

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Orgaanilise keemia õppetool

Eva-Lotta Palmiste

**Tselluloosi kristallide kaitsekilp – ligniini sisalduse mõju ultraheli
efektile**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendaja: Kait Kaarel Puss, MSc

Siim Salmar, PhD

Tartu 2023

Infoleht

Tselluloosi kristallide kaitsekilp – ligniini sisalduse mõju ultraheli efektile

Biorafineerimistehased on biomassi väärandamiseks pidevalt kasvav ja arenev tööstus. Biorafineerimistehaste peamised tooted on biokütused, kemikaalid ja biomaterjalid. Biomass koosneb põhiliselt kolmest komponendist: tselluloos, hemitselluloos ja ligniin. Nende üksteisest eraldamine on raske ja kulukas. Enim kasutust leiab tööstustes tselluloos. Üks laia kasutusala ja uudseim biomassi produkt on nanotselluloos. Nanotselluloosi kasutatakse näiteks biomeditsiinis, kosmeetikas, biolagunevates pakendites, tekstiilides jne. Ligniini sisaldus nanotselluloossetes materjalides tõstab materjali termilist stabiilsust, hüdrofoobsust, UV vastupanu ja vastupidavust oksüdeerimisele. Käesolevas töös uuritakse lignotselluloosse segu lahustuvust etanool-vesi segudes ning analüüsitakse nanotselluloosi teket ultraheli töötlusel erineva tselluloosi ja ligniini osakaaluga segudes.

Märksõnad: nanotselluloos, ultraheli, sonokeemia, tselluloos, ligniin

CERCS: P390 Orgaaniline keemia, P370 Makromolekulaar keemia

Cellulose crystal protective shield - the impact of lignin content on the ultrasound effect

Biorefineries for biomass valorization are a continuously growing and evolving industry. The main products of biorefineries are biofuels, chemicals, and biomaterials. Biomass primarily consists of three polymers: cellulose, hemicellulose and lignin. The separation of these three components from each other is challenging and expensive. One of the most versatile and innovative biomass product is nanocellulose. Nanocellulose is used, for example, in biomedicine, cosmetics, biodegradable packaging, textiles, etc. The inclusion of lignin in nanocellulose enhances the material's thermal stability, hydrophobicity, UV resistance, and resistance to oxidation. In this thesis, lignin-cellulose mixture solubility is determined in ethanol-water mixtures, and the formation of nanocellulose under ultrasonic treatment is observed in mixtures with varying proportions of cellulose and lignin.

Keywords: nanocellulose, ultrasound, sonochemistry, cellulose, lignin

CERCS: P390 Organic chemistry, P370 Macromolecular chemistry

Sisukord

Infoleht.....	2
Kasutatud lühendid.....	5
1. Sissejuhatus.....	6
2. Kirjanduse ülevaade	7
2.1. Puidubiomassi koostis	7
2.1.1. Tselluloos.....	7
2.1.2. Hemitselluloos	8
2.1.3. Ligniin	9
2.2. Lignotselluloos ja biorafineerimine.....	10
2.2.1. Ligniini ja tselluloosi eraldamine.....	11
2.3. Ultraheli	12
2.3.1. Ultraheli toime erinevatele tselluloosete toormetele - nanotselluloos	13
2.4. Ligniini lahustamine.....	13
2.4.1. Ligniini lahustumine aluselises lahuses.....	13
2.4.2. Ligniini lahustumine orgaanilistes solventides	13
3. Eksperimentaalne osa	14
3.1. Materjalid ja meetodika.....	14
3.1.1. Aparatuur ja töövahendid	14
3.2. LCM kuivaine määramine	15
3.3. LCM lahustamine naatriumhüdroksiidi lahuses	15
3.4. LCM lahustamine orgaanilistes solventides	16
3.4.1. Lahustumiskõvera koostamine etanoolis.....	16
3.4.2. Lahustamiskatsed optimaalsel kontsentratsioonil orgaanilistes lahustites	16
3.5. Ultraheli töötlus.....	16
3.5.1. Veesiduvuse määramine	17
3.6. Klason meetod ligniini sisalduse määramiseks.....	17
3.7. Osakese suurus analüüs	18
3.8. Infrapunaspektroskoopia (FT-IR)	18
3.9. SEM – <i>scanning electron microscopy</i>	18
4. Tulemused ja arutelu	19
4.1. Ligniini lahustamine LCM segust	19

4.1.1.	Naatriumhüdroksiidi (NaOH) lahuses LCM-i lahustamine.....	20
4.1.2.	Etanool-vesi segudes LCM lahustamine	21
4.1.3.	Tetrahüdrofuraani (THF) lahuses LCM lahustamine	22
4.2.	Klason analüüsi tulemused LCM segudele.....	22
4.3.	Struktuuranalüüs FT-IR meetodil.....	23
4.4.	Ultraheli töötuse mõju LCM segudele	24
4.4.1.	Veesiduvuse sõltuvus ultraheli töötusest.....	25
4.5.	Ultraheli töötuse mõju osakese suurusele.....	27
4.6.	Materjalide visualiseerimine SEM abil	29
5.	Kokkuvõte.....	31
6.	Summary.....	32
7.	Kasutatud kirjandus.....	33
8.	Lisad	37
9.	Lihtlitsents	39

Kasutatud lühendid

LCM – Ligniini-tselluloosi segu (ingl k. *Lignin-Cellulose mixture*)

LCB – Lignotselluloosne biomass (ingl k. *Lignocellulose biomass*)

EtOH – Etanool

UH – Ultraheli

THF – Tetrahüdrofuraan

FT-IR – Fourier' teisendusega infrapunaspektroskoopia

SEM – Skaneeriv elektron mikroskoopia (ingl k. *Scanning electron microscopy*)

HL – Hüdrolüüsi ligniin

AIR – happes lahustumatu ligniin (ingl k. *acid-insoluble residue*)

ASL – happes lahustunud ligniin (ingl k. *acid-soluble lignin*)

APL – happesadestatud ligniin (ingl k. *acid precipitated lignin*)

ATR – Nõrgendatud täielik sisepeegeldus (ingl k. *Attenuated total reflectance*)

1. Sissejuhatus

Lignotselluloosne biomass koosneb kolmest biopolümeerist: tselluloos, hemitselluloos ja ligniin. Biorafineerimistehased tegelevad lignotselluloosse biomassi komponentide lahutamise ja väärindamisega. Tselluloos on lignotselluloosse biomassi põhikomponent - puidubiomassis on tselluloosi osakaal umbes 45%. Looduses on üle 50% süsinikust pärit tselluloosist. Sellest tulenevalt on peamised biorafineerimissaadused tselluloosist ja hemitselluloosist toodetavad kemikaalid, biokütused ja loomasöödad. Aina rohkem leiab kasutust ka ligniini osa. Pidevalt kasvav ja uudseid kasutusi on leidmas nanotselluloos, kuna omab palju erinevaid omadusi nagu suur eripind ja tugevus ning madal tihedus. Nanotselluloosi kasutatakse biomeditsiinis, biolagunevates materjalides, kosmeetika toodetes, ehituses, superkondensaatorites ning paljudes teistes valdkondades. Nanotselluloosi tootmiseks on mitmeid erinevaid meetodeid. Üheks on füüsikalised meetodid, kus tselluloos jahvatatakse väiksemateks fiibriteks, see aga vajab spetsiifilist aparatuuri ja kõrget energiakulu. Teine meetod on keemiline töötus, kus kasutatakse söövitavaid ja keskkonnale kahjulikke kemikaale. Keskkonna säästlik ja üsna lihtsa kasutusega on nanotselluloosi tootmine ultraheli abil, mis lõhub kavitatsiooni nähtuse ja radikaalreaktsioonide käigus tselluloosi fiibreid nanoskaalasse. [1–4]

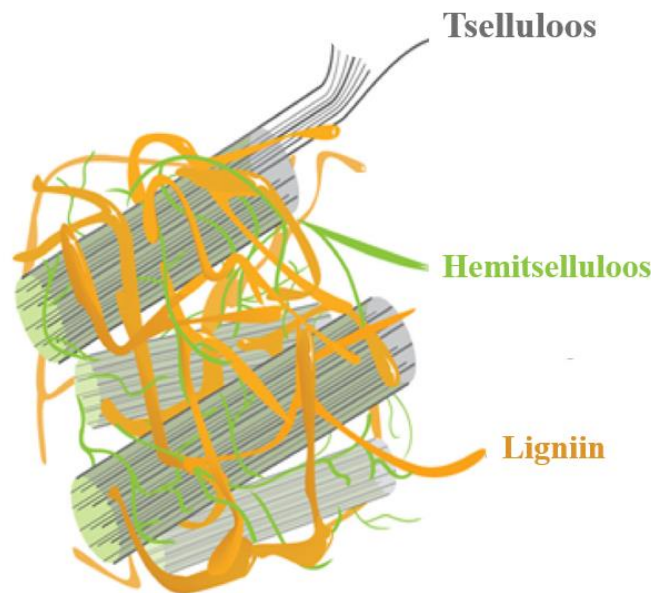
Ligniini sisaldus nanotselluloosis lisab erinevaid positiivseid omadusi. Materjali termiline stabiilsus tõuseb ligniinis esinevate mitte-polaarsete süsivesinik- ja fenoolsete funktsionaalrühmade abil, samuti annab materjalile hüdrofoobsuse, UV resistentsuse ja vastupidavuse oksüdeerimisele. Samal ajal säilivad materjali kõik nanotselluloosi omadused nagu biolagundatavus ja biosobivus, mis muudab nanotselluloosi ideaalseks kandidaadiks näiteks biomeditsiinis. [1]

Käesoleva töö eesmärgiks on hinnata ja karakteriseerida ultraheli töötuse mõju ligniini tselluloosi segudele erinevate ligniini sisalduste korral. Lisaks koostatakse esialgsele lignotselluloosele segule lahustumiskõver etanool-vesi segudes, et leida optimaalne kontsentratsioon materjali lahustamiseks. Erinevate ligniini osakaaludega ligniini-tselluloosi segud saadakse lahustades esialgset lignotsellulooset segumassi erinevate lahustitega optimaalsetel tingimustel ning hinnatakse ultraheli mõju saadud ligniini-tselluloosi segudele.

2. Kirjanduse ülevaade

2.1. Puidubiomassi koostis

Puit koosneb kolmest põhilisest biopolümeerist: tselluloosist, hemitselluloosist ning ligniinist. Tselluloos on puidu strukturealne alus, mida ümbritseb hemitselluloos, mida omakorda hoiab koos ligniin (**Joonis 1**). Ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi osakaal erinevates puidu- ja taimeliikides varieerub tugevalt nii perekonniti kui ka liigiti. Ligniini osakaal lignotsellulooses biomassis varieerub 3-60% olenevalt liigist, tselluloosi osakaal 25-95%. Tselluloosi osakaal taimede koostises on alati suurim, hemitselluloosi ja ligniini osakaalud on tugevalt varieeruvad nii üksteise kui ka tselluloosi suhtes. [2,5]

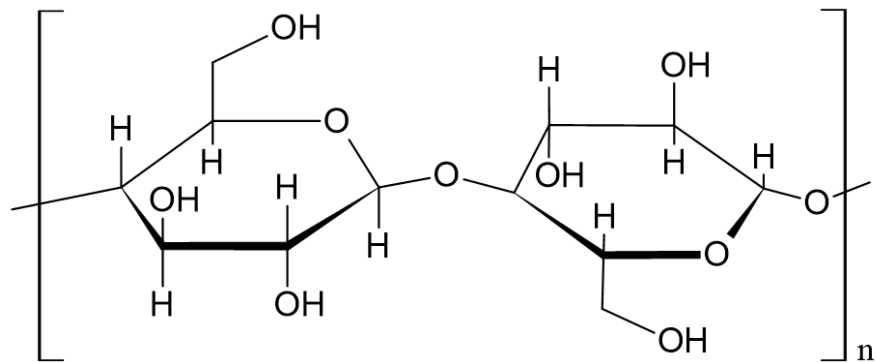


Joonis 1. Skemaatiline puidukomponentide paiknemine puit struktuuris [6].

2.1.1. Tselluloos

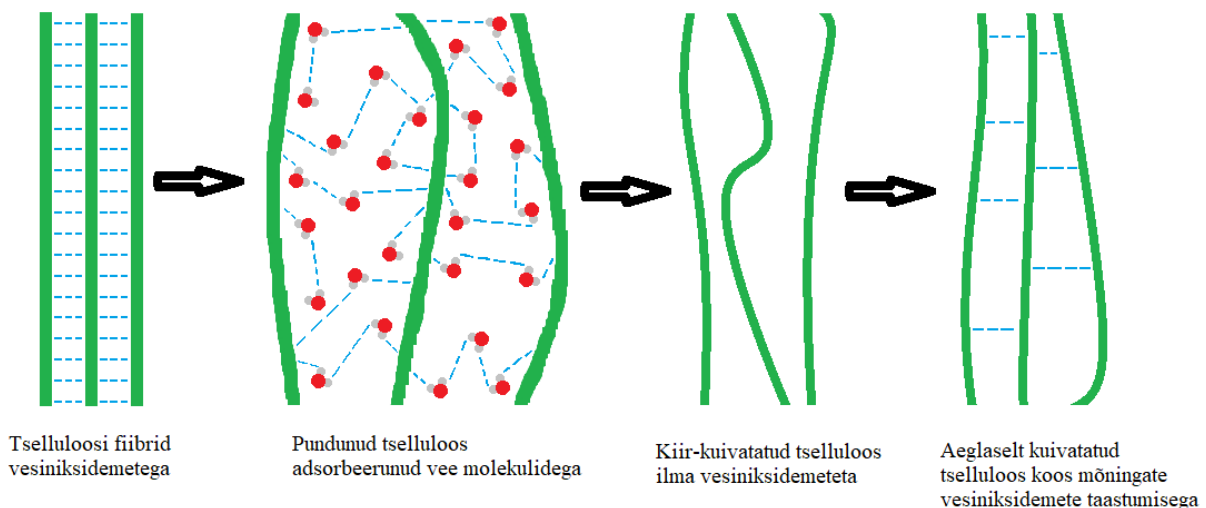
Tselluloosi leidub pea igas elu valdkonnas. Erinevates vormides tselluloosi kasutatakse toidutööstuses, ravimites, riietes ja ehituses. Tselluloosi roll puidus on võrreldav elusolendite skeleti eesmärgiga – see annab puidule strukturese tugevuse [7,8]. Tselluloos on orgaaniline ühend, täpsemini polüsahhariid, mis koosneb paljudest β -1,4 glükosiidsidemetega ühendatud glükoosi monomeeridest (**Joonis 2**). Tselluloosis on märkimisväärne hulk hüdroksiülrühmasid, mis võimaldavad luua vesiniksidemeid teiste molekulidega ning annab tselluloosile kõrge reaktsioonivõime [9]. Molekulidevahelised ja -sised vesiniksidemed ning van der Waalsi jõud annavad tselluloosile kristalse struktuuri, mistõttu on see lahustumatu peaaegu kõigis lahustites. Nõrgemate sidemetega struktuuriosad on amorfseid. Tselluloosi fiibrite suur molekulmass raskendab samuti lahustamist – lahustamiseks on vajalik lahusti, mis on tõhusalt võimeline

lõhkuma vesiniksidemeid. Tselluloosi on võimalik lahustada väga madalatel ja ka väga kõrgetel pH-del kuna toimub vesiniksidemete lõhkumine. [2,10,11]



Joonis 2. Tselluloosi polümeeri molekulaarstruktuur – kaks omavahel glükosiidsideme kaudu seotud glükoosi molekuli.

Oma looduslikus vormis esineb tselluloos fiibrina, mis on oma olemuselt paljude tselluloosi polümeeri ahelate klaster. Fiibrite pikkuseid mõõdetakse mikromeetrites, kuid läbimõõtu nanomeetrites, seega on tegu pikkade ja peenikeste fiibritega. Fiibrid moodustavad omakorda fibriidseid agregaatide. Vesi jääb lõksu fiibrite vahele ja vesiniksidemete kaudu ka agregaatide pinnale – sellest tingituna on tselluloos väga hügrokoopne. Agregaadid võivad veega interakteerudes punduda. Efekt on intensiivsem, mida väiksem on fiibri laius. Just veesiduvuse väärtust kasutatakse ka tselluloosi fiibri suuruse karakteriseerimisel (**Joonis 3**). [12–15]

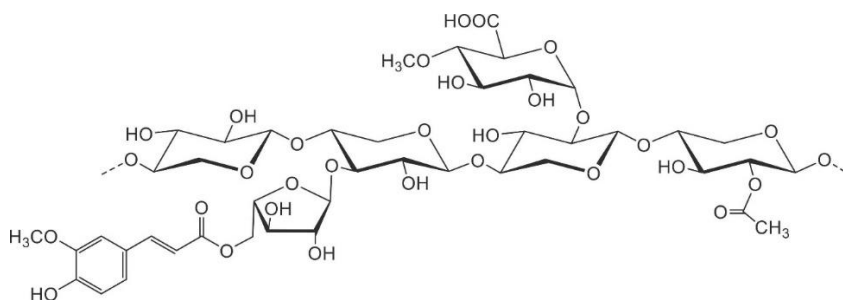


Joonis 3. Tselluloosi pundumine vees ja struktuuri taastumine kuivatamisel.

2.1.2. Hemitselluloos

Hemitselluloos on biopolümeer, mis koosneb peamiselt heksoosidest ja pentoosidest, nagu näiteks glükoos ja ksüloos (**Joonis 4**), lisaks leidub seal teisi sahhariidide ja uroonhappeid.

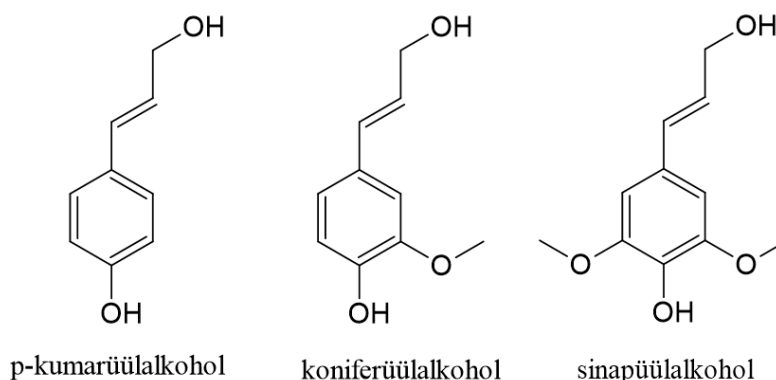
Koostis varieerub erinevates puidu- ja rohttaimeliikides. Suhkruühikute koostise põhjal saab hemitselluloosi rühmitada nelja gruppi: ksülaan, mannaan, ksüloglüktaan ja β -glüktaanid. Okaspuudes on hemitselluloosi peamiseks komponendiks mannaanid, lehtpuudes ksülaanid. Hemitselluloos mängib suurt rolli puidu maatriksis, moodustades kuni 35% biomassist. Hemitselluloos on seotud ligniini ja tselluloosiga läbi vesinik- ja kovalentsete sidemete, mis on ka peamiseks põhjuseks, miks on puidu komponente biomassis üksteisest raske lahutada [8,16].



Joonis 4. Ksülaani tüüpi hemitselluloosi struktuur seotud ligniini monomeeriga [16].

2.1.3. Ligniin

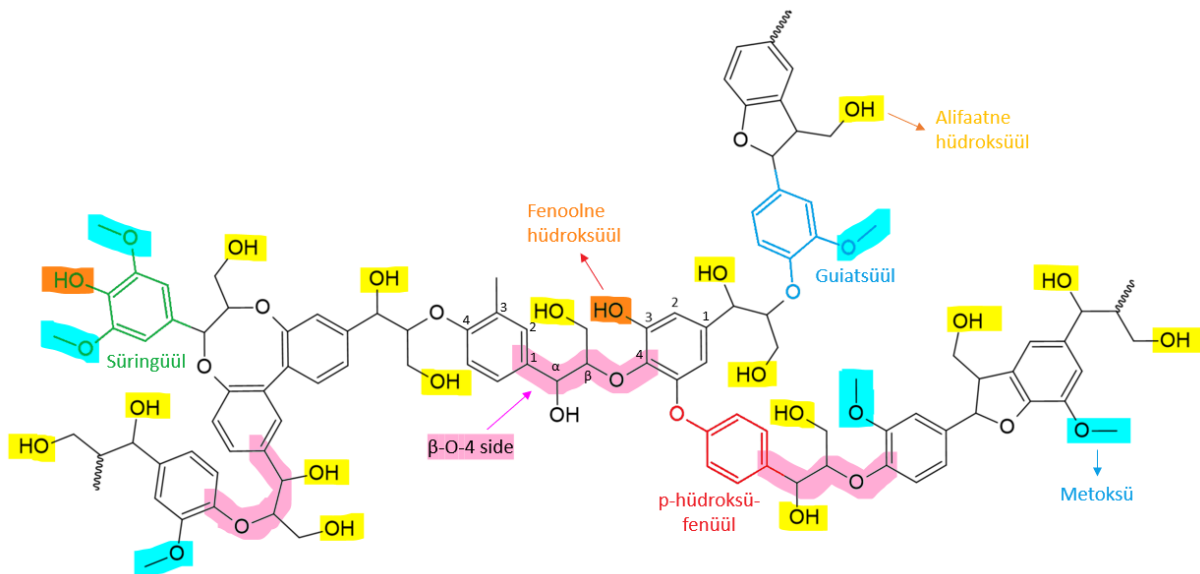
Ligniin on puidu- ja taimemassi komponent, mille funktsiooniks on tagada struktuurne tugevus, vee liikumine juurte ja lehtede vahel ning kaitse patogeenide eest [17]. Ligniinil on keerukas makromolekulaarne struktuur, mis ei ole esitatav ühese molekulina, vaid koosneb mitmetest erinevatest monomeeridest. Peamisteks on primaarsed monoligoolid: p-kumarüülalkohol, koniferüülalkohol ja sinapüülalkohol, millest tekivad vastavalt p-hüdroksüfenüül-, guaiaatsüül- ja süringüülühikud (**Joonis 5**). [18,19]



Joonis 5. Ligniini monomeerid.

Ligniinis esinevad mitmed funktsionaalrühmad: alifaatne hüdroksüül-, metoksüül-, ja fenoolne hüdroksüülrühm. Olulised on ka polümeeris esinevad monomeeride vahelised sidemed – peamiseks on eeterside β -O-4, mis moodustab 50–80% kõikidest sidemetest [18–20].

Ligniini monomeerne koostis erineb nii taimeliikide kui ka taime osade vahel, samuti mängivad rolli taime kasvukoha kliima, mulla koostis, valguse kogus jm. Ligniinil on kompleksne molekulaarne struktuur, mis koosneb polümeeridest, mida ei saa esitada ühese struktuurivalemiga. Ligniini omadusi on võimalik karakteriseerida ainult väljendatuna element sisalduse, funktsionaalrühmade ja strukturaalühikute sisalduse kombinatsioonina (**Joonis 6**) [20].



Joonis 6. Ligniini molekuli skemaatiline struktuuri osa koos ligniinis esinevate funktsionaalrühmade, struktuuri üksuste ja β -O-4 sideme näitega. Lainelised jooned tähistavad molekuli jätkumist.

2.2. Lignotselluloos ja biorafineerimine

Lignotselluloosi biomass (*lignocellulose biomass*) ehk LCB on puidubiomass, mis koosneb ligniinist, tselluloosist ja hemitselluloosist. Käsitletakse ka ligniini ja tselluloosi segu (*lignin-cellulose mixture*) ehk LCM-i, kus hemitselluloos on hüdrolüüsitud. Olles laialdaselt kättesaadav ja omades mitmekesist molekulaarset koostist, on LCM ja LCB hea lähtepunkt biorafineerimiseks. „Biorafineerimine on rajatiste võrgustik, mis ühendab biomassi muundamise protsessid ja seadmed, et toota biomassist biokütuseid, energiat ja kemikaale“ [21]. Tänapäeval on biorafineerimise peamine sihtmärk hemitselluloos ja tselluloos, millest on võimalik toota enamusi biorafineerimistehaste saadusi. Valdav enamik tööstusi tegelevad paberi valmistamise ja etanooli tootmisega LCB massist. Ligniini on läbi aegade kasutatud

tööstuses vähe ning tselluloosi eraldamisel biomassist on vaadeldud ligniini rohkem kui jääki, mis põletatakse energia tootmise eesmärgil. Niisiis on järjest hakatud leidma viise kõikide puidu biomass polümeeride väärimiseks, et tõsta biorafineerimistehaste tulu ja ka keskkonna säästlikust [2,17,22].

2.2.1. Ligniini ja tselluloosi eraldamine

Kraft protsess on maailmas üks peamisi LCB tootmise ja töötlemise protsesse. Puitu töödeldakse naatriumsulfiidi ja naatriumhüdroksiidi lahusega temperatuuril 155-175 °C. Protsessi produktiks on *Black liquor* – orgaaniline materjal, mis koosneb ligniini fragmentidest ja hüdroksühapetest, mis on saadud leelise katalüüsitud süsivesikute reaktsioonidest. Protsessi käigus eraldatakse filtrimisel tselluloos. [22,23]

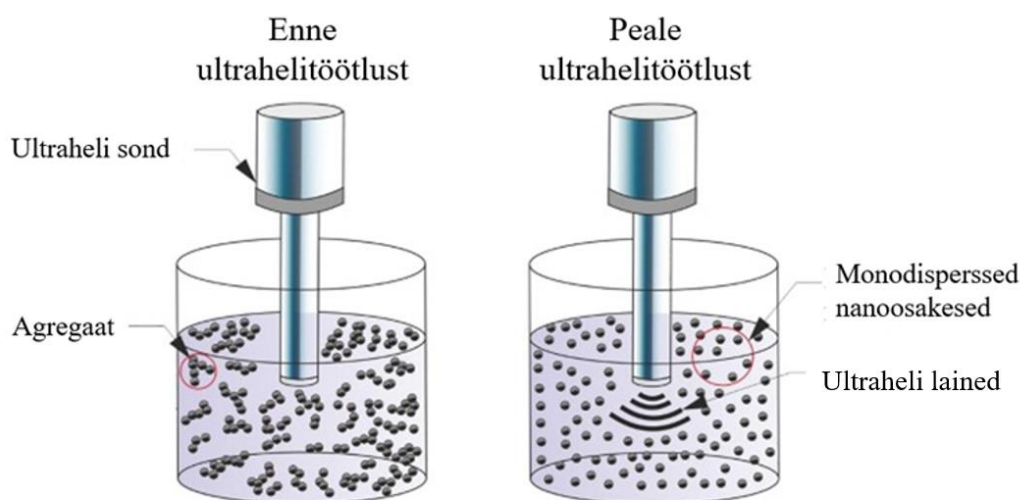
Teine kasutusel olev ligniini eraldusprotsess on ligniini sulfoneerimine, mis tugineb biomassi lagundamisel sulfiti või vesiniksulfiti abil. Kraft protsessis toimub ligniini lahustumine ligniini depolümerisatsiooni käigus: sulfoneerimisel lahustub ligniin sulfonaadi moodustumisel. Süsivesikud lagundatakse peamiselt mono- ja oligosahhariidideks. [23]

Organosolv meetod võimaldab eraldada ligniini väärlivabalt. Meetod hõlmab lignotselluloose massi töötlemist orgaanilise lahusega, enamasti etanooliga, kõrgel rõhul. Ligniini fragementeerub ja lahustub, hemitselluloos depolümeriseeritakse töötlemise käigus lahustuvateks sahhariidideks. Võimalik on eraldada tselluloosi kui töötlemise mittelahustuva osa, kuigi sisaldab märkimisväärses koguses ka ligniini. [23]

Lisaks eelpool mainitutele on ligniini võimalik eraldada tselluloosi hüdroolüüsil biomassist. Töötlemisel kasutatakse tugevaid kontsentreeritud happeid, et eraldada hemitselluloos ja hüdroolüüsida tselluloos glükoosi molekulideks. Peamine eesmärk ongi glükoosi tootmine, kuid võimaldab hästi eraldada ka ligniini, mis töötlemise käigus mittelahustuva osana filtreeritakse. Töötlemine eeldab väga madalat pH-d ning kõrgeid temperatuure - selleks on vaja vastupidavaid reaktsiooni nõusid. Ekstreemseid tingimusi saab vältida kasutades hüdroolüüsi läbiviimiseks ensüüme, mida nimetatakse tsellulaasideks. Ensümaatilise hüdroolüüsi viiakse läbi pH-l 4,8 ja temperatuuril 45-50 °C, ehk puudub vajadus eriliste mahutite järele, kuid on oluliselt aeglasem kui keemiline töötlemine. Ligniini eraldamine toimub samamoodi nagu keemilise hüdroolüüsi korral, saaduseks on ensümaatilise hüdroolüüsi ligniin. [24]

2.3. Ultraheli

Ultraheli (UH) töötlus on olemuselt nii keemilise- kui füüsilise töötuse meetod, mis põhineb molekulidele UH kiirguse rakendamisel. UH lainete levimine vedelikus põhjustab rõhuerinevusi. Meetodi tööpõhimõte on gaasimullide teke, paisumine ning seejärel lõhkemine, nähtust nimetatakse akustiliseks kavitatsiooniks. Mullide sisene rõhk võib tõusta kuni 1000 atm ja temperatuur 5000 K. Märkimisväärne rõhu erinevus mullide sisemise ja välimise ala vahel põhjustab lööklaine. Tekkinud lööklaine on võimeline lagundama nii mulli läheduses kui ka sees asuvaid molekule nanoskaalasse (**Joonis 7**). Kogu protsess mulli tekkest kuni selle kokkuvarisemiseni võtab vaid mõned millisekundid. Lööklainest tingituna tekivad vee molekulidest ka väga reaktiivsed radikaalid. Vesi pürolüüsib ning tekivad OH• radikaalid, termilisel lagunemisel võivad tekkida ka oksüdeerivate omadustega vesinikperoksiid, hapniku radikaal (O•) ning redutseeriv vesiniku aatom (H•). [25–27]



Joonis 7. Sonokeemilise töötuse mehhanismi illustatsioon - agregaatide lõhkumine nanoosakesteks [25].

Ultraheli töötlusel on palju kasutusalasid. Radikaalide teket ultraheli töötlusel kasutatakse reovees saasteainete oksüdeerimiseks. Hüdroksüülradikaalid reageerivad orgaaniliste ühenditega muutes need biolagunevateks [27]. Ultraheli töötlus on ka üks peamisi meetodeid nanotselluloosi tootmiseks. Nanotselluloosil on tänu biolagunevusele, suurele eripinnale ja kõrge reaktiivsusele lai kasutusala. Kasutatakse näiteks biolagunevates pakendites ja tekstiilides, jäikades materjalides tugevdajana, biomeditsiinis jne. [1,3,4,28]

2.3.1. Ultraheli toime erinevatele tselluloosete toormetele - nanotselluloos

Varasemad uuringud on peamiselt keskendunud LCB-s sisalduvatele suhkrutele ning vähe tähelepanu on pööratud ligniini osale, mida vaadeldakse hetkel pigem kui kõrvalprodukti ja ülejääki [29]. Küll aga on tehtud ulatuslikke uuringuid nanotselluloosi saamise kohta kasutades ultraheli töötlust. Ultraheli lõhub molekulide vahelised vesiniksidemed, mikrofiibrid lagunevad aina väiksemasse skaalasse. Tulemuseks on nanotselluloos. Samuti kiirendab ultraheli töötlustselluloosi happelise hüdrolüüsi kiirust märkimisväärselt ja tõstab ka saagikust. [30]

2.4. Ligniini lahustamine

Ligniin on lahustuv nii vesi- kui ka orgaanilistes lahustites, kuid selle lahustuvus sõltub ligniini päritolust ja eraldamise viisist. Tööstuslikult eraldatud ning looduslik ligniin on oma olemuselt väga erinevad. Orgaanilised solventid lahustavad ligniini peamiselt polaarsuse sarnasuse põhjal. Leeliselises vesilahuses määrab lahustuvuse fenoolrühmade sisaldus. Mõlemal juhul on lahustuvuse poolest määravamaks teguriks soodsate funktsionaalrühmade sisaldus, kui seda on molekuli suurus [31,32]. Leeliselistes lahustes mängib rolli ka katiooni iooniline raadius – mida suurem, seda halvem on lahustuvus [33].

2.4.1. Ligniini lahustumine aluselises lahuses

Ligniini lahustumine aluselises keskkonnas on vähe uuritud teema. Omajagu on tehtud uuringuid aluselises keskkonnas ligniini lahustamise optimeerimisest, kuid mitte selle mehhanismist. On teada, et Kraft ligniini puhul ligniini komponendid võtavad polüanioonse kuju, ning lahustuvus sõltub pH-st. Täielik lahustuvus võiks toimuda seljuhul täielikul fenoolhüdrosüülsete funktsionaalrühmade ioniseerumisel. On ka leitud, et Kraft ligniin võtab aluselises keskkonnas spiraalse konformatsiooni. [33]

2.4.2. Ligniini lahustumine orgaanilistes solventides

Ligniini struktuur omab nii polaarseid kui mitte-polaarseid osi, mistõttu on ligniin lahustuv nii polaarsetes kui ka mitte-polaarsetes solventides. Orgaanilised solventid muudavad ligniini konformatsioonilist olekut lineaarsemaks, erinevalt vesilahustest, mis pigem pakivad ligniini struktuuri kompaktselt. Ehk orgaanilises solvendis on lahustuvus seotud solvendi võimega ligniini struktuuri lahti pakkida – mida suurem on solvendi poolt ligipääsetav pindala, seda suurem on lahustuvus. Suurimad ligniini lahustuvused orgaaniliste lahustite puhul on keskmiselt polaarsetel tingimustel, puhta solvendina on parimaks DMSO ehk dimetüülsulfoksiid. [34]

3. Eksperimentaalne osa

3.1. Materjalid ja meetodika

Tabel 1. Töös kasutatud reagentide päritolu, tihedus, molaarmass ja keemistäpp.

Nimetus	Päritolu	Tihedus (g/cm ³) 20 °C juures	Molaarmass (g/mol)	Keemistäpp °C
EtOH 96%	Sigma-Aldrich	0.805	46.07	78.5
LCM	Fibinol	-	-	-
THF 99.9%	Sigma-Aldrich	0.889	72.11	65.0
H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	1.83	98.1	337
NaOH	Acros Organics	2.13	40.00	1388
KBr	Honeywell	2.75	119.00	1435

3.1.1. Aparatuur ja töövahendid

- Proove kaaluti Radwag WAS 220/C/2 analüütilise kaaluga
- Klason analüüside jaoks kasutati termostaati Huber Ministat 125 ja klaasist rõhuviaale
- Proove kuivatati lüofilisaatoris Christ Alpha 1-2 LDplus
- Proovide pikaajaliseks segamiseks kasutati IKA RCT pliit-magnetsegurit
- Ultraheli töötuse läbiviimiseks kasutati Bendelin Sonoouls HD 4200 homogeniseerijat, kasutatud sond – REF 3741 TS 103
- Klason analüüside läbiviimiseks kasutati Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis spektromeetrit, andmed töödeldi programmis VISIONlite 4.0, mõõtmiseks kasutati Hellma Analytics kvarstküvette (optiline teepikkus 1 cm, mahutavus 3 mL)
- Vedelike ülekandmise jaoks kasutati Eppendorf Reference ® 20 µL, 200 µL, 1000 µL, ja 5000 µL automaatpipette
- IR analüüsid viidi läbi IR-spektromeetril PerkinElmer FT-IR Spectrum BX, KBr meetodil
- KBr tablettide valmistamiseks kasutati Perkin-Elmer pressi
- Vaakumfiltreerimiseks kasutati vaakumpumpa KNF Laboport solid PTFE
- Proovide tsentrifuugimiseks kasutati Eppendorf ® Centrifuge 5804/5804R, nurkrootoriga FA-45-30-11 tsentrifuugi
- Proovide homogeniseerimiseks kasutati IKA Vortex Genius 3 segajat
- Proovide pH neutraliseerimiseks kasutati Metrohm 744 pH meetrit

- Materjalide visuaalseks karakteriseerimiseks kasutati skaneerivat elektron mikroskoopi Zeiss EVO15MA SEM, Oxford X-MAX energiat hajuvutava detektoriga. Proovi ettevalmistuseks kasutati Leica EM SCO 500 sadestussüsteemi
- Joonised koostati programmis ChemSketch

3.2. LCM kuivaine määramine

LCM kuivaine sisalduse määramiseks kasutati uhmreid, kuhu kaaluti 1 g LCM-i ning seejärel kuivatati ahjus 95 °C juures. Kindlustamaks täielik kuivamine kaaluti uhmreid kahe korduva tulemuseni – uhmer kaaluti, tulemus märgiti üles ning asetati seejärel tagasi ahju ja kuivatati veel 30 min. Kui korduskaalumisel puudus kaalumuutus, loeti LCM täielikult kuivaks.

3.3. LCM lahustamine naatriumhüdrosiidi lahuses

LCM-st ligniini lahustamiseks kasutati 16 mL klaasviaali. Lahustamiseks valmistati 50 g 2% NaOH lahust, selleks kaaluti 1 g NaOH graanuleid keeduklaasi ja viidi mass 50 grammini kasutades MilliQ vett. Lahustamise teostamiseks kaaluti viaali märg LCM, nii et kuivaine sisaldus lahuses oleks 8%. Seejärel lisati valmistatud NaOH lahust ja MilliQ vett, nii et NaOH kontsentratsioon lõplikus proovi lahuses oleks 1%.

Lahusesse lisati magnetsegaja ning homogeniseeriti vorteksil ja pideval segamisel jäeti lahustuma 1 h toatemperatuuril. Lahusest eemaldati magnetsegaja ja tsentrifuugiti 5 min 4000 rpm juures ning saadud lahuse osa dekanteeriti puhtasse viaali ja kaaluti.

Ligniini lahustuvus LCM-st kasutades NaOH lahust leiti happesadestuse teel. Lahusesse lisati vajalik kogus 3 M väävelhapet, et viia lahus pH 2 juurde. Saadud heterogeenne lahus tsentrifuugiti 5 min 4000 rpm juures. Lahus dekanteeriti ning sadenenud happesadestatud ligniini pesti 5 mL MilliQ veega ja tsentrifuugiti - protsessi korrati kolm korda. Pestud happesadestatud ligniin kuivatati lüofilisaatoris 24 h 0.3 mbar ja -49 °C juures.

Peale esmast lahustamist ja tsentrifuugimist saadud mass pesti kolm korda 5 mL MilliQ veega, misjärel neutraliseeriti materjal 3% H₂SO₄ lahusega. Seejärel eemaldati tsentrifuugimise teel nii palju vedelikku kui võimalik ning proov kaaluti. Edasiste katsete jaoks osa saadud lahustamise massist ka kuivatati lüofilisaatoris 48 h 0.3 mbar ja -49 °C juures, määrati massi kuivaine sisaldus.

3.4. LCM lahustamine orgaanilistes solventides

3.4.1. Lahustumiskõvera koostamine etanoolis

LCM-i lahustumiskõver EtOH-vesi segudes koostati kasutades nii märga kui ka kuivatatud LCM-i. Valitud EtOH kontsentratsioonipunktid: 20%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ja 96%. Märja LCM puhul sai lahustamist maksimaalselt teha 71%-lise EtOH lahusega, märjast LCM-st tuleneva vee koguse tõttu. LCM-i võeti kõikide katsete puhul 8% kuivainet. Vajalik kogus kaaluti klaasviaali, LCM kuivaine sisalduse arvutamisel võeti aluseks punktis 3.2. kirjeldatud meetodil määratud kuivaine sisaldus. Lisati vajalik kogus 96% EtOH lahust, vastava EtOH kontsentratsiooni saavutamiseks. Lahus viidi kogumassini kasutades MilliQ vett. Lahusesse lisati magnetsegaja, homogeniseeriti vorteksil ja jäeti 1 h toatemperatuuril pideval segamisel lahustuma. Peale lahustamise lõppu lahus tsentrifuugiti 5 min 4000 rpm juures ja lahus dekanteeriti. Lahus kaaluti ja kuivatati ahjus 95 °C. Saadud sade kaaluti ja arvatati LCM-i lahustuvus. Kõikidele lahustuvuspunktile teostati kolm korduskatset.

3.4.2. Lahustamiskatsed optimaalsel kontsentratsioonil orgaanilistes lahustites

LCM-i lahustamiseks orgaanilistes lahustites kasutati solventideks 70% EtOH ja 70% THF lahuseid. Mõlema solvendi puhul on töökäik sama. Lahustamiseks kasutati 16 mL klaasviaale. Lahustamiseks kaaluti viaali LCM kogus, mis vastab 8% LCM kuivaine kogusele, kuivaine sisalduse määramiseks kasutati punktis 3.2 kirjeldatud meetodi tulemusi. Võttes arvesse lahuse kogumassi ning LCM-s sisalduvat vett lisati viaali vajalik kogus orgaanilist solventi, et saavutada solvendi 70% kontsentratsioon. Lahuse kogumass viidi lõppmassini kasutades MilliQ vett. Lahusesse lisati magnetsegaja, homogeniseeriti ning segati toatemperatuuril 1 h.

Peale lahustamise lõppu eemaldati magnetsegaja ja tsentrifuugiti lahust 5 min 4000 rpm juures. Lahus dekanteeriti. Allesjäänud proovi pesti 70% vastava orgaanilise solvendi lahusega, tsentrifuugiti ning protsessi korrati kolm korda veega. Segust eemaldati tsentrifuugimise teel võimalikult palju vedelikku ning pooled proovidest (3 kordust nii kuivatatud kui kuivatamata proovide puhul) kuivatati lüofilisaatoris 48 h 0.3 mbar ja -49 °C juures edasiste katsete tarbeks, määrati ka massi kuivaine sisaldus.

3.5. Ultraheli töötlus

Punktides 3.3. ja 3.4. saadud massidele – nLCM, eLCM ja tLCM teostati UH töötlust. Töötluse jaoks kasutati Bendelin Sonopuls 4200 homogeniseerijat, kasutati peenet sondi (TS103), masina maksimaalne võimsus on 200 W. Kogu töötluse vältel olid aparatuuri parameetriteks

amplituud 20%, sagedus 20 kHz, proovi segati magnetseguril ja jahutati metall-rakus. UH töötluste ajaks valiti 5, 10 ja 20 min. Iga katsega käis kaasas ka nullproov, millele UH töötlust ei tehtud. Töötlusprotsessi tehti lahustega, milles kuivaines sisalduva tselluloosi kogus oli võrdsustatud vastavalt pestud 0.5% LCM-s sisalduva tselluloosi koguse pealt, mis määrati Klason meetodil, kirjeldatud punktis 3.6.

3.5.1. Veesiduvuse määramine

Veesiduvust peale UH töötlust iseloomustati nii visuaalselt kolloidi stabiilsuse kaudu kui ka gravimeetriliselt. Lahuse stabiilsuse hindamiseks jäeti lahused seisma 72 h ja vaadeldi vaba vee ja põhja sadeneva tahkise osakaalu viaalis. Gravimeetriliseks veesiduvuse määramiseks töödeldud lahus tsentrifugeeriti 15 min 4000 rpm juures kolm korda, pidurduskiirusega 1, eemaldades võimalikult palju vett iga tsentrifugeerimise vahel. Märg mass kaaluti ning jäeti kuivama lüofilisaatorisse 48 h 0.3 mbar ja -49 °C. Veesiduvus arvutati vee ja kuivaine suhtena. Igale proovile teostati kolm korduskatset kõikidel UH töötluste aegadel.

3.6. Klason meetod ligniini sisalduse määramiseks

Klason meetod on Innventia AB poolt standardiseeritud ja publitseeritud meetod ligniini ja süsivesinike sisalduse määramiseks. Protseduur baseerub proovi väävelhappe hüdrolüüsil - osa on happes lahustuv ning osa mitte. Ligniini jääb antud töös mitte-lahustuvaks osaks ja tselluloos hüdrolüüsib glükoosiks, mis lahustub. [35]

Keeduklaasi kaaluti 0.3 g kuiva proovi, millele lisati 3 mL 72% H₂SO₄ lahust. Lahust segati magnetsegajaga 1 h toatemperatuuril. Seejärel kanti proov analüütilise ülekandega üle kõrgrõhureaktorisse koos 84 g veega. Kõrgrõhureaktor asetati 120 °C termostateeritud õlivanni ning jäeti pideval segamisel reageerima 1 h. Kõrgrõhureaktori sisu filtreeritakse vaakumfiltreerimise teel eelnevalt kaalutud filtrile (VitraPOR® 15 mL p3) koos filterpaberiga. Saadud filtraati kogutakse edasise analüüsi jaoks. Filtrile jäänud sadet pestakse, et välja pesta happejääk. Filter jäetakse kuivama. Happes lahustumatu ligniini (AIR) sisaldus leitakse

Võrrand 1:

$$AIR = \frac{m}{M} \cdot 1000 \text{ mg/g}$$

Võrrand 1. Happes lahustumatu ligniini sisalduse valem. **AIR** (ingl k. *acid-insoluble residue*) – happes lahustumatu ligniin, **m** – sademe mass peale kuivatamist, **M** – kaalutud proovi mass enne happetöötlust.

Happes lahustunud ligniini kogus leitakse **Võrrand 2**:

$$ASL = \frac{A \cdot D \cdot V}{a \cdot b \cdot M} \cdot 1000 \text{ mg/g}$$

Võrrand 2. Happes lahustunud ligniini sisalduse leidmise võrrand. Põhineb UV-Vis analüüsi tulemustel 205 nm juures. **ASL** – (ingl k. *acid-soluble lignin*) – happes lahustunud ligniin. **A** – adsorptsioon 205 nm juures, **D** – lahjendusfaktor, **V** - filtraadi ruumala (0.029 L), **a** – ligniini neelduvustegur (110 g/L·cm), **b** – optilise tee pikkus, **M** – kaalutud proovi mass enne happetöötlust.

Ligniini kogus proovis leitakse AIR + ASL.

Kõikidele analüüsitavatele proovidele teostati kolm korduskatset

3.7. Osakese suurus analüüs

Osakese suuruse määramiseks kasutati Microtrac S3500, Model Bluewave osakese suuruse analüsaatorit. Osakese suuruse määramiseks on analüsaatoris dünaamiline valguse hajumine. Osakese kujuks eeldati sfääri ja analüüs viidi läbi veekeskkonnas.

3.8. Infrapunaspetskoopia (FT-IR)

IR spektrid mõõdeti KBr tableti meetodiga. Tableti valmistamiseks kaaluti 1 mg proovi mis homogeniseeriti uhmris koos 90-100 mg KBr ning pressiti seejärel kõrge rõhu all tabletiks. Proovid mõõdeti FT-IR spektromeetriga lainearvude vahemikus 4000-600 cm⁻¹, 16 skaneeringut, resolutsioon 4 cm⁻¹ ning intervalliga 1 cm⁻¹.

3.9. SEM – scanning electron microscopy

SEM ehk skaneeriv elektronmikroskoopi kasutati LCM segude visualiseerimiseks enne ja pärast UH töötlust. Enne mikroskoopi asetamist tuleb proovid katta plaatinaga, selleks kasutati Leica EM SCO 500 sadestamissüsteemi. Edasi kasutati Zeiss EVO15MA SEM, Oxford X-MAX energiahajuvusdetektoriga. Piltide tegemiseks ja töötamiseks kasutati programmi SmartSEM Version 6.05.

4. Tulemused ja arutelu

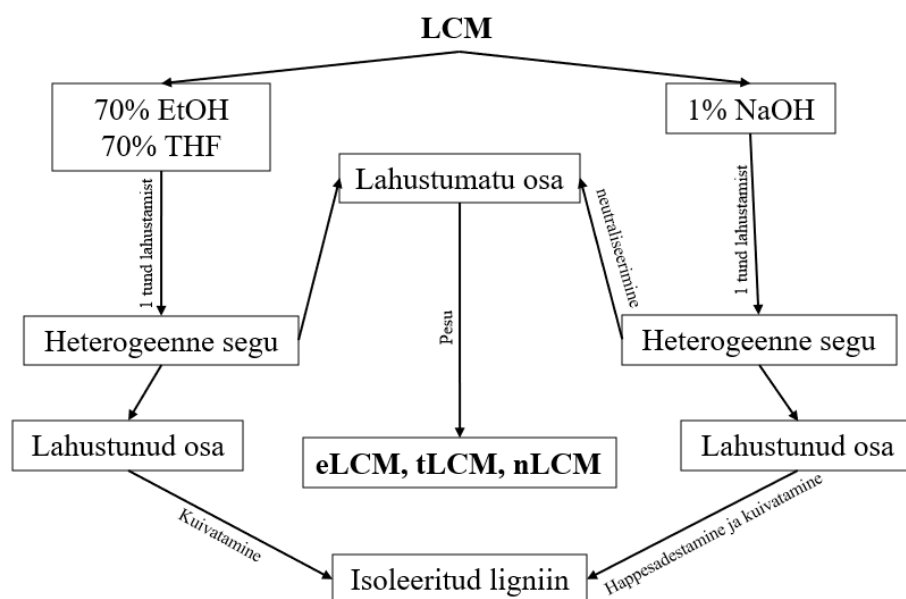
LCM on esmane materjal, mis saadakse biorafineerimises puidu töötlemisel, kust on auruplahvatuse teel happelises keskkonnas eemaldatud hemitselluloos. Töös kasutatud LCM koosneb tselluloosist, ligniinist ning monosuhkru jääkidest ja tuhast. Ligniini eraldatakse LCM-st tsellulaaside toimetel, kus tselluloos lagundatakse glükoosiks ning saaduseks on hüdrolüüsi ligniin ehk HL. Ligniini on võimalik lahustada paljudes solventides, kuna ligniinil on palju erinevaid omadusi: happeline, omab nii polaarset kui ka mittepolaarset osa. Kuna LCM-st saadud HL on omaduste poolest sama ligniin, mis on ka LCM-is, siis antud töö raames on eeldatud, et kahel materjalil puudub lahustumismehhanismis märkimisväärne erinevus. Ligniini lahustuvuse kohta erinevates solventides on palju uuringuid [32,33,36], sellest tulenevalt ei ole töö põhirõhk lahustamise tulemustel ning keskendutakse rohkem ligniini ja tselluloosi koosmõjule, nende osakaalule lahustamise järgses LCM-is ja UH töötamise toimele saadud segudele.

Varasemastest uuringutest on teada UH efekti tselluloosile, kus tselluloosi fiibrid lagunevad UH toimetel võrdlemisi lihtsasti väiksemateks osisteks, andes mikrokristallilise tselluloosi, millel on palju rakendusi. Puuduvad otsesed uuringud, kuidas ligniini kõrge sisaldus mõjutab tselluloosi UH töötlust.

4.1. Ligniini lahustamine LCM segust

Käesolevas töös lahustati LCM segust ligniini erinevate solventidega – NaOH, EtOH ja THF. Antud lahustid valiti vastavalt varasematele teadmistele meie töögrupist, mis on seotud HL lahustuvusega. NaOH-ga lahustamisel on määratud parimaks lahustuvuseks 1/10 suhe NaOH ja HL vahel [37]. Laboris varasemalt tehtud töö baasil on teada, et parim HL-i lahustuvus on 70% THF-veisi lahusega. EtOH-s lahustamise kohta puuduvad publikatsioonid, sellest tulenevalt teostati antud töö raames ka LCM-i lahustumiskõver EtOH-veisi segudes.

Määrati LCM lahustuvust solventides ning saadud lahustumatut massi kasutati edasistes analüüsid. Saadud lahustumatule massile, vastavalt etanoolis lahustunud - eLCM, THF-s lahustatud - tLCM ja NaOH-s lahustatud - nLCM (**Joonis 8**), teostati ligniini sisalduse määramiseks Klason ja FT-IR analüüsid.



Joonis 8. LCM-ist ligniini lahustamise skeem NaOH, EtOH ja THF lahustes.

4.1.1. Naatriumhüdroksiidi (NaOH) lahuses LCM-i lahustamine

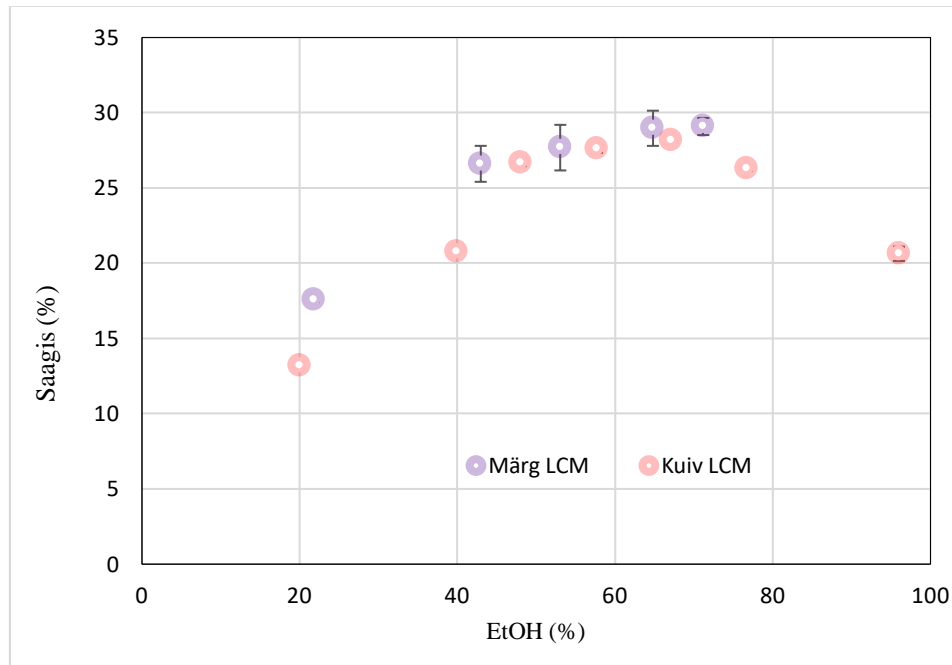
Ligniini lahustub tugevalt aluselises keskkonnas, seega kasutades NaOH lahust saame ka LCM-i lahustada. Eraldatud lahusest on võimalik ligniini välja sadestada, selleks viiakse lahuse pH happeliseks, mille tulemusena lahustunud ligniini välja sadeneb. Happesadestamisel saadakse puhtam ligniini kui orgaanilise solventiga lahustamisel, kuna viimase puhul saadud lahust kuivatatakse kokku, seega jäävad ka kõik lisandid saadud ligniini (monosuhkrud ja tuha lahustuv osa).

LCM lahustati 1%-lises NaOH lahuses ja lahustuvus määrati peale happesadestamist gravimeetriselt. LCM-st lahustati välja 41.14% kuivainest. Lahustumisest ülejäänud tahke segu koosneb peamiselt tselluloosist, kuid sisaldab ka lahustumata jäänud ligniini. Segu neutraliseeriti 3% väävelhappe lahusega. pH neutraliseeriti selleks, et eemaldada nLCM-st NaOH jääk ja viia segu teiste proovidega võrreldavatele tingimustele. Saadud materjali, mille ligniini sisaldus on madalam kui esialgses LCM-s, kasutati edasi katsetes UH-ga ning käsitletakse edaspidi kui nLCM.

NaOH on ligniini eraldamiseks nii LCM segust kui ka puhta HL puhul efektiivseimaks lahustiks ja on kõrge saagikusega. Saadud happesadestatud ligniini (APL – ingl k *acid precipitated lignin*) teostati ka FT-IR mõõtmine, mille tulemusi käsitletakse punktis 4.3.

4.1.2. Etanool-vesi segudes LCM lahustamine

Kuna teadaolevalt pole varasemalt uuritud nii LCM-st kui ka HL-st ligniini välja lahustamist EtOH lahustega siis teostati käesoleva töö raames ka LCM lahustuvuse optimumi uurimine EtOH erinevatel kontsentratsioonidel (**Joonis 9**).



Joonis 9. LCM-i lahustumise kõver EtOH erinevatel kontsentratsioonidel kuivatatud ja kuivatamata LCM puhul.

Nii kuivatatud kui ka kuivatamata LCM puhul on näha, et parim lahustuvus jääb 70% juurde. Saagise protsent 70% EtOH juures on 28-29%, 80% EtOH juures kuiva LCM puhul on saagis 20% ja 60% EtOH juures on saagis 27-28%. Varasemad uuringud ligniini lahustamisel EtOH-s kasutades Kraft ligniini saavutati kõrgeim saagikus kasutades 60% EtOH lahust. Erinevused Kraft ligniini ja LCM vahel tulenevad ligniini erinevatest struktuuridest [32]. Lahustamiskõveral nähtavad erinevused kuivatatud ja kuivatamata LCM vahel on tingitud solvendile juurdepääsetava pindala vähenemisest – kuivatatud LCM struktuur on kompaktsem. Sellest tulenevalt teostati ka edaspidised LCM-i lahustamised 70% EtOH lahusega kasutades kuivatamata LCM-i. Edasiste töötluste eesmärk on eemaldada esialgsest LCM-st võimalikult palju ligniini, ning saada erinevate ligniini osakaaludega LCM-id, seetõttu kasutatakse ka lahustamiseks optimaalseid tingimusi.

LCM-i lahustamiseks EtOH-s kaaluti lahus nii, et LCM kuivaine massiprotsent oleks 8% ning EtOH kontsentratsioon 70%. Lahustuvus leiti gravimeetriliselt lahustumatu segu pealt.

Miinuseks ligniini eraldamises orgaanilise lahustiga, võrreldes NaOH lahustamise meetodikaga, tulevad lahusega kaasa ka LCM-s sisalduvad suhkrud, mis jäävad isoleeritud ligniini sisse. Lahustamisest alles jäänud massi kasutati edasises töös, ning käsitletakse edaspidi kui eLCM.

4.1.3. Tetrahüdrofuraani (THF) lahuses LCM lahustamine

THF on veega tugevalt interakteeruv solvent, tekitades veega ka aseptroopi. Olles madalama polaarsusega, kui EtOH, võimaldab THF ligniini lahustada laiemas fraktsiooni vahemikus, kui EtOH. Kui EtOH lahustab peamiselt ligniini polaarsema osa siis THF veega koosmõjul lahustab nii polaarsema osa kui ka vähempolaarsema fraktsiooni [38]. Seda on näha ka kõrgema lahustuvusena kui EtOH-s (**Tabel 2**).

THF-s lahustamine teostati sarnaselt EtOH-s lahustamisele. Lahustuvuseks saadi 35.68%. Sarnaselt EtOH-ga on probleemiks suhkrute püsimine lahuses ja see läbi ka lõpp-produktis. Saadud lahustamise alles jäänud massi kasutati edasistes analüüsidest ning käsitletakse töös edaspidi kui tLCM.

4.2. Klason analüüsi tulemused LCM segudele

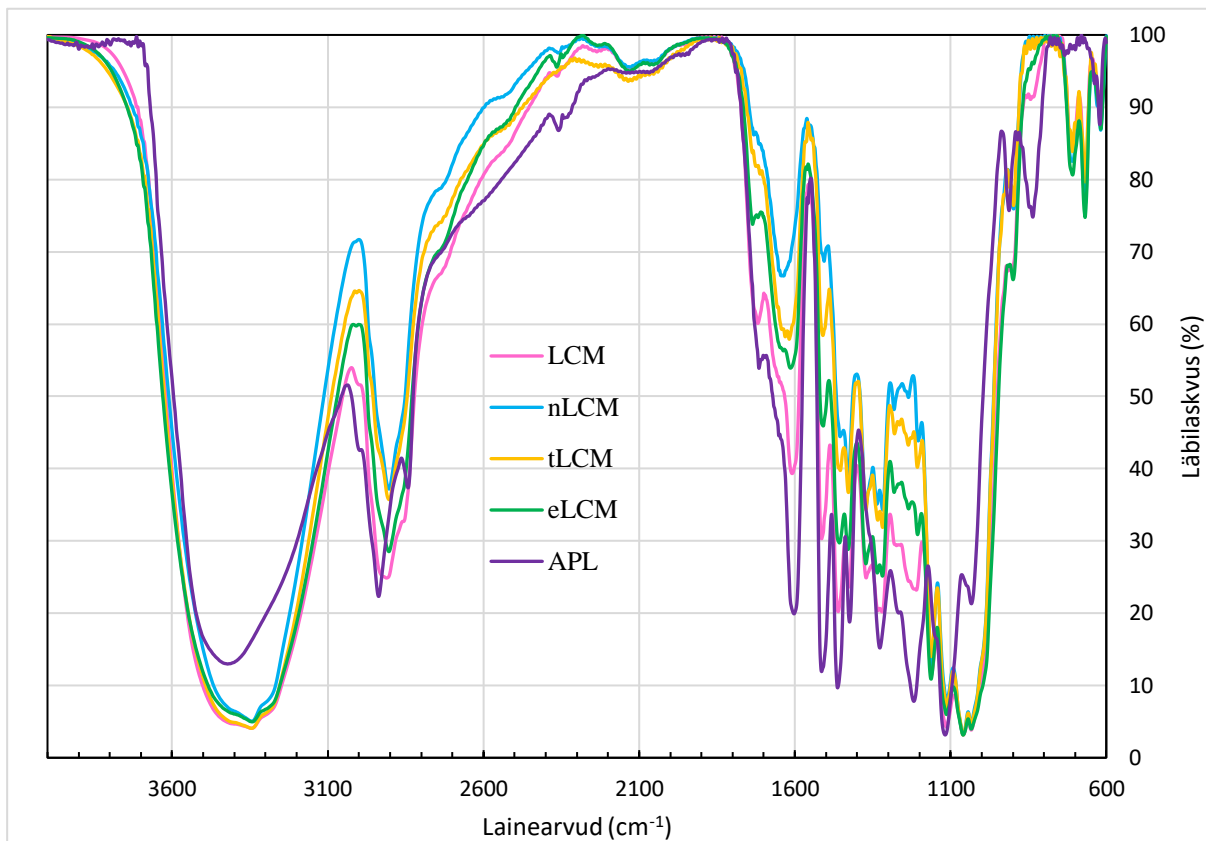
Tabel 2 annab ülevaate erinevates LCM-ides sisalduva ligniini hulga kohta ja palju esialgsest LCM-st lahustus töötuse käigus. Allesjäänud ligniini osakaal läheb laias kokku lahustamise tulemustega – parima lahustava toimega on NaOH, kuhu on jäänud alles ka kõige vähem ligniini, järgnevad vastavalt EtOH ja THF. Klasoni tulemustest saab kaudset infot ka tselluloosi sisalduse kohta - tselluloosi osakaal massis tõuseb ligniini osakaalu langusega. Töö peamine eesmärk on uurida ligniini-tselluloosi vahelist koosmõju ultraheli töötusel, siinkohal on loodud erinevad materjalid, mille ligniini sisaldus erineb märkimisväärselt algsest. Taolise sisalduse erinevuse pealt on võimalik võrrelda ligniini osakaalu mõju segus UH töötuse tulemustele. Edaspidi töös eeldatakse, et saadud segud koosnevad 95% ligniinist ja tselluloosist ja nende osakaalu osas toetutakse Klason tulemustele.

Tabel 2. Erinevate lahustitega lahustatud LCM segude Klason analüüside tulemused. Analüüsiti ka esialgset LCM-i, millest on pestud välja vabad suhkrud.

Lahusti	Ligniini sisaldus (%)	Lahustuvus (%)
nLCM	14.36 ± 0.11	41.14 ± 0.3
tLCM	20.07 ± 0.13	35.86 ± 1.3
eLCM	27.58 ± 0.22	32.93 ± 0.4
LCM	38.31 ± 0.68	-

4.3. Struktuuranalüüs FT-IR meetodil

Töös kasutatud LCM-idele ja ka NaOH lahusest sadestatud ligniinile mõõdeti FT-IR spektrid. Antud meetod on kasutusel, kuna teised spektroskoopilised mõõtmised nõuavad materjali lahustamist (nt TMR) ja puudub lahusti mis oleks võimeline saadud segusid täielikult lahustama. Taolise tahke materjali puhul on võimalik FT-IR puhul mõõta kas ATR (attenuated total reflectance) või KBr meetodiga. LCM puhul annab parima tulemuse KBr meetod ning seega kasutati seda meetodit antud töös. Ligniini osakaalu hindamiseks iseloomulikud piigid IR spektris on vahemikus 1700-1100 cm^{-1} , kus on aromaatses tuuma vibratsioonid – erinevate ligniini struktuuriühikute aromaatsed tuumad ja nende funktsionaalrühmad [39]. Tselluloosi spektris eristada pigem ei ole võimalik, umbes 1000 cm^{-1} juures on näha primaarse alkoholi piiki, APL puhul, kus on ka kõige väiksem tselluloosi osakaal, on antud piik kõige väiksema intensiivsusega. Tselluloosile ei ole ligniinist eristatavaid piike, kuna puuduvad funktsionaalrühmad mida ei leiduks ligniini struktuuris (**Joonis 2** ja **Joonis 6**).



Joonis 10. IR spekter proovidele: LCM, nLCM, tLCM, eLCM ja APL.

Ligniini osakaalu hindamiseks on 1500 cm^{-1} ja 1700 cm^{-1} juuresolevad piigid kõige selgemalt välja joonistunud – ligniini sisalduse muutus on lihtsasti hinnatav piikide intensiivsuse kaudu. 1700 cm^{-1} juures olev piik vastab C = O konjugeerimata ketoonide ja aromaatsete estrite vibratsioonidele. 1500 cm^{-1} juures olev piik vastab C = C aromaatses tuuma vibratsioonidele. Samuti on võimalik vaadelda laia OH piiki spektris 3400 cm^{-1} juures, kus on näha, et OH osakaal langeb tugevalt APL puhul, sest tselluloosi antud materjalis puudub. (**Joonis 10**) [39,40]

Ligniini osakaal töödeldud segudest on kõige kõrgem LCM proovis. Edasi tuleb osakaalus ligniini sisaldus langevas järjekorras eLCM, tLCM ja nLCM.

4.4. Ultraheli töötamise mõju LCM segudele

Kõikidele 4.1. osas käsitletud lahustamise LCM materjalidele teostati UH töötlemine erinevatel aegadel – 0, 5, 10 ja 20 minutit. Lahused tehti kuivatamata LCM-ist ning nii, et tulemuseks oleks 0.5% kuivainega LCM lahus, ülejäänud LCM segude kuivaine mass lisati nii, et seal sisalduv tselluloosi kogus oleks võrdne 0.5% LCM kuivaine lahuses sisalduva tselluloosiga. Tselluloosi võrdsustamise aluseks võeti pestud LCM-s sisalduv tselluloosi kogus.

Võrdsustamise põhjuseks on eeldus, et valdav enamus UH töötuse mõjust läheb üle tselluloosi lagundamisele ning selleks, et erinevaid proove võrdselt võrrelda ühtlustati nendes sisalduva tselluloosi mass. Lahuste valmistamiseks ei kasutatud kuivatatud proove, kuna kuivatamisel muutub sisalduva tselluloosi fiibrise struktuur ja morfoloogia, ning osa UH töötuse efektest läheks tekkinud kuivanud struktuuride uuesti lõhkumiseks (**Joonis 3**).

4.4.1. Veesiduvuse sõltuvus ultraheli töötusest

UH töödeldud proovidel vaadeldi veesiduvust ning kolloidi stabiilsust. Kolloidi stabiilsuse vaatlemiseks jäeti töödeldud proovid segamatult seisma 72 h. Selgus, et kolloidi stabiilsus tõuseb UH töötuse ajaga LCM lahuses, nLCM, eLCM ja tLCM UH töödeldud lahustes on stabiilsed kolloidid (**Joonis 11**). Veesiduvuse määramiseks proovid tsentrifugeeriti, ning eemaldati vaba vesi, protsessi korrati kolm korda, eemaldades igakord võimalikult suur kogus vett. Seejärel proovid kuivatati, saades allesjäänud kuivaine mass. Proovide veesiduvus leiti segusse jäänud vee ja kuivaine jagatisena.



Joonis 11. UH-ga töödeldud tselluloos võrdsustatud lahused, vasakult paremale: LCM 0, 5, 10, 20 min, eLCM 0, 5, 10, 20 min, tLCM 0, 5, 10, 20 min, nLCM 0, 5, 10, 20min.

Tabel 3. Veesiduvuse väärtused LCM materjalidele UH töötuse pikkusega - 0, 5, 10 ja 20 minutit. Vee suhe on leitud seondunud vee massi ja kuivjäägi massi jagatisena.

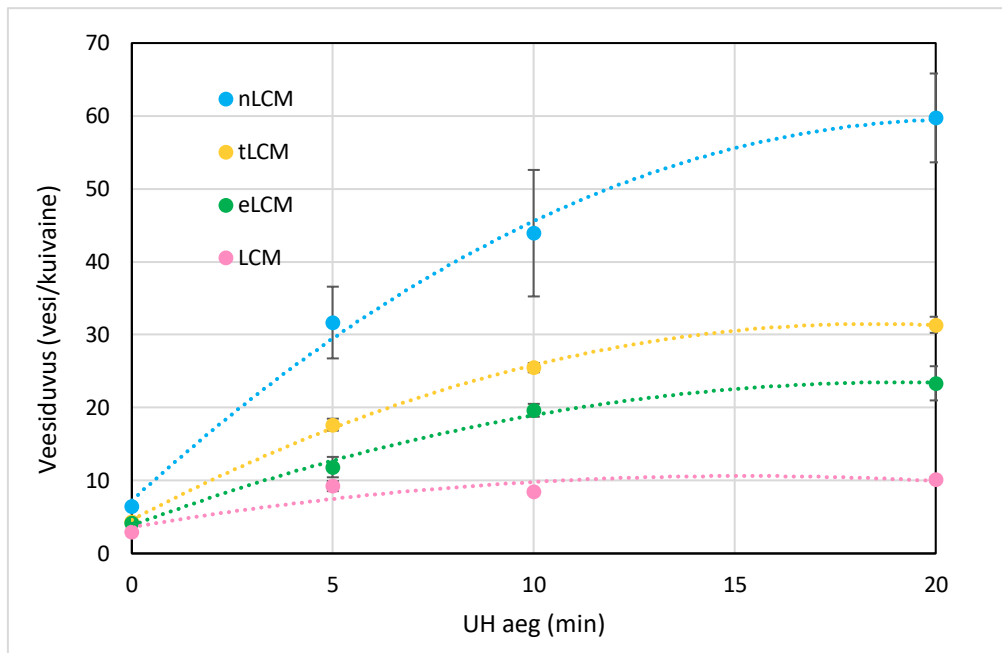
UH aeg (min)	Veesiduvus (vesi/kuivaine)			
	nLCM	tLCM	eLCM	LCM
0	6.4 ± 0.4	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.3	3.0 ± 0.2
5	31.7 ± 4.9	17.7 ± 0.8	11.8 ± 1.4	9.2 ± 0.7
10	43.9 ± 8.7	25.5 ± 0.6	19.6 ± 0.9	8.5 ± 0.3
20	59.7 ± 6.1	31.4 ± 1.1	23.3 ± 2.3	10.2 ± 0.3

Tselluloosil on vett siduv omadus, kuna vabad -OH rühmad loovad veega vesiniksidemeid ning fiibrite vahelisse alasse jääb vesi lõksu. Vabade tselluloosi fiibrite kasvul suureneb tselluloosi osakese eripind, seda suurem on nende fiibrite vahelise ala pindala, seda rohkem on võimalusi luua vesiniksidemeid ja veesiduvuse väärtus tõuseb.

Tabel 3 annab ülevaate veesiduvuse väärtustest kõikides segudes UH töötuse aegadel 0, 5, 10 ja 20 minutit. Veessiduvuse väärtus tõuseb tugevalt UH töötuse pikkuse kasvades. Tõenäoliselt tuleneb veesiduvuse tõus ultraheli töötuse pikenedes tselluloosi fiibri suuruse vähenemise ning tselluloosi osakeste omavaheliste interaktsioonide langusest ehk veesiduvuse väärtust võiks siin vaadelda ka kui tselluloosi fiibrite suuruse mõõdnuna.

Tselluloosi võrdsel sisaldusel vaadeldes puhtalt tselluloosi võiks eeldada, et veesiduvused võrdsustuvad, kuna tselluloosi on võrdselt. Selle asemel joonistub välja, et mida vähem on analüüsitava proovis ligniini, seda suurem on efekt tselluloosile.

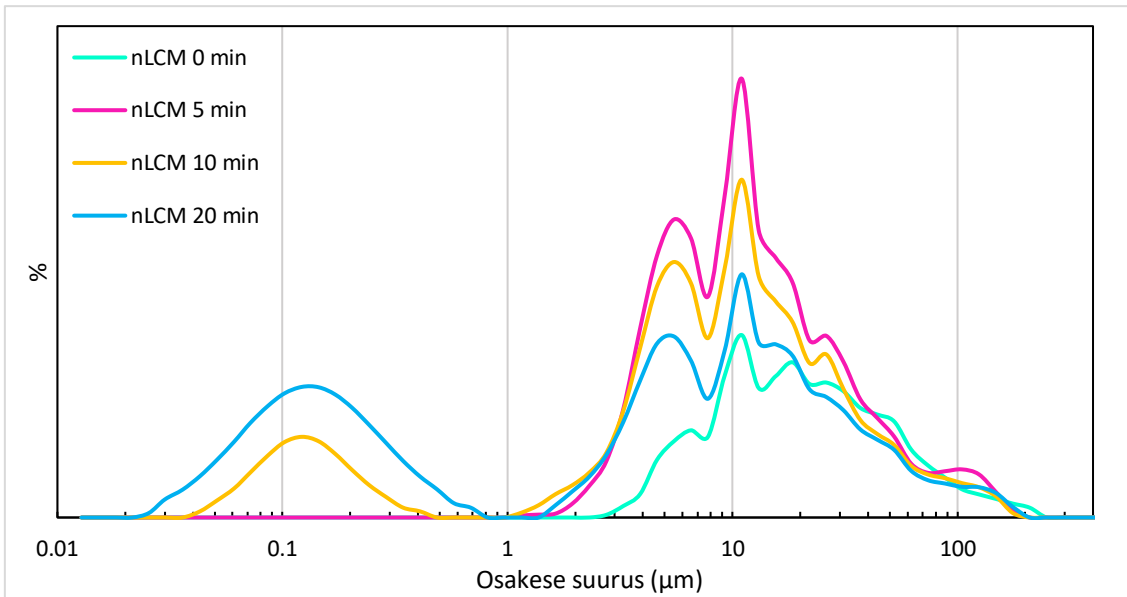
Graafiliselt esitades on näha, et kõigi lahustite puhul joonistub välja kõversõltuvus UH aja ja veesiduvuse vahel (**Joonis 12**).



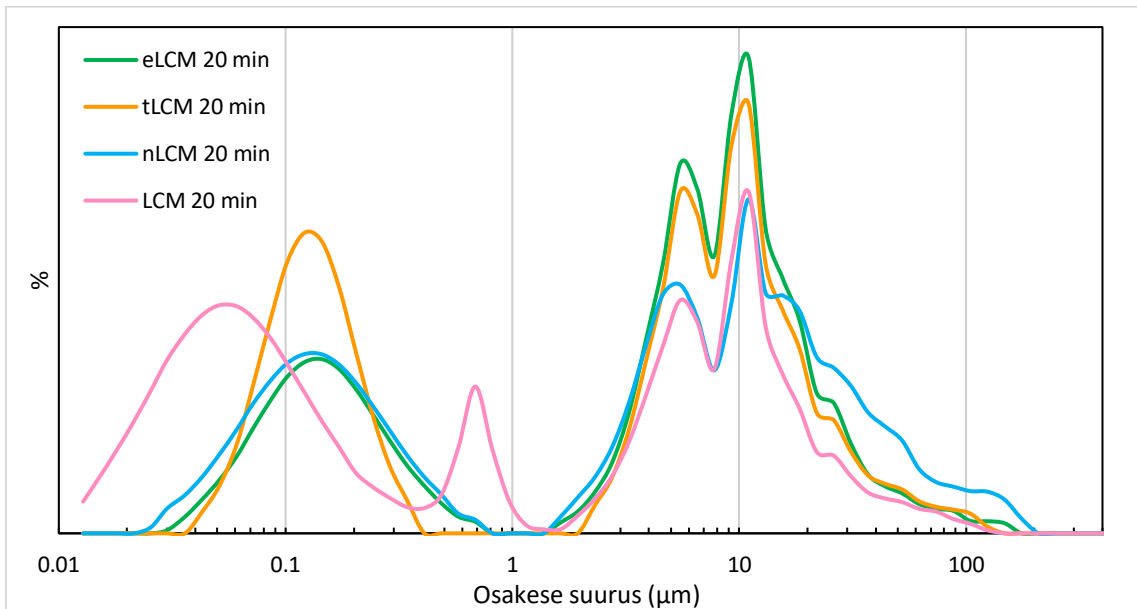
Joonis 12. nLCM, tLCM, eLCM ja LCM veesiduvuse ja UH aja sõltuvus graafik koos kuivaines tselluloosi koguse võrdsustamisega.

4.5. Ultraheli töötuse mõju osakese suurusele

Lisaks veesiduvusele mõõdeti punktis 4.4.1. kirjeldatud katse proovidele ka osakeste suurus. Saadud tulemused kinnitavad hüpoteesi, et veesiduvus on otseses seoses tselluloosi fiibrise suurusega lahuses ning, et UH töötuse tulemusena saame nanotselluloosi. Mida pikem on UH töötus, seda väiksem on osakese suurus (**Joonis 13**), sama trend on kõikide proovide puhul. Joonisel on näha, et esimesena lagunevad tselluloosi fiibrid 10 ja 6 μm suurusteks ning edasisel töötusel nihkub osakeste suurus aina väiksemasse skaalasse. 10 μm juures on näha kuidas 5 min juures on piik kõrgemal kui 0, 10 ja 20 min juures. Nanotselluloosi hakkab tekkima pikemal, kui 5 minutilisel UH töötusel – seda on näha piikide tekkena 0.1 μm juures.



Joonis 13. nLCM osakese suuruse graafik 0, 5, 10 ja 20 min UH töötuse juures.

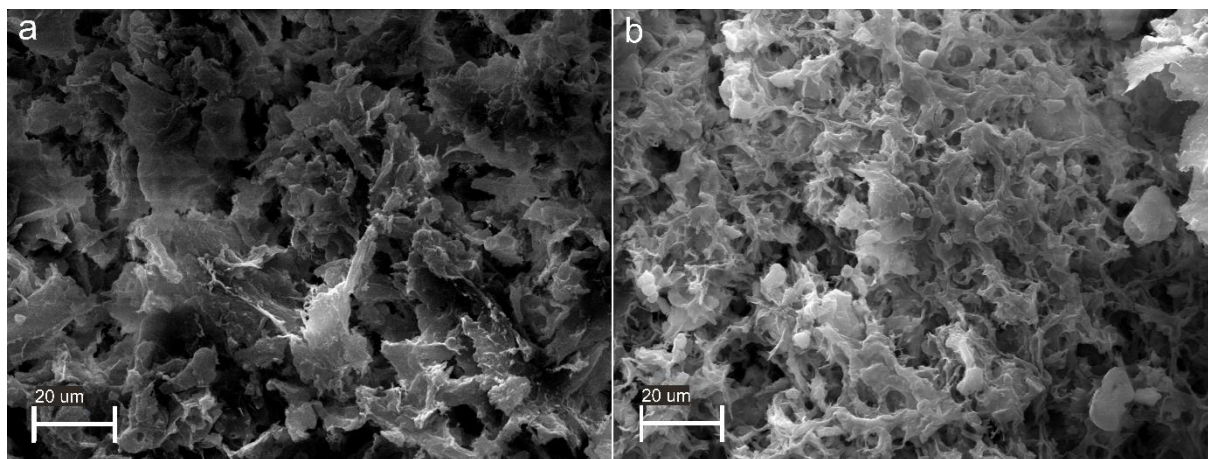


Joonis 14. Osakese suuruse graafik eLCM, LCM, nLCM, tLCM UH töötusega 20 min.

Nanotselluloos tekib kõikide proovide puhul samadel aegadel, erandiks on LCM, millel on nanotselluloosi teket näha juba 5 minuti juures (**Lisa 1**). Graafikul (**Joonis 14**) joonistub välja 6-10 μm juures olevate piikide kaudu, et orgaaniliste lahustitega töödeldud LCM puhul on mikrokristalse tselluloosi osakaal peale 20 min UH töötlust on väiksem kui on esialgse LCM ja nLCM puhul.

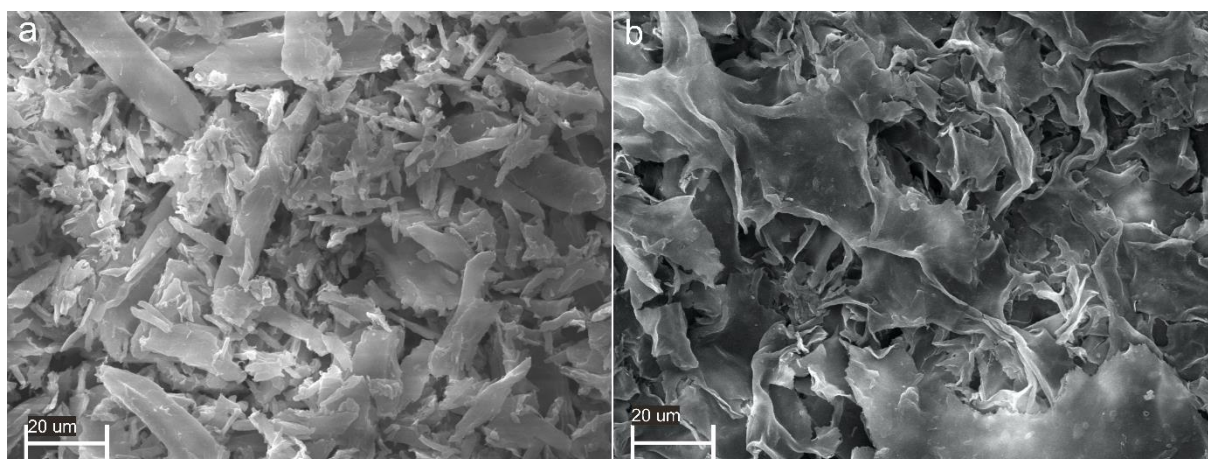
4.6. Materjalide visualiseerimine SEM abil

SEM analüüsi teostati nLCM, eLCM, tLCM ja LCM kuivatatud proovidele nii ilma UH töötluseta kui 20 minutiliste UH töötlusega proovidele. LCM töötlemata proovis on näha põhiliselt amorfseid alasid, kus võib eeldada ka osaliselt kristallide olemasolu (**Joonis 15**).



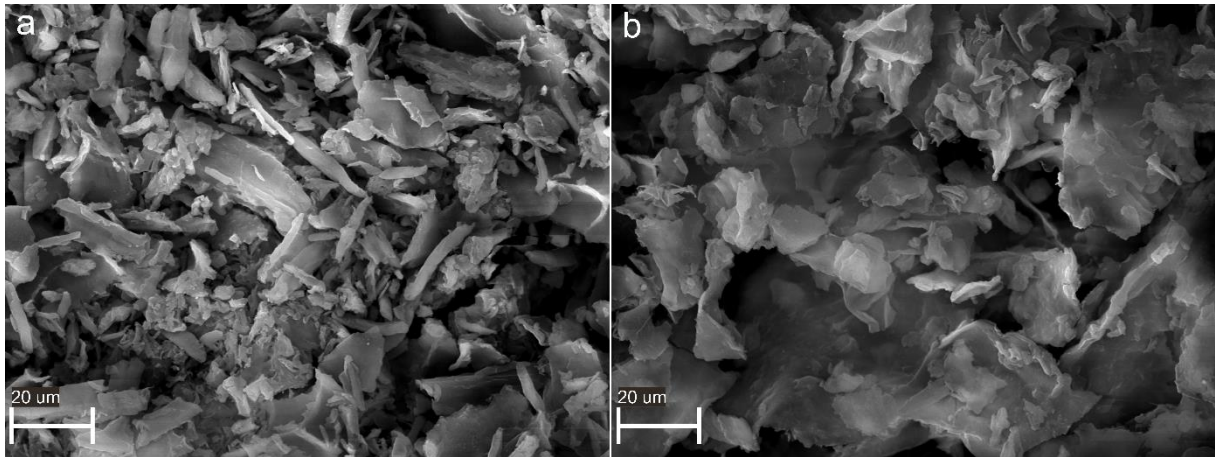
Joonis 15. LCM SEM pildid, vasakul UH töötlemata, paremal UH töötlusega 20 minutit.

eLCM, tLCM ja nLCM töötlemata proovidel on kristallide kuju selgemalt näha. Kõige paremini joonistub välja UH efekti mõju nLCM piltidel, kus ligniini sisaldus on madalaim. nLCM töötlemata proovil on näha ilusaid ja selgeid tselluloosi kristalle ning UH töödeldud pildil on kristallid lõhnutud ja alles on jäänud kiuline materjal (**Joonis 16**).

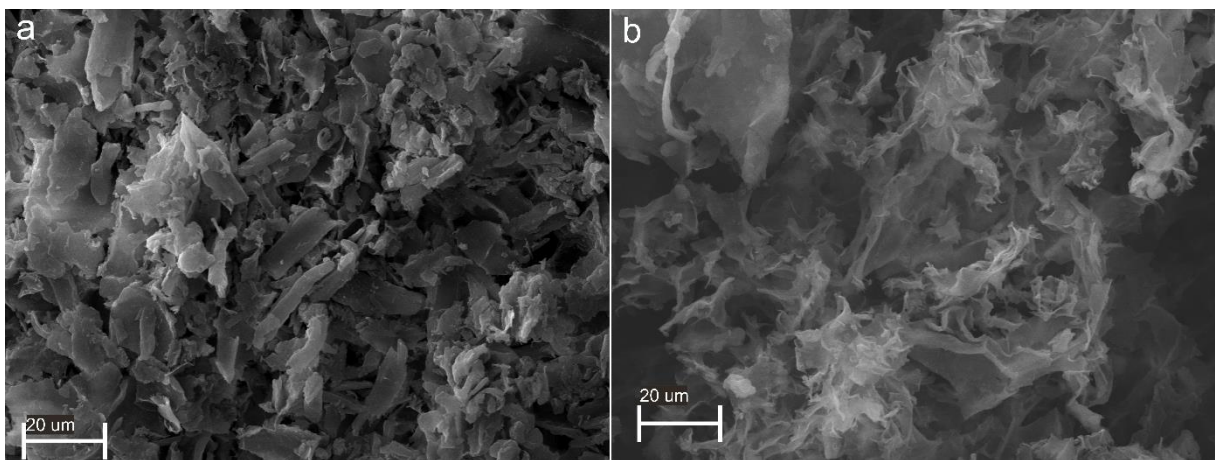


Joonis 16. nLCM SEM pildid, vasakul UH töötlemata, paremal UH töötlusega 20 minutit.

tLCM puhul on UH töötlusel lõhnutud tselluloosi kristallid ja saaduseks on siledam materjal, mis võib olla tingitud ligniinist (**Joonis 17**). eLCM ja LCM on näha kiulise ja keeruka struktuuri teket (**Joonis 18** ja **Joonis 15**).



Joonis 17. tLCM SEM pildid, vasakul UH töötlemata, paremal UH töötlusega 20 minutit.



Joonis 18. eLCM SEM pildid, vasakul UH töötlemata, paremal UH töötlusega 20 minutit.

SEM pildid ei anna täielikku ülevaadet sellest, milline näeb materjal välja lahuses kuna kuivatatud ja kuivatamata proovidel on suured struktuuralsed erinevused (**Joonis 3**). Nanotselluloosi kuivatamisel, olenemata kuivatamise meetodist, toimub vesiniksidemetest tingitud struktuuri kuhjumine [30]. SEM piltide põhjal on võimalik teha ainult hüpoteetilisi järeldusi lahuses toimunud muutustest, kuid reaalselt visuaalset pilti nanotselluloosist lahuses ei ole võimalik otseselt saada.

5. Kokkuvõte

Lignotselluloosne biomass kooseb peamiselt kolmest biopolümeerist – tselluloos, hemitselluloos ja ligniin. Tselluloos moodustab biomassist valdava enamuse ning üle poole looduses leiduvast süsinikust pärineb tselluloosist. Olles laialdaselt kättesaadav on tselluloosil palju erinevaid kasutusi, millest tuntumad on etanool ja paber. Aina rohkem on hakatud uurima ja kasutama nanotselluloosi, mille mõõtmed on nanoskaalas. Nanotselluloosil on palju kasulikke omadusi ja sellest tulenevalt kasutatakse seda paljudes valdkondades. Näiteks on võimalik kasutada nanotselluloosi biomeditsiinis, kuna on biolagunev ja biosobiv. Parim meetod nanotselluloosi tootmiseks on ultraheli rakendamine. Ultraheli tekitab lahuses kavitatsiooni nähtust, kus suure rõhu ja temperatuurierinevusega mullid lahuses lõhkevad, lõhkudes ettejäävaid molekule. Samuti toimub vee pürolüüs saades väga reaktiivseid radikaale, mis on võimelised molekule oksüdeerima.

Käesolevas töös koostati lahustuvuskõver esialgse lignotselluloosse segu lahustamiseks etanool-vesi segudes ning karakteriseeriti ultraheli töötusel nanotselluloosi teket lignotselluloossetes segudes erinevatel tselluloosi ja ligniini osakaaludel. Erineva ligniini sisaldusega lignotselluloossete segude saamiseks lahustati esialgne lignotselluloosne segu, NaOH, THF ja EtOH lahustes. Kuna kõik lahustid lahustavad segu erinevalt, oli tulemuseks erineva ligniini sisaldusega segud. Kõikidele segudele teostati ultraheli töötus erineva kestvusega – 5, 10 ja 20 minutit. Töödeldud segudele teostati veesiduvuse, osakese suuruse ja SEM analüüsid. Tulemustest selgus, et ultraheli töötuse käigus tselluloosi fiibrите mõõt väheneb. 20 minutilise ultraheli töötusega tekib juba suures koguses nanotselluloosi. Veesiduvus paranes nii fiibri suuruse kui ka ligniini sisalduse vähenemisega. SEM piltidelt on näha UH töödeldud ja töötlemata proovidel märkimisväärseid erinevusi. nLCM ja tLCM puhul, kus ligniini sisaldus on madalaim, on selgelt näha töötlemata proovis tselluloosi kristalle. Peale töötlust kristalle enam näha ei ole. Madalaima ligniini sisaldusega nLCM-is on SEM pildil fibrillaarne moodustis. LCM segus, kus ligniini kogus on kõrgeim, on näha poorset struktuuri ning sfäärilised moodustised on tõenäoliselt ligniin.

Tulemustest selgub, et ultraheli töötusel ligniini sisaldus segus ei sega nanotselluloosi teket. Küll aga on veesiduvus tugevalt mõjutatud ligniini osakaalust. Tulemused annavad võimaluse edasi arendada ligniin-nanotselluloosseid materjale. Kuna ligniin annab nanotselluloosile juurde kasulikke omadusi, võiks uurida võimalusi nende omaduste rakendamiseks, näiteks päikesekreemides, kus saaks kasutada ligniini UV-resistentsust ja termilist stabiilsust

6. Summary

Lignocellulosic biomass consists mainly of three biopolymers - cellulose, hemicellulose, and lignin. Cellulose constitutes the majority of biomass, and over half of the carbon found in nature comes from cellulose. Being widely available, cellulose has many different end products, with the most well-known being ethanol and paper. Nanocellulose, which has nanoscale dimensions, is increasingly studied and used in various fields due to its characteristic properties. For example, it can be used in biomedicine because it is biodegradable and biocompatible. The best method for producing nanocellulose is the application of ultrasound. Ultrasound generates the cavitation phenomenon in the solution, where bubbles in the solution collapse with high pressure and high temperatures, breaking adjacent molecules. Water pyrolysis also occurs, producing highly reactive radicals capable of oxidizing molecules.

In this thesis, lignin-cellulose mixture solubility is determined in ethanol-water mixtures, and the formation of nanocellulose in lignocellulosic mixtures was characterized under ultrasonic treatment at different cellulose and lignin ratios. To obtain lignocellulosic mixtures with different lignin contents, the initial lignocellulosic mixture was dissolved in different solvents - NaOH, THF, and EtOH. Since all solvents dissolve the mixture differently, LCM with varying lignin contents were obtained. The mixtures were subjected to ultrasonic treatment for different durations. The treated mixtures were analyzed for water retention, particle size, and SEM visualization. The results revealed that the duration of ultrasonic treatment decreases the size of cellulose. A significant amount of nanocellulose was formed with 20-minute ultrasonic treatment. Water absorbency improved with decreasing fiber size and lignin content. SEM images showed significant differences between the treated and untreated samples. In the case of nLCM and tLCM, where lignin content is the lowest, cellulose crystals are clearly visible in the untreated sample. After treatment, the crystals are no longer visible. In nLCM with the lowest lignin content, a fibrillar structure is visible in the SEM image. In LCM with the highest lignin content, a porous structure forms, and the spherical formations are likely to be lignin.

The results indicate that the presence of lignin in the mixture does not hinder the formation of nanocellulose under ultrasonic treatment. However, water absorbency is strongly influenced by the proportion of lignin. The results provide an opportunity to further develop lignin-nanocellulose materials. Since lignin imparts beneficial properties to nanocellulose, opportunities could be developed to utilize them, for example, in sunscreens by using lignin's UV resistance and thermal stability as well as the emulsion properties of nanocellulose.

7. Kasutatud kirjandus

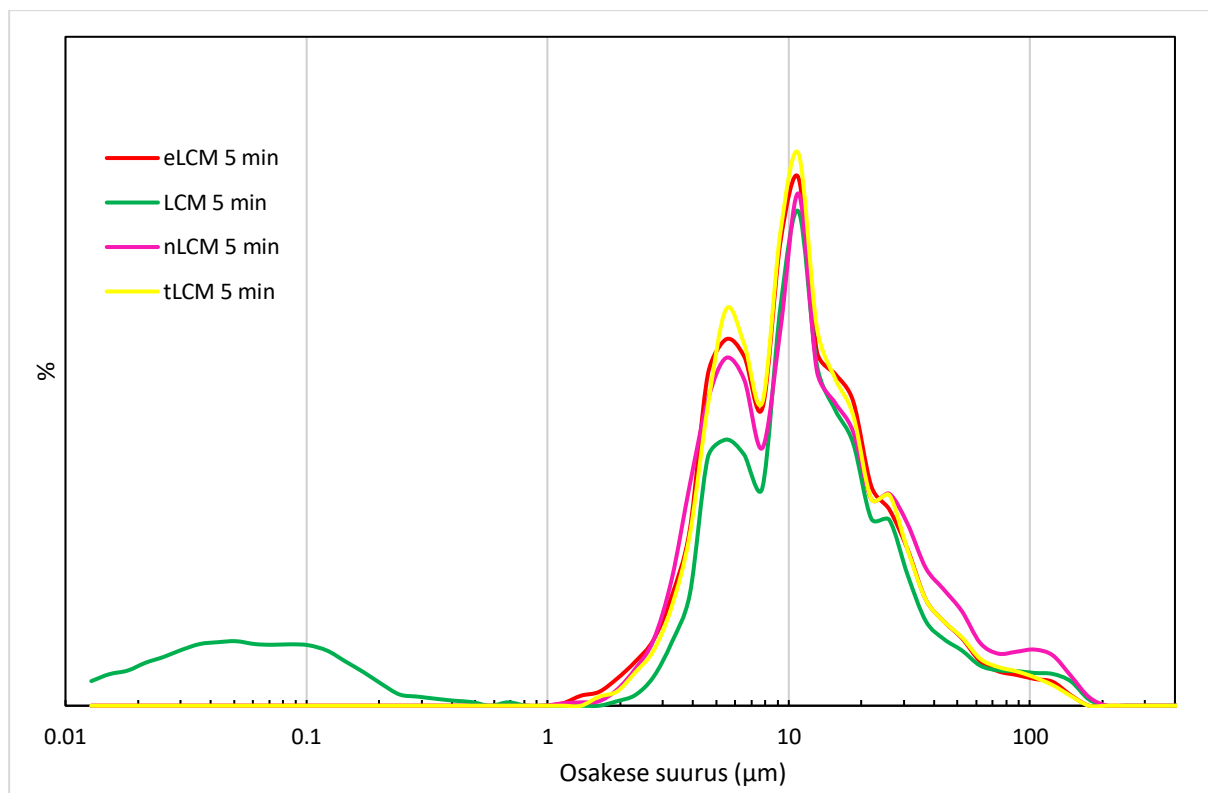
1. Lu, A.; Yu, X.; Ji, Q.; Chen, L.; Yagoub, A. E.-G.; Olugbenga, F.; Zhou, C. Preparation and Characterization of Lignin-Containing Cellulose Nanocrystals from Peanut Shells Using a Deep Eutectic Solvent Containing Lignin-Derived Phenol. *Ind. Crops Prod.* **2023**, *195*, 116415. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116415>.
2. Saini, J. K.; Saini, R.; Tewari, L. Lignocellulosic Agriculture Wastes as Biomass Feedstocks for Second-Generation Bioethanol Production: Concepts and Recent Developments. *3 Biotech* **2015**, *5* (4), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0246-5>.
3. Zhu, S.; Sun, H.; Mu, T.; Li, Q.; Richel, A. Preparation of Cellulose Nanocrystals from Purple Sweet Potato Peels by Ultrasound-Assisted Maleic Acid Hydrolysis. *Food Chem.* **2023**, *403*, 134496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134496>.
4. Cheah, Y. J.; Yunus, M. H. M.; Fauzi, M. B.; Tabata, Y.; Hiraoka, Y.; Phang, S. J.; Chia, M. R.; Buyong, M. R.; Yazid, M. D. Gelatin–Chitosan–Cellulose Nanocrystals as an Acellular Scaffold for Wound Healing Application: Fabrication, Characterisation and Cytocompatibility towards Primary Human Skin Cells. *Cellulose* **2023**. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05212-w>.
5. Lu, Y.; He, Q.; Fan, G.; Cheng, Q.; Song, G. Extraction and Modification of Hemicellulose from Lignocellulosic Biomass: A Review. *Green Process. Synth.* **2021**, *10* (1), 779–804. <https://doi.org/10.1515/gps-2021-0065>.
6. Melro, E.; Alves, L.; Antunes, F. E.; Medronho, B. A Brief Overview on Lignin Dissolution. *J. Mol. Liq.* **2018**, *265*, 578–584. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.021>.
7. Harris, D.; Bulone, V.; Ding, S.-Y.; DeBolt, S. Tools for Cellulose Analysis in Plant Cell Walls. *Plant Physiol.* **2010**, *153* (2), 420–426. <https://doi.org/10.1104/pp.110.154203>.
8. Zhu, X.; Han, Y.; Feng, Y.; Cheng, P.; Peng, Y.; Wang, J.; Cai, J.; Chen, Y. Formation and Emission Characteristics of Intermediate Volatile Organic Compounds (IVOCs) from the Combustion of Biomass and Their Cellulose, Hemicellulose, and Lignin. *Atmos. Environ.* **2022**, *286*, 119217. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2022.119217>.
9. Han, Z.; Zhu, H.; Cheng, J.-H. Structure Modification and Property Improvement of Plant Cellulose: Based on Emerging and Sustainable Nonthermal Processing Technologies. *Food Res. Int.* **2022**, *156*, 111300. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111300>.
10. Vasić, K.; Knez, Ž.; Leitgeb, M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. *Molecules* **2021**, *26* (3), 753. <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>.

11. Lindman, B.; Karlström, G.; Stigsson, L. On the Mechanism of Dissolution of Cellulose. *J. Mol. Liq.* **2010**, *156* (1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2010.04.016>.
12. Cheng, Q.; Wang, J.; Mcneel, J.; Jacobson, P. Water Retention Value Measurements of Cellulosic Materials Using a Centrifuge Technique. *Bioresources* **2010**, *5*. <https://doi.org/10.15376/biores.5.3.1945-1954>.
13. Ioelovich, M. Microcellulose Vs Nanocellulose -A Review. *World J. Adv. Eng. Technol. Sci.* **2022**, *5*. <https://doi.org/10.30574/wjaets.2022.5.2.0037>.
14. Chen, H.; Wang, X.; Bozell, J.; Feng, X.; Huang, J.; Li, Q.; Ragauskas, A.; Wang, S.; Mei, C. Effect of Solvent Fractionation Pretreatment on Energy Consumption of Cellulose Nanofabrication from Switchgrass. *J. Mater. Sci.* **2019**, *54*. <https://doi.org/10.1007/s10853-019-03413-y>.
15. Olejnik, K.; Skalski, B.; Stanislawski, A.; Wysocka-Robak, A. Swelling Properties and Generation of Cellulose Fines Originating from Bleached Kraft Pulp Refined under Different Operating Conditions. *Cellulose* **2017**, *24* (9), 3955–3967. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1404-9>.
16. Chen, Z.; Wang, Y.; Cheng, H.; Zhou, H. Hemicellulose Degradation: An Overlooked Issue in Acidic Deep Eutectic Solvents Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *187*, 115335. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115335>.
17. Poveda-Giraldo, J. A.; Solarte-Toro, J. C.; Cardona Alzate, C. A. The Potential Use of Lignin as a Platform Product in Biorefineries: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2021**, *138*, 110688. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110688>.
18. Zhang, L.; Larsson, A.; Moldin, A.; Edlund, U. Comparison of Lignin Distribution, Structure, and Morphology in Wheat Straw and Wood. *Ind. Crops Prod.* **2022**, *187*, 115432. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115432>.
19. del Río, J. C.; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Elder, T.; Kim, H.; Ralph, J. Lignin Monomers from beyond the Canonical Monolignol Biosynthetic Pathway: Another Brick in the Wall. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (13), 4997–5012. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01109>.
20. Chapter 2 - Structure and Characteristics of Lignin. In *Lignin Chemistry and Applications*; Huang, J., Fu, S., Gan, L., Eds.; Elsevier, 2019; pp 25–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813941-7.00002-3>.
21. Moncada B., J.; Aristizábal M., V.; Cardona A., C. A. Design Strategies for Sustainable Biorefineries. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *116*, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.06.009>.

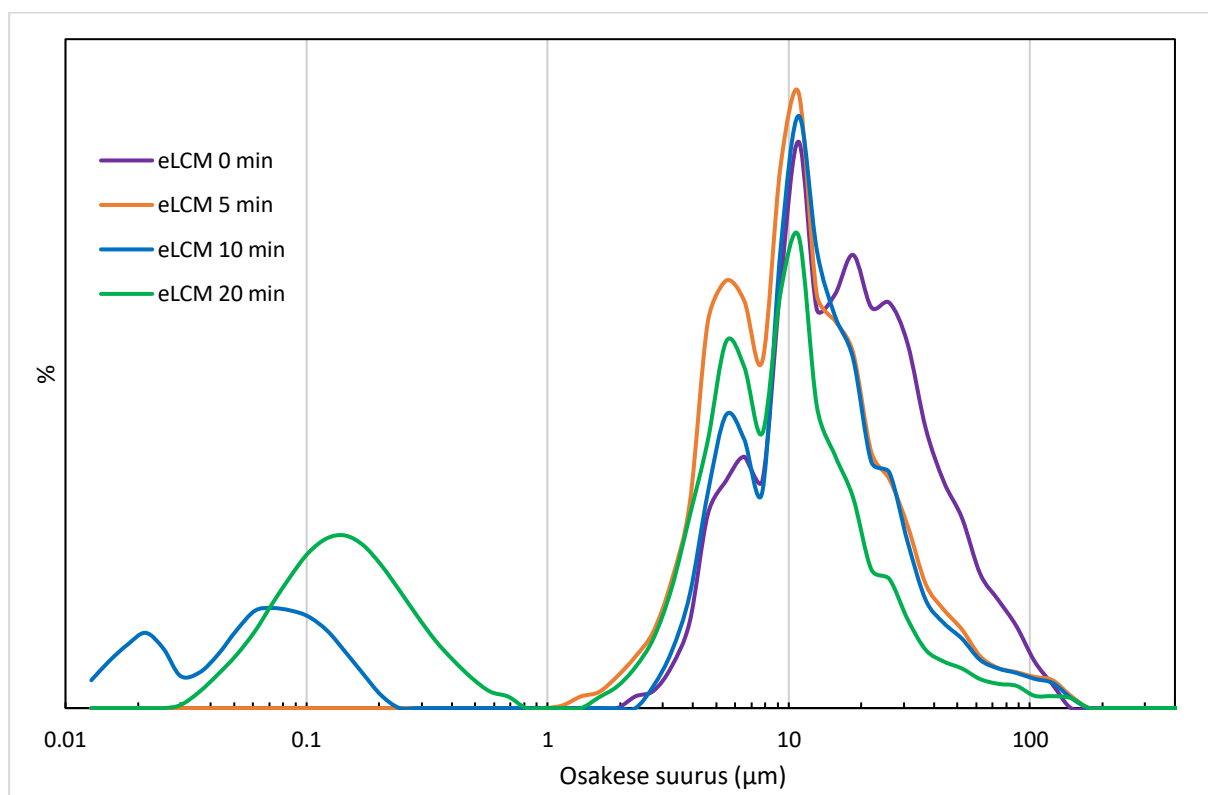
22. Demuner, I. F.; Colodette, J. L.; Demuner, A. J.; Jardim, C. M. Biorefinery Review: Wide-Reaching Products through Kraft Lignin. *BioResources* **2019**, *14* (3), 7543–7581. <https://doi.org/10.15376/biores.14.3.Demuner>.
23. Li, T.; Takkellapati, S. The Current and Emerging Sources of Technical Lignins and Their Applications. *Biofuels Bioprod. Biorefining* **2018**, *12* (5), 756–787. <https://doi.org/10.1002/bbb.1913>.
24. Binod, P.; Janu, K. U.; Sindhu, R.; Pandey, A. Chapter 10 - Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. In *Biofuels*; Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S. C., Dussap, C.-G., Gnansounou, E., Eds.; Academic Press: Amsterdam, 2011; pp 229–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00010-3>.
25. Dheyab, M. A.; Aziz, A. A.; Jameel, M. S.; Khaniabadi, P. M.; Mehrdel, B. Mechanisms of Effective Gold Shell on Fe₃O₄ Core Nanoparticles Formation Using Sonochemistry Method. *Ultrason. Sonochem.* **2020**, *64*, 104865. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104865>.
26. Yasui, K. Numerical Simulations for Sonochemistry. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *78*, 105728. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105728>.
27. Juretic, H.; Montalbo-Lombay, M.; van Leeuwen, J. (Hans); Cooper, W. J.; Grewell, D. Hydroxyl Radical Formation in Batch and Continuous Flow Ultrasonic Systems. *Ultrason. Sonochem.* **2015**, *22*, 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.07.003>.
28. Han, G.; Bang, J.; Jin, H.-J.; Kwak, H. W. Natural Fiber Nonwoven Preform Using Cellulose Nanocrystal as a Green Additive. *Cellulose* **2023**, *30* (5), 3013–3025. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05047-5>.
29. Balakshin, M. Yu.; Capanema, E. A.; Sulaeva, I.; Schlee, P.; Huang, Z.; Feng, M.; Borghei, M.; Rojas, O. J.; Potthast, A.; Rosenau, T. New Opportunities in the Valorization of Technical Lignins. *ChemSusChem* **2021**, *14* (4), 1016–1036. <https://doi.org/10.1002/cssc.202002553>.
30. Hoo, D. Y.; Low, Z. L.; Low, D. Y. S.; Tang, S. Y.; Manickam, S.; Tan, K. W.; Ban, Z. H. Ultrasonic Cavitation: An Effective Cleaner and Greener Intensification Technology in the Extraction and Surface Modification of Nanocellulose. *Ultrason. Sonochem.* **2022**, *90*, 106176. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106176>.
31. Evstigneyev, E. I.; Shevchenko, S. M. Structure, Chemical Reactivity and Solubility of Lignin: A Fresh Look. *Wood Sci. Technol.* **2019**, *53* (1), 7–47. <https://doi.org/10.1007/s00226-018-1059-1>.

32. Goldmann, W. M.; Ahola, J.; Mikola, M.; Tanskanen, J. Solubility and Fractionation of Indulin AT Kraft Lignin in Ethanol-Water Media. *Sep. Purif. Technol.* **2019**, *209*, 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.06.054>.
33. Melro, E.; Filipe, A.; Sousa, D.; Valente, A. J. M.; Romano, A.; Antunes, F. E.; Medronho, B. Dissolution of Kraft Lignin in Alkaline Solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *148*, 688–695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.153>.
34. Vermaas, J. V.; Crowley, M. F.; Beckham, G. T. Molecular Lignin Solubility and Structure in Organic Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (48), 17839–17850. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c07156>.
35. Innventia AB. Kraft Lignins – Lignin and Carbohydrate Content – Acid Hydrolysis Method, 2016.
36. Puss, K. K.; Loog, M.; Salmar, S. Ultrasound Enhanced Solubilization of Forest Biorefinery Hydrolysis Lignin in Mild Alkaline Conditions. *Ultrason. Sonochem.* **2023**, *93*, 106288. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106288>.
37. Li, M.-F.; Sun, S.-N.; Xu, F.; Sun, R.-C. Ultrasound-Enhanced Extraction of Lignin from Bamboo (*Neosinocalamus Affinis*): Characterization of the Ethanol-Soluble Fractions. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19* (2), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.06.018>.
38. Li, J.; Zhang, W.; Xu, S.; Hu, C. The Roles of H₂O/Tetrahydrofuran System in Lignocellulose Valorization. *Front. Chem.* **2020**, *8*.
39. Bermello, A.; Valle, M.; Orea, U.; Carballo, L. Characterization by Infrared Spectrometry of Lignins of Three Eucalyptus Species. *Int. J. Polym. Mater.* **2010**, *June 2002*, 557–566. <https://doi.org/10.1080/00914030209696301>.
40. Lourençon, T. V.; Hansel, F. A.; da Silva, T. A.; Ramos, L. P.; de Muniz, G. I. B.; Magalhães, W. L. E. Hardwood and Softwood Kraft Lignins Fractionation by Simple Sequential Acid Precipitation. *Sep. Purif. Technol.* **2015**, *154*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.09.015>.

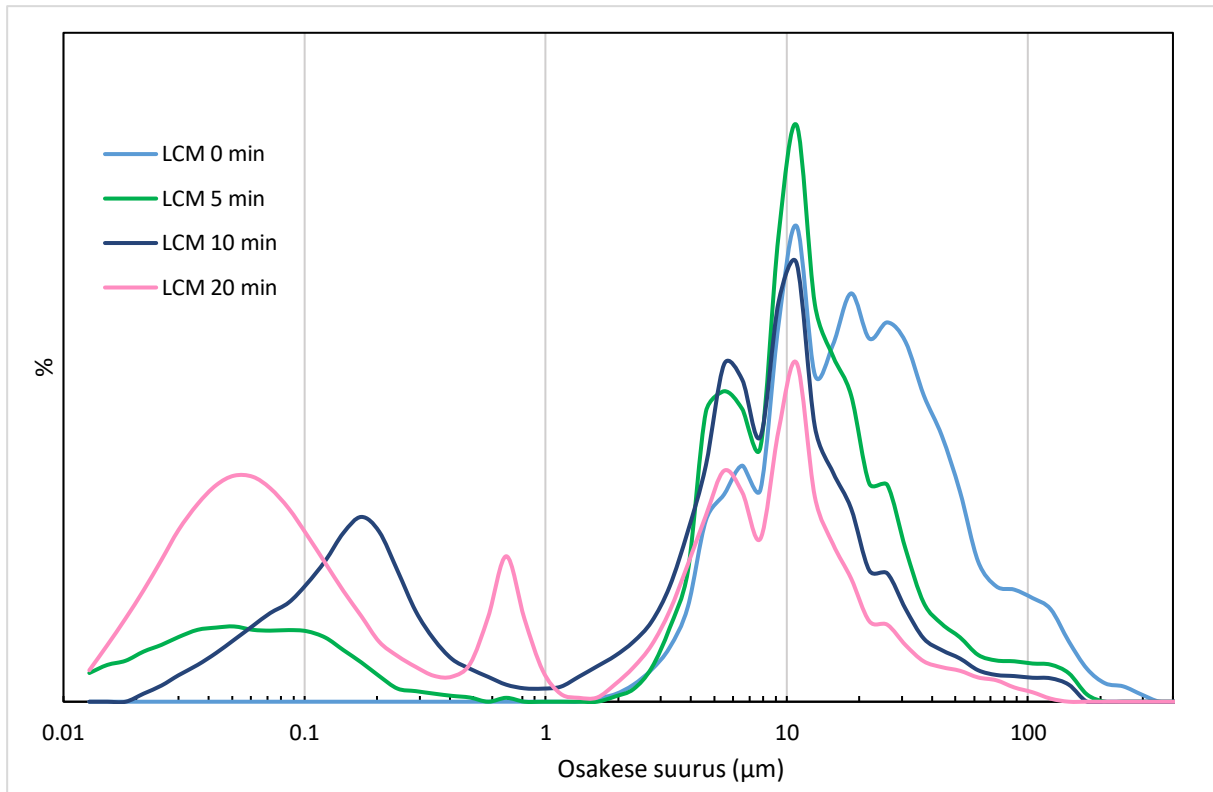
8. Lisad



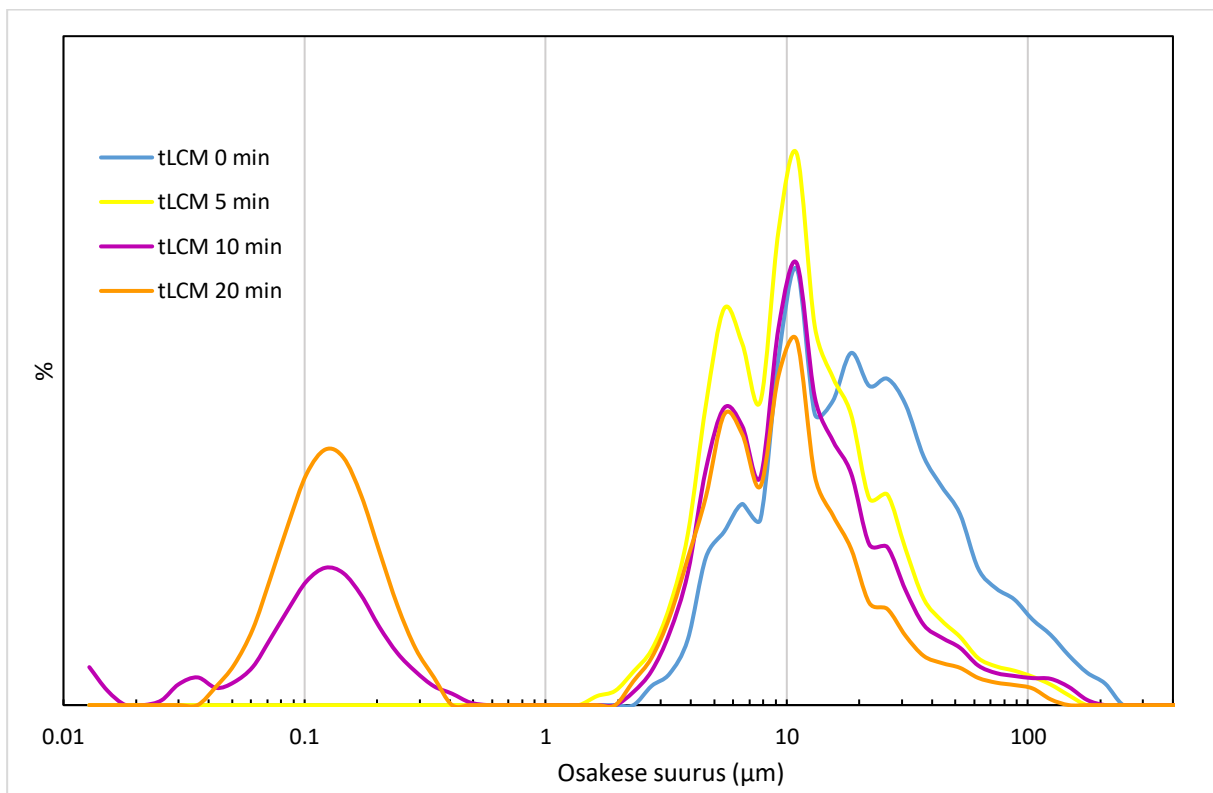
Lisa 1. eLCM, LCM, nLCM, tLCM osakese suuruse graafik 5 min UH töötusega.



Lisa 2. eLCM osakese suuruse graafik UH aegadel 0, 5, 10, ja 20 min.



Lisa 3. LCM osakese suuruse graafik UH aegadel 0, 5, 10, ja 20 min.



Lisa 4. tLCM osakese suuruse graafik UH aegadel 0, 5, 10 ja 20 min.

9. Lihtlitsents

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Eva-Lotta Palmiste

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Tselluloosi kristallide kaitsekilp – ligniini sisalduse mõju ultraheli efektile

mille juhendajad on Kait Kaarel Puss ja Siim Salmar, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

1. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, **alates 24.05.2026** kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Eva-Lotta Palmiste

24.05.2023