksiltaan ne ovat hydrofiilisiä ja kemiallisesti helposti muokattavia valmisteita. Ne ovat kooltaan pieniä ja niillä on suuri ominaispinta-ala, minkä ansiosta ne ovat hyvin reaktiivisia ja hyvän sitoutumiskyvyn omaavia valmisteita. Näitä selluloosapohjaisia valmisteita voidaan hyödyntää monissa sovelluskohteissa, kuten lääke-, paperi-, maali- ja elintarviketeollisuudessa. (Kangas 2014, s. 7–8)

5.1 Nanoselluloosa

Nanoselluloosa on selluloosaa, joka koostuu ainakin yhdestä nanokokoluokan eli 1–100 nanometrin dimensiosta (Sain & Oksman 2006). Nanoselluloosa voidaan jakaa kolmeen pääluokkaan, jotka eroavat toisistaan valmistusmenetelmänsä, kokonsa ja ominaisuuksiensa perusteella. Pääluokat ovat selluloosananofibrillit (eng. cellulose nanofibrils, CNF), selluloosananokiteet (eng. cellulose nanocrystals, CNC) ja bakteeriselluloosa (eng. bacterial cellulose, BC). Selluloosananomateriaalien yleisin lähde on puu. Puun käyttöä kuitenkin rajoittaa kuitujen eristämiseen tarvittava energian määrä ja monivaiheinen prosessointi. Muita suosittuja raaka-ainelähteitä ovat ligniiniköyhät puumassat, yksivuotiset kasvit, pellava, hamppu, puuvilla, vehnänkorsi ja sokeriruoko. Lisäksi nanomittakaavan selluloosaa saadaan eräiden bakteerien valmistamana sekä eläinperäisenä sitä voidaan eristää meressä elävien vaippaeläimien kuoresta. (Kangas 2014, s. 8–9)

Selluloosananofibrillien (CNF) keskeisin valmistusmenetelmä on mekaaninen käsittely, Mekaanisessa käsittelyssä selluloosakuituja voidaan fibrilloida eli säikeistää jauhamalla jauhimessa. Jauhatus perustuu koneellisesti suoritettavaan mekaaniseen rasitukseen, joka johtaa kuidun kuituseinämien kuoriutumiseen. Kuituseinämien kuoriutumisesta aiheutuu sisempien kerrosten paljastuminen ja kuitujen rakenteen löyhtymisen. Selluloosananofibrillejä voidaan valmistaa mekaanisesti myös homogenoinnilla ja mikrofluidisoinnilla. Homogenointi on perinteinen valmistusmenetelmä, jossa

fibrilloituminen suuttimen läpi saadaan aikaan korkean paineen ja suurten paine-erojen yhteisvaikutuksen ansiosta. Tuloksena saadaan geelimäistä selluloosananofibrilliä. Homogenoinnissa voidaan käyttää mikrofluidisaattoria, jonka läpi kuitu-vesisuspensio ajetaan useita kertoja kuitujen fibrillaatioasteen kasvattamiseksi. (Kangas 2014, s.17) Mekaanisen rasituksen yhteydessä voidaan käyttää entsymaattisia tai kemiallisia käsittelyjä, joiden avulla kuitujen fibrilloituminen helpottuu. Mekaanisella rasituksella valmistetut selluloosananofibrillit koostuvat eri kokoisista kuiduista, nanokuitukimpuista, mikro- ja nanoskaalan kuiduista. Selluloosananofibrillien leveys vaihtelee 20–40 nanometrin välillä ja niiden pituus on yleensä useita mikrometrejä. (Kangas 2014, s. 9–10)

Selluloosananokiteiden (CNC) valmistukseen käytetään happohydrolyysiä. Happohydrolyysikäsittelyn vaikutuksesta selluloosakuitujen mikrofibrillit katkeavat amorfisen alueen kohdalta, jolloin saadaan kiteisiä alueita sisältävää selluloosaa. Käsittelyn jälkeen selluloosa hajotetaan mekaanisesti, jonka tuloksena saadaan selluloosananokiteitä. Selluloosananokiteiden leveys on yleensä 2–20 nanometriä ja pituus voi vaihdella 100–600 nanometrin väliltä jopa yli 1 mikrometrin pituuteen raaka-ainelähteestä riippuen. Selluloosananofibrilleihin (CNF) verrattuna selluloosananokiteet (CNC) omaavat korkeamman kiteisyyden, 62–90 %, valmistustavastaan johtuen. (Kangas 2014, s. 11–12)

Bakteeriselluloosa (BC) eroaa selluloosananokiteistä ja -fibrilleistä valmistustapansa mukaan, sillä sitä voidaan syntetisoida bakteerien, esimerkiksi *Acetobacter xylinum* – bakteerin avulla. Biosynteesissä bakteeri valmistaa glukoosista selluloosaa ja erittää sen soluseinänsä läpi solun ulkopuolelle geelimäisenä massana. Massa muodostuu verkottoituneesta rakenteesta, joka koostuu suuremmista 20–100 nanometrin ja pienemmistä 2–4 nanometrin leveyden omaavista nanofibrilleistä. Tuotettu bakteeriselluloosa omaa korkean kiteisyyden (60–80 %) ja se on hyvin puhdasta selluloosaa. (Kangas 2014, s. 13)

5.2 Mikrokiteinen selluloosa

Mikrokiteinen selluloosa (eng. microcrystalline cellulose, MCC) on puhdistettua, osittain depolymeroitunutta selluloosaa, joka koostuu 70 % kiteisestä ja 30 % amorfisesta alueesta. Mikrokiteinen selluloosa on veteen liukenematon aine. (Wüstenberg 2014, s. 117) Mikrokiteistä selluloosaa esiintyy luonnostaan (Kangas 2014, s.12), mutta sitä voidaan lisäksi valmistaa liukosellusta johtamalla (Sixta 2006a). Yleisin mikrokiteisen selluloosan valmistustapa on hydrolyysi. Kaupallisesti tunnetun MCC:n hydrolyysi toteutetaan kemiallisesti happojen avulla. Mikrokiteistä selluloosaa muodostuu lisäksi silloin, kun nanokiteisen selluloosan kiteet aggregoituvat eli yhdistyvät kuivattaessa. (Kangas 2014, s.12)

Mikrokiteisen selluloosan fysikaaliset ominaisuudet riippuvat sen käyttökohteesta. Tyypillinen mikrokiteisen selluloosan partikkelikoko on 20–250 mikrometrin välillä. Nanokiteisen selluloosan kiteiden aggregoituessa syntyvän mikrokiteisen selluloosan koko voi olla jopa 1000–1400 mikrometriä. (Vanhatalo 2017, s. 15) Mikrokiteinen selluloosa voitaisiin luokitella nanoluokkaan nanokiteisyytensä vuoksi, mutta varsinaisesti sitä ei luokitella nanoselluloosaksi, sillä sen ulkoiset mitat, leveys ja pituus, ovat suurempia kuin 1 mikrometrin. Mikrokiteinen selluloosa on kaupallisesti merkittävä tuote, jota käytetään apu- ja sideaineena erityisesti lääke- ja elintarvikesovelluksissa. (Kangas 2014, s. 12–13)

6 ENTSYYMIT LIUKOSELLUN JA MUIDEN SELLULOOSAPOHJAISTEN VALMISTEIDEN MUOKKAUKSESSA

Entsyymejä hyödynnetään useilla teollisuuden aloilla korkean spesifisyytensä, tehokkuutensa ja ympäristöystävällisyytensä johdosta. Entsyymien toiminta, kuten hydrolysointi tai hapettaminen muuntavat kohteena olevan kuitumassan ominaisuuksia tehden siitä sopivamman käyttökohdettansa varten. Entsymaattisella käsittelyllä voidaan muokata liukosellulta haluttuja ominaisuuksia. Sellulaasikäsittelyllä voidaan vaikuttaa liukosellun sisältämään selluloosaan ja siten kontrolloida liukosellun molekyylipainoa ja viskositeettia. Hemiselluloosaa hajottavalla hemisellulaasikäsittelyllä voidaan parantaa liukosellun kirkkautta ja tasalaatuisuutta. (Yang et al. 2019) Muissa selluloosapohjaisissa valmisteissa entsyymejä voidaan hyödyntää muuntamaan selluloosakuidun rakennetta ja pintaominaisuuksia kuituuntumisen helpottamiseksi (Kangas 2014, s.21).

6.1 Liukosellun entsymaattiset käsittelyt

Käyttökohteesta riippuen liukosellulta vaaditaan tiettyjä erityisominaisuuksia, joita voidaan saavuttaa erilaisilla menetelmillä. Liukosellulta haluttuja erityisominaisuuksia, kuten korkea reaktiivisuus ja matala viskositeetti voidaan saavuttaa kemiallisilla ja fysikaalisilla menetelmillä (Miao et al. 2015; Tian et al. 2014) sekä biologisilla menetelmillä, kuten entsymaattisilla käsittelyillä (Miao et al. 2014; Zhao et al. 2017; Duan et al. 2016). Entsymaattisen käsittelyn tavoitteena on katkaista selluloosaketjun sidoksia entsymaattisella hydrolyysillä ja avata liukosellumassan kuiturakenne. Sellulaasien hydrolysointi pilkkoo selluloosaketjua alentaen ketjun polymeroitumisastetta. Hydrolysointi johtaa molekyylipainon pienenemiseen ja siten liukosellun viskositeetin pienenemiseen. Sellulaasien toiminnan vaikutuksesta selluloosan kuiturakenteen seinämä turpoaa. Toimintojen seurauksena selluloosan kuiturakenteen huokosten määrä lisääntyy, huokoisuus kasvaa ja ominaispinta-ala laajenee. Nämä tekijät parantavat liukosellun reaktiivisuutta, kun kuiturakenteen amorfisten alueiden rakenne saadaan avattua ja sen seurauksena reaktiopinta-ala kasvaa. (Miao et al. 2015; Yang et al. 2019) Liukosellun kemiallinen muokattavuus helpottuu,

kun reaktiivisuus kasvaa. Esimerkiksi valmistettaessa liukosellusta viskoosikuitua viskoosiprosessilla, tarvittavien kemikaalien määrä on sitä vähäisempi, mitä korkeampi on liukosellun reaktiivisuus. (Yang et al. 2019)

6.1.1 Liukosellun sellulaasikäsittely

Rahkamo et al. (1996) ovat tutkineet sellulaasien entsymaattista tehokkuutta liukosellun ominaisuuksien muokkaamisessa. Tutkimuksessa lehtipuupohjainen liukosellu käsiteltiin puhdistetuilla *Trichoderma reesei* – sienen endoglukanaaseilla (EG I ja EGII) ja sellobiohydrolaaseilla (CBH I ja CBH II). Tutkimustulosten perusteella Rahkamo et al. (1996) havaitsivat, että samalla entsyymiannostuksella endoglukanaasit olivat tehokkaampia liukosellun hiilihydraattien hydrolysoinnissa kuin sellobiohydrolaasit. Viskositeetin tehokkain lasku saatiin käyttämällä endoglukanaasi II:sta. Mitä enemmän sellulaasit pilkkoivat selluloosakuidun hiilihydraatteja, sitä alhaisempi oli massan viskositeetti. Tutkimuksessa todettiin, että eri sellulaasien tyypillä oli merkitys sen kykyyn alentaa massan viskositeettiä. Tutkimuksessa todettiin sellobiohydrolaasien vaikuttavan vähemmän merkittävästi selluloosan viskositeettiin ja liukoisuuteen. (Rahkamo et al. 1996)

Sellulaaseja voidaan hyödyntää muuntamaan liukosellu alkaliliukoisempaan muotoon. Sellulaasien entsymaattisen hydrolyysin seurauksena selluloosaketjun molekyylipaino alenee, jolloin liukosellun viskositeetti pienenee. Tämän seurauksena liukosellun alkaliliukoisuus lisääntyy. (Rahkamo et al. 1996) Tutkimuksessaan Rahkamo et al. (1996) totesivat endoglukanaasien vaikuttavan tehokkaimmin selluloosan alkaliliukoisuuden lisääntymiseen. Entsyymiannostuksen ollessa 2,5 mg/g, selluloosan alkaliliukoisuus kasvoi alkuperäisestä 40 %:sta liukoisuudesta 66 %:iin. Myös Kamppuri et al. (2016) totesivat tutkimuksessaan *Trichoderma reesei* – sienen erilaisten endoglukanaasi- ja sellobiohydrolaasiyhdistelmien alentaneen liukosellumassan viskositeettia ja siten parantaneen massan alkaliliukoisuutta.

Entsymaattisen käsittelyn vaikutuksia liukosellun ominaisuuksiin ovat tutkineet myös Miao et al. (2014), jotka käyttivät tutkimuksessaan lehtipuupohjaisesta sulfaattisellusta valmistettua liukosellua. Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää entsymaattisen käsittelyn

vaikutuksia erityisesti liukosellun selluloosan kuiturakenteen saatavuuteen ja Fock-reaktiivisuuteen. Entsymaattisessa käsittelyssä käytettiin endoglukanaasia (Novozyme Fibercare U), jonka sellulolyyttinen aktiivisuus oli 219 u/mL. Tutkimuksessa entsymaattiset käsittelyt suoritettiin eri sellulaasiannostuksilla. Taulukossa 2 on esitetty liukosellun ominaisuuksien muutokset ennen entsymaattista käsittelyä ja jälkeen entsymaattisen käsittelyn. Tutkimuksessa sellulaasikäsittely suoritettiin 55 °C lämpötilassa 120 minuutin ajan liukosellumassan ollessa 4 % sakeudessa.

Taulukko 2. Entsymaattisen käsittelyn vaikutukset liukosellun ominaisuuksiin (Miao et al. 2014).

	Huokostilavuus ($x10^{-3}$ cm^3/g)	Viskositeetti (ml/g)	Fock-reaktiivisuus (%)
Käsittelemätön liukosellu, entsyymiannostus (0 u/g)	4,79	634,8	47,67
Käsitelty liukosellu, entsyymiannostus (0,5 u/g)	6,74	490,8	66,02
Käsitelty liukosellu, entsyymiannostus (5,0 u/g)	-	-	87,87

Kuten taulukosta 2 nähdään, entsymaattinen käsittely kasvatti liukosellun huokostilavuutta noin 40 % sellulaasiannostuksen ollessa 0,5 u/g. Miao et al. (2014) mukaan entsymaattisen käsittelyn seurauksena selluloosan kuiturakenteesta tulee huokoisempi, mikä kasvattaa selluloosan saatavuutta viskoosiprosessin ksantaatioreaktiossa. Tämä johtaa liukosellun Fock-reaktiivisuuden kasvuun. Liukosellun keskimääräisen molekyylipainon lasku sai aikaan viskositeetin pienenemisen. Samalla sellulaasiannostuksella (0,5 u/g) liukosellun Fock-reaktiivisuus kasvoi noin 18 prosenttiyksikköä. Suuremmalla sellulaasiannostuksella (5,0 u/g), Fock-reaktiivisuus kasvoi alkuperäisestä arvosta jopa 40 prosenttiyksikön verran. Miao et al. (2014) tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että sellulaasikäsittelyt parantavat liukosellun Fock-reaktiivisuutta merkittävästi.

Duan et al. (2016) tutkivat tutkimuksessaan entsymaattisen käsittelyn vaikutusta valkaisemattoman PHK-liukosellun viskositeettiin ja Fock-reaktiivisuuteen.

Tutkimuksessa sellumassan valkaisuun käytetty hypokloriittivaihe korvattiin entsymaattisella käsittelyllä endoglukanaaseja hyödyntäen. Liukosellun alkuperäinen viskositeetti ennen hypokloriittivaihetta tai entsymaattista käsittelyä oli 944 mL/g. Tutkimuksen mukaan hypokloriittivaiheen jälkeen liukosellun viskositeetti laski arvoon 560 mL/g, kun taas entsymaattisen käsittelyn jälkeen viskositeetti oli 557 mL/g. Entsymaattinen käsittely kasvatti liukosellun Fock-reaktiivisuuden noin 72 %:iin, kun hypokloriittivaiheen jälkeen Fock-reaktiivisuus oli vain 46,7 %. Entsymaattinen käsittely vaikutti liukosellun viskositeettiin yhtä tehokkaasti kuin kemialliseen käsittelyyn perustuva hypokloriittivaihe. Tutkimus osoitti sen, että entsymaattista käsittelyä voidaan pitää hyvänä vaihtoehtona korvaamaan myrkylliset, kemikaaleja vaativat liukosellun käsittelyvaiheet.

6.1.2 Liukosellun hemisellulaasikäsittely

Jotta liukosellusta saataisiin mahdollisimman kirkasta ja tasalaatuista, on sen sisältämän hemiselluloosapitoisuuden oltava mahdollisimman alhainen. Liukosellun valmistusvaiheessa hemiselluloosa saadaan eristettyä puuhakkeesta liuottamalla. Käsittelyssä puuhakkeesta vapautuvat orgaaniset hapot hydrolysoivat hemiselluloosaa vesiliukoisiksi hiilihydraateiksi. (Sixta 2006a) Hemiselluloosa halutaan poistaa mahdollisimman tehokkaasti, sillä jäljelle jäänyt hemiselluloosa heikentää selluloosan saatavuutta ja reaktiivisuutta jatkoprosesseissa, kuten selluloosajohdannaisten valmistuksessa. Mahdollisimman matala hemiselluloosapitoisuus on tärkeää, jotta saadaan tuotettua mahdollisimman korkean reaktiivisuuden omaavaa selluloosaa. Esimerkiksi viskoosikuitua valmistettaessa liukosellun sisältämän hemiselluloosan poisto on välttämätöntä, sillä NaOH-liuokseen liuetessaan hemiselluloosa heikentää selluloosan reagointia, selluloosaksantaatin muodostumista ja vähentää selluloosan reaktiivisuutta. Hemiselluloosan poistamiseen voidaan käyttää entsymaattista käsittelyä. Hemisellulaasikäsittelyissä entsyymeinä voivat toimia endoksylanaasit, jotka hydrolysoivat hemiselluloosan sisältämää ksylaania. (Yang et al. 2019) Hemiselluloosan poistamiseen voidaan käyttää menetelmää, jossa esikäsittelynä hyödynnetään ksylanaasikäsittelyä ja jälkikäsittelynä alkalista käsittelyä (Gehmayr et al. 2011).

6.1.3 Liukosellun mekaaninen esikäsittely

Entsymaattisen käsittelyn vaikutuksia voidaan parantaa yhdistämällä käsittely mekaaniseen jauhatukseen, alkalikäsittelyyn tai lisäaineiden käyttöön. Ennen varsinaista entsymaattista käsittelyä suoritettu mekaaninen käsittely edistää kuitujen fibrilloitumista ja laajentaa selluloosan ominaispinta-alaa, minkä seurauksena reaktiopinta-ala kasvaa ja entsymaattinen käsittely tehostuu entisestään. (Yang et al. 2019)

Miao et al. (2015) yhdistivät tutkimuksessaan mekaanisen käsittelyn ja sellulaasikäsittelyn kasvattaakseen liukosellun Fock-reaktiivisuutta. Lehtipuupohjaisesta sulfaattisellusta valmistettu liukosellu esikäsiteltiin mekaanisesti PFI-jauhatuksella. Jauhatuksen jälkeen liukosellu käsiteltiin endoglukanaasilla (Novozyme Fibercare D), jonka sellulolyyttinen aktiivisuus oli 658 u/ml. Käsiteltäessä liukosellua ainoastaan sellulaasikäsittelyllä, Fock-reaktiivisuus kasvoi 49,6 %:sta 75,8 %:iin. Yhdistämällä mekaaninen jauhatus ja sellulaasikäsittely, liukosellun Fock- reaktiivisuus kasvoi 49,6 %:sta 81,7 %:iin. Mekaaninen PFI-jauhatus edisti selluloosakuitujen fibrilloitumista, jonka seurauksena selluloosan mikrokuitujen määrä kasvoi. Sellulaasien hydrolysoinnin seurauksena kuiturakenteen pinta muuttui ominaisuuksiltaan huokoiseksi ja karkeaksi. Yhdistämällä mekaaninen jauhatus ja sellulaasikäsittely, kuiturakenteen pinta-ala laajeni sekä huokosten määrä ja koko kasvoivat. Ominaisuuksien muuttumisen ansiosta liukosellun sisältämän selluloosan saatavuus ja reaktiivisuus parantuivat ksantaationreaktion edistämiseksi viskoosiprosessissa.

Zhao et al. (2017) tutkivat mekaanisen jauhatuksen ja ksylanaasilla toteutetun hemisellulaasikäsittelyn yhteisvaikutusta hemiselluloosan poistamiseksi liukosellusta, joka oli valmistettu bambupohjaisesta sulfaattisellusta. Tutkimustulosten mukaan PFI-jauhatus vaikutti kuidun fysikaalisiin ominaisuuksiin lyhentämällä kuitujen keskimääräistä pituutta sekä lisäämällä hienoaine- ja α-selluloosapitoisuutta. Jauhatuksen todettiin edistävän kuitujen fibrilloitumista, lisäävän kuidun pinta-alaa ja huokostilavuutta. Jauhatuksen seurauksena kuiturakenteen sisältämän ksylaanin saatavuus kasvoi, mikä kasvatti ksylanaasin hydrolysoinnin tehokkuutta. Samanlaisia mekaanisen käsittelyn hyötyjä havaittiin myös Miao et al. (2014) tutkimuksessa.

6.2 Muiden selluloosapohjaisten valmisteiden entsymaattiset käsittelyt

Selluloosananomateriaaleilla on suuri ominaispinta-ala, minkä johdosta ne ovat ominaisuuksiltaan hyvin reaktiivisia. Reaktiivisuuden ansiosta niiden pinta on helposti muokattavissa erilaisilla käsittelyillä, kuten entsymaattisilla käsittelyillä. Selluloosananofibrillien (CNF) valmistuksessa entsymaattista käsittelyä voidaan käyttää haluttujen ominaisuuksien ja toiminnallisuuksien saavuttamiseksi sekä energiankulutuksen pienentämiseksi. Entsymaattinen käsittely muuntaa selluloosakuidun rakennetta siten, että kuituuntuminen helpottuu, jolloin selluloosamateriaalin prosessointiin vaadittu energiankulutus pienenee. (Kangas 2014, s.15:21–23) Pääkkö et al. (2007) käyttivät tutkimuksessaan entsymaattista käsittelyä esikäsittelynä mekaanisen käsittelyn tehostamiseksi selluloosananofibrillien valmistuksessa. Ennen varsinaista entsymaattista käsittelyä sellumassa jauhettiin selluloosan kuiturakenteen paljastamiseksi. Varsinaisessa entsymaattisessa käsittelyssä käytettiin endoglukanaasiyhdistettä (Novozym 476, Novozym A/S). Entsymaattisen käsittelyn jälkeen sellumassa jauhettiin uudelleen ja korkeapainehomogenisoitiin. Tutkimuksessa käytetyllä menetelmällä saatiin tuotettua halkaisijaltaan 5–6 nanometrin selluloosananofibrillejä ja 10–20 nanometrin fibrilliaggregaatteja.

Mikrokiteisen selluloosan valmistuksessa entsymaattista käsittelyä voidaan hyödyntää korvaamaan perinteinen happohydrolyysi. Tutkimuksessaan Stupińska et al. (2007) valmistivat onnistuneesti mikrokiteistä selluloosaa valkaistusta liukosellusta kaksivaiheisella säteily-entsyymiprosessilla. Agblevor et al. (2007) hyödynsivät entsymaattista käsittelyä valmistaessaan mikrokiteistä selluloosaa maissintähkästä ja puuvillan siemenjätteestä. Tutkimuksessaan he huomasivat, että entsymaattinen käsittely vaikutti mikrokiteisen selluloosan pintaominaisuuksiin muuttamalla partikkelien reunat terävimmiksi.

Lyyttisten polysakkaridimono-oksigenaasien (LPMO) käyttöä selluloosakuitujen entsymaattisissa käsittelyissä on alettu tutkia enemmän. LPMO:ien toimintamekanismi perustuu hapetukseen. Hapettavina entsyymeinä LPMO:t voivat olla apuna selluloosakuitujen hydrolyysissä. Esimerkiksi Villares et al. (2017) tutkivat LPMO:ien vaikutuksia selluloosakuitujen rakenteeseen ja ominaisuuksiin. Tutkimuksessa

havupuupohjaista valkaistua sulfaattisellua käsiteltiin eräällä AA9-entsyymiperheeseen kuuluvalla LPMO:lla. Tutkimuksessa LPMO-käsittelyn todettiin heikentävän selluloosakuidun rakennetta, kun LPMO:t loivat rakenteeseen eräänlaisia lovikohtia. Käsittelyn jälkeen selluloosakuitujen todettiin olevan alttiimpia mekaaniselle käsittelylle ja kuitujen fibrilloituvan voimakkaasti. LPMO:ien hapettavan toimintamekanismin ansiosta selluloosakuiduista saadaan alttiimpia tavanomaisten sellulaasien, kuten endoglukanaasien entsymaattiselle hydrolyysille. (Villares et al. 2017) Myös Hu et al. (2018) hyödynsivät LPMO-käsittelyä yhdessä endoglukanaasin ja ksylanaasin kanssa sulfaattisellun muokkaamisessa.

6.3 Entsymaattisten käsittelyjen hyödynnettävyys

Entsymaattiset käsittelyt nähdään lupaavina ja ympäristöystävällisinä menetelminä, vaikka niiden hyödynnettävyyteen tosin liittyy vielä ongelmia. Ongelmat liittyvät entsyymien teollisen käytön lisäämiseen ja käytön kannattavuuteen. Yang et al. (2019) mukaan entsyymien hyödyntämistä rajoittavat niiden vaativat toimintaolosuhteet ja korkeat käyttökustannukset. Entsymaattinen käsittely vaatii toimiakseen optimaaliset toimintaolosuhteet esimerkiksi pH-arvon ja lämpötilan suhteen. Toimintaolosuhteiden lisäksi entsymaattisen käsittelyn tehokkuuteen vaikuttavat prosessointiaika ja entsyymiannostus. Toimintaolosuhteiden on oltava entsyymille suotuisat, jotta entsymaattisessa käsittelyssä kuitumateriaalin morfologia ja ominaisuudet eivät muutu liikaa. Vääränlainen käsittely voi johtaa merkittävien ominaisuuksien, kuten lujuusominaisuuksien heikkenemiseen. (Kangas 2014, s. 23) Entsyymien ollessa tehottomia, prosessin prosessointiajat ovat pitkiä ja siten energiaintensiivisiä (Zhao et al. 2017). Lisäksi entsyymien kierrättäminen uudelleen käytön mahdollistamiseksi on huonoa. Pitkien prosessointiaikojen ja huonon entsyymien kierrätettävyyden vuoksi eräissä prosesseissa entsymaattisia käsittelyjä ei suosita ollenkaan, vaan käsittely yhdistetään kemiallisen käsittelyn kanssa. (Vanhatalo 2017, s.23) Parantamalla entsyymien tehokkuutta sekä talteenottoa ja kierrätettävyyttä, voitaisiin vaikuttaa merkittävästi entsymaattisen käsittelyn kokonaiskäyttökustannuksiin ja sen myötä entsyymien teollisen käytön kannattavuuteen (Yang et al. 2019).

Vakiintuneiden käyttökohteiden, kuten sellun valkaisun lisäksi entsymaattisia käsittelyjä voitaisiin hyödyntää laajemmin uusissa sovelluskohteissa. Tutkimus- ja kehitystyöllä voidaan löytää ratkaisuja ongelmiin, jotta entsymaattiset käsittelyt olisivat kannattavia ja entsyymien käyttö yleistyisi teollisissa käyttökohteissa. Viskoosikuidun tuotantoprosessi voitaisiin saada ympäristöystävällisemmäksi, kun myrkyllisen rikkihiilen käyttö korvattaisiin osittain tai kokonaan entsymaattisella käsittelyllä. Esimerkiksi Gehmayr et al. (2010) hyödynsivät entsymaattisia käsittelyjä esikäsittelyn tavoin viskoosikuidun valmistuksessa. Tutkimustulokset osoittivat sen, että entsymaattisilla käsittelyillä voidaan vähentää valkaisu- ja puhdistusvaiheita sekä laskea niissä käytettävien kemikaalien kulutusta. Entsymaattisia käsittelyjä voitaisiin hyödyntää laajemmin muissakin tekstiilisovelluksissa. Tällä hetkellä entsymaattisia käsittelyjä hyödynnetään Biocelsol-kuidun valmistuksessa, jossa kuitua valmistetaan entsyymikäsitellystä sellusta ilman myrkyllisen rikkihiilen käyttöä (Mäki 2018).

7 YHTEENVETO

Työssä käsiteltiin entsymaattisia käsittelyjä ja käsittelyn vaikutuksia selluloosavalmisteiden muokkaamisessa. Liukosellun sellulaasikäsittelyt toteutettiin pääasiassa endoglukanaaseilla (EG) ja sellobiohydrolaaseilla (CBH). Endoglukanaasien ja sellobiohydrolaasien hydrolysoinnin seurauksena selluloosaketjun polymeroitumisaste alenee ja molekyylipaino pienenee, jolloin liukosellun viskositeetti laskee. Viskositeetin laskun seurauksena liukosellun alkaliliukoisuus paranee, jolloin liukosellusta tulee alttiimpi alkalisille käsittelyille. Entsymaattisten käsittelyjen seurauksena liukosellun selluloosakuidusta tulee huokoisempi, mikä kasvattaa selluloosan saatavuutta ja reaktiopinta-alaa kemiallisten reaktioiden edistämiseksi viskoosiprosessin ksantaatioreaktiossa. Entsymaattisten käsittelyjen todettiin vaikuttavan merkittävästi regeneroituneen selluloosan määrää kuvaavan Fock-reaktiivisuuden kasvuun. Suurilla sellulaasiannostuksilla Fock-reaktiivisuutta saatiin kasvatettua jopa 40 prosenttiyksikön verran. Reaktiivisuuden parannuttua liukosellun kemiallinen muokattavuus helpottuu, mikä edesauttaa liukosellun prosessoitavuutta johdannaisten valmistuksessa. Reaktiivisuuden parannuttua kemikaalitarve prosesseissa on vähäisempi. Hemisellulaasikäsittelyt pilkkovat kuidun pinnalta hemiselluloosaa tehden liukosellusta tasalaatuisempaa. Hemiselluloosapitoisuuden alennuttua liukosellun reaktiivisuus kasvaa, mikä edistää liukosellun alkaliselluloosan reagointia rikkihiilen kanssa selluloosaksantaatin muodostamiseksi viskoosiprosessissa.

Entsyymien hydrolysoinnin seurauksena selluloosananomateriaalien kuiturakenne saadaan näkyviin ja kuituuntuminen helpottuu. Tämä vähentää prosessien energiankulutusta. Mikrokiteisen selluloosan valmistuksessa entsymaattisella käsittelyllä voidaan korvata myrkyllinen happohydrolyysi valmistusmenetelmä. Hapettavina entsyymeinä LPMO:t voivat edistää selluloosakuitujen hydrolyysiä. Hapetuksen seurauksena selluloosakuidun rakenne muuttuu alttiimmaksi perinteisten sellulaasien, kuten endoglukanaasien entsymaattiselle hydrolyysille.

Tutkimusartikkelien tutkimustulosten perusteella voidaan todeta entsymaattisten käsittelyjen olevan ympäristöystävällinen vaihtoehto selluloosavalmisteiden erityisominaisuuksien saavuttamiseen vähemmällä kemikaalikulutuksella.

Entsymaattisilla käsittelyillä poistetaan kuiturakenteesta epäpuhtauksia, jolloin seuraavien prosessointivaiheiden kemikaalit voivat reagoida helpommin. Näin eri prosessointivaiheissa käytettyjen kemikaalien kulutus laskee. On odotettavissa, että entsymaattiset käsittelyt ympäristöystävällisinä ja kestävinä menetelminä tulevat nousemaan merkittäviksi menetelmiksi teollisessa mittakaavassa.

LÄHDELUETTELO

Agblevor F., Ibrahim M., El-Zawawy W., (2007). Coupled acid and enzyme mediated production of microcrystalline cellulose from corn cob and cotton gin waste. Cellulose, 14, pp. 247–256

Aittomäki E., Eerikäinen T., Leisola M., Ojamo H., Suominen I., von Weymarn N., (2002). Bioprosessitekniikka. Porvoo: Werner Söderström Osakeyhtiö, 445 p. ISBN 951-0-26995-6

De Souza W.R., (2013). Microbial degradation of lignocellulosic biomass. In: Chandel A.K., da Silva S.S. (Ed.) Sustainable Degradation of lignocellulosic biomass - Techniques, applications and commercialization. Croatia: IntechOpen, pp. 207–247 ISBN 978-953-51-1119-1

Duan C., Verma S.K, Li J., Ma X., Ni Y., (2016). Viscosity control and reactivity improvements of cellulose fibers by cellulase treatment. Cellulose, 23, pp. 269-276

Fock W., (1959). A Modified method for determining the reactivity of viscose-grade dissolving pulps. Das Papier 13(3), 92 p.

Gehmayr V., Schild G., Sixta H., (2011). A precise study on the feasibility of enzyme treatments of a kraft pulp for viscose application. Cellulose, 18(2), pp. 479-491

Hellner G., (2011). Application of lipolytic enzymes of microbial origin as biocatalysts, Ph.D. dissertation [online document]. Hungary: Corvinus University of Budabest, Available from: http://phd.lib.uni-corvinus.hu/568/2/Hellner_Gabriella_ten.pdf [cited on 12.03.2020] 132 p.

Hon D.N.-S., (1996). Functional Natural Polymers: A New Dimensional Creativity in Lignocellulosic Chemistry. In: Hon D.N.-S. (Ed.) Chemical Modification of Lignocellulosic Materials. 1. edition. New York, USA: Marcel Dekker, pp. 1-10 ISBN 978-0-824-79472-9

Hu J., Tian D., Renneckar S., Saddler J. N., (2018). Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. Scientific reports, 8, pp. 1-8

Johansen K.S., (2016). Lytic Polysaccharide Monooxygenases: The Microbial Power Tools for Lignocellulose Degradation. Trends in Plant Science, 21(11), pp. 926-936

Kamppuri T., Vehviläinen M., Backfolk K., Heiskanen I., (2016). Characterization of endoglucanase rich Trichoderma reesei cellulase mixtures and their effect on alkaline solubility of dissolving pulp. Cellulose, 23(6), pp. 3901–3911

Kangas H., (2014). Opas selluloosananomateriaaleihin. VTT Technology, No. 199. [online document]. Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland. Available from: https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/technology/2014/T199.pdf [cited on 15.11.2020] 97 p. ISBN 978-951-38-8194-8

KnowPulp, (2021). Sellutekniikan ja automaation oppimisympäristö. Versio 19.00, päivitetty 1/2021. Helsinki: Taitotalo ja Prowledge Oy. Available from: http://www.knowpulp.com/extranet/suomi/kps/ui/knowpulp.htm [cited on 30.05.2021]

Kont R., Pihlajaniemi V., Borisova A.S., Aro N., Marjamaa K., Loogen J., Büchs J., Eijsink V.G.H., Kruus K., Väljamaë P., (2019). The liquid fraction from hydrothermal pretreatment of wheat straw provides lytic polysaccharide monooxygenases with both electrons and H_2O_2 co-substrate. Biotechnology for Biofuels, 12, 235

Krässig H., Schurz J., Steadman R.G., Schliefer K., Albrecht W., Mohring M., Schlosser H., (2004). Cellulose. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. (Ed.) Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 279-332 ISBN 978-3-527-30673-2

Linder M., Salovuori I., Ruohonen L., Teeri T.T., (1996). Characterization of a double cellulose-binding domain: Synergistic high affinity binding to crystalline cellulose. Journal of Biological Chemistry, 271(35), pp. 21268-21272

Miao Q., Chen L., Huang L., Tian C., Zheng L., Ni Y., (2014). A Process for enhancing the accessibility and reactivity of hardwood kraft-based dissolving pulp for viscose rayon production by cellulase treatment. Bioresource Technology, 154, pp. 109-113

Miao Q., Tian C., Chen L., Huang L., Zheng L., Ni Y., (2015). Combined mechanical and enzymatic treatments for improving the Fock reactivity of hardwood kraft-based dissolving pulp. Cellulose, 22, pp. 803–809

Mäki S., (2018). Suomessa kehitetään uusia ekologisia tekstiilikuituja – tutustu uusiin materiaaleihin, joista kuullaan vielä! [online document]. Suomen tekstiili & muoti. Available from: https://www.stjm.fi/uutiset/suomessa-kehitetaan-uusia-ekologisia-tekstiilikuituja-tutustu-uusiin-materiaaleihin-joista-kuullaan-viela/ [cited on 14.05.2021]

Palonen H., (2004). Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Publications 520 [online document]. Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland. Available from: https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/publications/2004/P520.pdf [cited on 13.09.2020] 80 p.

Pääkkö M., Ankerfors M., Kosonen H., Nykänen A., Ahola S., Österberg M., Ruokolainen J., Laine J., Larsson P.T., Ikkala O., Lindström T., (2007). Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. Biomacromolecules, 8, pp. 1934–1941

Rahkamo L., Siika-Aho M., Vehviläinen M., Dolk M., Viikari L., Nousiainen P., Buchert J., (1996). Modification of hardwood dissolving pulp with purified Trichoderma reesei cellulases. Cellulose, 3, pp. 153-163

Sain M., Oksman K., (2006). Introduction to cellulose nanocomposites. In: Sain M. & Oksman K. (Ed.) Cellulose Nanocomposites, ACS Symposium Series. Washington, DC, United States: American Chemical Society, pp. 2–8 ISBN 9780841239807

Sixta H., (2006a). Introduction. In: Sixta H. (Ed.) Handbook of Pulp. 1.edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 2–19 ISBN 978-3-527-30999-3

Sixta H., (2006b). Chemical Pulping Processe: Sections 4.2.8-4.3.6.5. In: Sixta H. (Ed.) Handbook of Pulp. 1.edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 366-509 ISBN 978-3-527-30999-3

Sixta H., (2006c). Pulp Properties and Applications. In: Sixta H. (Ed.) Handbook of Pulp. 1.edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1009–1067 ISBN 978-3-527-30999-3

Sixta H., Potthast A., Krotschek A.W., (2006). Chemical Pulping Processe: Sections 4.1-4.2.5. In: Sixta H. (Ed.) Handbook of Pulp. 1.edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 109–229 ISBN 978-3-527-30999-3

Stupińska H., Iller E., Zimek Z., Wawro D., Ciechańska D., Kopania E., Palenik J., Milczarek S., Stęplewski W., Krzyżanowska G., (2007). An environment-friendly method to prepare microcrystalline cellulose. Fibres & Textiles in Eastern Europe, 15, pp. 167-172

Suurnäkki A., Tenkanen M., Buchert J., Viikari L., (1997). Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. In: Eriksson K.-E.L. (Ed.) Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. BerlinHeidelberg, Germany: Springer, pp. 261-287 ISBN 978-3-540-61868-3

Tian C., (2013). Improvement in the Fock test for determining the reactivity of dissolving pulp. Tappi Journal, 12, pp. 21-26

Tian C., Zheng L., Miao Q., Cao C., Ni Y., (2014). Improving the reactivity of kraft-based dissolving pulp for viscose rayon production by mechanical treatments. Cellulose, 21(5), pp. 3647–3654

Vanhatalo K., (2017). A new manufacturing process for microcrystalline cellulose (MCC), Aalto University publication series DOCTORAL DISSERTATIONS 152/2017 [online document]. Espoo: Aalto University. Available from: https://aaltodoc.aalto.fi/bitstream/handle/123456789/28047/isbn9789526075648.pdf?sequence=1&isAllowed=y [cited on 15.3.2021] 166 p. ISBN 978-952-60-7564-8

Vehviläinen M., (2015). Wet-spinning of cellulosic fibres from water-based solution prepared from enzyme-treated pulp, Publication 1312 [online document]. Tampere:

Tampere University of Technology. Available from: https://trepo.tuni.fi/bitstream/handle/10024/114278/vehvilainen_1312.pdf?sequence=1&isAllowed=y [cited on 12.01.2021] 160 p. ISBN 978-952-15-3555-0

Viikari L., Grönqvist S., Kruus K., Pere J., Siika-aho M., Suurnäkki A., (2010). Industrial Biotechnology in the Paper and Pulp Sector. In: Soetaert W. & Vandamme E.J. (Ed.) Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 385–412 ISBN 978-3-527-31442-3

Villares A., Moreau C., Bennati-Granier C., Garajova S., Foucat L., Falourd X., Saake B., Berrin J.-G., Cathala, B. (2017). Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. Scientific Reports, 7, 40262

Wahlström R., (2014). Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous ionic liquids, VTT science 52 [online document]. Espoo: VTT Technical Research Centre of Finland. Available from: https://www.vttresearch.com/sites/default/files/pdf/science/2014/S52.pdf [cited on 14.08.2020] 102 p. ISBN 978-951-38-8115-3

Wilkes A.G., (2001). 3-The viscose process. In: Woodings C. (Ed.) In Woodhead Publishing Series in Textiles, Regenerated Cellulose Fibres. Cambridge, U.K.: Woodhead Publishing. pp. 37-61 ISBN 978-1-855-73459-3

Wüstenberg T., (2014). Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications. Weinheim, Germany: John Wiley & Sons. 554 p. ISBN: 978-3-527-68296-6

Yang S., Yang B., Duan C., Fuller D.A., Wang X., Chowdhury S.P., Stavik J., Zhang H., Ni Y., (2019). Applications of enzymatic technologies to the production of high-quality dissolving pulp: a review. Bioresource technology, 281, pp. 440-448

Zhao L., Yuan Z., Kapu N.S., Chang X.F., Beatson R., Trajano H.L., Martinez D.M., (2017). Increasing efficiency of enzymatic hemicellulose removal from bamboo for production of high-grade dissolving pulp. Bioresource technology, 223, pp. 40–46