

Lappeenrannan teknillinen yliopisto  
LUT Teknis-luonnontieteellinen  
Kandidaatintyö

## **Sellulaasit ja niiden käyttö teollisuudessa**

Risto Mäkelä  
20.1.2015

## TIIVISTELMÄ

Tekijä: Risto Mäkelä  
Nimi: Sellulaasit ja niiden käyttö teollisuudessa  
Yksikkö: LUT Teknis-luonnontieteellinen  
Vuosi: 2015

Kandidaatintyö, 24 sivua, 4 kuvaa, 3 taulukkoa

Työn tarkastaja: Kaj Backfolk  
Työn ohjaaja: Katja Lyytikäinen

Avainsanat: selluloosa, entsyymaattinen hydrolyysi, sellulaasi

Selluloosa on yksi maapallon yleisimmistä uusiutuvista raaka-aineista. Selluloosan hyödyntäminen on ollut kuitenkin vaikeaa, koska se on sitoutunut tiiviisti hemiselluloosaan ja ligniiniin. Tämän takia sen erottaminen on vaatinut korkeita lämpötiloja ja myrkyllisiä kemikaaleja. Luonnossa selluloosa hajoaa matalassa lämpötilassa ilman myrkyllisiä kemikaaleja lahottajasienten ja bakteerien avustuksella. Ne käyttävät selluloosan hajottamiseen entsyymejä kuten sellulaaseja, jotka ovat luonnon omia katalyyttejä.

Sellulaaseja on alettu käyttämään laajasti myös eri teollisuuden aloilla, kuten paperi-, sellu-, tekstiiliteollisuudessa ja bioetanolin valmistuksessa. Niiden käyttö perustuu joko selluloosan täydelliseen tai osittaiseen hydrolyysiin. Osittaisessa hydrolyysissä selluloosakuitujen ominaisuuksia muokataan prosessiin sopiviksi esimerkiksi turvottamalla kuituja tai muokkaamalla niiden fibrillaatio-ominaisuuksia. Täydellisessä hydrolyysissä selluloosa hydrolysoidaan glukoosiksi. Sellulaaseja voidaan myös geenimuokata, jolloin niistä saadaan esimerkiksi paremmin korkeampia lämpötiloja tai laajempaa pH-vaihtelua kestäviä.

## SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO .....	2
2	SELLULOOSA.....	3
3	ENTSYYMIT .....	4
3.1	Hydrolaasit .....	6
3.2	Sellulaasit .....	6
3.3	Hemisellulaasit.....	8
4	SELLULOOSAN TÄYDELLINEN HYDROLYYSI.....	9
4.1	Selluloosan happohydrolyysi .....	10
4.2	Selluloosan entsyymattinen hydrolyysi.....	10
4.3	Selluloosan entsyymattisen hydrolyysin mekanismi .....	11
5	SELLULOOSAN OSITTAINEN HYDROLYYSI.....	13
5.1	Sellulaasien käyttö paperi- ja selluteollisuudessa .....	14
5.1.1	Sellulaasit musteenpoistossa.....	14
5.1.2	Sellulaasit sellun jauhatuksessa .....	15
5.1.3	Sellulaasien muut paperi- ja selluteollisuussovellukset.....	16
5.2	Sellulaasien käyttö tekstiiliteollisuudessa.....	17
5.2.1	Kankaiden värien haalennus .....	17
5.2.2	Kankaiden viimeistely .....	18
5.3	Sellulaasien muut käyttökohteet teollisuudessa.....	18
6	YHTEENVETO SELLULAASIEN KÄYTTÖSOVELLUKSISTA JA TULEVAISUUDEN NÄKYMISTÄ.....	19
	LÄHTEET .....	22

## 1 JOHDANTO

Tiukentunut ympäristölainsäädäntö, pyrkimys energian säästämiseen ja kemikaalikuormien vähentämiseen ovat ajaneet yrityksiä kehittämään prosessejaan ympäristöystävällisempään suuntaan. Myös fossiilisten polttoaineiden korkea hinta on innostanut kehittämään vaihtoehtoisia ja uusiutuvaan energiaan perustuvia energiamuotoja. Lignoselluloosan ollessa maailman yleisempiä uusiutuvia luonnonvaroja ovat monet tahot intoutuneet kehittämään siitä tulevaisuuden energiamuotoa fossiilisten polttoaineiden tilalle. /1/

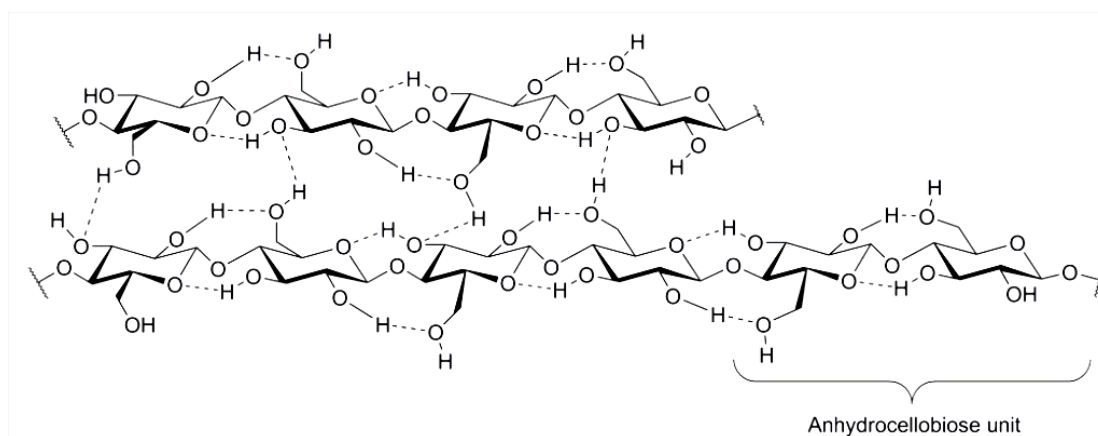
Lignoselluloosan hyödyntäminen polttoaineena on perinteisesti ollut haastavaa sen rakenteen heterogeenisyyden takia. Lisäksi sen hydrolyysiin on tarvittu vahvoja kemikaaleja ja monivaiheisia prosesseja. Entsyymit, kuten sellulaasit, ovat luonnollinen keino hajottaa lignoselluloosaa glukoosiksi ja viime vuosina niiden käyttö on merkittävästi lisääntynyt. Tähän asti suurin ongelma sellulaasien käytölle on ollut muun muassa niiden korkea hinta sekä niiden toimimattomuus korkeissa lämpötiloissa. Entsyymien jatkuva tutkiminen ja entsyymiteollisuuden kehittyminen ovat hiljalleen laskeneet niiden hintoja kemikaalien kanssa kilpailevalle tasolle. Samalla myös etsitään ja kehitetään uusia sellulaaseja, jotka kestäisivät paremmin teollisuudessa käytettäviä rajuja reaktio-olosuhteita. /1, 2/

Sellulaaseja voidaan hyödyntää kaikkialla, missä selluloosaa vain käytetään ja siksi niillä on käyttökohteita lähes rajattomasti. Niitä on jo vuosia käytetty muun muassa tekstiili-, paperi- ja selluteollisuudessa. Niiden avulla voidaan muokata selluloosakuituja paremmin prosessiin sopiviksi, sekä näin ollen saavuttaa energiasäästöjä ja laatuparannuksia sekä vähentää ympäristökuormaa. Tässä kandidaatintyön kirjallisuuskatsauksessa esitellään selluloosan entsyymaattisen hydrolyysin toimintamekanismi ja kerrotaan sellulaasien käytöstä aiheutuvista eduista ja haitoista eri teollisuussovelluksissa. /1, 2/

## 2 SELLULOOSA

Selluloosa on yleisin luonnossa esiintyvä polymeeri, joka on pääraaka-aineena puissa sekä monissa kasveissa lignoselluloosaan sitoutuneena pääasiassa hemiselluloosan ja ligniinin kanssa. Tämän takia sen saatavuus raaka-aineena on hyvä ja sille onkin kehitetty monia käyttötarkoituksia aina vaatteista paperiin kuin polttoaineisiinkin. /1/

Selluloosan ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> tehtävänä on antaa puissa ja kasveissa soluseinämälle lujuutta. Se on hydrofiilinen homopolysakkaridi, joka muodostuu glukoosiyksiköistä ja sen polymeroitumisaste on tavallisesti noin 5000-10000. Selluloosan glukoosiyksiköt ovat 180° kulmassa toisiinsa nähden ja näin ne muodostavat lineaarisen, mutta kierteisen akselin. Glukoosiyksiköt muodostavat selluloosamolekyylin sisällä ja toisten selluloosamolekyylin välille vahvoja vetysidoksia. Kiertyneet, toisiinsa sitoutuneet selluloosamolekyylit muodostavat molekyylinippuja, jotka muodostavat elementaarifibrillejä. Nämä edelleen yhdistyvät isommiksi mikrofibrillikimpuiksi, jotka orientoituvat kuidun eri sekundäärikerroksissa tiettyihin kulmiin tehden näin kuidusta lujan. Vetysidosten ohella myös kovalenttiset sidokset ja heikommat van der Waals -voimat auttavat pitämään mikrofibrillejä koossa. Kuvassa 1 on esitetty selluloosamolekyylin rakenne. /1, 3/



Kuva 1. Selluloosamolekyylin rakenne /1/.

Kuvasta 1 nähdään kuinka selluloosan glukoosiyksiköt muodostavat molekyylin sisäisiä ja molekyylin välisiä vetysidoksia. Pienin toistuva selluloosan rakenneosa on

kahdesta glukoosiyksiköstä muodostunut anhydrosellobioosiyksikkö. Selluloosamolekyylien järjestäytyminen toisiinsa nähden vaihtelee alueittain. Alueita, joissa selluloosamolekyylit ovat järjestäytyneet toistensa kanssa paremmin, kutsutaan kiteisiksi alueiksi ja huonommin järjestäytyneitä alueita ei-kiteisiksi eli amorfisiksi alueiksi. Amorfisilla alueilla on suuri vaikutus selluloosan reaktiivisuuteen, sillä vuorovaikutukset niin entsyymien kuin muidenkin yhdisteiden kanssa tapahtuvat nopeammin amorfisilla alueilla kuin kidealueen pinnalla. /1, 3/

Selluloosalla on ainakin kuusi erilaista rakennetta. Selluloosa I on selluloosan luonnollinen muoto, joka jakautuu I $\alpha$ - ja I $\beta$ -muotoihin. Amorfisten alueiden löyhempi rakenne mahdollistaa selluloosa I rakenteen  $\alpha$ - ja  $\beta$ -variaatiot. Selluloosan II-muoto johdetaan joko regeneroimalla tai merseroimalla selluloosa I. Selluloosa II on selluloosista termodynaamisesti kaikkein stabiilein muoto. Selluloosaa III ja IV on kumpaakin kaksi eri rakennemuotoa, jotka johdetaan selluloosista I ja II tiettyjen kemikaali- tai lämpökäsittelyjen avulla. /1, 3/

Selluloosa on sitoutunut etenkin puissa hyvin tiukasti hemiselluloosaan ja ligniiniin, mikä vaikeuttaa selluloosan talteenottoa lignoselluloosasta. Hemiselluloosapolymeeri koostuu selluloosan tapaan sokereista. Toisin kuin selluloosa, hemiselluloosat ovat kuitenkin heteropolymeerejä ja koostuvat erilaisista heksooseista ja pentooseista. Hemiselluloosia ovat muun muassa ksylaani ja glukomannaani. Hemiselluloosa on amorfinen ja täten myös selluloosaa helpommin hydrolysoituvaa. Ligniini puolestaan on hydrofobinen, amorfinen ja omaa selluloosaa ja hemiselluloosaa heterogeenisemmän rakenteen. Ligniini muodostuu kolmesta erilaisesta fenyylipropaaniyksiköistä; p-kumaryylialkoholi, koniferyylialkoholi ja sinapyylialkoholi. /1, 3/

### 3 ENTSYYMIT

Luonnossa olosuhteet eivät ole optimaalisia kemiallisille reaktioille, koska alhainen lämpötila 20-40 °C ja neutraali pH-alue eivät anna hyviä edellytyksiä riittäville

reaktionopeuksille. Kemialliset reaktiot ovat kuitenkin mukana kaikessa, mitä luonnossa tai esimerkiksi ihmisen kehossakin tapahtuu. Tämän takia olisikin tärkeää, että reaktiot tapahtuisivat nopeasti, jotta elämä olisi ylipäänsä mahdollista. Entsyymit ovat luonnossa esiintyviä biokatalyyttejä, jotka voivat nopeuttaa kemiallisia reaktioita usein jopa yli tuhatkertaisesti. Ihmiset ovat tietämättään käyttäneet entsyymeitä apunaan jo vuosituhansien ajan, sillä niin alkoholin käyminen sokerista alkoholiksi kuin alkoholin hapettuminen etikaksikin ovat entsyymien aikaansaannosta. /4/

Entsyymit ovat elämälle välttämättömiä proteiineja, jotka muodostuvat aminohappoketjuista ja ovat sitoutuneet toisiinsa peptidisidoksin. Ne eivät katalyytteinä itse muutu prosesseissa vaan mahdollistavat reaktioiden huomattavasti nopeamman etenemisen alentamalla reaktioihin tarvittavaa aktivoitumisenergiaa. Tämän vuoksi entsyymien katalysoimat reaktiot tapahtuvat huomattavasti alemmissa lämpötiloissa ja lähempänä neutraali pH:ta, kuin olisi mahdollista ilman entsyymeitä. Entsyymeille on ominaista myös korkea selektiivisyys, eli ei-toivottuja sivutuotteita ei yleensä muodostu ja näin ollen varsinainen tuote on helpommin erotettavissa ja saanto on korkeampi. /4, 5/

Entsyymit toimivat katalyytteinä hyvin erilaisissa prosesseissa ja ne voivat nopeuttaa niin molekyylien pilkkoutumista kuin niiden yhdistymistäkin. Entsyymit luokitellaan substraatin ja toimintamekanismin mukaan EC-luokituksen perusteella kuuteen pääluokkaan, jotka jakautuvat edelleen moniin alaluokkiin, sillä eri entsyymejä on tuhansittain. Taulukossa I on esitetty EC-luokituksen pääryhmät. /4, 5, 6/

Taulukko I. Entsyymien EC-luokittelu /4, 6/.

<b>Luokka</b>	<b>Tehtävä</b>
EC1/Oksidoreduktaasit	Katalysoi hapetus/pelkistysreaktioita
EC2/Transferaasit	Siirtää funktionaalisia ryhmiä yhdisteiden välillä
EC3/ Hydrolaasit	Hajottaa yhdiste lähtöaineiksi veden avulla
EC4/Lyaasit	Pilkkoo sidoksia muilla tavoin kuin hydrolysoimalla tai hapettamalla/pelkistämällä
EC5/Isomeraasit	Katalysoi isomeraatiomuutoksia molekyylissä
EC6/ligaasit	Auttaa muodostamaan sidoksia kahden molekyylin välille

Vain murto-osaa entsyymeistä hyödynnetään teollisuudessa, mutta geeniteknologian nopea kehittyminen on lisännyt käytettävien teollisuusentsyymien määrää sekä laskenut niiden hintoja kilpailukykyiselle tasolle /4/.

### **3.1 Hydrolaasit**

Teollisuudessa eniten hyödynnetty entsyymiluokka ovat hydrolaasit (EC 3.x.x.x), jonka alaluokista etenkin esteraasit, proteaasit ja glykosylaasit omaavat kaupallista potentiaalia. Niiden suosio perustuu siihen, että ne kestävät suhteellisen koviakin prosessiolosuhteita, eivätkä ne usein tarvitse toimiakseen erillisiä koentsyymejä. Koentsyymit ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka ovat monien entsyymien aktiivisuudelle välttämättömiä. Ne eivät kuitenkaan ole proteiinejä kuten entsyymit. Hydrolaasit katalysoivat hydrolyysireaktioita eli nopeuttavat yhdisteiden pilkkoutumista veden avulla ja ne jakautuvat 13 eri alaluokkaan, joista yhteen kuuluvat glykosylaasit (EC 3.2.x.x). Tämän luokan entsyymit hydrolysoivat -N -O ja -S glykosyyli-rakenteita. Glykosylaasit jakautuvat taas kolmeen alaluokkaan, joista yksi on glukosidaasit (EC 3.2.1.x) ja nämä puolestaan hydrolysoivat -O ja -S glykosyyli-rakenteita. Glukosidaasit jakautuvat vielä 195 eri alaluokkaan, joista sellulaaseja on ainakin kolmessa eri alaluokassa. Lignoselluloosan täydelliseen entsymaattiseen hydrolyysiin tarvitaan sellulaasien ohella myös hemisellulaaseja. /4, 6, 7, 8/

### **3.2 Sellulaasit**

Sellulaasit ovat yksi merkittävimmistä teollisuusentsyymeistä ja niiden uskotaan nousevan suurimmaksi teollisuusentsyymiryhmäksi lähitulevaisuudessa. Niitä hyödynnetään muun muassa tekstiili-, ruoka- ja selluteollisuudessa, mutta suurin kasvupotentiaali nähdään kuitenkin bioetanoli-tuotannossa. Sellulaaseja voidaan tuottaa eri sieni- ja bakteerilajien avulla. Teollisuusentsyymit valmistetaan pääasiassa *Trichoderma*- ja *Aspergillus*-suvun sienten avulla, sillä niistä saadaan kasvatettua



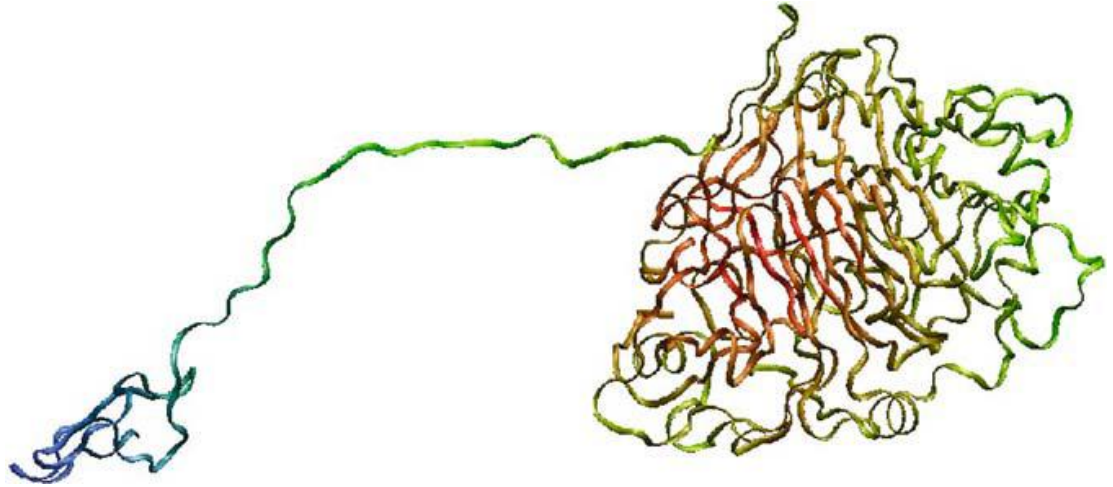
selluloosaa kustannustehokkaimmin. Kaupalliset sellulaasit ovat kuitenkin useimmiten eri sellulaasityyppien seoksia. /9, 10, 11, 13, 14/

Sellulaasit voidaan jaotella useisiin eri alaryhmiin, mutta ne kaikki hydrolysoivat selluloosan  $\beta$ -1-4-glykosididoksia. Yleensä tarvitaan näiden kaikkien sellulaasiryhmien seos, jotta selluloosa saadaan hydrolysoitua tehokkaasti glukoosiyksiköiksi. Sellulaasit jakautuvat toimintansa perusteella EC-luokituksessa kolmeen eri ryhmään, jotka ovat endoglukanaasit (EC 3.2.1.4),  $\beta$ -glukosidaasit (EC 3.2.1.21) ja sellobiohydrolaasit (EC 3.2.1.91). Jotta eri entsyymit olisivat paremmin vertailtavissa, ne voidaan jaotella myös aminohappojärjestyksensä perusteella eri ryhmiin. Niissä glukosidaasit jaotellaan GH-ryhmiin joita on 133 erilaista ja sellulaaseja kuuluu näistä ainakin 14 eri ryhmään. Nämä ryhmät jaotellaan vielä eri "klaaneihin" entsyymien kierrakenteen mukaan. Jaottelussa ja ryhmien määrässä ilmenee kuitenkin muutoksia sitä mukaa, kun tietämys sellulaaseista lisääntyy. Taulukossa II on esitetty sellulaasien EC- ja GH-ryhmittely. /7, 8/

Taulukko II. Sellulaasien EC-ryhmät, GH-ryhmät ja nimitykset /7, 8/.

EC-numero	Nimitykset	Toimintamekanismi	GH-ryhmät
3.2.1.4	endoglukanaasi, $\beta$ -1,4-glukanaasi	Hydrolysoi selluloosaa pätkiksi ei-kiteisiltä alueilta	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 45, 48, 51, 74
3.2.1.21	$\beta$ -glukosidaasi	Hydrolysoi sellobiooseja glukoosiyksiköiksi	1, 3, 9
3.2.1.91	eksoglukanaasi, sellobiohydrolaasi	Hydrolysoi selluloosaa sellobiooseiksi selluloosaketjujen kiteisten alueiden päistä	5, 6, 7, 9, 10, 48

Useimmat sellulaasit muodostuvat ei-katalyyttisestä CBM-osasta (carbohydrate-binding module) ja varsinaisesta katalyyttiosasta, jotka yhdistyvät toisiinsa joustavalla peptidilinkillä. CBM-osa on huomattavasti katalyyttiosaa pienikokoisempi ja sen avulla entsyymi pääsee paremmin kiinnittymään substraattiin. Kuvassa 2 on esitetty eräs sellulaasi, sellobiohydrolaasi, jossa alhaalla vasemmalla on CBM-osa ja oikealla varsinainen katalyyttiosa ja nämä ovat yhdistyneet toisiinsa peptididoksella. /8/



Kuva 2. Sellobiohydrolaasi /7/.

Sellulaasit toimivat miedoissa olosuhteissa kuten yleensäkin suuri osa entsyymeistä. Ne toimivat parhaiten pH-alueella 3-10 ja 30-60 °C lämpötilassa. Tosin toimintaolosuhteet riippuvat paljon sellulaasien alkulähteestä ja erimerkiksi eri sienistä kasvatetuilla sellulaaseilla vaihtelevat niin optimitoimintaolosuhteet kuin entsyymien aktiivisuuskin. Lisäksi sellulaasien geenimuokkauksella voidaan niiden ominaisuuksia koittaa muovata halutunlaisiksi ja näin ollen voidaan kehittää sellulaaseja, jotka kestävät esimerkiksi korkeampia lämpötiloja. Sellulaasit ovat myös helposti tuhottavissa prosessin jälkeen kohottamalla lämpötilaa. Niiden erottaminen prosesseista on usein vaikeaa uudelleenkäyttöä varten ja lisäksi ne eivät pysy tehokkaina kuin 2-3 käyttökertaa. Sellulaasien kierrätys voidaan suorittaa muun muassa ultrasuodatuksella tai prosessivesiä kierrättämällä, vaikkakin yleensä sellulaaseja käytetään vain kerran. /9, 10, 11/

### 3.3 Hemisellulaasit

Kuten edellä jo mainittiin, niin lignoselluloosan täydellinen entsyymaattinen pilkkominen monosakkarideiksi vaatii sellulaasien lisäksi hemisellulaaseja. Ne ovat vielä sellulaasejakin kirjavampi joukko eri entsyymejä, koska hemiselluloosan rakenne on selluloosarakennetta heterogeenisempi. Hemiselluloosa on kuitenkin

selluloosaa helpompi hydrolysoida sokereiksi, koska se ei omaa tiivistä kiderakennetta kuten selluloosa. Toisin kuin sellulaasit, jotka kaikki kuuluvat glukosidaaseihin, niin hemisellulaaseista osa kuuluu glukosidaasien ja hydrolaasien lisäksi vielä karboksyyliesterihydrolaaseihin. Nämä hydrolysoivat hemiselluloosan ja ligniinin välisiä esterisidoksia, jotka puolestaan auttavat ligniinin erottamisessa lignoselluloosasta. Hemisellulaaseja käytetään monissa prosesseissa yhdessä sellulaasien kanssa. /11, 12/

#### **4 SELLULOOSAN TÄYDELLINEN HYDROLYYSI**

Lignoselluloosa eli biomassa on edullista ja sen hydrolyysi on tunnettu jo kohta 200 vuotta, mutta silti sen käyttö sokerin tuotannon raaka-aineena ei ole ollut teollisesti kannattavaa verrattuna yleisimpiin sokerikasveihin sokeriruokoon ja sokerijuurikkaaseen. Tämä johtuu pääasiassa lignoselluloosan heterogeenisestä rakenteesta, jonka takia sokereiden erottaminen on monimutkaista ja kallista. Lignoselluloosan hydrolyysissä puu on pilkottava sopiviksi lastuiksi tai puruksi, jotta reaktiopinta-alaa puun, entsyymien ja kemikaalien välillä saadaan kasvatettua. Tämän jälkeen selluloosa voidaan hydrolysoida lignoselluloosasta monin eri tavoin, joista eniten käytetyt ovat happohydrolyysi tai entsyymikäsittely. /2, 15/

Kaikki tavat noudattavat kuitenkin pääpiirteittäin samaa kaavaa, jossa ensin hydrolysoidaan helpommin hydrolysoituva hemiselluloosa. Tämän jälkeen ligniinin ja selluloosan seoksesta hydrolysoidaan selluloosa ja lopuksi siitä erotetaan ligniini, joka voidaan esimerkiksi polttaa energiaksi. Tosin ligniinillä on monia muitakin potentiaalisia jalostuskohteita, joista mainittakoon liimat, fenolit ja muovien raaka-aineet polymeerisovelluksissa. Selluloosan ja hemiselluloosan monosakkaridit jatkofermentoidaan yleensä bioetanoliksi, joka konsentroidaan tislaamalla. Monosakkaridit voidaan jalostaa myös moniksi muiksi tuotteiksi, kuten butanoliksi, orgaanisiksi hapoiksi, asetoniksi, glyseroliksi tai vaikka ksylitoliksi ja muiksi sokereiksi. /2, 15/

#### **4.1 Selluloosan happohydrolyysi**

Selluloosan happohydrolyysi tapahtuu yleensä joko laimean tai vahvan rikkihapon avulla. Vahvalla rikkihapolla hydrolysoidessa voidaan toimia matalassa lämpötilassa ja saanto on korkea, jopa 90 % teoreettisesta glukoosisaannosta. Haittana ovat kuitenkin vahvan hapon aiheuttamat korroosio-ongelmat, myrkyllisyys, sekä hapon uudelleenkierrätys. Laimealla hapolla hydrolysoinnissa ei ole samanlaisia ongelmia myrkyllisyyden suhteen ja happoa kuluu vähemmän, mutta tällöin joudutaan toimimaan korkeammassa lämpötiloissa, noin 180-250 °C. Korkeammassa lämpötiloissa glukoosi alkaa kuitenkin hajota ja glukoosin saanto on noin 50-60 % teoreettisesta maksimisaannosta. Laimean hapon hydrolyysi onkin tehokkaampi keino pilkkoa hemiselluloosaa sokereiksi, sillä siinä voidaan saavuttaa jopa yli 90 % teoreettisesta maksimisaannosta, mutta yleensä tällöin on käytettävä kaksivaiheista prosessia. /16/

#### **4.2 Selluloosan entsyymaattinen hydrolyysi**

Sellulaasientsyymien annostelu suoraan lignoselluloosan sekaan johtaa selluloosan pilkkoutumiseen, mutta tällöin prosessi on hyvin hidas. Tämä johtuu lignoselluloosan rakenteesta, jossa selluloosa on tiiviisti sitoutuneena hemiselluloosaan ja ligniiniin, jolloin sellulaasientsyymit eivät pääse helposti kosketuksiin selluloosamolekyylien kanssa. Lignoselluloosan esikäsitteilyn avulla voidaan kuitenkin tehostaa sellulaasientsyymien vaikutusta, jotta sellulaasit pääsevät tehokkaammin hydrolysoimaan selluloosamolekyylejä. /17/

Tehokkaalla esikäsitteilyllä on tarkoitus saada hiilihydraatit mahdollisimman tarkasti talteen, saada lignoselluloosan rakennetta hajalle myöhempää entsyymikäsitteilyä varten, sekä estää sokerituotteiden jatkopilkkoutuminen. Tässä vaiheessa suurin osa hemiselluloosasta pilkkoutuu ja liukenee. Tärkeää on myös esikäsitteilyprosessin alhainen energiankulutus ja esikäsitteilyllä onkin merkittävä vaikutus koko hydrolyysiprosessiin taloudellisuuteen. Se voidaan toteuttaa monella tapaa, mutta

yleisimmät ovat höyrykäsittely joko rikkihapon kanssa tai ilman, tai käsittely kaasumaisella rikkidioksidilla. Myös alkaliset esikäsittelyt ovat mahdollisia. Esikäsittely voidaan myös tehdä kaksiportaisesti, jolloin hemiselluloosan ja selluloosan sokerit saadaan spesifisemmin talteen. Esikäsittely suoritetaan korkeissa lämpötiloissa, noin 180-210 °C, alhaisilla kemikaalikonsentraatioilla, noin 0-5 %, sekä lyhyillä ajanjaksoilla, noin 2-10 minuuttia. Siinä muodostuu kuitenkin entsyymaattista hydrolyysiä inhiboivia yhdisteitä, jotka rajoittavat glukoosin saantoa. /17/

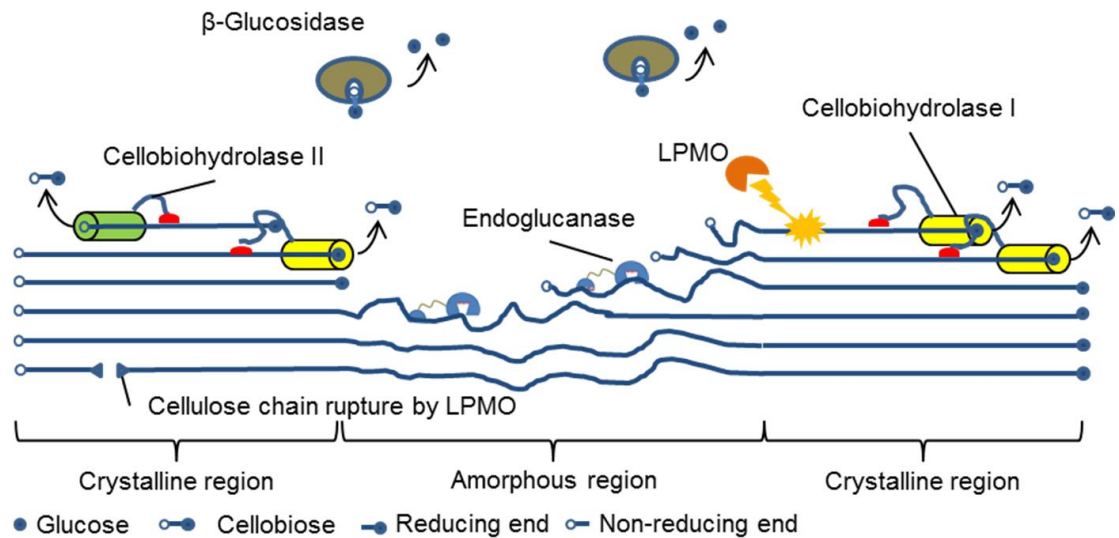
Varsinainen entsyymikäsittely tehdään miedoissa olosuhteissa, sillä sellulaasit eivät kestä kovia olosuhteita. Jäljelle jääneen biomassan pH säädetään sopivalle alueelle, noin pH 4-6, ja lämpötila lasketaan entsyymien toiminta-alueelle eli noin 50 °C. Eri variaatioita on todella paljon, entsyymikäsittely voi olla moniportainen ja se voidaan toteuttaa monien eri entsyymien seoksilla. Vaikka lähes kaikki hemiselluloosa onkin liuennut jo esikäsittelyvaiheessa, niin jäljelle jäänyt fraktio hidastaa selvästi glukoosin hydrolyysiä ja siksi entsyymikäsittelyyn voidaan sisällyttää myös hemisellulaaseja, jotka vähentävät tätä ongelmaa. Syntyneiden sokereiden jatkofermentointi etanoliksi voidaan suorittaa joko samassa tai eri vaiheessa entsyymikäsittelyn kanssa. Monosakkaridien fermentointi kuitenkin toimii optimaalisesti alhaisemmassa lämpötilassa kuin mitä sellulaasit toimivat ja siksi se on tuotannon tehokkuuden kannalta hyvä tehdä erikseen. Hydrolyysistä on tarpeellista poistaa glukoosia ja ksylooseja koko ajan, sillä konsentroituuksaan ne inhiboivat sellulaasien toimintaa. /17, 18/

### **4.3 Selluloosan entsyymaattisen hydrolyysin mekanismi**

Selluloosan entsyymaattisen pilkkoutumisen aloittavat endoglukanaasit, jotka sattumanvaraisesti hajottavat selluloosan sisäisiä glykosididoksia. Tämän jälkeen selluloosan polymeroitumisaste laskee ja muodostuu uusia polymeeriketjun pääteosia, joita alkavat pilkkomaan sellobiohydrolaasit. Ne jakautuvat kahteen ryhmään, CBH I ja CBH II, riippuen kummasta päästä ne oligosakkarideja pilkkovat. Niiden tehtävä

on pilkkoa oligosakkaridien pääteryhmät sellobiooseiksi ja muiksi lyhytketjuisiksi glukoosipolymeereiksi, joita sitten  $\beta$ -glukosidaasit pilkkovat edelleen glukoosiyksiköiksi. Syntyneet monosakkaridit ja lyhytketjuiset oligosakkaridit ovat vesiliukoisia. /1, 12/

Selluloosan hydroloitusperiaate on esitetty kuvassa 3. Kuvasta 3 nähdään miten sellobiohydrolaasit ja endoglukanaasit ovat kiinnittyneinä selluloosaan CBM-osan avulla, kun taas  $\beta$ -glukosidaasit toimivat ilman CBM-osaa. Endoglukanaaseja on tosin ainakin viittä eri luokkaa, joista osalla ei ole CBM-osaa. CBM-osattomat endoglukanaasit pilkkovat pääasiassa selluloosakuidun kiteettömän osan pintasäikeitä, kun taas CBM-osalliset endoglukanaasit pääsevät paremmin hydrolysoimaan kiteettömän osan sisemmällä olevia sidoksia. Kuvasta 3 nähdään myös, että sellobiohydrolaasit pilkkovat selluloosaa kiteisiltä alueilta, kun taas endoglukanaasit pilkkovat ei-kiteisiltä alueilta. /1, 12/



Kuva 3. Eri sellulaasien toiminta selluloosan hydrolyysissä /1/.

Vasta hiljattain on huomattu, että myös hapettavat entsyymit voivat olla apuna selluloosan hydrolyysissä. Kuvasta 3 nähdään, miten selluloosan hydrolysointia edesauttaa myös LPMO (lytic polysaccharide monooxygenases). Tällaisten hapettavien entsyymien toimintaperiaate ei ole vielä täysin varma, mutta epäillään että ne katalysoivat selluloosan hapettuvia kohtia molekyylin pinnalla, jolloin

selluloosa pilkkoutuu nopeammin pätkiksi ja sellobiohydraalaasit voivat toimia tehokkaammin. Tämän on todettu vähentävän huomattavasti myös sellulaasien kulutusta. /1/

## **5 SELLULOOSAN OSITTAINEN HYDROLYYSI**

Sellulaaseja käytetään teollisuudessa paljon muuhunkin kuin bioetanolin tuotantoon. Bioetanolin tuotannossa sellulaasien käyttö perustuu täydelliseen hydrolyysiin, mutta monissa muissa teollisuuden sovelluksissa niiden käyttö perustuu selluloosan muokkaamiseen osittaisella hydrolyysillä. Tällöin ei käytetä kaikkia sellulaasilajeja vaan pääasiassa eri endoglukanaaseja ja/tai sellobiohydraalaaseja. Näin selluloosaa voidaan muokata halutunlaiseksi sovelluksesta riippuen. Sellulaasien osittaisella hydrolyysillä voidaan muun muassa tehostaa selluloosan fibrilloitumista tai saada selluloosa turpoamaan. /19, 20/

Selluloosakuidun turvotus entsyymeillä perustuu spesifien sellulaasien käyttöön. Turvotuksen ideana on lisätä selluloosan reaktiopinta-alaa ja tätä kautta vaikuttaa sen ominaisuuksiin ilman että sen lujuusominaisuudet huomattavasti kärsisivät. Selluloosan entsyymaattisen turpoamisen mekanismi ei ole täysin varmaa, mutta epäillään, että sellobiohydraalaasin CBM-osan tunkeutuessa selluloosan kiteisen rakenteen pintaan se samalla heikentää kuidun sisäisiä vetysidoksia, jolloin niihin pääsee sitoutumaan vesimolekyylejä, jotka samalla saavat kuidun turpoamaan. Toisaalta osassa tutkimuksissa on todettu pienten endoglukanaasiannosten turvottavan myös kuitua. Tällöin annostelut eivät kuitenkaan saa olla suuria, koska muuten kuidut hydrolysoituvat liikaa ja menettävät lujuuttaan. /2, 19, 20/

Selluloosan fibrilloitumiskykyynkin voidaan vaikuttaa sellulaasien avulla, vaikka sen mekanismi on vielä hiukan epäselvä. Fibrilloitumiseen vaikuttavat pääasiassa endoglukanaasit, mutta niiden käytössä on kuitenkin vaarana, että hydrolyysi jatkuu liian pitkälle ja kuidut alkavat pilkkoutua. On epäilty, että CBM-osattomat endoglukanaasit vaikuttaisivat vain selluloosan ei-kiteisten alueiden pintaosissa,

jolloin kuidun pilkkoutuminen ei etenisi liian pitkälle. Toisaalta sellobiohydrolaaseillakin voidaan vaikuttaa kuidun pintaominaisuuksiin ja pilkkoa selluloosan pääteketjuja. Kaiken kaikkiaan selluloosan osittainen hydrolyysi on vaikeahko toteuttaa optimaalisesti ja sen hallinta vaatii niin oikeat reaktio-olosuhteet, sellulaasiannokset ja -valinnat, kuin usein oikeanlaisen mekaanisen esikäsitteilynkin. Alla on esitetty yleisimpiä teollisuussovelluksia, joissa hyödynnetään selluloosan osittaista hydrolyysiä sellulaaseilla. /2, 19/

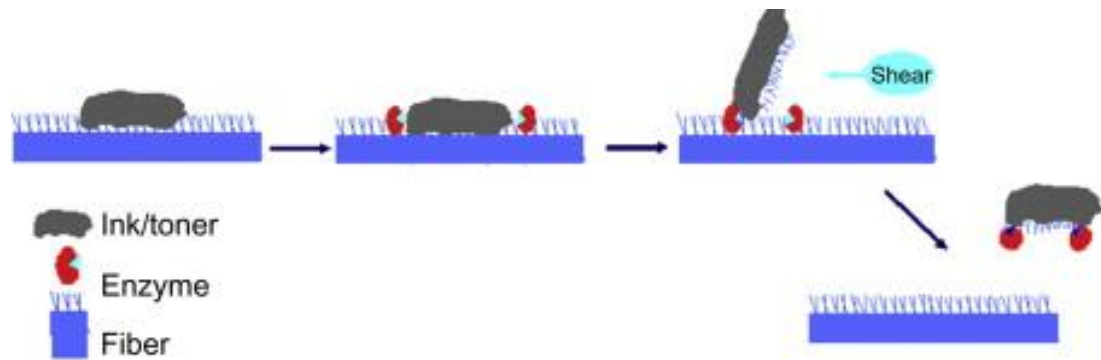
## **5.1 Sellulaasien käyttö paperi- ja selluteollisuudessa**

Sellulaaseja käytetään ja niillä on monia lupaavia sovellusaloja paperi- ja selluteollisuudessa. Niitä käyttämällä saadaan aikaiseksi etuja, kuten energian säästöä jauhatuksessa ja lisäksi ne muun muassa helpottavat musteen irrotusta paperista. Esteenä sellulaasien yleisemmälle käytölle on tälläkin teollisuuden alalla ollut niiden korkea hinta. Myös eri sellulaasisuhteiden optimointi ja niiden optimaaliset toimintaolosuhteet ovat välillä vaikea toteuttaa. Uusia, paremmin kovempia olosuhteita kestäviä sellulaaseja kuitenkin kehitetään koko ajan ja onnistuessaan tämä avaisi uusia potentiaalisia käyttökohteita sellulaaseille. /2, 21, 22/

### **5.1.1 Sellulaasit musteenpoistossa**

Musteenpoisto on tavallisesti ollut vaikein osa kierrätyspaperien uudelleenkäytössä, vaikkakin se on riippuvainen musteen ja paperin laadusta. Musteen irrottaminen on tavallisesti tehty käyttämällä kemikaaleja kuten natriumhydroksidia, natriumsilikaattia ja vetyperoksidia, jotka aiheuttavat ympäristöongelmia ja lisäävät jätevesikäsitteilyn kustannuksia. Sellulaaseja käyttämällä voidaan kuitenkin vähentää selvästi näitä ongelmia. Sellulaaseja käytetään musteen irrotuksessa yhdessä muiden entsyymien, kuten pektinaasien ja hemisellulaasien kanssa. Kuvassa 4 on esitetty sellulaasien toimintaperiaate musteenpoistossa. /21/





Kuva 4. Sellulaasientsyymien toiminta musteenpoistossa /21/.

Kuvasta 4 nähdään, että sellulaasien toiminta perustuu selluloosakuidun pinnan ja sidosten muokkaukseen lähellä mustepartikkeleita, jolloin mustepartikkelit irtoavat kuiduista. Tämän jälkeen irronneet mustepartikkelit erotetaan kuitumassasta pesun tai flotaation avulla. Sellulaaseista endoglukanaaseilla on saavutettu lupaavimpia tuloksia musteenpoistossa. Endoglukanaasien toiminta perustuu ilmeisesti niiden kykyyn heikentää selluloosamolekyylien sitoutumiskykyä ja muodostamalla lisää pääteryhmiä, mikä taas edesauttaa mustepartikkeleiden irtoamisessa. Mustepartikkeleiden irrotuksen lisäksi entsyymikäsittelyllä saadaan nostettua massan vaaleus- ja lujuusominaisuuksia, sekä parannettua suotautumista ja paperikoneen ajettavuutta. Entsyymejä käyttämällä valkaisukemikaaleja ei välttämättä tarvita ja pH-säätökemikaalien kulutus voi tippua puoleen. Hyödyt riippuvat kuitenkin aina kierrätyspaperissa käytetystä paperista ja musteesta. /21, 23/

### 5.1.2 Sellulaasit sellun jauhatuksessa

Sellulaaseja käytetään myös sellun jauhatuksessa ennen paperin valmistusta. Jauhamisen tarkoituksena on parantaa kuitujen ominaisuuksia, kuten sitoutumislujuutta, kuitujen pintarakennetta muokkaamalla. Samalla kuidut turpoavat ja fibrilloituminen lisääntyy, jolloin myös massasta valmistettavan paperista muun muassa lujuusominaisuudet paranevat. Jauhatus kuluttaa kuitenkin paljon energiaa ja siksi sen energiatehokkuutta on yritetty jatkuvasti kehittää. /21, 24, 25/

Sellulaaseja käyttämällä on jauhatuksessa eri tutkimuksista päästy noin 15-35 %:n energiasäästöihin. Energiaa säästyy, koska sellulaasit heikentävät selluloosamolekyylien keskinäisiä sidoksia. Sellulaasiannosta suurentamalla energiaa säästyy enemmän, mutta samalla hydrolyysi etenee liian pitkälle ja kuitujen ominaisuudet alkavat huonontua. Sellulaasien avulla jauhatuksessa saadaan myös parannettua kuitujen turpoavuutta ja kontrolloitua hienoaineen määrää. Nämä taas vaikuttavat valmistettavan paperin ominaisuuksiin. Endoglukanaasit ja sellobiohydrolaasit vaikuttavat pääasiassa selluloosan fibrillointi- ja turpoamisominaisuuksiin, kun taas  $\beta$ -glukosidaaseilla voidaan vaikuttaa hienoaineen määrään. Käytettävät sellulaasit valitaan aina sen mukaan, mitä ominaisuuksia lopputuotteelle halutaan. Apuna voidaan käyttää myös hemisellulaaseja. /21, 24, 25/

### **5.1.3 Sellulaasien muut paperi- ja selluteollisuussovellukset**

Sellulaaseja ja muita puuta hajottavia entsyymejä voidaan käyttää myös puun kuorinnan helpottamiseen. Puun kuorinnassa entsyymien tarkoituksena on heikentää puun ja kuoren välisiä sidoksia, jolloin puun kuorikerros irtoaa tarkemmin ja helpommin. Tämä taas säästää kuorintaenergiaa ja vähentää jäännöskuoriaineksesta aiheutuvia sellunvalmistusongelmia. Vaikeutena on kuitenkin entsyymien tehokas annostelu kuorikerroksen sisempiin osiin, mutta tätäkin voidaan helpottaa esikuorinnan avulla. /2, 21/

Entsyymeillä, pääasiassa hemisellulaaseilla, saadaan vaalennettua sellumassoja ja niitä voidaan käyttää apuna valmistaessa korkean selluloosapitoisuuden omaavia massoja. Entsyymeistä on apua myös paperitehtaiden kiertovesien limantorjunnassa. Pellavapohjaisessa sellunvalmistuksessa sellulaasit helpottavat pellavan liotusta. Lisäksi sellulaaseja voidaan käyttää hylkypaperin, sahanpurun ja muiden sellu- ja paperiteollisuudessa syntyneiden puupitoisten rejektijakeiden hydrolysoimiseen bioetanoliksi. Tosin monet näistä prosesseista ovat pilottivaiheessa ja vielä teollisessa mittakaavassa kannattamattomia. /2, 21/

## 5.2 Sellulaasien käyttö tekstiiliteollisuudessa

Tekstiiliteollisuus on yksi suurimpia sellulaasien käyttäjiä. Tekstiiliteollisuudessaakin käytetään kontrolloitua selluloosan hydrolyysiä, sillä selluloosan hydrolysoituessa liian pitkälle kankaat menettävät lujuutta ja massaa. Sellulaaseja käytetään hyväksi puuvillan ja muiden selluloosapohjaisten tekstiileiden viimeistelyssä ja farkkujen värien haalennuksessa. Sellulaasien käyttö on helppoa, sillä niitä voidaan lisätä jo olemassa olevien märkäprosessivaiheiden yhteyteen. Ne ovat myös täysin biohajoavia, jolloin ympäristön kuormitus vähenee. /9/

### 5.2.1 Kankaiden värien haalennus

Farkkujen väri on perinteisesti haalennettu kivipesulla, mutta nykyään se suoritetaan pääasiassa sellulaasikäsitteilyllä. Tutkimuksissa on todettu, että endoglukanaasi II on tehokkain sellulaasi värien haalennukseen, sillä muut sellulaasit aiheuttavat tuntuvampia lujuus- ja massamenetyksiä. Endoglukanaasien tehokkuus perustuu ilmeisesti kuitujen fibrillaation vähentämiseen amorfisilla alueilla, jolloin selluloosan kristallirakenne pysyy pääosin ehjänä ja lujuus säilyy. Samalla kuitujen päätesidoksia kuitenkin hajoaa lankojen pinnalta, jolloin myös väriä irtoaa kankaasta. /9, 26/

Sellulaaseja käytettäessä farkkuja ei tarvitse enää kivipestä, jolloin selluloosakuidut säilyvät ehjempinä, aikaa sekä energiaa säästyy ja pesulaitteet eivät joudu yhtä kovan mekaanisen rasituksen kohteeksi. Lisäksi jätevesiongelmat vähenevät ja kivipesussa syntynyttä pölyä ei ole enää tarpeellista erottaa. Pesuolosuhteet ovat yleensä luokkaa lämpötila 40-65 °C, pH 4,5-7 ja kesto 15-60 minuuttia. Helpoiten käytettäviä ovat neutraalilla pH-alueella toimivat sellulaasit, sillä ne eivät vaadi erillistä pH-säätöä. Happamalla pH-alueella toimivat sellulaasit toimivat aggressiivisemmin, jolloin pesuaika lyhenee, mutta samalla aiheutuu myös suurempia kangasvaurioita. /9, 26/

### **5.2.2 Kankaiden viimeistely**

Sellulaaseja käytetään tekstiiliteollisuudessa myös kankaiden viimeistelyyn. Kankaiden viimeistelyssä ne pehmentävät kangasta, tasoittavat kankaiden värejä ja parantavat kankaiden värien kirkkautta. Lisäksi niillä saadaan vähennettyä kankaiden nukkaisuutta. Viimeistelyssä käytetään samoja sellulaaseja kuin värien haalennuksessakin, koska tässäkin tapauksessa halutaan säilyttää kankaiden lujuusominaisuudet ja vaikuttaa kankaaseen vain pinnan muutoksilla. Kankaita viimeistelevä sellulaasikäsittely voidaan tehdä joko ennen tai jälkeen kankaan värjäyksen, riippuen miten vahvasti väreihin halutaan vaikuttaa. Endoglukanaasikäsittely vaatii toimiakseen kohtuullisen tehokkaan mekaanisen rasituksen, esimerkiksi sekoituksen, jotta entsyymit pääsevät toimimaan kankaan pinnalla tehokkaammin. Sellulaasit tehdään prosessin jälkeen aina tehottomiksi joko nostamalla lämpötilaa tai pH:ta, jottei hydrolyysi jatkuisi liian pitkälle ja kangas menettäisi turhaan lujuuttaan. /9, 26/

Puuvilla on tavallisesti käsitelty puhtaaksi selluloosaksi emäksisellä keitolla, jotta siitä saadaan poistettua epäpuhtaudet kuten vaha, peptiinit ja proteiinit. Tämäkin prosessivaihe voitaisiin toteuttaa erilaisten entsyymien seoksella, jossa on sellulaasien lisäksi pektinaaseja, ksylanaaseja, lipaaseja ja muita proteaaseja. Tämä on kuitenkin teollisesti ollut vielä kannattamatonta monien entsyymien korkean hinnan vuoksi. Kaiken kaikkiaan sellulaaseja voidaan käyttää tekstiiliteollisuudessa hyvinkin monipuolisesti ja niiden avulla voidaan saavuttaa suuria säästöjä niin ympäristöä, laitteita kuin henkilöstöäkin ajatellen. Vaikeinta niiden käytössä on kuitenkin optimaalisten toimintaolosuhteiden ja sellulaasilajien löytäminen. Myös laitevalinnoilla on suuri vaikutus sellulaasien tehokkuuteen. /9, 27/

### **5.3 Sellulaasien muut käyttökohteet teollisuudessa**

Vaikka sellulaasien suurimmat käyttökohteet teollisuudessa ovat tekstiili-, paperi- ja selluteollisuus, niin niitä käytetään pienemmässä mittakaavassa myös muualla

teollisuudessa. Muita käyttöaloja ovat muun muassa elintarvike-, maatalous-, pesuaine- ja eläinruokateollisuus. Käyttöaloja on siis lähes loputtomasti, koska selluloosapohjaisia tuotteita käytetään hyvin laajasti. /2, 28/

Eläinruokateollisuudessa monet rehukasvit sisältävät myös ei-tärkkipohjaisia yhdisteitä kuten selluloosaa ja hemiselluloosaa, joita monien eläinten on tehotonta sulattaa. Sellulaaseilla ja hemisellulaaseilla nopeutetaan selluloosan pilkkoutumista, jolloin eläimet pystyvät sulattamaan ruuan tehokkaammin ja samalla myös ruuan ravintoarvot paranevat. Tämän ansiosta eläimet kasvavat nopeammin ja pysyvät terveempinä. Sellulaaseista käytetyimpiä ovat endoglukanaasit, sillä ne pilkkovat tehokkaimmin selluloosaa pienemmiksi yksiköiksi. /2, 28/

Sellulaasien, hemisellulaasien ja peptinaasien seoksia käytetään myös maataloudessa. Niiden avulla saadaan kasvit kasvamaan nopeammin, suojautumaan paremmin kasvitaudeilta sekä itämään ja kukkimaan nopeammin. Esimerkiksi endoglukanaasit irrottavat soluseinämistä taudinaiheuttajia.  $\beta$ -glukosidaaseja taas käytetään vähentämään sitrushedelmämehun kitkeryyttä, ja tuomaan paremmin mehun aromit esiin. Tämän lisäksi mehuteollisuudessa käytetään sellulaaseja alentamaan mehun viskositeettiä ja lisäämään saantoa. Oliiviöljyn uutossa sellulaaseilla saadaan parannettua oliiviöljyn saantoa ja siinä olevien vitamiinien määrää. Niiden avulla saadaan myös luontaisia väriaineita talteen porkkanoista ja perunoista. /2, 28/

Näiden lisäksi sellulaaseilla on potentiaalia myös pesuaineteollisuudelle, sillä niiden käyttö vähentäisi selvästi kemikaalijäämiä jätevesissä. Lisäksi niitä voidaan hyödyntää myös selluloosapohjaisten keinokuitujen käsittelyssä hiukan tekstiilikäsittelyn tapaan. /2/

## **6 YHTEENVETO SELLULAASIEN KÄYTTÖSOVELLUKSISTA JA TULEVAISUUDEN NÄKYMISTÄ**

Sellulaaseilla on jo tällä hetkellä monia käyttösovelluksia eri teollisuuden aloilla ja lisäksi monia uusia sovelluksia on pilotti- ja laboratoriotestausvaiheessa. Ihmisten

huoli ympäristön ja ilmankehän saastumisesta, sekä tiukentuva ympäristölainsäädäntö ajavat yrityksiä kehittämään prosessejaan jatkossakin ympäristöä kuormittamattomaan suuntaan, joka edesauttaa myös entsyymisovellusten kehittämistä eteenpäin. Luonnon omina katalyytteinä entsyymit ovat tehokkaita katalyyttejä moniin prosesseihin, kunhan niitä vain opitaan vaan käyttämään oikein. Taulukossa III on eritelty sellulaasien yleisempiä teollisuussovelluksia.

Taulukko III. Sellulaasien teollisuussovellukset; EG=endoglukanaasi, CBH=sellobiohydrolaasi ja BGD=  $\beta$ -glukosidaasi /2, 23, 29/.

Teollisuuden ala	Sovellukset	Käytettävät sellulaasit
Polttoaine	Bioetanoli	EG, CBH, BGD
Paperi/sellu	Musteen irrotus Sellun jauhatus Ajettavuuden parantaminen	EG, CBH EG, CBH, BGD EG, CBH, BGD
Tekstiili	Kankaan viimeistely Farkkukankaan värien haalennus	EG, (CBH) EG
Eläinruoka	Ruuansulatus Ravintoarvojen parantaminen	EG, CBH, BGD EG, CBH, BGD
Maatalous	Kasvitaudeilta suojautuminen Mehujen valmistus (mm: viskositeetin alennus ja antioksidanttien irrotus) Viinien ja oluiden aromien ja viskositeetin muokkaus Oliiviöljyn saannon ja laadun tehostaminen	BGD BGD BGD BGD
Tekokuitu	Tekokuitujen muokkaus	EG
Pesuaine	Pesutuloksen parantaminen	EG, CBH

Taulukosta III nähdään kuinka laajasti sellulaaseja jo käytetään. Suurin osa sovelluksista liittyy selluloosan osittaiseen hydrolyysiin ja tähän tärkeimmät sellulaasit ovat endoglukanaasit ja sellobiohydrolaasit. Niiden hallitulla käytöllä selluloosakuituja voidaan muokata halutunlaiseksi. Näin saadaan aikaan energian säästöä, tuotteiden laadun parantumista kuin materiaalisäästöjäkin aina sovelluksesta riippuen.  $\beta$ -glukosidaaseja käytetään selluloosan hydrolyysissä, jossa halutaan tuotteeksi glukoosia. Lisäksi niillä vaikutetaan erilaisten juomien viskositeettiin ja aromaattisuuteen.

Sellulaaseja tutkitaan ja kehitellään koko ajan, ja tämä voi johtaa uusien ja tehokkaampien sellulaasien löytämiseen. Lisäksi sellulaaseja voidaan geenimuokata,

jolloin muun muassa niiden optimaalisia toimintaolosuhteita saadaan muutettua. Uusien sellulaasimuunnosten kehittäminen on kuitenkin aikaa vievää ja kallista. Sellulaasit eivät myöskään monissa sovelluksissa yksinään paranna prosesseja, vaan lopputulos on usein monien eri entsyymien summa. Tällöin prosessin optimointi vaikenee, mutta samalla laajempi, erilaisissa olosuhteissa toimivien entsyymien kirjo auttaa tilannetta. Sellulaasit vaativat usein hyvin toimiakseen oikean lämpötilan, pH:n ja vaikutusajan lisäksi myös oikein järjestetyn sekoituksen, jotta entsyymit pääsevät kunnolla kosketuksiin selluloosaan kanssa. Tällöin myös laitteistovalinnoilla on suuri merkitys prosessien optimoinnissa.

Selluloosan täydellinen hydrolyysi on saanut lähiaikoina paljon huomiota ja sitä on tutkittu paljon. Sen avulla tuotetut monosakkaridit voidaan jatkokäsitellä muun muassa polttoaineeksi. Tästä prosessista voisi tulla uusiutuva korvaaja fossiilisille polttoaineille, joita ei riitä loputtomasti. Fossiilisten polttoaineiden vuosia jatkunut hinnannousu on myös motivoinut kehittämään niille korvaavia tuotteita. Lähiaikoina tapahtunut jyrkkä raakaöljyn hinnanlasku tulee tosin varmasti hetkellisesti laskemaan innostusta bioetanolin kehittelyyn, koska sen kannattavuus suhteessa fossiilisiin polttoaineisiin laskee. Pitkällä tähtäimellä uusiutuvista luonnonvaroista kuten selluloosasta jalostetuille tuotteille riittänee kuitenkin kysyntää.

## LÄHTEET

1. Wahlström, R., Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous ionic liquids, VTT science 52, Espoo, 2014
2. Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme Research* **2011**(2011), article ID 280696
3. VTT, Prowledge Oy, KnowPulp 10.0, Sellutekniikan, automaation ja prosessinhallinnan oppimisympäristö. Saatavissa: Intranet LTY:n sisäisessä käytössä, vaatii salasanan. [viitattu 7.11.2014]
4. Hellner, G., Application of lipolytic enzymes of microbial origin as biocatalysts, Ph.D. dissertation, Doctoral School of Food Sciences, Budapest, 2011
5. Korhola, M., Uusikylä, M., Teollisuussentsyymeistä kansainvälisesti verkostoitunutta liiketoimintaa, Tekesin katsaus 287/2012
6. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>, [viitattu 11.12.2014]
7. Qi, Xu, Adney, W.S., Ding, S-Y., Himmel, M.E., Chapter 3, Cellulases for biomass conversion. In: Polaina, J., MacCabe, A.P, ed, Industrial enzymes, structure, function and applications, Springer, Hollanti, 2007, s. 35-47
8. Häkkinen, M., Transcriptional analysis of *Trichoderma reesei* under conditions inducing cellulase and hemicellulase production, and identification of factors influencing protein production, VTT science 65, Espoo, 2014
9. Miettinen-Oinonen, A., Chapter 4: Cellulases in the textile industry, In: Polaina, J., MacCabe, A.P, ed, Industrial enzymes, structure, function and applications, Springer, Hollanti, 2007, s. 51-64
10. Lu, Y., Yang, B., Gregg, D., Saddler J.N., Mansfield, S.D., Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues, *Applied biochemistry and biotechnology* **98-100**(2002), s. 641-654
11. Voutilainen, S., Fungal thermostable cellobiohydrolases, VTT publications 754, Helsinki, 2010
12. Palonen, H., Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, VTT publications 520, Espoo, 2004



13. Suchy, M., Accessibility and enzymatic degradation of native and model cellulose substrates, Doctoral dissertation, Aalto University, Helsinki, 2011
14. Xiao-Zhou Zhang, Yi-Heng Percival Zhang, Chapter 8, Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. In: Shang-Tian Yang, Hesman, A., El-Enshansy, Nuttha Thongchul, ed., *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers.*, John Wiley & Sons, Inc., 2013, s. 131-142
15. Fernandes, D.L.A., Pereira, S.R., Serafim, L.S., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B., Chapter 6: Second generation bioethanol from lignocellulosics: Processing of Hardwood sulphite spent liquor., In: Aurelio, M., Lima, P., Natalense, P.P., ed., *Bioethanol*, University of Aveiro, Portugali, 2012, s. 126-146
16. Galbe, M., Zacchi, G., A review of the production of ethanol from softwood, *Applied microbiology and biotechnology* **59**(2002), 6, s. 618-628
17. Scott, F., Quintero, J., Morales, M., Conejeros, R., Cardona, C., Aroca, G., Process design and sustainability in the production of bioethanol from lignocellulosic materials, *Electronic journal of biotechnology* **16**(2013), 3, Review article
18. Várnai, A., Siika-aho, M. Viikari, L., Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose, *Enzyme and microbial technology* **46**(2010), s. 185-193
19. Do Vale, L.H.F., Filho, E.X.F., Miller, R.N.G., Ricart, C.A.O., de Sousa, M.V., Cellulase systems in *Trichoderma*: An overview, In: Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrella-Estrella, A., Upadhyay, R.S., Druzhinina, I., Tuohy, M., ed., *Biotechnology and biology of trichoderma*, Newnes, 2014, s. 229-240
20. Hirofumi Nakamura, Hidetoshi Kubota, Toshiaki Kono, Using of cellulase (endoglucanase) effecting a pulp-swelling activity (hydration) in a lower dosage then up to now and which does not lower the paper strength; determination of dosage to minimize the cellulase addition level and lessen the amount of the deinking agent needed; measuring water retention, US7297224 B2, Nov. 20, 2007

21. Bajpai, P., *Biotechnology for pulp and paper processing*, Springer science+business media, 2012
22. Viikari L., Oksanen, T., Suurnäkki, A., Buchert, J., Pere, J., Cellulases in pulp and paper processing, In: Kennedy, J.F., Philips, G.O., Williams, P.A., *Cellulosic pulps, fibres and materials*, ed., Elsevier 31.10.2001
23. Vyas, S., Lachke, A., Biodeinking of mixed office waste paper by alkaline active cellulases from alkalotolerent *Fusarium* sp., *Enzyme and microbial technology* **32**(2003), s. 236-245
24. Cui, L., Meddeb-Mouelhi, F., Laframboise, F., Beauregard, M., Effect of commercial cellulases and refining on kraft pulp properties: Correlations between treatment impacts and enzymatic activity of components, *Carbohydrate Polymers* **115**(2015), s. 193-199
25. Lecourt, M., Sigoillot, J., Perit-Conil, M., Cellulase-assisted refining of chemical pulps: Impact of enzymatic charge and refining on energy consumption and pulp quality, *Process biochemistry* **45**(2010), s. 1274-1278
26. Samanta, S., Asitava, B., Halder, U.C., Sen, S.K., Characterization of *Trichoderma reesei* endoglucanase II expressed heterologously in *Pichia pastoris* for better biofinishing and biostoning, *The journal of microbiology* **50**(2012), 3, s. 518-525
27. Miettinen-Oinonen, A., *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry, VTT publications 550, Espoo, 2004
28. Phitsuwan, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., Kyu, K.L., Ratanakhanokchai, K., Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy, *Folia microbioli* **58**(2013). s. 163-176
29. Krisch, J., Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, C., Characteristics and potential use of  $\beta$ -glucosidases from *Zygomycetes*, In: Méndez-Vilas, A., ed., Current research, technology and education topics in Applied microbial biotechnology, 2(2010), s. 891-896