

**KONTRASTIN LISÄÄMINEN PUUKUIDUN
RAKENTEEN SELVITTÄMISEKSI JA
PAIKALLISTAMISEKSI PAPERIARKISTA
RÖNTGENTOMOGRAFIALLA**

Pro gradu -tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

Orgaanisen kemian pääaine

21.11.2011

Riikka Koski

Vipuvoimaa
EU:lta
2007–2013



Euroopan unioni
Euroopan aluekehitysrahasto



KESKI-SUOMEN LIITTO
Regional Council of Central Finland

TIIVISTELMÄ

Pro gradu -tutkielman kirjallisuusosassa tavoitteena oli esitellä kemiallisia kontrastin kemiallisia lisäysmenetelmiä puukuitumateriaalille. Kontrastin lisäyksen tavoitteena on pystyä paikallistamaan kuitufraktioita, kuten nanoselluloosaa ja hienoaainesta, paperiarkista röntgentomografiakuvauksen avulla. Kuidun eri kerrosten kontrastien lisääminen toisiin kerroksiin nähden auttaisi myös kuidun yksityiskohtaisen kerrosrakenteen määrittämisessä tomografiakuvantamisella, mikä on myös yhtenä tavoiteltavana kohteena.

Alussa aihetta pohjustetaan kertomalla tomografiasta materiaalin rakenteen tutkimusmenetelmänä ja syvennyttään ymmärtämään kuidun monimutkaista rakennetta. Merkintä- ja värjäysmenetelmiä käydään läpi jo olemassa olevista värjäys- ja merkintämenetelmistä aina sovellettaviin keinoihin.

ESIPUHE

Pro gradu -tutkielma on kirjoitettu vuoden 2011 tammikuun ja lokakuun välisenä aikana. Tutkielman aihe on saatu Teknologian tutkimuskeskuksen VTT:n Jyväskylän toimipisteen ja Jyväskylän yliopiston fysiikan laitoksen yhteistyön antimista. Aihe kuului osaksi FuFiPro-projektia, jonka rahoitus tuli Euroopan unionin Euroopan aluekehitysrahastolta ja Keski-Suomen liitolta. Aiheeseen liittyen on tehty tutkimusprojekti, joka on osa kemian alan syventäviä opintojani. Tutkielmassa käytetyt kirjallisuusviitteet on löydetty pääosin SciFinder - ja Web of Science -tietokantoja sekä VTT:n omia tietokantoja käyttäen.

Tahdon kiittää Teknologian tutkimuskeskus VTT:tä ja Jyväskylän yliopiston fysiikan laitosta mielenkiintoisesta ja haasteellisesta aiheesta. Haluan kiittää suuresti projektin päävetäjänä toimivaa VTT:n tiiminvetäjääni erikoistutkija Juha Salmelaa. Kiitos hänelle innostavasta aiheesta. Tahdon kiittää suurella sydämelläni myös tutkielmani ohjaajaa professori Maija Nissistä loistavasta ja korvaamattomasta ohjauksesta sekä pro gradu -tutkielman tarkastamisesta. VTT:n asiakaspäällikkö Terhi Saarelle suuri kiitos tutkielman tarkastamisesta. Kiitos kuuluu myös Jyväskylän yliopiston professori Markku Katajalle ja tutkijatohtori Markko Myllykselle sekä koko fysiikan laitoksen tomografiaporukalle tomografiaosaamisen neuvoista. Kiitän myös VTT:n johtava tutkija Elias Retulaista kuituosuuden ohjauksesta. Kiitokset kuuluvat lisäksi VTT:n tutkija Pia Vennolle ja erikoistutkija Timo Lappalaiselle hyvistä ohjeista ja mukavasta matkaseurasta matkalla Ruotsin KTH-korkeakouluun kokeilemaan erästä merkitsemismenetelmää, joka oli osa tutkimusprojektia. Kiitokset näin ollen myös KTH:n Harry Brumerille ja Johan Larsbrinkille. Lämpimät halaukset koko VTT:n mukavalle ja ystävälliselle työporukalle, joiden kanssa on ollut kiva tehdä töitä opiskelujeni ohessa. Kiitokset Anssi Lipposelle ja Henna Martiskaiselle vasta-aineisiin ja entsyymien sitoutumisasiin perustuvien merkitsemismenetelmien - tekstiosuuden korjaus-ehdotuksista.

Suurimmat ja lämpimimmät kiitokset kuuluvat kihlatulleni Arille, joka on jaksanut kannustaa, tukea ja kuunnella minua koko yhteiselomme ajan. Lämpimät kiitokset myös perheelleni ja ystäväilleni opiskelujeni kannustuksesta.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ.....	II
ESIPUHE	III
KÄYTETYT LYHENTEET	VI
1 JOHDANTO.....	1
2 RÖNTGENTOMOGRAFIA PUUKUITUNÄYTTEIDEN ANALYSOINNISSA.....	3
2.1 RÖNTGENSÄTEILY	3
2.1.1 Röntgensäteilyn muodostuminen	3
2.1.2 Röntgensäteilyn vuorovaikutus materiaalin kanssa.....	4
2.2 RÖNTGENSÄDETOMOGRAFIA.....	5
2.2.1 Periaate.....	5
2.2.2 Tomografian eri menetelmät kuitunäytteiden kuvantamisessa	6
2.2.3 Röntgentomografialaitteisto	7
2.3 TOMOGRAFIADATAN ANALYSOINTI JA PROJEKTIOIDEN REKONSTRUOINTI KOLMIULOTTEISEKSI KUVAKSI.....	11
2.3.1 Kuituperäisen näytteen kuvadatan analysointi ja karakterisointi	12
3 PUUKUIDUN RAKENNE	13
3.1 PUUKUIDUN MAKROSKOOPINEN RAKENNE.....	13
3.1.1 Puusolujen makrorakenne ja tehtäväluokittelu.....	13
3.1.2 Solujen jaottelu havu- ja lehtipuissa	14
3.1.3 Hienoaines sekä mikro- ja nanokoon kuidut	15
3.2 PUUKUIDUN SOLUSEINÄMÄN KERROSRAKENNE	17
3.2.1 Huokokset	19
3.3 PUUKUIDUN PINNAN JA SOLUSEINÄMÄN KEMIALLINEN KOOSTUMUS JA RAKENNE ..	20
3.3.1 Selluloosa	21
3.3.2 Hemiselluloosa	22
3.3.3 Ligniini.....	23
3.4 KUITUVAURIOT JA DEFORMAATIOT	25
3.5 MIKROSKOPIAMENETELMÄT PUUKUIDUN JA RAKENTEEN MÄÄRITTÄMISESSÄ	27

4 MERKINTÄ- JA VÄRJÄYSMENETELMÄT	29
4.1 VÄRJÄYS EPÄORGAANISILLA SUOLOILLA JA ATSOVÄRIAINOILLA	31
4.2 VASTA-AINEISIIN JA ENTSYIMIEN SITOUTUVIIN OSIIN PERUSTUVAT PAIKALLISTAMISMENETELMÄT KONTRASTIN LISÄÄMISEKSI	33
4.2.1 CBM:n käyttö kontrastin lisäyskeinona.....	33
4.2.2 Biotiini-avidiini-systeemiin perustuva merkintämenetelmä	37
4.3 METALLIKALVOPÄÄLLYSTYKSEEN PERUSTUVAT KONTRASTIN LISÄYSMENETELMÄT.....	38
4.3.1 Atomikerrossaostumatekniikka (ALD).....	38
4.3.2 Sputterointitekniikka.....	38
4.4 METALLINANOPARTIKKELEIHIN PERUSTUVAT KONTRASTIN LISÄYSMENETELMÄT..	39
4.4.1 Hiilihydraattien kytkentä kultananopartikkeleihin	39
4.4.2 Ioninesteisiin perustuva selluloosa/kultananokidehybridien valmistus	40
4.4.3 Metallinanopartikkeleiden syntetisointi huokosiin.....	40
4.4.4 Metallinanopartikkeleiden syntetisointi bakteeriselluloosaan	41
4.5 PAINEKYLLÄSTYS SOVELLETTAVANA MENETELMÄNÄ	42
5 YHTEENVETO.....	42

KÄYTETYT LYHENTEET

AFM	atomivoimamikroskopia
ALD	atomikerrossaostumatekniikka
BACH	biotiiniamidokaprooylihydratsidi
CBM	hiilihydraattiin / selluloosaan sitoutuva rakennuspalikka
CCD	varauskytketty kuvantamisilmaisim
Ct	<i>Clostridium thermocellum</i>
DOF	terävyysalue
FE-SEM	kenttäemissiopyyhkäiselektronimikroskopia
FITC	fluoreseiini-isotiosyanaatti
FOV	Field Of View = kuvausalue
GFP	vihreänä fluoresoiva proteiini
GH	<i>O</i> -glykosyylihydrolaasi
His	histidiini
keV	kiloelektronivoltti
Kryo-TEM	jäähdytetty transmissioelektronimikroskopia
mA	milliampeeri
MFC	mikrofibrilloitu selluloosa
MicroXCT	mikrotomografialaitteisto
ML	välilamelli
MTF	Modulation Transfer Function = modulaation siirtymäfunktio
NCC	nanokiteinen selluloosa
NFC	nanofibrilloitu selluloosa
P	primääriseinä
PARA	perjodihappohapetus, pelkistävä aminointi

PFPA	perfluorofenyylisidi
QD	kvanttipiste
RFP	punaisena fluoresoiva proteiini
S1	sekundääriseinän ulkokerros
S2	sekundääriseinän keskikerros
S3, T	sekundääriseinän sisäkerros
SEM	pyyhkäiselektronimikroskopia
STEM	pyyhkäisytransmissioelektronimikroskopia
TEM	transmissioelektronimikroskopia
ToF-SIMS	lentoaikaerotteinen sekundääri-ionimassaspektrometri
TRITC	tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti
W	kyhmykerros
XPS	röntgenfotoelektronispektroskopia

1 JOHDANTO

Klassinen kuvattavien näytteiden rakenteiden karakterisoiminen suoritetaan usein kaksikulotteisilla kuvantamismenetelmillä, kuten optisella mikroskopialla tai elektronimikroskooppisin tekniikoin. Niillä saadaan suuri määrä rakenteellista tietoa näytteen pinnasta sekä pinnalla olevista kohteista, mutta ne eivät kuitenkaan usein ole riittäviä kuvaamaan näytteen sisäistä rakennetta ilman näytettä rikkovien poikkileikkeiden valmistamista.¹

Röntgentomografia, joka on suhteellisen uusi menetelmä materiaalitutkimuksessa, tarjoaa näytettä rikkomattoman menetelmän kohteen sisäisen rakenteen tutkimiseen. Menetelmä perustuu röntgensäteisiin, joiden olemassaolon Wilhelm Röntgen havaitsi ensimmäisen kerran vuonna 1895.² Röntgensäteitä on käytetty lääketieteellisissä tutkimuksissa jo vuosikymmeniä tutkimaan potilaan sisäisiä luurakenteita, mahdollisia murtumia ja syöpäsolujen kasvua.³ Lääketieteessä tomografiatutkimukset, joissa sekä lähde että detektori pyörivät potilaan ympäri kuvauksen aikana, alkoivat yleistyä 1970-luvulla. Korkean resoluution röntgensädetomografia, jossa näytettä pyöritetään pyörimisakselin ympäri pienin kulmamuuutoksin detektorin ja lähteen ollessa kiinteästi paikallaan, tuli teollisuuden materiaalien tutkimusten käyttöön vasta reilu vuosikymmen sen jälkeen.^{4,5} Röntgentomografialla voidaan tutkia muun muassa rakenteen sisäisiä huokosia, vikoja, laitteen osia, murtumia sekä erilaisista komponenteista ja kemikaaleista koostuvien materiaalien rakenteita.³

Suurena mielenkiinnon kohteena paperiteollisuudessa on nähdä kolmiulotteisesti kuidun sisäistä rakennetta ja paperin sisäistä kuituverkoston rakennetta, kuitujen kytkeytymistä toisiinsa ja kuitufraktioiden hajaantuneisuutta. Pääongelmana kuitujen röntgentomografiakuvauksissa kuitenkin on kuidun kemiallisten ainesosien, kuten hiilihydraattien, samankaltaisuus. Hiilihydraatit koostuvat pääosin kevyistä alkuaineista, kuten hapesta, hiilestä ja vedystä. Kevyet alkuaineet absorboivat röntgensäteitä hyvin heikosti, jolloin röntgensäteet eivät kykene erottamaan pienimpiä komponentteja toisistaan.⁶ Merkintä- ja värjäysmenetelmillä kuidun kontrastia voidaan parantaa, jolloin tomografialla saatu kuvadata on paljon yksityiskohtaisempi kartta kuidun sekä paperin sisäisestä rakenteesta.

Pro gradu -tutkielman päätavoitteena on esitellä kirjallisuudesta löytyviä kontrastin parantamiskeinoja. Aluksi kirjallisuudessa pohjustetaan röntgentomografiaa kuitumateriaalin mittausten menetelmänä, jonka jälkeen kerrotaan tarkemmin kuitujen rakenteesta ja valaistuksesta, miten kuituja on kuvattu mikroskooppisin menetelmin. Lopuksi käydään läpi kirjallisuudessa esiteltyjä kemiallisia merkintämenetelmiä, joita voitaisiin soveltaa kuitujen kontrastin lisäämiseen röntgentomografiassa.

2 RÖNTGENTOMOGRAFIA PUUKUITUNÄYTTEIDEN ANALYSOINNISSA

2.1 Röntgensäteily

2.1.1 Röntgensäteilyn muodostuminen

Röntgensäteily on elektromagneettista säteilyä, jonka aallonpituus on alle yksi ångströmiä (10^{-10} metriä).² Röntgensäteily muodostetaan kiihdyttämällä varauksellisia partikkeleita hehkukatodilta, joka on yleensä röntgenputkessa volframihehkulankaa, anodikohtiolle, joka on yleensä metallia, kuten kuparia (Cu), molybdeenä (Mo), hopeaa (Ag) tai volframia (W). Elektronit emittoituvat lämmitetystä hehkulangasta ja kiihtyvät potentiaalierosta johtuen kohti kohtiota. Elektronien törmätessä anodiin niiden vauhti hiljenee ja osa elektronien kineettisestä energiasta muuttuu jarrutussäteilyksi eli jatkuvan spektrin säteilyksi ja osa karakteristiseksi säteilyksi (Kuva 1), joka on peräisin anodin atomien elektroniverhoon syntyneiden viritystilojen purkautumisesta. Röntgensäteilyssä merkitystä on ainoastaan K-kuoreen liittyvällä karakteristisella säteilyllä, sillä muiden kuorien virityksestä syntyvien fotonien energiat ovat niin pieniä, etteivät ne kykene tunkeutumaan röntgenputken ulkopuolelle. Vain pieni määrä elektronisäteen kineettisestä energiasta muuttuu röntgensäteilyksi. Suurin osa energiasta vapautuu lämpönä.⁵ Tuotetun säteilyn määrä kasvaa, mitä raskaampi alkuaine anodimateriaaliksi valitaan ja mitä korkeampi jännite säädetään. Anodimateriaali vaikuttaa spektrin karakteristisen säteilyn piikkeihin ja jarrutussäteilyn spektrin muotoon.^{2,7}

Röntgensäteilyn fotonien energia röntgendiagnostiikassa on tyypillisesti 10 - 150 keV. Röntgensäteilyn ”kovuus” eli läpätunkevuus riippuu säteilyn kvanttien energiasta. Kova säteily läpäisee ainekerroksia hyvin ja sen kvanttien energia on suuri. Pehmeän säteilyn läpäisykyky on huono ja sen kvanttien energia on pieni.⁷ Pehmeän röntgensäteilyn energia on noin 1 - 10 keV. Korkean intensiteetin piikeillä on erittäin kapea energia-alue. Röntgensäteiden intensiteettiä pienentää se, että röntgensäteet emittoituvat kaikkiin suuntiin ja suurin osa niistä ei ikinä kohtaa kuvattavaa kohdetta.⁵

Kuva 1. Röntgensäteilyn aallonpituusspektri (vas.) ja karakteristisen röntgensäteilyn muodostuminen (oik.).²

2.1.2 Röntgensäteilyn vuorovaikutus materiaalin kanssa

Kaikilla hiukkasilla on sekä aalto- että hiukkasluonnetta. Kun fotonilla on suuri energia, kuten röntgensäteilyllä, sen hiukkasominaisuudet korostuvat. Jokainen fotoni matkaa eteenpäin suoraviivaisesti, kunnes se kohtaa toisen aineen ja joko absorboituu siihen tai siroaa siitä. Sironnan jälkeen fotoni jatkaa uuteen suuntaan muuttuneella energialla, kunnes se kokee uuden vuorovaikutuksen. Vuorovaikutukset jatkuvat niin kauan kunnes fotoni absorboituu tai poistuu aineesta lopullisesti. Atomi jää viritettyyn tilaan energian absorboitumisen jälkeen ja palaa takaisin perustilaansa emittoimalla karakteristisen röntgensäteilyn fotoneita tai Augerin elektroneja. Painavampien alkuaineiden karakteristinen säteily saattaa edetä pitkälle, kun taas Augerin elektronit ja kevyiden alkuaineiden karakteristinen säteily absorboituvat lähelle lähtöpaikkaansa.⁷

Röntgensäteet kykenevät tunkeutumaan näytteen sisään, jolloin on mahdollista nähdä muun muassa näyttemateriaalin sisällä olevia vaurioita tai rakennemuutoksia. Säteily vaimenee näytteessä sen alkuainekoostumuksesta, paksuudesta ja tiheydestä sekä säteilyn spektristä riippuen. Röntgenkuva on näytteen vaimentuneen säteilyn muodostama varjokuva eli tavallisesti negatiivikuva, joka koostuu eri harmaasävyistä. Säteilyä voimakkaasti vaimentavat kohteet näkyvät vaaleampana ja säteilyä hyvin läpäisevät näytteen osat näkyvät tummina alueina. Mitä painavampia alkuaineita ja mitä tiheämpää ainetta säteily kohtaa ja mitä paksunnan ainekerroksen läpi säteilyn täytyy tunkeutua, sitä enemmän säteily vaimenee.^{8,7}

Aallonpituudella λ olevan röntgensäteen vaimeneminen homogeenisessa materiaalissa on esitetty alla olevalla kaavalla (kaava 1), jossa I_0 on vaimentamaton röntgensäteilyn intensiteetti ja I on x paksuisen materiaalin läpi kulkeneen säteilyn intensiteetti ja μ (cm^{-1}) on materiaalille ominainen lineaarinen vaimenemiskerroin.

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

Kun kyseisen kaavan kirjoittaa uudelleen (kaava 2) massavaimennuskertoimen μ/ρ (cm^2/g) ja tiheyden ρ (g/cm^3) avulla, voidaan havaita vaimenemisen määrän olevan verrannollinen röntgensäteen kohtaamien atomien määrään.

$$I = I_0 \exp \left[\left(-\frac{\mu}{\rho} \right) \rho x \right] \quad (2)$$

Esitetyt kaavat ovat röntgensäteiden vaimenemiseen epätäydellisiä, mutta ne ovat riittävän hyviä kuvaamaan useita sovelluksia.⁵ Lambert-Beerin lain mukaan säteilyn intensiteetti pienenee sen kulkiessa näytteen läpi. Säteilyn pieneminen on jokaiselle aineelle ominaista ja siihen vaikuttaa näytteen paksuus, pitoisuus ja näytteeseen tulevan säteilyn aallonpituus.⁹ Monokromaattisen säteilyn tapauksessa, intensiteetiksi saadaan Lambert-Beerin lain mukaan kaava 3, missä säteilyn näytteessä kulkema matka merkitään x -kirjaimella, c on absorboivan aineen konsentraatio ja ϵ on molaarinen absorptiokerroin, joka on jokaiselle aineelle ominainen suure ja aallonpituuden funktio.⁹

$$I = I_0 10^{-\epsilon c x} \quad (3)$$

2.2 Röntgensädetomografia

2.2.1 Periaate

Tomografiakuvauksella kuvattava kohde pystytään kuvaamaan sitä rikkomatta. Kuvantaminen on kaksivaiheinen prosessi: ensin näytteestä muodostetaan ja tallennetaan kuvatiedostot, toisena vaiheena kuvatiedostot jatkokäsitellään ja visualisoidaan kuvan tarkastelua varten sopivaan muotoon. Menetelmä perustuu röntgensäteilyn kohdentamiseen näytteeseen, jonka jälkeen transmittoitunut säde tallennetaan CCD-detektorille. Lambert-Beerin lain mukaan transmittoituneiden fotonien lukumäärän suhde tuleviin fotoneihin on suhteessa materiaalin absorptiovakioon, joka riippuu tiheydestä, atomien järjestysluvusta sekä säteilyn energiasta. Lambert-Beerin laki soveltuu täysin kuitenkin vain monokromaattiselle säteilylle, jota saadaan muodostettua synkrotronissa, mutta se antaa suuntaa antavaa tietoa myös monienergiselle säteilylle, jota muodostetaan röntgenputkessa.

Klassinen tapa saada kolmiulotteista tietoa näyttemateriaalista on kuvata sitä pienin kulmamuuтокsin 0 asteesta vähintään 180 asteeseen (Kuva 2). Näytteestä läpi menneet säteet heijastuvat tuikeilmaisimelle, joka muuntaa röntgensädefotonit näkyviksi valon säteiksi, jotka CCD-kamera havaitsee. Jokaisesta kulma-asemasta otetaan yksi kuva. Kun kuvaus on suoritettu, suoritetaan kuvan rekonstruktio käyttäen esimerkiksi suodatettuun takaisinheijastamiseen perustuvaa algoritmia (filtered back-projection algorithm), jolla projektioradiograafeista eli läpivalaisukuvista rekonstruoidaan näytteelle tilavuusdata eli kolmiulotteinen kuvadata. Projektio tietyssä kulmassa on kuvan integraali kulman määräämässä suunnassa.^{7,10,11} Kolmiulotteisesta kuvasta voidaan valita poikkileikkeitä näytteen eri kohdista ja tarkastella niitä yksittäin tai suuremmissa paloissa. Näin saadaan tietoa näytteen sisäisestä rakenteesta ja koostumuksesta ilman, että näytteeseen tarvitsee laittaa mittaustureita tai näytettä tarvitsee rikkoa tai poikkileikata, kuten esimerkiksi 2D-kuvauksia varten (SEM, TEM). Etuna tomografiassa on juuri se, että näytettä voi tomografiakuvauksen jälkeen vielä analysoida toisella kuvantavalla tai mekaanisella rikkovalla mittaustureilla, sillä näyte säilyy koskemattomana tomografiakuvantamisen ajan.⁵

Kuva 2. Röntgensädetomografiakuvauksen periaate.¹²

Tomografiakuvantamista varten näytteen ei tarvitse olla yhtä ohut kuin mitä esimerkiksi läpäisyelektronimikroskopia vaatii ja näyte kuvataan normaalissa ilmakehän paineessa. Näytettä voidaan haluttaessa lämmittää tai jäähdyttää. Tomografialla voidaan kuvata myös kosteita näytteitä, mutta ne tulee asettaa röntgensäteitä läpäisevään astiaan tai ohutseinäiseen kapillaariin.^{8,13}

2.2.2 Tomografian eri menetelmät kuitunäytteiden kuvantamisessa

Paperin rakenne ja koostumus vaikuttavat merkittävästi paperin fysikaalisiin ominaisuuksiin ja käyttötarkoituksiin. Paperi koostuu halkaisijaltaan 10 - 30 μm ontoista kuiduista, pienemmistä kuituosista, fibrilleistä sekä paperin valmistuksessa lisätystä partikkeleista, kuten täyteaineista. Paperin kuidut koostuvat hiilihydraateista ja ligniinistä eli ne sisältävät vain kevyitä alkuaineita, kuten happea, hiiltä ja vetyä. Kevyet alkuaineet absorboivat säteilyä kuitenkin hyvin heikosti. Paperiteollisuuden suurena

haasteena on jo kauan ollut paperin kolmiulotteisen rakenteen visualisointi. Röntgentomografia on lupaava menetelmä tähän haasteeseen.⁶

Suoraviivaisin menetelmä, joka tarjoaa tarvittavan kontrastin paperin kuvantamiseen, on absorptiomenetelmä, johon tässä työssä keskitytään. Muita menetelmiä ovat faasikontrastimenetelmä sekä holotomografiamenetelmä, jossa on mahdollista analysoida kvantitatiivisesti materiaalin tiheyttä kolmiulotteisesti. Faasikontrastikuvantaminen ei anna riittävää kuvaa kuiduista, vaan sen avulla voidaan erottaa vain huokonen-kuitu -rajapinnat. Absorptio- ja faasikontrastimenetelmät eroavat toisistaan näytteen ja CCD-kameran etäisyyden suhteen. Absorptiomenetelmässä näyte asetetaan lähelle detektoria. Absorptiomenetelmä tallentaa näytteen atomien keskitiheyden, kun taas faasikontrastimenetelmässä tallentuu materiaalin eri taitekertoimisten alueiden rajat.

Faasikontrastimoodissa kontrasti havaitaan, kun säteily on ainakin osittain koherenttia ja etäisyys näytteen ja detektorin välillä on pidempi kuin absorptiomoodissa. Se on kätevä menetelmä, kun halutaan havaita heterogeenisen näytteen sisältämien erilaisten materiaalien raja-alueita (edge detection) etenkin silloin, kun absorptiomoodilla päästään vain heikkoon kontrastiin. Pidentämällä näytteen ja detektorin välistä etäisyyttä materiaalin reunarajoista saadaan vahvempi ja voimakas kuvaus.^{6,11,12}

Absorptiomenetelmässä on merkitystä etenkin näytteen alkuaineiden järjestysluvuilla ja tiheyseroilla. Mitä suurempi ero on, sitä parempi kontrasti saavutetaan ja sitä helpompaa on kuva-analysointi. Muodostuvan kuvan kontrasti perustuu pääosin näytteen eri materiaalien erilaisiin absorptioeroihin. Varsinkin suurella röntgensäteilyn energialla röntgensäteiden vaimenemispituus voi olla hyvin suuri. Tällöin röntgensäteet absorboituvat näytteeseen hyvin vähän, jolloin saadaan huono kuvauskontrasti. Transmission tulisi olla juuri sopiva kuvattavalle näytteelle. Hyvä transmissio on noin kymmenen prosentin luokkaa.^{11,14}

2.2.3 Röntgentomografialaitteisto

Röntgensädetomografialaitteistot voidaan jakaa saavutettavan resoluution mukaan mikrotomografialaitteistoihin sekä nanotomografialaitteistoihin. Mikrotomografialla

päästään 1 - 100 μm :n resoluutioon ja nanotomografialla parhaimmillaan 50 nm:n resoluutioon.^{7,14}

2.2.3.1 Mikrotomografialaitteisto

Tyypillinen mikrotomografialaitteisto koostuu röntgenlähteestä, energiansuodattimesta, näytteenpidikkeestä ja korkean resoluution detektorista (Kuva 3). Mikrotomografialla pystytään saamaan tietoa esimerkiksi näytteen rakenteesta, kuten huokoskokojakaumasta, pilkkomatta näytettä ensin fyysisesti pieniin poikkileikkeisiin. Näytteen laadulle ei ole merkittäviä rajoituksia ja mikrotomografiamenetelmällä on tutkittu muun muassa paperi-, maaperä-, puu-, ja kasvinäytteitä, fossilisoituneita näytteitä sekä päällysteitä. Lisäksi menetelmällä on tutkittu komposiittien vauriokasaantumista, metallien väsymishalkeamia ja keraamisten aineiden tihentymistä. Päähaitat mikrotomografiassa ovat laitteiston korkea hinta ja laitteistojen harvalukuisuus, mikä rajoittaa mittausmahdollisuuksia.^{5, 12, 15-18}

Kuva 3. Mikrotomografialaitteiston (MicroXCT) koostuu tyypillisesti röntgenlähteestä, energiasuodattimesta, näytteenpitimestä sekä korkean resoluution detektorista, jossa on linssit eri suurennoksille.

2.2.3.2 Nanotomografialaitteisto

Tyypillinen nanotomografialaitteiston kokoonpano on esitetty alla (Kuva 4). Nanoluokan kuvantaminen vaatii korkeamman säteilyannoksen kuin mikrotomografialla kuvantaminen, joten säteilylle alttiit näytteet, kuten biologiset kudokset voivat vaatia ennen kuvantamista kryogeenisen tai jonkin muun kiinnitysmenetelmän, joka estää säteilystä johtuvia rakennevaurioita.

Kuva 4. Nanotomografialaitteiston kokoonpano, jossa pääkomponentteina lähteen, energiasuodattimen ja detektorin lisäksi on kondensoiva linssi ja Fresnelin linssi.¹⁴

Nanotomografiassa säteilyn aallonpituudet vastaavat energioita 8 - 11 keV.¹⁹ Jos nanotomografialaitteiston resoluutioksi halutaan 150 nm, tulee näyteeseen olla alle 60 μm ja 50 nm:n resoluutiolla alle 15 μm .²²

Nanotomografialaitteistolla laboratorio- tai synkrotronilähteestä tulevat röntgensäteet fokusoidaan näytteeseen heijastavalla kapillaarioptiikalla ja noin 20 mm näytteen takana on diffraktoiva kohdistusoptiikka, niin sanottu Fresnelin linssi (Fresnel zone plate) (Kuva 5).¹⁴ Diffraktiivisella optiikalla toteutetun röntgenmikroskoopin resoluutioon ei vaikuta lähteen koko, vaan sitä rajoittavat lähinnä Fresnelin linssin ominaisuudet. Mitä ohuimmat rengasalueet linssissä ovat, sitä korkeampi resoluutio saavutetaan. Uloimman alueen leveyden ollessa 35 nm, on teoreettisesti mahdollista saada $\sim 42,7$ nm:n Rayleigh'n resoluutio. Rayleigh'n resoluutio saadaan laskettua kaavalla $\delta = 1,22\Delta r_n$, jossa Δr_n on objektilasin uloimman alueen leveys.

Kuva 5. Fresnelin linssi kokoaa näytteestä tulevan säteilykeilan detektorille.¹⁴

Laboratoriokoon nanotomografialaitteistojen käytännön teknisiä vaikeuksia alle mikronin tilavuusresoluutiolla ovat säteilykeilan stabiilisuus sekä säteilylähteen, kuvattavan näytteen ja detektorin välinen mekaaninen stabiilisuus ja kohdistusongelmat. Kohdistusongelmia voidaan välttää lisäämällä näytteeseen kultapartikkeleita. Kun halutaan resoluutio mahdollisimman suureksi, tulee kuvattavan näytteen kokoa pienentää.²¹

2.2.3.3 Röntgenputki

Röntgensäteilyä voidaan muodostaa laboratoriotyyppisessä röntgenputkessa. Röntgenputken (Kuva 6) kuori on yleensä valmistettu lasista ja sen sisällä on tyhjiö, jossa on putken anodi ja katodi. Säteilyä muodostetaan röntgenputkessa kytkemällä suurjännite eli putkijännite anodin ja katodin välille, jolloin muodostunut sähkökenttä vetää katodilta irtoavat elektronit röntgenputken kohtiolle. Röntgenputken suurjännitteellä säädetään röntgenputken säteilyn tuottoaika. Hehkuvirran avulla voidaan säätää hehkulangan lämpötilaa ja täten emittoituneiden elektronien lukumäärää. Elektronit törmäävät kohtioon jännitteestä riippuen noin 0,3 - 0,6 -kertaisella valon nopeudella. Jännitteestä nähdään suoraan liike-energian suuruus kiloelektronivoltteina eli 60 kV jännitteellä liike-energiaksi saadaan 60 keV. Röntgenputken läpi kulkevalla sähkövirralla kuvataan röntgenputkessa kiihdytettyjen elektronien määrää aikayksikössä. Röntgenputkea pitää jäähdyttää, jotta ylikuumenemista ei tapahtuisi.⁷

Kuva 6. Röntgenputken rakenne.¹³

Kun jännitettä röntgenputkessa nostetaan, saadaan säteilyn määrä lisääntymään sekä muodostettua lyhytaaltoisempaa, korkeaenergisempää eli kovempaa säteilyä.^{7,20} Korkeamman röntgensäde-energian käytön etuina ovat suurempi läpäisyteho ja suurempi terävyysalue (depth of focus, DOF).¹⁴ Säteilyn energia määrittelee röntgensäteilyn läpäisykyvyn. Pehmein säteily absorboituu herkemmin näytteen pintakerrokseen aiheuttaen turhan säteilyannoksen, jota ei voida käyttää kuvan muodostamiseen. Säteilyn suodatuksella voidaan poistaa röntgensäteilystä sen pehmein osa eli pienienergiset kvantit ja lisätä säteilyn keskimääräistä läpäisykykyä. Suodattimena toimii esimerkiksi alumiinista tai kuparista valmistettu levy, joka asetetaan röntgenputken ikkunan eteen. Suodatuksessa säteilyn aallonpituus lyhenee. Näytteeseen absorboituvan säteilyn määrä riippuu absorboivan aineen paksuudesta, tiheydestä ja säteilyn aallonpituudesta. Mitä paksumpi näyte on, sitä suurempaa korkeajännitettä on käytettävä, jotta röntgensäteily läpäisee kuvattavan näytteen. Röntgenputken milliampeerimäärän lisääminen lyhentää ainoastaan kuvausaikaa.^{7,20}

2.2.3.4 Synkrotronisäteily

Röntgensäteilyä voidaan muodostaa myös suuremman laitoksen tarvitsevassa synkrotronikeräysrenkaassa. Kehässä kulkevia elektroneja ohjataan kehän suunnassa olevilla pakottavilla magneettikentillä. Synkrotronissa muodostuu useita eri säteilytyyppejä mikroaalloista infrapunasäteilyyn ja todella kovaan röntgensäteilyyn. Synkrotronissa pystytään keräämään röntgensäteilyä, jonka energia on 25 - 30 keV:n luokkaa. Suuremmat energiat, 30 ja 60 keV, ovat harvinaisempia. Muodostunut säteily on tavalliseen tyhjiöputkisäteilyyn verrattuna paljon voimakkaampaa ja säteily voidaan virittää erittäin kapealle halutulle aallonpituuksien energia-alueelle, joka on paras juuri kuvattavalle näytteelle. Haittana synkrotronisäteilyssä on synkrotronilaitoksen suuri koko ja kalleus.^{2,5}

2.2.3.5 Detektorit

Kuvausdetektoriksi kutsutaan röntgenlaitteiston sitä osaa, joka havaitsee näytteen läpäisseen säteilyn ja muuntaa sen helpommin käsiteltävään muotoon esimerkiksi näkyväksi kuvaksi tai sähköiseksi signaaliksi.⁷ Detektorit voi olla viuhkasäteilydetektorit (1D fan-beam) tai 2-ulotteinen CCD-kamera. CCD-kenno (charge-coupled device) on kaksiulotteinen miljoonien pienten fotodiodidetektorien järjestelmä, joka pystyy havainnoimaan laajan alueen aallonpituuksia samanaikaisesti. CCD-detektoreita käytetään yleisesti havaitsemaan absorptiota, emissiota ja Raman-siroamista. Säteily kohtaa CCD-kamerassa ensimmäiseksi tuikeilmaisinlevyn. Näytteen halutun kuvakohdan tulee mahtua detektorin kuva-alueeseen. Kompromisseja näytteen maksimikoon ja resoluution kesken voidaan tämän vuoksi joutua tekemään. Kokonaiskuvauksen keston vaikuttavat suuresti haluttu resoluutio, CCD-kameran koko, lähteen teho, valittu valotusaika sekä otettavien kuvien lukumäärä.^{2,11} Valotusajalle ei ole ylärajaa, mutta valotusajan olisi hyvä olla vähintään 0,2 sekuntia.

2.3 Tomografiadatan analysointi ja projektioiden rekonstruointi kolmiulotteiseksi kuvaksi

CCD-kamera tallioi kuvattavasta kohteesta jokaisesta kulma-asemasta kuvan. Kuvauksen jälkeen tehdään kolmiulotteisen kuvan rekonstruktio käyttäen esimerkiksi suodatettua takaisinheijastamismenetelmää. Ensimmäiset vaiheet absorptiokuvadatan

käsittelyssä ovat kohinan poisto suodattamalla kuvaa. Tämän jälkeen kuvasta voidaan kynnystää haluttu tieto tai rajata pois alueita. Kuvan eri osien erottelua kutsutaan segmentoinniksi.¹²

2.3.1 Kuituperäisen näytteen kuvadatan analysointi ja karakterisointi

Paperinäytteen tomografiakuvaa (esim. Kuva 7) analysoitaessa paperi jaotellaan kuiduiksi ja tyhjiksi tiloiksi. Yksittäisegmentoinnissa kuitujen massasta erotellaan yksittäiset kuidut. Kun kuvasta halutaan tarkastella vain yhtä haluttua kohdetta tai aluetta, voidaan sille luoda maski. Maskin luomisessa kuvadatan tilavuus ensin binarisoidaan eli kynnystetään etualaksi eli halutuksi analysoitavaksi alueeksi ja taustaksi, eli nollassa ja ykköseksi, jonka jälkeen alkuperäinen kuva kerrotaan kynnystetyllä kuvadatala, jolloin tausta saadaan eliminoitua kuvasta.¹²

Kuva 7. Tyypillinen paperinäytteen röntgentomografiakuvadata.¹²

Kuitukuvien määrittämisessä on pääasiassa kolme eri tasoa, jolla niitä voi määrittää: paperitaso, kuituverkostotaso sekä kuitutaso. Jokaisella tasolla on erilaiset vaatimukset. Paperitason määrittämisessä kuituja ei tarvitse merkitä yksittäin vaan binarisoitu kolmiulotteinen kuva kyseisestä paperinäytteestä riittää. Paperitason määrittämisessä tarkastellaan näytteen pinnan ominaisuuksia, kuten pinta-alaa ja karheutta, materiaalin ominaisuuksia, kuten näytteen paksuutta, kerrosten tiheyttä, neliöpainoa ja materiaalin orientoitumista, huokosominaisuuksia, kuten huokoisuutta ja huokoskokojakaumaa sekä kuljetusominaisuuksia ja aineiden läpäisevyyttä. Kuituverkoston tasolla analysoitaessa jokainen yksittäinen kuitu tulee merkitä ja erottaa toisistaan. Kuituverkoston tasolla määrittää esimerkiksi kuitujen kontaktikohtia sekä keskimääräistä kuidunpituutta. Kuitutason määrittäminen tehdään jokaiselle kuidulle erikseen. Kuitutason määrittämisessä ovat kuidun pituus, seinämän paksuus, kuidun käyryys, vääntyneisyys, taitekohtien määrä, vääntölujuus, luhistumisaste, luumentilavuus, kiharuus, jne.¹²

Kuitumateriaalien analysointi tomografialla on melko hankalaa, sillä kuitunäytteiden rakenne on hyvin satunnaista ja kuidut muodostavat toisiinsa liittyneinä kuituverkoston,

jolloin kuvasta ei ole helppo erotella yksittäisiä kuituja. Kuidut ovat myös muodoltaan hyvin erilaisia ja erikokoisia ja niillä on erilaiset huokosrakenteet, ja ne saattavat olla hyvinkin fibrilloituneita tai katkenneita ja vääntyneitä. Paperi on herkkä kosteuden ja lämpötilan muutoksille, jolloin sen rakenne voi muuttua niiden vaihdellessa. Siksi onkin tärkeää tasapainottaa näyte ennen mittausta haluttuun kosteuteen ja lämpötilaan ja mitata näyte samoissa olosuhteissa. Olosuhteet tulee aina ilmoittaa tulosten yhteydessä.

12, 23, 24

3 PUUKUIDUN RAKENNE

3.1 Puukuidun makroskooppinen rakenne

3.1.1 Puusolujen makrorakenne ja tehtäväluokittelu

Puu koostuu rungosta, latvasta, oksista, juurista sekä lehdistöstä, joista vain kaarnatonta runkokuusta käytetään paperinvalmistukseen. Puun poikkileikkaus jaetaan eri osiin seuraavasti ytimeä ulkokuorelle: ydin, sydänpuu, pintapuuta, jälsi, nila ja kaarna. Puu on anisotrooppista ainesta anatomisten, fyysisten sekä kemiallisten ominaisuuksien suhteen. Se koostuu useista erilaisista soluista, jotka ovat erikoistuneet eri tehtäviin: mekaanisen tuen antamiseen, vedenkuljetukseen, ravintoaineiden varastointiin sekä solun metaboliaan.²⁵

Jakautumisprosessissa solut syntyvät kasvusoluista, minkä jälkeen ne alkavat erilaistua. Eri solut kasvavat pituutta tai leveyttä riippuen niiden tehtävästä. Useimmat soluista kasvavat pitkähköiksi rungon suuntaisiksi kuiduiksi. Soluseinämän paksuuntuessa puusolun kemiallinen koostumus alkaa erikoistua muodostaen jakautuneen polymeerikomposiitin, joissa kemialliset pääyhdisteet ovat selluloosa, hemiselluloosa ja ligniini.^{25, 26}

3.1.1.1 Kevätpuu ja kesäpuu

Puusolujen seinämät muokkautuvat eri paksuisiksi riippuen niiden kasvunopeudesta, joka etenkin lauhkealla vyöhykkeellä riippuu vuodenaikasta. Vaaleaa kevätpuuta muodostuu kasvukauden alussa, jolloin kasvu on nopeaa ja puu tarvitsee tehokkaan

vedenkuljetussysteemin. Tästä johtuen kevätpuun puusoluilla on suuri poikkipinta-ala, ohuet soluseinämät ja suuri avonainen soluontelo eli luumen, joka takaa tehokkaan vedenkuljetusreitit. Kesäpuu, joka on tummempaa, muodostuu kasvukauden lopulla ja solujen poikkipinta-ala on pienempi kuin kevätpuusoluilla. Niillä on myös kapeampi luumen ja ne ovat paksuseinäisempiä puusoluja, minkä ansiosta ne antavat enemmän mekaanista tukea rungolle kuin kevätpuun solut. Kevät- ja kesäpuu vaihtelevat vuorotellen puun poikkileikkauksessa muodostaen vuosirenkaita, joista puun iän voi laskea.²⁵

3.1.2 Solujen jaottelu havu- ja lehtipuissa

Puun solut jaetaan muotonsa perusteella kahteen pääryhmään: suippu- eli prosenkyymisoluihin ja tylppy- eli parenkyymisoluihin. Suippusolut ovat pitkänomaisia ja päistään suippenevia soluja, joiden muodot vaihtelevat. Suippusoluja ovat muun muassa trakeidit ja putkilosolut. Tylppysolut ovat ohutseinäisiä ja lyhyitä soluja, jotka ovat yleensä suorakaiteen muotoisia. Yleisnimeä kuidut käytetään kaikista tukisolun luonteisista lehtipuiden soluista, puusyistä, putkilosoluista ja tylppysoluista. Lehtipuilla erilaisten puusolutyyppien lukumäärä on suurempi kuin havupuilla.

3.1.2.1 Havupuun solut

Havupuun soluja (Kuva 8) ovat erilaiset trakeidit ja tylppysolut. Havupuun kuidulla tarkoitetaan lähinnä trakeideja, jotka ovat päästään umpinaisia, kuitumaisia soluja. Ne hoitavat vedenkuljetuksen ja mekaanisen tuen tehtävää. Johtosolut ja tukisolut ovat pitkänomaisia, rungon suuntaisia kuolleita suippusoluja ja niissä on solun sisällä onkalo eli luumen. Varastosolut ovat ohutseinäisiä parenkyymi- eli tylppysoluja, jotka varastoivat ja kuljettavat ravintoaineita. Trakeidien pituus suomalaisella männyllä ja kuusella on noin 2 - 6 mm ja leveys on 0,02 - 0,05 mm. Lyhyet tylppysolut ovat ravintosoluja, joiden tehtävänä on huolehtia ravinteiden kuljetuksesta ja varastoinnista. Tylppysolut ovat eläviä soluja niin kauan kuin ne kuuluvat pintapuuhun. Havupuun puuaineksesta 5 - 10 % on tylppysoluja ja 90 - 95 % on trakeideja.²⁵⁻²⁷

Kuva 8. Havupuun soluja.²⁶

3.1.2.2 Lehtipuun solut

Lehtipuun päätyyppisoluja (Kuva 9) ovat kuidut, puusyyt, putkilosolut ja tylppysolut. Lehtipuilla kuljetustehtävistä vastaavat suurionteloiset putkilosolut ja tukisoluina toimivat erilaiset kuidut. Putkilosolut ovat suurionteloisia ja ohutseinäisiä leveitä soluja, joissa on runsaasti huokosia. Ne muodostavat päällekkäin asettuneina nesteiden kuljetuksen pystysuunnassa mahdollistavia putkiloita. Lehtipuilla putkilosolut toimivat johtosoluina, ja tukisoluina ovat lähinnä puusyyt. Tylppysolut esiintyvät lehtipuilla säteen suuntaisissa ydinsäteissä sekä rungon suuntaisina jonoina. Lehtipuilla on myös välimuotoja kuitutyypeistä: esimerkiksi kuitutrakeidit toimivat pääasiallisesti tukisoluina sekä nesteen kuljetussoluina. Lehtipuulla puuaineksesta on eniten tukisolukkoa ja putkilosoluja toiseksi eniten. Esimerkiksi koivussa on tukisolukkoa noin 70 % rungon tilavuudesta sekä putkilosoluja 20 - 25 %. Tylppysoluja on noin 5 - 10 %. Lehtipuun kuitujen pituus vaihtelee 0,4 mm:n ja 1,6 mm:n välillä ja leveys on 10 - 40 µm. Putkilosolujen pituus on 0,2 mm:n ja 0,6 mm:n luokkaa ja leveys 10 - 300 µm:ä.²⁵

26

Kuva 9. Lehtipuun soluja.²⁶

3.1.3 Hienoaines sekä mikro- ja nanokoon kuidut

Hienoainekseksi nimitetään puukuitumassan kuitufraktioita, jotka kulkeutuvat Bauer McNett -laitteistossa 200 meshin viiran 75 µm:n aukkojen läpi. Hienoaines koostuu niin sanotusta primäärihienoaineesta, joka käsittää lähinnä pienet tylppysolut, ja sekundäärihienoaineesta, joka koostuu massan jauhatuksessa kuiduista irronneista kappaleista, fibrilleistä, lamelleista jne. Lehtipuusta tehdyssä sellussa primäärihienoaineksen osuus on suurempi kuin havupuun selluilla, sillä lehtipuulla on paljon lyhyitä tylppysoluja. Erilaisia mikro- ja nanokoon kuitupartikkeleita voidaan luokitella vielä edelleen, kuten nanokiteet, nanofibrilloitu selluloosa (NFC), mikrofibrilloitu selluloosa (MFC) ja mikrofibrilli-aggregaatit. Kaupallisia

nanoselluloosatyyppinä ovat muun muassa nanokiteinen selluloosa (NCC, nanocrystalline cellulose) sekä mikrofibrilloitu selluloosa (MFC, microfibrillated cellulose).^{28,29}

Selluloosamateriaalista pystytään tuottamaan nanokokoluokan partikkeleita useilla eri kemiallisilla ja mekaanisillakin menetelmillä, joissa voidaan hyödyntää eri tekniikoita, kuten kryomurskausta, jauhamista, korkeapainehomogenisointia, hydrolyysia, massakolloidisoitua, fluidisoitua sekä ultraäänitekniikkaa. Kemialliset fibrillointimenetelmät antavat paljon homogeenisemmän fibrillimateriaalin kuin mekaaniset menetelmät. Useimmiten käytössä on sekä kemiallinen että mekaaninen menetelmä. Fluidisaattorilla valmistetut nanoselluloosafibrillit ovat pituudeltaan lyhyempiä kuin massakolloidisaattorilla valmistetut fibrillit. Nanokiteen, jonka koko on noin 2-3 nanometriä, fibrillin vierekkäisten selluloosaketjujen lukumäärä on noin viisi kappaletta olettaen, että yhden selluloosamolekyylin leveys on noin 0,4 nm:ä.^{28,29}

Nanoselluloosakuituja voidaan kuvata hyvin korkean resoluution mikroskoopeilla kuten FE-SEM:llä (Kuva 10), mutta näyte pitää päällystää esimerkiksi kullalla ennen kuvausta. Muita hyviä korkean resoluution mikroskopointitekniikoita ovat myös TEM ja AFM-kuvantamismenetelmät (Kuva 11).^{30,31} Eri mikroskopointitekniikat antavat hieman erilaista informaatiota ja osin toisistaan poikkeavia tuloksia. Eroja tuloksiin aiheuttavat näytteen valmistus kuvaukseen, pituuden ja paksuuden analysointimenetelmät, mikroskooppien tekniset resoluutiot sekä pikselien määrä digitaalisissa kuvissa.²⁹

Kuva 10. FE-SEM-kuva fluidisoiduista (vas. yllä) ja karboksimeyloiduista (oik. yllä) nanoselluloosafibrilleistä. FE-SEMillä on päästy 1,9 - 3,1 nanometrin pikseliresoluutioon. Kryo-TEM-kuva (alla) karboksimeyloinnilla valmistetuista nanoselluloosafibrilleistä. Kryo-TEM -menetelmällä on päästy 0,2 – 0,5 nanometrin pikseliresoluutioon.²⁹

Kuva 11. AFM-kuvia nanofibrilloidun (NFC) - ja nanokiteisen (NCC) selluloosakuitumateriaalien hienorakenteesta. a) fluidisoitu NFC, b) NCC kuitukiteitä (wiskereitä) puuvillasta. Kuvien vieressä on korkeusakseli 0 – 20 nanometriin. Kuvien pinta-ala on $2 \times 2 \mu\text{m}$.²⁹

3.2 Puukuidun soluseinämän kerrosrakenne

Puukuidun soluseinämän useat kerrokset (Kuva 12) voidaan havaita perinteisellä valomikroskopiolla isolla suurennoksella. Kerrokset eroavat toisistaan niiden erilaisten fibrilliorientaatioiden sekä kemiallisen koostumuksen johdosta. Tarkkoja yksittäisten kerrosten rakenteellisia eroja pystytään tarkastelemaan elektronimikroskopiolla. Selluloosaketjut muodostavat yhdessä 5 - 30 nm levyisiä mikrofibrillirakenteita. Kyseiset selluloosamikrofibrillit ovat orientoituneet eri kuituseinämäkerroksissa eri tavoin, joko oikeakätiseksi kierteksi (S-heliksi) tai vasenkätiseksi kierteksi (Z-heliksi). Mikrofibrilleissä esiintyy sekä kiteisiä, järjestäytyneitä ja amorfisia, järjestäytymättömiä alueita. Mikrofibrillit voivat muodostaa yhdessä vielä isompia yksikköjä, joista syntyy edelleen lamelleja. Lamellit voidaan jo nähdä hyvin valomikroskoopilla. Mikrofibrillien orientaatioilla on vaikutusta kuituseinämän ja kuidun fyysisiin ominaisuuksiin.^{25, 26} Kuituseinämän kerrosten paksuuksia on esitetty taulukossa 1.

Kuva 12. Kaaviokuva kuidun rakenteesta. ML = välilamelli, P = primääriseinä, S1 = sekundääriseinän ulkokerros, S2 = Sekundääriseinän keskikerros, T = S3 = sekundääriseinän sisäkerros, W = kyhmykerros.^{26, 32}

Taulukko 1. Kuituseinämän kerrosten paksuuksia²⁷

Seinäkerros	Paksuus, μm	Massaosuus, %
Välilamelli	0,50 - 1,50	8
Primääriseinä	0,06 - 0,34	5
Sekundääriseinä S1	0,12 - 0,35	12
Sekundääriseinä S2	1,17 - 3,68	73
Sekundääriseinä S3	0,10 - 0,17	2

Välilamelli (M) liittää kuituja toisiinsa, ja se ei varsinaisesti kuulu soluseinään. Välilamelli on kemialliselta koostumukseltaan ollut juuri muodostuneessa puusolussa pektiiniä, mutta puutuuntumisessa se on muuttunut ligniiniksi. Primääriseinä (P) on soluseinämän uloin ohut kerros, joka sisältää runsaasti ligniiniä ja amorfista hemiselluloosaa. Primääriseinäessä selluloosan osuus on pieni. Primääriseinäessä mikrofibrillit ovat kerroksen ulkoreunalla hajallaan ja sisäreunalla lähes kohtisuoraan kuidun akselia vastaan. Primäärikerros irtoaa yleensä kokonaan kuidun mekaanisessa jauhatuksessa.²⁶

Sekundääriseinä jaetaan kolmeen eri kerrokseen: S₁-, S₂- ja S₃-kerrokseen. Uloin (S₁) ja sisin (S₃ tai T) kerros ovat molemmat ohuita kerroksia. Keskikerros (S₂), joka on kuidun tärkein osa, on erittäin paksu. Kun kuidun paksuus kasvaa, yleensä S₂-kerroksen paksuus kasvaa, kun taas S₁- ja S₃-kerrokset pysyvät suhteellisen vakiopaksuisina.^{25, 26} Kuituseinämän paksuutta on vaikea arvioida eri kuitutyypin tapauksissa, joten kuitujen mittojen määrittäessä on alettu käyttää pituusmassa-termiä, joka on läheisesti yhteydessä kuituseinämän paksuuteen.²⁶

S₁-kerros, joka irtoaa myös mekaanisessa jauhatuksessa muodostaen hienoainesta, koostuu 2 - 6 lamellista. Näiden lamellien mikrofibrillit kiertävät vuorotellen eri suuntiin kuituakseliin nähden muodostaen ristikkomaisen rakenteen. S₂-kerros sisältää suurimman osan puusolun selluloosasta. Mikrofibrillit sijaitsevat keskikerroksessa 10 - 30 asteen kulmassa kuituakseliin nähden muodostaen kierteisen spiraalimaisen rakenteen. Tämän ansiosta kuitu on aksiaalisuunnassa erittäin luja ja jäykkä. Sekundääriseinän sisäkerros, jota myös kutsutaan tertiärikerrokseksi, on ohut eri suuntiin kiertävä mikrofibrilleistä koostuva kerros kuin on myös sekundääriseinämän uloin kerros. Kyhmykerros sijaitsee soluseinän sisimmässä osassa.^{25, 26}

3.2.1 Huokokset

3.2.1.1 Puukuidun seinämänsisäiset huokokset

Kuitujen seinämän sisäisten huokosten koko vaihtelee riippuen käytetyistä massan valmistusmenetelmistä ja valkaisumenetelmistä. Kemiallisessa massanvalmistuksessa kuituihin muodostuu enemmän huokosia, sillä kuituainesta, kuten ligniiniä ja hemiselluloosaa, poistuu käsittelyn aikana soluseinistä (Kuva 13). Mekaanisen käsittelyn jauhatus lisää myös kuitujen huokoisuutta. Huokosten koosta riippuen kemikaalit kykenevät diffundoitumaan kuituseinämästä ulos ja kuituseinämään sisään. Huokoskoko vaikuttaa myös kuitujen turpoamiseen vedessä, kuitujen kutistumiseen ja veden poistumiseen kuidusta. Huokokset kuitenkin yleensä sulkeutuvat, kun kuitu kuivataan vedestä. Natiivikuiduilla huokostilavuus on noin $0,02 \text{ cm}^3/\text{g}$ ja kemiallisen sulfaattikäsittelyn kokeneilla kuiduilla huokostilavuus on noin $0,6 \text{ cm}^3/\text{g}$.^{33,34}

Kuva 13. Ligniini ja hemiselluloosan liukeneminen massan valmistuksen eri prosesseissa avaa kuidun seinämään huokosia.³³

3.2.1.2 Johtosolujen huokokset

Puusolut ovat huokosten avulla yhteydessä toisiinsa ja niiden kautta tapahtuu nesteiden ja ravinnon kuljetus solujen välillä. Kaksipihainen huokonen muodostuu kahdesta rengashuokosesta ja sitä tavataan yleensä kuolleissa soluissa. Kaksipihaisen huokosen sisäosuuden muodostavat *torus* ja *margo*. Yksipihaisessa huokosessa on toisella puolella rengashuokonen ja toisella puolella pihatton huokonen. Pihattomia huokosia esiintyy vain tylppy- eli parenkyymisolulla. Huokokset ovat kullekin puulajille tyypillisiä. Niiden perusteella pystytään tunnistamaan perinteisillä mikroskopiamenetelmillä eri puulajien kuituja (Kuva 14) toisistaan ja identifioimaan kuitujen alkuperä kuitumassan kuiduista.^{25,26}

Kuva 14. SEM-kuva kuidun huokosista ja pinnasta.³²

3.3 Puukuidun pinnan ja soluseinämän kemiallinen koostumus ja rakenne

Puussa orgaanisen aineen muodostuminen tapahtuu puun neulasten ja lehtien viherhiukkasissa. Yhteyttämisessä muodostuu glukoosia, joka kulkeutuu puun solukoihin, joissa se muuttuu monimutkaisten biokemiallisten prosessien kautta selluloosaksi, hemiselluloosaksi tai ligniiniksi.²⁶ Edellä mainitut soluseinämän rakenneosat ligniiniä lukuunottamatta muodostuvat monosakkarideista, jotka ovat kiinnittyneet toisiinsa glykosidisilla sidoksilla.³⁵

Kevät- ja kesäpuusolut eroavat paitsi seinämän paksuudeltaan myös kemialliselta koostumukseltaan ja tiheydeltään, esimerkiksi selluloosapitoisuus on kevätpuusoluissa alhaisempi kuin kesäpuusoluissa.²⁷ Männyn ja koivun hiilihydraatti-, ligniini ja uuteainepitoisuudet on esitetty taulukossa 2 erikseen käsittelemättömälle puuainekselle ja sulfaattisellulle.

Taulukko 2. Hiilihydraattikoostumukset puuraaka-aineelle ja sulfaattisellulle³⁶

	Puuraaka-aineen koostumus		Sulfaattisellun koostumus	
	Mänty (%)	Koivu (%)	Mänty (%)	Koivu (%)
Selluloosa	38 - 40	40 - 41	35	34
Glukomannaani	15 - 20	2 - 5	5	1
Ksylaani	7 - 10	25 - 30	5	16
muut hiilihydraatit	0 - 5	0 - 4	-	-
Ligniini	27 - 29	20 - 22	2 - 3	1,5 - 2
Uuteaineet	4 - 6	2 - 4	0,25	0 - 0,5

Puusoluista löytyy pieniä määriä ei-rakenteellisia pienimolekyyllisiä yhdisteitä, kuten orgaanisia vesiliukoisia yhdisteitä ja epäorgaanisia aineita, proteiineja, alkaloideja sekä mineraaleja. Puun uuteaineilla eli pihkalla tarkoitetaan yhdisteitä, jotka liukenevat orgaanisiin liuottimiin. Puun uuteaineiden määrä ja koostumus vaihtelevat samankin

puun eri osissa suuresti ja puun kasvupaikka ja ikä vaikuttavat uuteaineiden koostumuksiin ja määriin.^{25, 26}

3.3.1 Selluloosa

Selluloosa on puusolun seinämän keskeisin ainesosa ja sen tehtävänä on toimia tukirakenteena kuidulle. Selluloosa on lineaarinen haaroittumattomista β -glukopyraanosiyksiköistä muodostunut polymeeri, joissa yksiköt ovat liittyneet toisiinsa 1 \rightarrow 4 β -glykosidisilla sidoksilla (Kuva 15). Glukopyranoosirakenneyksiköt ovat molekyylissä tuolimudossa, jolloin hydroksyyliyhdyt ovat ekvatoriaalisissa asemissa ja vetyatomit aksiaalisissa asemissa. Selluloosan polymerisointiaste on melko korkea, enimmillään 15000 yksikköä. Selluloosaketjussa joka toinen glukosiyksikkö on käännettynä 180 astetta edelliseen verrattuna. Selluloosan toistuva yksikkö on sellobioosiyksikkö, jossa on kaksi glukosiyksikköä. Natiiviselluloosan molekyylimassan on arvioitu olevan yli 1,5 miljoonaa ja molekyylin pituudeksi on määritetty yli 5 μm .^{26, 34, 35}

Kuva 15. Selluloosan primäärirakenne.³⁷

Selluloosan sekundäärisellä rakenteella tarkoitetaan muodostuneita vetysidoksia yhden ketjun ja useiden selluloosaketjujen kesken (Kuva 16). Vetysidokset stabiloivat glykosidista sidosta ja tekevät rakenteesta jäykän. Erillisten vierekkäisten selluloosaketjujen välillä esiintyy myös vetysitoutumista C6-hydroksyylin sekä C3-hydroksyylin kesken.³⁷ Selluloosassa funktionaalisia ryhmiä ovat kunkin glukosianhydridiyksikön kolme hydroksyyliyhdyt, glykosidiset sidokset sekä pelkistävä pääteryhmä. Hydroksyyliyhdytien kemialliset ominaisuudet ovat samanlaiset kuin pienimolekyylisten alifaattisten alkoholien hydroksyyliyhdytien. Happokäsittelyillä saadaan glykosidisia sidoksia katkeamaan ja pelkistimillä, kuten NaBH_4 :llä voidaan selluloosa pelkistää.²⁶

Kuva 16. Vierekkäisten selluloosaketjujen välistä vetysitoutumista C3- ja C6-hydroksyylien kesken.³⁷

Selluloosaketjuista muodostuvat levyt vuorovaikuttavat toistensa kanssa Van der Waalsin -voimilla ja hydrofobisilla vuorovaikutuksilla järjestäytyen päällekkäin ja muodostaen pieniä fibrillejä. Kun selluloosa-alkaisfibrillit sitoutuvat keskenään, ne muodostavat kahta erilaista kiteistä aluetta, I_α ja I_β -selluloosarakennetta sekä amorfista rakennetta (Kuva 17).

Kuva 17. Selluloosamolekyylien kiteisiä ja amorfisia muotoja.²⁶

Selluloosan pinta on hyvin hydrofiilinen ja se kykenee absorboimaan paljon vettä itseensä, vaikka selluloosa on täysin veteen liukenematon. Vesimolekyylit sitoutuvat selluloosakuitujen järjestäytymättömien alueiden vapaisiin hydroksyyliiryhmiin vetysidosten avulla, jolloin selluloosakuidut turpoavat. Ylä- ja alapuoli selluloosan glukoosiyksiköistä ovat hydrofobisia ja kooltaan samankokoisia kuin aromaattiset renkaat. Tämän takia selluloosa vuorovaikuttaa vahvasti usein aromaattisten yhdisteiden kanssa.^{26, 35}

3.3.2 Hemiselluloosa

Hemiselluloosa, joka on puusolun yksi rakenneyksiköistä, on heteropolysakkaridi, joka koostuu erilaisista monosakkaridimolekyyliyksiköistä. Hemiselluloosaa esiintyy soluseinässä selluloosafibrillien väleissä. Hemiselluloosa esiintyy yleensä heteropolysakkarideina, joskin eräitä homopolysakkarideja tiedetään olevan. Hemiselluloosien rakenneyksiköt ovat joko heksooseja, joita ovat D-glukoosi, D-mannoosi, D-galaktoosi, ja/tai pentooseja, joita ovat D-ksyloosi ja L-arabinoosi. Hemiselluloosissa esiintyy myös pieniä määriä deoksiheksooseja, joita ovat L-rhamnoosi ja L-fukoosi, sekä uronihappoja, joita ovat 4-O-metyyli-D-glukuronihappo, D-galakturonihappo ja D-glukuronihappo. Hemiselluloosilla vallitseva rakenne on lineaarinen β-(1→4)-linkittynyt sokeripyraanosirenkaista koostunut runko, josta lähtee

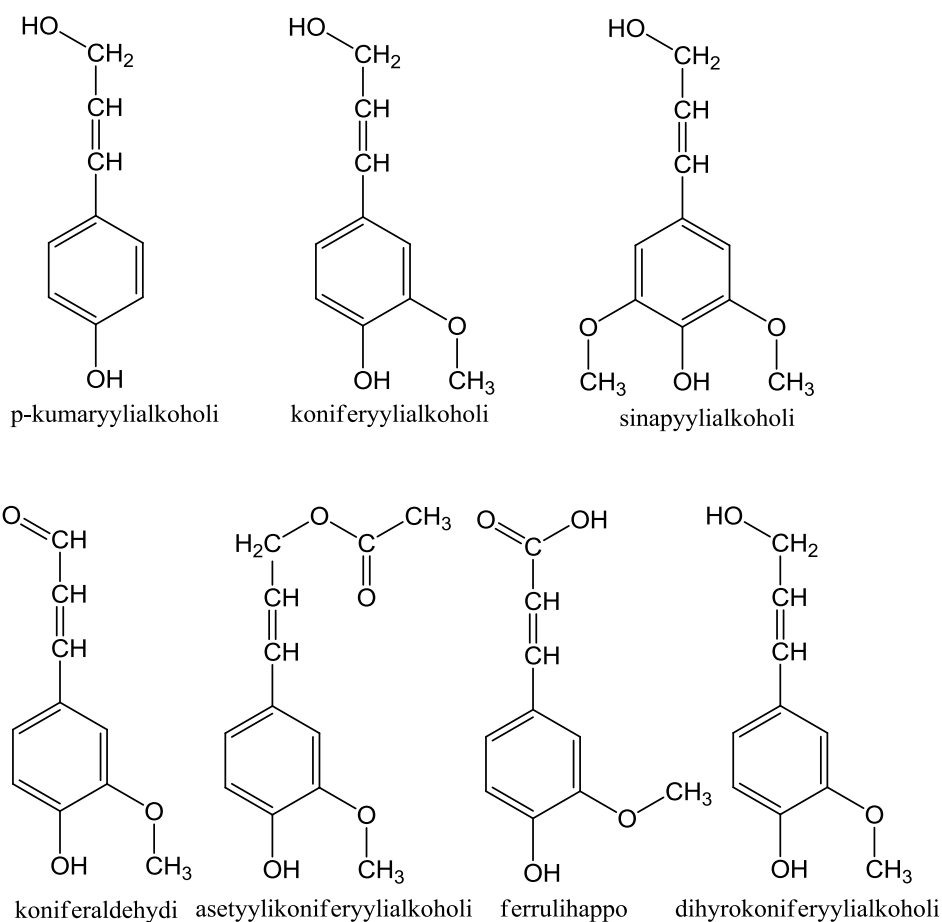
sivusuuntaisesti lyhyitä sivuketjuja. Hemiselluloosien kemiallinen ja terminen stabiilisuus on alhaisempi kuin selluloosalla. Puuaineksen kuivapainosta hemiselluloosaa on noin 20 - 30 %. Hemiselluloosien suhteelliset osuudet eroavat suuresti toisistaan havupuiden ja lehtipuiden kesken sekä saman puun osien, kuten rungon, oksien ja juurten alueilla (Taulukko 3). Hemiselluloosat edistävät kuitujen limoittumiskykyä jauhatuskäsittelyssä ja vaikuttavat ratkaisevasti kuitujen kykyyn muodostaa keskenään sidoksia. Huomattava osa hemiselluloosista liukenee kemiallisen massan valmistusprosessin aikana.^{26, 27, 38}

Taulukko 3. Päähemiselluloosat lehti- ja havupuissa.³⁸

Puulaji	Hemiselluloosa	Määrä kuiva-aineesta (%)
Havupuu	Galaktoglukomannaani	5-8
Havupuu	Glukomannaani	10-15
Havupuu	Arabinoglukuronoksyylaani	7-15
Lehtikuu-sipuu	Arabinogalaktaani	3-35
Lehtipuu	Glukuronoksyylaani	15-35
Lehtipuu	Glukomannaani	2-5

3.3.3 Ligniini

Ligniiniä esiintyy eniten puusolujen välilamelleissa, mutta sitä esiintyy myös koko kuituseinämässä pieninä määrinä. Se on rakenteeltaan monihaarainen polymeeri, joka koostuu pääosin fenyylipropaaniyksiköistä (Kuva 18) sekä muista aromaattisista ja alifaattisista osista.^{26, 27, 35}



Kuva 18. Ligniinin rakenneyksikkömonomeerit. Ylhäällä kolme eniten ligniinissä esiintyvää monolignolia ja alhaalla ligniinissä vähemmän esiintyvät ligniinimonomeerit.³⁵

Ligniinin koko rakennetta on mahdoton esittää yksityiskohtaisesti, sillä sitä ei täysin tunneta. Sen rakenne (Kuva 19) on kuitenkin kolmiulotteinen verkosto, jossa monomeerit ovat liittyneet satunnaisesti muihin rakenneosiin erilaisilla eetteri- tai hiilihiili-sidoksilla. Solun seinämässä (Kuva 20) ligniini on liittynyt kovalenttisilla sidoksilla hemiselluloosaan, mutta se muodostaa sidoksia myös selluloosaan ja pektiiniin.

Ligniinin tehtävänä on sitoa kuidut lujasti toisiinsa ja antaa puulle sen tarvitsemää jäykkyyttä. Hydrofobisuutensa vuoksi se estää veden kulkeutumisen soluseinämien lävitse ja suojelee puuta myös mikrobiologiselta hajoamiselta. Ligniinin tärkeimpiä funktionaalisia ryhmiä ovat fenoliset hydroksyyli-ryhmät, bentsyylialkoholi, karbonyyli-ryhmät. Funktionaalisilla ryhmillä on tärkeä merkitys selluloosan valmistuksessa. Selluloosaa valmistettaessa keiton tarkoituksena on poistaa juuri

ligniini, joka sitoo kuituja toisiinsa. Keiton avulla ligniini saadaan poistettua lähes kokonaan.

Kuva 19. Esimerkkinä havupuun ligniinin oletettu rakenne.³⁵

Kuva 20. Ligniinin, selluloosan ja hemiselluloosien kuvainnollinen molekyyli-
tason esiintyminen S₂-kerroksessa.³⁵

3.4 Kuituvauriot ja deformaatiot

Puussa olevat kuidut ovat pääosin suorina, mutta yksittäisinä kuituina niillä on useita eri muotoja johtuen muun muassa niiden käsittelyhistoriasta. Kuidun dimensiot muuttuvat puun haketuksen ja kuitujen massanvalmistusprosessien aikana. Mekaaniset käsittelyt kuten sekoitus, pumppaus ja massan sakeuttaminen muokkaavat kuidun muotoa ja aiheuttavat kuituun kiharuutta (curl) ja jyrkkiä mutkia (kinks). Kun kuituja jauhetaan alhaisessa sakeudessa, suurin osa kuiduista suoristuu. Kuidun pinta fibrilloituu ja hienoainesta muodostuu lisää. Samanaikaisesti kuituseinämän rakenne aukeaa ja kuidut turpoavat herkemmin. Kuituseinämästä tulee joustavampi ja kuituontelo voi luhistua. Mitä intensiivisempää jauhatusta on, sitä todennäköisemmin kuidut katkeavat jauhatuksen aikana (Kuva 21). Samankin massan kuitujen morfologiset ominaisuudet eroavat suuresti toisistaan johtuen prosessoinnin epätasaisuuksista ja suurista prosessointitilavuuksista.^{34, 39}

Kuva 21. Jauhatuksen vaikutus kuituun. Kuvassa on esitettyä katkova, fibrilloiva sekä katkova ja fibrilloiva -jauhatusvaikutus.²⁶

Jauhatuksessa syntyvät rakennemuutokset jaetaan primäärisiin ja sekundäärisiin vaikutuksiin. Primäärisinä vaikutuksina voidaan pitää kuidun sisäistä ja ulkoista fibrillaatiota. Sekundäärisiin vaikutuksiin luetaan kuidun pituussuuntainen

kokoonpuristuminen ja katkeaminen, kuidun muodonmuutokset sekä kuidun pinnan vauriot.⁴⁰ Kuidun seinämän kolmiulotteisen rakenteen muutoksiksi luokitellaan kuituseinämän sijoiltaanmeno (dislocation) ja seinämäkerrosten liukumat tasosta (slip plane) (Kuva 22).⁴¹

Kuva 22. Ylhäällä on kuvattuna kuidun sijoiltaanmeno (dislocation)⁴¹ ja alhaalla on isoja ja pieniä sijoiltaanmenoja kuusen kesäpuukuidussa⁴².

Mikrokompressiot (Kuva 23) ovat kuituakselin suuntaisia mikrotysäymiä ja ne yleensä sisältävät myös sijoiltaanmenot ja tasoliukumat. Niissä kuidun pituus voi lyhentyä hieman.⁴¹

Kuva 23. Kuiduissa esiintyvää mikrokompressiota.⁴¹

Nivelkohdat (Kuva 24) tai toisin sanoen polvekkeet (node) ja poimut (crimp) ovat suuruusluokaltaan hieman suurempia kuidun muutoksia. Nivelkohta on alue, jossa on taivutus- ja puristusvaurioita, joissa solun seinä on usein delaminoitunut. Jyrkkiä mutkia, joita kutsutaan usein kinkeiksi, saattaa muodostua näihin nivelkohtiin. Kinkin erottaa kiharasta (Kuva 25) siinä, että kinkissä kuituakselin suunta muuttuu jyrkästi, kun kiharassa (curl) kuitu taipuu loivalle mutkalle muuttaen suuntaa kaarevasti.⁴¹

Kuva 24. Kuidun nivelkohta (ylempi) ja kinkki nivelkohdassa (alempi).⁴¹

$$\text{Kiharusindeksi} = \frac{L}{l} - 1 \quad (\text{Kaava 4})$$

Kuva 25. Kiharan ja kinkin ero. Kuvassa on esitettyä myös kiharusindeksin laskentaan käytetty kaava 4 ja osoitettu L- ja l-kirjaimin laskennassa käytettävät kuva-analysoinnin pituudet.⁴¹

Kuva 26. Erittäin kiharaisia(vas.) havupuun kraft-massakuituja sekä suoraa bisulfiittimassakuituja(oik.) kuvattuna valomikroskoopilla.^{41 41}

Kuidun kiharuus vaihtelee massoittain ja sen runsauteen vaikuttaa myös, onko paperimassan valmistuksessa käytetty jauhamista (Kuva 26).^{41, 42} Kuidulle voidaan laskea kiharuusindeksi (curl-index) (Kaava 4). Kiharuusindeksi on kuidun muotopituuden (L) eli koko kuidun pituuden suhde kuidun pisimpään dimensioon (l). Tyypillinen kiharuusindeksin arvo suoralle kuidulle on lähellä nollaa ja kiharalle kuidulle suurempi kuin 0,5.^{39, 41}

SEM:lla pystytään havainnoimaan jauhatuksen vaikutusta ja kuvantamaan kuituun tulleita murtumia ja kuidun rakenteen ja muodon muutoksia, fibrillaatiota ja turpoamista ja luhistumista. Kuidun pinnan kemiallisia jauhatuksen aiheuttamia muutoksia voidaan tarkastella SEM:lla, XPS:llä sekä ToF-SIMS -menetelmillä. Niillä pystytään määrittämään massanvalmistuksessa syntyneitä kuituvaurioita.⁴⁰ SEM-kuvauksella saadaan tarkkoja kuvia myös kuituun muodostuneista raoista ja rajusta entsyymikäsittelystä peräisin olevista kuidun katkeamisista (Kuva 27).⁴²

Kuva 27. SEM-kuva sellulaasi-entsyymikäsittelystä kuidusta, joka on käsittelyn jälkeen pakastekuivattu. Kuidun päälle on sputteroitu kultaa kolmen minuutin ajan 50 mA:n sähkövirralla. Kuvassa on esitettyä entsyymikäsittelyn johdosta katkennut kuitu ja nuolella on osoitettu käsittelyn johdosta muodostunut kulmikas rako.⁴²

3.5 Mikroskopiamenetelmät puukuidun ja rakenteen määrittämisessä

Mikroskooppisilla menetelmillä pystytään tutkimaan kuidun rakennetta tarkemmin. Määritykset voidaan suorittaa perinteisellä valomikroskoopilla suoraan objektilasille asetetuista kuiduista tai hartsiin valettujen kuitujen poikkileikkeestä transmittoivalla valolla. Valomikroskoopilla päästään parhaimmillaan 0,2 µm:n resoluutioon ja kokonaissuurenos voi olla 1000-kertainen alkuperäiseen kuvakokoon verrattuna.

Konfokaalilasermikroskoopilla laser kohdennetaan pieneksi ja kirkkaaksi pisteeksi näytteen haluttuun syvyystasoon ja lasersäteellä pyyhitään nopeasti näytteen pintaa. Pyyhitystä syvyystasosta emittoituu fluoresenssista johtuen valonsäteitä, jotka tarkennetaan apertuuriin ja siitä valo siirtyy ilmaisimelle. Konfokaalilla voidaan ottaa kuvia peräkkäisistä leiketasoista ja niiden avulla voidaan koota kolmiulotteinen kuva näytteestä.

Kuidun poikkileikkausdimensiot muuttuvat riippuen kuidun kosteudesta. Jokaista kuvantamista varten on otettava huomioon, missä kosteudessa kuvaukset halutaan suorittaa ja kyseiset mittauserokset on aina ilmoitettava tulosten yhteydessä. Suora valomikroskopiamenetelmä ja konfokaalimikroskopiamenetelmä sallivat molemmat sekä kuivan että kostean näytteen määrittämisen.

Elektronimikroskoopilla on valomikroskoopin kanssa analoginen magneettilinssijärjestelmä, mutta valon tilalla toimii elektronisuihku. Elektronimikroskopiin kaksi perusmenetelmää ovat läpäisyelektronimikroskopiointi, TEM (Transmission electron microscope) sekä pyyhkäisyelektronimikroskopiointi, SEM (Scanning electron microscope).^{39,43} TEM-menetelmässä elektroneja ohjataan näytteen läpi magneettilinssien avulla, jolloin tutkittavasta näytteestä saadaan muodostettua kuva fluoresoivalle levyille. Osa elektroneista törmää näytteen atomien elektroneihin tai ytimiin, jolloin elektronisuihkun elektroni siroaa ympäristöön. Suurinta sironta on näytteen tiheämmissä kohdissa, jolloin alueet näkyvät muodostuneessa kuvassa tummina alueina.⁴³ Suurimpia rajoitteita TEM-kuvannalle on se, että näytteen tulee kestää elektronisuihku ilman vaurioita ja sen tulee olla ohut, yleensä paksuudeltaan 100 nm:n luokkaa, jolloin näytteen tulee olla poikkileikkoina. TEM:llä ongelmana on myös huono kontrasti hiili-, happi- ja typpiatomien välillä. Kontrastia pyritään lisäämään värjäämällä näytteitä raskaammilla alkuaineilla. Ligniiniä on esimerkiksi värjätty ja merkitty bromilla, kaliumpermanganaatilla ja osmiumtetroksidilla ja hemiselluloosia kultakonjugoiduilla vasta-aineilla.⁴⁴ TEM-kuvantamisessa suurennos on käytännössä 250 000-kertainen ja erotuskyky on 0,2 - 0,8 nm:n luokkaa. Parhaimmilla laitteilla päästään jopa 0,12 nm:n luokkaan.⁴³

Pyyhkäisyelektronimikroskopiassa kuva muodostetaan näytteestä, kun pintaa pyyhitään kapealla elektronisuihkulla, jolloin elektronit irtoavat tai heijastuvat näytteen pinnasta ja

saadaan muodostettua yksityiskohtainen pintakuva näytteestä. Pyyhkäisyelektronimikroskoopilla voidaan tutkia kiinteiden pintojen rakenteita 1000 - 100000 -kertaisella suurennoksella. Näytteen tulee olla kuiva ja sen pinnan sähköä johtava, jotta SEM-kuvaus onnistuisi. Pyyhkäisyelektronimikroskooppi ei kykene myöskään erottelemaan hiiltä, tyypeä eikä happea toisistaan, joten kuitumateriaalin kemiallisesta koostumuksesta se antaa vain hyvin vähän tietoa, ellei näytteen kontrastia ole parannettu. Useimmat näytteet käsitelläänkin ennen kuvausta puhdistamalla, kiinnittämällä, kuivaamalla sekä päällystämällä painavilla metallialkuaineilla, kuten kullalla tai palladiumilla.^{43,44}

Atomivoimamikroskoopilla (AFM) saadaan korkean resoluution kuvia näytteistä. AFM havaitsee vuorovaikutusvoimia näytteen pinnan ja mikroskoopin terävän tunnistejärjen välillä.⁴⁵ AFM:llä pystytään muun muassa havainnoimaan tarkasti puukuidun soluseinämän rakennetta ja massanvalmistuksesta aiheutuvia seinämärakenteen muutoksia.⁴⁶

Mikroskopiamittauksia varten kuvattavista kuitunäytteistä tulee usein valmistaa poikkileikkeitä tai näytteille voidaan joutua tekemään kemiallisia tai mekaanisia kerrosten poistamisia, jotta päästäisiin kuvaamaan haluttua kerrosta. Poikkileikkeitä varten kuitunäyte valetaan usein hartsiin. Poikkileikkeiden valmistaminen rikkoo aina näytteen, ja poikkileikkeiden pinnalla voidaan havaita muun muassa leikkauksista aiheutuvia veitsen jälkiä.^{8,47} Näytteiden pitää usein olla ohuuden lisäksi kuivia. Näytteen kuivaus ja poikkileikkaus voivat muokata soluseinän nanorakennetta muuttaen näytteen rakennetta pysyvästi. Yksinkertaisimmassa kuivaustekniikassa veden annetaan haihtua 105 °C:een lämpötilassa. Menetelmän takia kuituseinämän sisäiset huokokset voivat luhistua ja kuituontelo saattaa mennä kasaan. Jotta kuidun rakenteen vääristyminen voidaan estää, kuidut kuivataan yleensä liuottimen vaihtomenetelmällä tai pakastekuivauksella, joita yleensä seuraa näytteen valaminen hartsiin.⁴⁴

4 MERKINTÄ- JA VÄRJÄYSMENETELMÄT

Merkintä- ja värjäysmenetelmien tarkoitus on lisätä kuidun kontrastia, jolloin näytteen havainnoiminen eri kuvantamismenetelmillä saataisiin paljon yksityiskohtaisemmaksi.

Tässä kappaleessa esitetään kirjallisuudessa esitettyjä mikroskooppitekniikoiden havainnoimisen avuksi olevia merkintä- ja värjäysmenetelmiä, joita voitaisiin käyttää soveltaen kuitujen mikrotomografiakuvaukseen, sekä muutamia muita sovellettavia menetelmiä.

Eri epäorgaanisilla suoloilla ja atsoväriaineilla värjäämisen avulla pystytään havainnoimaan muun muassa kuidun sisärakenteen huokosten jakautumista sekä tutkimaan ligniinin jakautumista puusolussa. Simonsin värjäyksellä, joka perustuu atsoväriaineisiin, kyetään tutkimaan kuitujen mekaanisen käsittelyjen astetta. Vasta-aineisiin perustuvilla merkintämenetelmillä pystytään paikallistamaan tarkasteltavia kohdeaineita vasta-aineen ja sen tunnistaman antigeenin välisellä spesifisellä vuorovaikutuksella. Tarkasteltava kohdeaine voidaan tunnistaa merkitsemällä käytetty vasta-aine merkkiaineella. Entsyymien sitomisosalla (CBM, cellulose/carbohydrate binding module) voidaan paikallistaa tomografialla kuiduista eri hiilihydraatteja, kun CBM:ään on lisätty merkkiaine, esim metalliatomi. Biotiini-avidini -systeemi perustuu myös vasta-ainemenetelmään, minkä avulla biotinyloituun primäärivasta-aineeseen voidaan sitouttaa merkittyjä avidiinimolekyylejä, ja tämän avulla kyetään paikallistamaan esimerkiksi selluloosaketjuja kuiduista.

Metallikalvopäällystyksiin perustuvat kontrastin lisäysmenetelmät muodostavat kuidun pinnalle ohuen metallikalvon, jonka avulla kuitujen pinta voidaan havainnoida esimerkiksi elektronimikroskoopeilla. Metallinanopartikkeleihin perustuvissa kontrastin lisäysmenetelmissä yhtenä menetelmänä kultananopartikkeleita on kytketty hiilihydraatteihin kovalenttisesti. Kyseisessä menetelmässä hiilihydraattien alkuperäistä rakennetta ei muokata ennen merkintää. Menetelmän avulla voitaisiin paikallistaa esimerkiksi kuitufraktioita paperin joukosta tomografialla. Metallinanopartikkeleita on myös kyetty syntetisoimaan kuitujen huokosiin. Tällöin huokokset pystyttäisiin paikallistamaan kuiduista tomografialla. Paineekyllästyksellä suoja-aine, joissa tehoaineina ovat erilaiset kupari-, kromi- ja/tai arseeniyhdisteet, tunkeutuu koko pintapuukerroksen läpi aina sydänpuuhun asti. Kyseinen menetelmä voisi toimia tomografiaa ajatellen kontrastin lisäyskeinona, jos suoja-aine saataisiin tasaisesti imeytettyä kaikkiin puun soluihin.

4.1 Värjäys epäorgaanisilla suoloilla ja atsoväriaineilla

Osmiumtetroksidi (OsO_4) ja kaliumpermanganaatti (KMnO_4) ovat yleisiä fiksatiiveja ja elektronitiheitä reagensseja. Osmiumtetroksidi ja kaliumpermanganaatti reagoivat muun muassa ligniinin kanssa ja värjäävät ligniiniä ja sen esiasteita.⁴⁸ Kuidun sisärakenteen huokosten jakautumista voidaan nähdä TEM-kuvantamisella diffundoimalla ensin isopreenipolymeeri turvonneeseen kuituun ja värjäämällä kuitu sitten osmiumtetroksidilla ja lyijysitraatilla. Osmiumtetroksidi värjää isopreenipolymeerit, jolloin huokosalueet näkyvät tummina tai mustina alueina. Näytekuidun poikkileikkeet voidaan jatkovärjätä lyijysitraatilla, jolloin voidaan tunnistaa alueet, joihin isopreeni ei ole tunkeutunut. Lyijysitraattivärjäyksellä saadaan osmiumtetroksidivärjäyskuville ”negatiivinen” kuva, jossa selluloosa-alueella on korkeampi elektronitiheys kuin osmiumvärjätyillä alueilla ja selluloosa näkyy mustana ja huokokset valkoisena alueena. Osmium on hyvin myrkyllinen aine, joten osmiumtetroksidilla värjääminen kaasufaasissa ei ole suositeltavaa. Värjäys onkin täten parempi tehdä vesipohjaisella osmiumtetroksidiliuoksella. Kyseisillä värjäysmenetelmillä pystytään TEM:lla näkemään huokosia ja huokosrykelmiä, joiden koko on 10 nm:stä mikrometreihin.⁴⁹

Myös merkurisaatiovärjäysmenetelmää on käytetty ligniinin jakautumisen tutkimiseen puusolunäytteistä sekä puusolujen rakennetutkimuksiin FE-SEM:lla sekä TEM:lla. Merkurisaatio tapahtuu laimeissa happamissa olosuhteissa, jossa elohopea-asettaatti reagoi elektrofiilisen substituution kautta ligniinin aromaattisten osien kanssa tuottaen kovalenttisen sidoksen aromaattisen renkaan ja asetoksielohopearyhmän välille, jolloin elohopea-atomeja saadaan liitettyä näytteeseen.⁵⁰

Muita perinteisiä värjäysaineita, joita on käytetty kuitujen alkuperän, koostumuksen ja käsittelyn tunnistamiseksi mikroskooppisin menetelmin, ovat erilaiset applikointimenetelmät, joissa väriaine applikoidaan kuitujen joukkoon, annetaan vaikuttaa ja huuhdellaan ylimääräinen väri pois.⁵¹ Käytettäviä värjäysreagensseja ovat muun muassa Graff ”C”-, Herzberg-, Sellegerin tai Alexanderin, Wilsonin sekä Green-Yorston väriseokset. Värjäyksessä kuitujen väri kehittyy riippuen raakamateriaalista, kemiallisesta koostumuksesta ja kuidun käsittelyhistoriasta. Kongon punainen -värjäysmenetelmä sopii parhaiten puhtaalle selluloosalle, mutta se värjää kaikentyypisiä paperivalmistukseen käytettyjä kuituja. Kun sitä sekoitetaan veden

kanssa, se muodostaa kolloidisia partikkeleita, jotka tunkeutuvat kiteisen selluloosafibrillin rakenteeseen.³⁹ Negatiivivärjäyksessä tutkittava näyte käsitellään raskasmetallisuoloista, kuten uranyyliasetaatista ja fosfovolframihaposta valmistetulla liuoksella. Kuivunutta näytettä voidaan tarkastella elektronimikroskopisesti.⁵²

Simonsin kuituvärjäyksellä voidaan tutkia erilaisten massanvalmistuksen aikaisten mekaanisten tai biomekaanisten käsittelyjen, kuten jauhatuksen ja entsyymikäsittelyn, vaikutuksia kuituseinämän muutoksiin.^{53, 54} Simonsin värjäysmenetelmässä kuidut värjätään kahden värin (sininen ja oranssi; Kuva 28) seoksella ja värimuutoksia tarkastellaan valomikroskoopin avulla. Sinisiä värjäyskemikaaleja on olemassa useita, eikä sininen väri ole kovin spesifinen, kun taas kaikki oranssit värjäyskemikaalit ovat 5-nitro-*o*-tolueenisulfonihapon kondensaatiotuotteita, joka takaa korkean affiniteetin kuituihin. Oranssin väriainemolekyylin on todettu muodostavan pitkiä polymeerejä, ja sen tarkkaa molekyylikaavaa eikä rakennetta ole täysin määritetty. Esitettyjen Direct Blue 1 ja Direct Orange -värjäysaineiden lisäksi esimerkiksi Pontamine fast orange ja Pontamine sky blue -värjäysaineet ovat Simonsin värjäysmenetelmässä käytettyjä reagensseja.^{39, 55}

Kuva 28. Esimerkki sinisen värin molekyyliarakenteesta (Direct Blue 1 -väriaine) (ylempi) ja oranssin värin oletettu molekyyli rakenne (Direct Orange -väriaine) (alempi).⁵⁴

Simonsin värjäysmenetelmä perustuu värimolekyylien kokoerojen mukaiseen tunketumiseen kuituun ja väriaineen kuidun affiniteettiin. Oranssilla väriaineella on suurempi molekyylikoko siniseen verrattuna ja se kykenee tunkeutumaan kuituihin kuidun huokosten kautta värjäten osan kuiduista oransseiksi, kun huokosleveyden suuruus on suurempi kuin 5 nm. Kuidut värjäytyvät sinisiksi huokoskoon ollessa alle 5 nm:ä. Oranssilla värillä on suurempi affiniteetti kuituihin ja näin ollen se korvaa sinisen värin päästyään kuidun sisään. Simonsin värjäyksellä värierot eivät välttämättä ole täysin selkeitä, sillä kuidut voivat värjäytyä eri tavoilla (Kuva 29). Kuidut voivat värjäytyä esimerkiksi tummansinisiksi, vaaleansinisiksi, kellertävänvihreiksi, keltaisiksi tai oransseiksi. Vihreiksi värjäytyneissä kuiduissa on havaittu olevan merkittävät määrät sekä isoja että pieniä huokosia.^{53, 54}

Kuva 29. Simonsin värjäysesimerkkikuvia. Ylemmässä kuvaparissa on esitettyä poikkileikuvat kuitunäytteistä. Vasemman puolen kuidut ovat käyneet läpi suuremman mekaanisen käsittelyn. Ne ovat värjäytyneet hieman tummemman oranssin värisiksi, täten niiden kuitujen huokokset ovat suurempia kuin oikeanpuoleisten kuitujen huokokset.³³ Alemmassa kuvassa on esitetty värjätyt mekaanisen massan kuidut kuvattuna valomikroskoopilla.⁵⁵

4.2 Vasta-aineisiin ja entsyymien sitoutuviin osiin perustuvat paikallistamismenetelmät kontrastin lisäämiseksi

Vasta-aineisiin perustuvilla paikallismenetelmillä periaatteena on vasta-aineen ja sen tunnistaman kohdemolekyylin eli antigeenin välinen spesifinen vuorovaikutus. Kohdeaineeseen kiinnittynyt vasta-aine voidaan visualisoida siihen liitetyn merkkiaineen, kuten metallipartikkelin tai fluoresoivan molekyylin, avulla. Puukuidun soluseinämän mikrorakennetta ja sen kemiallista koostumusta on tutkittu paljon entsyymien sitoutuviin osiin perustuvilla merkitsemismenetelmillä. Tällöin entsyymien sitoutumisosa, kuten tiettyyn hiilihydraattiin / selluloosaan sitoutuva (CBM, carbohydrate / cellulose binding module), toimii vasta-aineen tavoin sitoutuen kohdemolekyyliin. CBM on luonnon aineiden biohajoamista katalysoivien mikro-organismien entsyymien sitoutumisosa. Myös yksi käytetyimmistä leimausmenetelmistä on biotiini-avidini-systeemi, jossa biotinyloituun primäärivasta-aineeseen voidaan sitouttaa leimattuja avidiinimolekyylejä.^{52, 53}

4.2.1 CBM:n käyttö kontrastin lisäyskeinona

Luonnon komponenttien biohajoamista katalysoivat erilaiset entsyymit. Ne ovat kehittyneet spesifisiin tarpeisiin ja ne toimivat parhaiten organismin fysiologisissa olosuhteissa. Sellulaaseiksi kutsutaan kaikkia sellulolyttisiä bakteereita ja sieniä, joiden tehtävänä on hajoittaa kiteistä selluloosaa. Sellulaasit ovat *O*-glykosyylihydrolaaseja (GHs, Glycosyl hydrolases), jotka hydrolysoivat selluloosan β -1 \rightarrow 4-glukosidisia sidoksia. Niitä on löydetty luonnosta etenkin prokaryooteista ja sienistä. Sellulaasit jaetaan perinteisesti eksoglukanaaseihin (1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase),

joka vapauttaa selluloosaketjusta peräkkäisiä sokeriyksiköitä ja endoglukanaaseihin [1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan 4-glucanohydrolase], joka hyökkää selluloosaketjun sisäosiin.⁵³

Monissa sellulaaseissa ja muissa GH:issa rakenne koostuu yhdestä tai useammasta katalyyttisestä alueesta ja yhdestä tai useammasta hiilihydraattiin sitoutuvasta moduulista, eli CBM:stä, joiden kokoluokka on 4-20 kDa ja ne tavallisesti sijaitsevat proteiinisekvenssin yhdessä päässä (Kuva 30). CBM:t sitoutuvat spesifisiin hiilihydraatteihin ilman hydrolyysia keskittäen entsyymien liikkumattomalle substraatille. Muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta CBM:t ovat kiinnittyneet entsyymien katalyyttiseen moduuliin korkeasti glykosyloidun joustavan linkkerin välityksellä. Kaikki CBM:t käyttävät aromaattisia ja usein polaarisia tähteitään kohteidensa vuorovaikutukseen, joissa vetysitoutumisella on suuri rooli. Sellulosomi on molekyylikone, joka on perustunut proteiinitukirankaan, jolla on vähintään yksi CBM ja useita koheesiomoduuleita rakenteessaan. Sellulosomeja esiintyy pääosin anaerobisilla bakteereilla ja niitä voi ilmentyä yksittäin tai polysellulosomeina. Sellulosomi sitoutuvat aktiiviseen soluun erityisellä telakoitumiskoheesiosysteemillä. Useat CBM:t ovat ehdottoman substraattispesifisiä.⁵⁶

Kuva 30. Sellobiohydrolaasi Cel7A (*T. reesei*):n moduulirakenne.⁵³

TEM-analyysien mukaan CBM:t eivät sitoudu hajanaisesti ympäri selluloosan kiteistä aluetta, vaan spesifisesti selluloosan kiteisen alueen hydrofobiseen puoleen, selluloosaketjun 110-kulmaan. CBM:illä, jotka sitoutuvat kiteiseen selluloosaan, on kolme aromaattista aminohappoa, jotka omaksuvat planaarisin topologian. Kyseiset tähteet tekevät laajan hydrofobisen kontaktin täysin esillä oleviin 110-puolen kiteisen selluloosaketjun sokerirenkaisiin. Eräät CBM:t ovat myös spesifisiä hemiselluloosan rakenneyksiköille.^{56,57}

Kun useiden CBM:ien ja sellulaasien rakenteet ja niiden toimintatavat ja sitoutuminen tunnetaan, voidaan niitä käyttää analyttisinä työkaluina. Esimerkkinä voidaan mainita sellulaasien CBM:n käyttö lignoselluloosan koostumuksen ja ultrarakenteen selvittämisessä. Hiilihydraatti voidaan merkitä kahdella eri tapaa, joko epäsuoralla tai

suoralla merkitsemistavalla (Kuva 31). Epäsuora merkitsemismenetelmä perustuu substraattiin sitoutuneen CBM:n merkitsemiseen vasta-ainevälitteisesti. Suorassa merkitsemisessä CBM:ään on suoraan konjugoitu merkitsemismolekyylä. Merkitsemismolekyyleinä voivat toimia fluoresoivat molekyylit tai metallit, joista kulta on melko yleisesti käytetty. Sitoutumista voidaan tutkia SEM, TEM ja FE-SEM - tekniikoin tai fluoresenssimikroskopiolla sekä atomivoimamikroskopiolla, jolla saadaan yksityiskohtaisempaa kuvaa pinnasta.^{56,57} Menetelmää voisi käyttää kuitujen tutkimiseen tomografiolla, kun merkitsemiseen käytettäisiin metallimerkainetta.

Kuva 31. Hiilihydraattien paikallistaminen CBM-merkitsemismenetelmien avulla joko epäsuoralla (yllä) tai suoralla merkitsemismenetelmällä. Kuvassa olevat lyhenteet ovat TRITC = tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti, FITC = fluoreseiini-isotiosyanaatti ja Au = kulta.⁵⁷

CBM:ia pystytään muokkaamaan lisäämällä niihin erilaisia mikroskooppisesti paikallistettavia lisäkomponentteja, kuten metallikvanttipisteitä (QD, quantum dots) ja histidiinileimoja (Histidine tag), joihin fluoresoivia molekyylejä ja metalliatomeita, kuten kultaa ja kuparia, pystytään liittämään. Suoralla merkitsemismenetelmällä, missä kvanttipisteet linkittyvät kiteiseen selluloosaan sitoutuvien moduulien (CBM) välityksellä, pystytään visualisoimaan kiteistä selluloosaa (Kuva 32). (CdSe)ZnS-puolijohde-kvanttipisteitä käytettiin merkitsemään CBM:t ja visualisoimaan *Valonia*-selluloosakiteitä. Menetelmän avulla pystyttiin osoittamaan, että kyseiset CBM:t sitoutuvat spesifisesti selluloosan planaariselle puolelle.^{58,59}

Kuva 32. Selluloosan ja hiukkastäplällä varustettu CBM-kompleksi, joka on kolmikomponenttisytemi. Sen osasina ovat selluloosakiteet, rekombinantti-CBM ja pintamodifioidut hiukkastäplä. Kyseiset QD-CBM-merkityt selluloosakiteet pystyttiin havaitsemaan valomikroskoopin valkoisella valolla ja fluoresenssilla sekä STEM:llä ja TEM:llä.⁵⁹

Molekyylitunnistuksen spesifisyyden lisäksi liittyneiden molekyylien tiheys tietyllä alueella on kriittinen tekijä, jotta selluloosamateriaali kyetään merkitsemään korkean resoluution kuvantamista varten. Mitä enemmän spesifisesti merkittyjä molekyyliä on, sitä korkeampi resoluutio voidaan saavuttaa. Toisin sanoen CBM-QD-molekyylien tiheyttä selluloosakiteessä kasvattamalla voidaan resoluutiota saada paremmaksi (Kuva 33). Kvanttipisteiden tiheyttä saadaan kasvatettua käyttämällä pienempiä CBM:ta, sillä mitä pienempi on CBM:n koko, sitä enemmän niitä mahtuu vierekkäin saman selluloosakiteen pinnalle.⁵⁹

Kuva 33. (CdSe)ZnS-quanttipiste -menetelmällä merkittyjä kuituja. a) AFM-kuva selluloosakiteistä, mitta-asteikko = 500 nm. b) Korkeampi suurennos yksittäisen kiteen hydrofobisesta pinnasta, mitta-asteikko = 50 nm. Fluoresenssimikroskooppikuvia selluloosakiteistä, jotka on merkitty c) CtCBM3-RFP:llä, d) CtCBM3-GFP:llä ja e) CtCBM3-His/QD:llä. Mitta-asteikko = 5 µm. TEM-kuva (f) ja STEM-kuva (g) selluloosakiteistä, joihin on linkitetty CtCBM3-His/QD:t. Kvanttipisteet näkyvät tummina pisteinä TEM-kuvassa ja valkoisina pisteinä STEM-kuvassa. Mitta-asteikot näissä on 50 nm.⁵⁸

Immunokultamerkkäusmenetelmissä käytetään myös puhtaita ja kultamerkattuja polysakkarideja hajottavia entsyymejä tai niiden merkittyjä hiilihydraattiin sitoutuvia rakennepalikoita. Immunokultamerkitsemisessä merkitseminen suoritetaan hartsiin valettujen näytteiden mikro- tai ultratomopoiikkileikkisiin. TEM:lla kultapartikkelein merkatut vasta-aineet nähdään mustina pilkkuina (Kuva 34). Duchesnen *et al.*⁶⁰ julkaisussa immunokultamerkkäukseen käytettyjen kultakolloidien halkaisija oli 5 nm ja Altaner *et al.*⁶¹ käyttämien kultakolloidien halkaisija oli 12 nm. Kulta-atomit tuovat kontrastia kuituseinämän alueisiin, jolloin seinämän osia ja alueita kyetään erottamaan ja kemiallisia komponentteja, kuten hemiselluloosia pystytään paikallistamaan TEM-kuvantamisella. Arend⁶² on paikallistanut vetopuupoppelikuitujen seinämäkerroksista immunokultamerkkäuksella 1,4-β-galaktaania ja Altaner *et al.* ovat paikallistaneet havupuun trakeidin soluseinästä 1,4-β-galaktaania, arabinogalaktaaniproteiineja, heteroksyylaaneja sekä (1→3)-β-glukaaneja.

Kuva 34. Kuituseinämässä sijaitsevien 1,4- β -galaktaanien paikallistaminen immunokultamerkkaukset näkyvät mustina pisteinä TEM-kuvassa.⁶¹

4.2.2 Biotiini-avidini-systeemiin perustuva merkintämenetelmä

Hienoaines pystytään paikallistamaan massasulpun joukosta PARA-kulta (Periodic Acid oxidation, Reductive Amination and Gold labeling) -merkintämenetelmän avulla (Kuva 35).⁶³ Vastaavalla menetelmällä on myös pystytty visualisoimaan selluloosamikrokiteiden pelkistävät päät selluloosa I:stä, II:sta ja III₁:sta.⁶⁴

Kuva 35. PARAKulta-merkkkausmenetelmän reaktiovaiheet.⁶³

PARA-kulta -merkkkausmenetelmässä⁶³ selluloosaketjun β -1,4-linkittyneisiin glukoosiyksiköihin muodostetaan dialdehydiryhmä miedolla perjodihappohapetuksella, jonka jälkeen karbonyyliryhmät biotinyloidaan pelkistävällä aminoinnilla. Selluloosaketjun biotinyloituihin kohtiin linkataan streptavidini-konjugaatti, johon on liitetty joko fluoresoiva merkkiaine tai kultananopartikkeli. Streptavidiniin ja biotiinin välillä tiedetään olevan korkea affiniteetti (streptavidiniin ja biotiinin välinen dissosiaatiovakio on noin 4×10^{-14} M)⁶⁵, jonka ansiosta saadaan muodostettua vahva sidos merkkiaineen ja kuidun välille. Fluoresoivan streptavidinikonjugaatin avulla hienoaines pystytään erottamaan pitkistä kuiduista ja havaitsemaan konfokaalimikroskoopilla ja kultapartikkeli edesauttaa hienoaineen havaitsemisen SEM- ja TEM-mikroskoopilla (Kuva 36).⁶³

Kuva 36. PARA-kulta-käsiteltyjen hienoainesten mikroskopiakuvia. Jokaisessa kuvaparissa on käsitelty a) tuore hienoaines ja b) kuollut hienoaines ja sekoitettu se pitkien käsittelemättömien kuitujen joukkoon. Ylimmässä kuvaparissa laserkonfokaalimikroskooppikuvat, keskimmaisessä kuvaparissa SEM-kuvat ja alimassa kuvaparissa TEM-kuvat. TEM-kuvissa katkoviivat osoittavat hienoaineen absorption kuidun pinnalle/sisäosiin.⁶³

SEM-kuvien perusteella tuore hienoaines sitoutuu puukuituun paljon homogeenisemmin kuin kuollut hienoaines, joka mieluummin kertyy pieniin laikullisiin alueisiin pitkin puukuitua. TEM-kuvasta havaitaan, että tuoretta hienoainesta on adsorboitunut kuidun pinnalle, mutta sitä on myös adsorboitunut kuidun seinämän sisäpuolelle. Kuollutta hienoainesta on tunkeutunut pienemmissä määrin kuituseinämän sisään, jolloin se muodostaa pieniä laikullisia alueita kuidun pinnan vaurioiden kohdille (kuvassa 34 olevat ympyröidyt alueet).⁶³

4.3 Metallikalvopäällystyksen perustuvat kontrastin lisäysmenetelmät

4.3.1 Atomikerrossaostumatekniikka (ALD)

ALD-tekniikalla (atomic layer deposition) pystytään muodostamaan substraatin pinnalle atomikerroksia sykleittäin ja kasvattamaan näin muodostuneen metallikalvokerroksen paksuutta. Tekniikan etuina on tiiviiden ja ohuiden atomikerrosten kontrolloitu valmistaminen sekä erilaisten kolmiulotteisten rakenteiden tasainen päällystyskyky.⁶⁶ Menetelmässä lähtöaineet tuodaan pulsseissa kaasumaisessa muodossa reaktoriin vuorotellen inertin kaasun kanssa. Inerti kaasun erottaa lähtöainereagenssipulssit toisistaan, jolloin substraatin pintaan voi asettua vain yksi atomikerros haluttua pinnoitusreagenssia. Jokaisen lähtöainereagenssipulssin ja inertin kaasupulssin jälkeen substraatin pintaan on asettunut yksi atomikerros pinnoitusreagenssia.⁶⁷

4.3.2 Sputterointitekniikka

Kun kuitunäytteitä halutaan kuvata pyyhkäisyelektronimikroskopiolla, näyte tulee päällystää ohuella metallikerroksella, kuten kulta-, platina- tai kromimetallilla, jotta näytteen kontrastia saadaan parannettua. Etenkin FESEM-kuvantamiseen kromipäällystys on parempi kuin muut edellä mainitut metallit, sillä se muodostaa ohuemman metallikerroksen poikkileikenäytteen päälle. Päällystys suoritetaan usein sputteroimalla metallia näytteen päälle. Sputterointi on myös eräänlainen ohutkalvon valmistusmenetelmä. Siinä kohtiota, joka voi olla esimerkiksi kultaa, platinaa tai kulta-palladiumia, pommitetaan jalokaasuioneilla, usein argonkaasulla. Metalliatomit irtoavat kohtiosta pommituksen kaasun ja kohtioon törmäyksen johdosta ja laskeutuvat kondensoituen reaktorissa olevien pintojen ja sinne asetetun näytteen pinnalle. Reaktorissa käytetään alhaista 0,1 - 0,05 mbarin vakuumia.^{68, 69}

4.4 Metallinanopartikkeleihin perustuvat kontrastin lisäysmenetelmät

4.4.1 Hiilihydraattien kytkentä kultananopartikkeleihin

Wang *et al.*⁷⁰ ovat julkaisussaan kertoneet uudesta kytkentäreaktiosta, jossa hiilihydraatteja on kytketty kovalenttisesti kultananopartikkeleihin (Kuva 37). Menetelmän etuna on, ettei hiilihydraattien alkuperäistä rakennetta muokata ennen linkkausta. Menetelmä perustuu aryyliatsidin fotokemiaan, jossa valon vaikutuksesta atsidifunktionaalisuus muutetaan reaktiiviseksi nitreeniksi ja hiilihydraatin CH:n ja nitreenin typhen välille muodostuu kovalenttinen sidos. Pintaligandit, kuten tioliligandit, muodostavat kultananopartikkelille suojaavan kerroksen, joka stabiloi nanopartikkelia. Kultananopartikkeleihin kytkettiin PFPA:n (perfluorofenylyatsidi) avulla muun muassa 3,6-di-*O*-(α -D-mannopyranosyyli)-D-mannopyranoosi-hiilihydraatteja. Periaatteessa tarvitaan vain yksi kovalenttinen sidos kiinnittämään hiilihydraattimolekyyli PFPA:han ja todennäköisyys sidoksen muodostumiselle kasvaa, mitä enemmän CH-sidoksia yhdisteessä on tai mitä suurempi hiilihydraatin koko on. Hiilihydraatit kytkettiin PFPA-funktionalisoituihin nanopartikkeleihin sekoittamalla PFPA-funktionalisoituja kultananopartikkeleita hiilihydraattien kanssa ja säteilyttämällä seosta 280 nm:n valolla viiden minuutin ajan.

Kuva 37. PFPA-tiolifunktionalisoitujen kultananopartikkeleiden fotoavusteinen kytkentä hiilihydraatteihin. PFPA-tiolifunktionalisoitujen molekyylien etyleeniketjujen pituudet vaihtelivat; $n=1$ (1), $n=5$ (2) ja $n=10$ (3) ja yhdessä molekyylissä (4) oli lisäksi $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4$ -yksikkö, joka lisäsi nanomateriaalin vesiliukoisuutta. Man2 = 2-*O*- α -D-mannopyranosyyli-D-mannopyranoosi, Man3 = 3,6-di-*O*-(α -D-mannopyranosyyli)-D-mannopyranoosi.⁷⁰

Menetelmää voisi soveltaa esimerkiksi nanoselluloosien paikallistamiseen kuitusulpun joukosta kiinnittämällä kultananopartikkeleita suoraan nanoselluloosaketjuun ennen kuitusulppuun sekoittamista. Tällöin röntgentomografiakuvantamisella olisi mahdollista paikallistaa nanoselluloosafraktioita kuitusulpun joukosta.

4.4.2 Ioninesteisiin perustuva selluloosa/kultananokidehybridien valmistus

Li ja Taubert⁷¹ ovat valmistaneet HAuCl_4 :sta ja selluloosasta, joka liukenee ioninesteeseen, kolloidisia kultananopartikkeli-selluloosa -hybridisaostumia. Ioninesteenä on käytetty 1-butyyl-3-metyyli-imidatsoliumkloridia. Tetrakloorikultahapon, selluloosan ja ioninesteen seosta oli lämmitetty ensin $100\text{ }^\circ\text{C}$:ssa kunnes liuos oli tullut kirkkaaksi, jonka jälkeen se oli yhdistetty pelkistimenä käytetyn natriumboorihydridin (NaBH_4) vesiliuokseen, jolloin kulta(III) pelkistyi kulta(0):ksi. Samanaikaisesti ioninesteeseen liuennut selluloosa saostui nanokuituina ulos nesteestä. Menetelmässä selluloosakuidut toimivat rakennepalikkoina nanopartikkelin kasvulle tai ryhmittymiselle, sillä kultananopartikkelit ovat kerääntyneet selluloosakuituverkoston mukailleen (Kuva 38).

Kuva 38. TEM-kuvia kultapartikkeleista selluloosasaostuman päällä.⁷¹

Menetelmä saattaa soveltua myös nano- ja mikroselluloosakuituverkoston tomografiakuvantamiseen. Tutkimuksessa epäiltiin natriumboorihydridin reagoivan myös selluloosan kanssa. Jatkossa olisikin mietittävä, muuttaako se selluloosakuitujen ominaisuuksia merkittävästi.

4.4.3 Metallinanopartikkeleiden syntetisointi huokosiin

Junhui He, Toyoki Kunitake ja Aiko Nakao⁷² ovat syntetisoineet hopea-, kulta, platina ja palladiummetallinanopartikkeleita selluloosakuidun huokosissa. Huokoiset selluloosakuidut toimivat nanoreaktoreina toimien samalla partikkeleiden stabilisoijina. Selluloosakuitujen lähteenä käytettiin nukatonta selluloosapaperia, jonka paksuus oli $49\text{ }\mu\text{m}$, ja joka koostui keskimäärin $11\text{ }\mu\text{m}$ paksuista selluloosakuiduista. Kuiduissa oli huokosia, joiden halkaisija oli $30 - 70\text{ nm}$. Paperi pidettiin minuutin ajan halutun metallin (AgNO_3 , AuCl_3 , PtCl_4 ja $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$) liuoksessa. Tämän jälkeen sitä huuhdeltiin etanolissa noin 30 sekunnin ajan. Huuhtelu etanolissa poisti metalli-ionit, jotka eivät olleet kiinnittyneet selluloosakuituihin ioni-dipolivuorovaikutuksilla. Huuhtelun jälkeen metallikationit pelkistettiin pitämällä kuituja NaBH_4 -liuoksessa 10 minuutin ajan.

Muodostuneiden partikkeleiden kokoa pystyttiin kontrolloimaan vaihtamalla metalliliuosten konsentraatiota.

Kyseistä menetelmää voisi kokeilla selluloosakuidun huokosrakenteen tutkimiseen tomografialla. Menetelmän avulla kontrastia lisääviä metallipartikkeleita saadaan kuljetettua huokosiin ja huokosten kautta kuidun sisäosiin. Kyseinen menetelmä olisi myös helppo tapa nostaa yksittäisen kuidun kokonaiskontrastia. Tutkimus antaa myös viitettä sille, että jo pelkkä kuitujen liotus metallisuolaliuoksissa johtaa metallikationien kulkeutumiseen ja kiinnittymiseen kuituun.

4.4.4 Metallinanopartikkeleiden syntetisointi bakteeriselluloosaan

Olsson *et al.*⁷³ ovat kehittäneet magneettisia aerogeelejä ja magneettista nanopaperia bakteeriselluloosasta ja rautasulfaatti- ja kobolttikloridisuoloista.⁷³ Bakteeriselluloosaverkostoa käytettiin kasvutemplaattina 40 - 120 nm:n kobolttiferriittinanopartikkeleiden syntetisointiin. Metallinanopartikkelit kiinnittyvät bakteeriselluloosaan ja tuovat sille magneettisia ominaisuuksia. Partikkeleiden synteesikaavio ja valmistusvaiheet on esitetty alla (Kuva 39). Menetelmässä bakteeriselluloosahydrogeeli on valmistettu *Acetobacter xylinum* FF-88 -bakteerilla. Hydrogeeli on pakastekuivattu ja upotettu FeSO₄/CoCl₂-vesiliuokseen 15 minuutin ajaksi ja lopuksi lämmitetty 90 °C:ssa kolmen tunnin ajan. Liukoinen Fe/Co hydroksidit ovat muuttuneet liukenemattomiksi komplekseiksi. Selluloosaverkosto on asetettu vielä NaOH/KNO₃-liuokseen 90 celsiusasteessa, jolloin mustat kobolttiferriittipartikkelit ovat saostuneet selluloosananofibrilleihin.

Kuva 39. Kobolttiferriittinanopartikkeleiden syntetisointi bakteeriselluloosatemplaattiin.

- a.) Pakastekuivattu bakteeriselluloosatemplaatin SEM-kuva. b) SEM-kuva pakastekuivatusta kobolttiferriittiselluloosa-aerogelistä. c) SEM-kuva magneettinanopaperista.⁷³

4.5 Paineekyllästys sovellettavana menetelmänä

Paineekyllästämässä suoja-aine tunkeutuu koko pintapuukerroksen läpi aina sydänpuuhun asti. Suomessa kyllästämistä tehdään vain männylle, sillä kuusipuun solurakenne ei sovellu painekyllästämiseen. Teolliseen puun kyllästämiseen käytetään kolmea erilaista kyllästysainetyyppiä, joita ovat C-kyllästeet, CC-kyllästeet sekä CCA-kyllästeet. C-kyllästeaineissa tehoaineena ovat kupariyhdisteet, CC-kyllästeaineissa kupari- ja kromiyhdisteet ja CCA-kyllästeissä kupari-, kromi- sekä arseeniyhdisteet.⁷⁴ Näistä CCA on nykyisin kielletty arseeniyhdisteiden myrkyllisyyden vuoksi. CCA-kyllästysmenetelmässä puuainesta vakuumikuivataan ennen painekyllästystä. Vakuumikuivauksella poistetaan ilma puun sisältä, jolloin kemikaalit pystyvät paremmin tunkeutumaan puun soluaineeseen. CCA reagoi ligniinin ja selluloosayhdisteiden funktionaalisten ryhmien, kuten karbonyylin, karboksyylihapporyhmän, metoksyylin ja fenolisen hydroksyylin, kanssa joko kompleksoituen, saostuen tai adsorpoituen. Pääreaktio, joka kyllästyksessä tapahtuu, on puuainesten hapettuminen heksavalenttisella Cr^{VI} :llä, jolloin Cr^{VI} pelkistyy trivalenttiseksi Cr^{III} :ksi.⁷⁵⁻⁷⁷ CCA:ssa kromi toimii kiinnittimenä, kuparin tehtävänä on toimia sienimyrkkinä ja arseeni takaa suojan hyönteisiä vastaan. Heksavalenttisen kromin pelkistyminen trivalenttiseksi käynnistää puuainesten heikkojen happojen deprotonoitumisen, jolloin kupari kykenee sitoutumaan suoraan ligniiniin ja selluloosaan ja muodostuu saostumia kuten CrAsO_4 , CuCrO_4 ja $\text{Cr}_2(\text{OH})_4\text{CrO}_4$.⁷⁸ Paineekyllästämistä voisi kokeilla kuidun kontrastin lisäyksenä tomografianäytteisiin.

5 YHTEENVETO

Pro gradu -tutkielman tavoitteena oli esitellä kemiallisia kontrastin lisäyksiä puukuitumateriaalille, jotta röntgentomografialaitteella pystyttäisiin määrittämään kuidun sisäinen rakenne yksityiskohtaisemmin sekä paikallistamaan kuitufraktioita, kuten nanoselluloosaa ja hienoainesta, paperiarkista. Alussa esiteltiin teoriapohjaa tomografiasta materiaalin rakenteen tutkimusmenetelmänä ja syvennyttiin kuidun monimutkaisen rakenteen ymmärtämiseen. Menetelmiä käytiin läpi jo olemassa olevista värjäys- ja merkintämenetelmistä aina sovellettaviin keinoihin.

Röntgentomografia tarjoaa kolmiulotteisen kuvantamismahdollisuuden näytettä rikkomatta. Rekonstruoidusta kuvadatasta voidaan tarkastella kolmiulotteisesti näytteen poikkileikkeitä eri kohdista. Useita kaksikulotteisia kuvantamismenetelmiä varten näytteestä tulee valmistaa poikkileikkeitä, mikä rikkoo näytteen, jolloin kyseisestä näytteestä ei voida suorittaa enää uusia mittauksia toisilla tutkimusmenetelmillä. Tomografiakuvantamisen jälkeen näytettä voidaan vielä analysoida muilla kuvantavilla tai mekaanisilla rikkovilla analysointimenetelmillä.

Tomografiakuvauksessa näytettä säteilytetään röntgensäteillä detektorin ja lähteen pysyessä paikalla ja näytteen pyöriessä pyörimisakselinsa ympäri pienin kulmamuutoksia 0-asteesta vähintään 180-asteeseen. Säteily vaimenee näytteessä sen alkuainekoostumuksesta, paksuudesta ja tiheydestä sekä säteilyn spektristä riippuen. Röntgenkuva on näytteen vaimentuneen säteilyn muodostama varjokuva eli tavallisesti negatiivikuva, joka koostuu eri harmaasävyistä. Mitä painavampia alkuaineita ja mitä tiheämpää ainetta säteily kohtaa ja mitä paksumman ainekerroksen läpi röntgensäteilyn täytyy tunkeutua, sitä enemmän säteily vaimenee.

Näytteen koko ei tosin sovi tomografialla kuvattaessa olla järin suuri, jotta resoluutio mittauksessa olisi mahdollisimman hyvä, ja jotta näyte pystyy pyörimään pyörimisakselinsa ympäri niin, että tutkittava alue pysyy koko mittausajan kuvausalueessa. Röntgensädetomografialaitteistot, joissa lähteenä käytetään röntgenputkea, voidaan jakaa saavutettavan resoluution mukaan mikrotomografialaitteistoihin, joilla päästään 1 - 100 μm :n resoluutioon sekä nanotomografialaitteistoihin, joilla päästään parhaimmillaan alle 50 nm :n resoluutioon. Näytteen maksimikokoon vaikuttavat valittu suurennosobjekti ja haluttu resoluutio. Mikrotomografialla kuvattaessa näytteenkoko esimerkiksi 10X suurennosobjektilla kuvattaessa tulee olla alle 50 mm :ä. Nanotomografialla näytteiden koot tulee mahtua kuvausalueeseen, joka 150 nm :n resoluutiolla on 60 μm :a ja 50 nm :n resoluutiolla on 15 μm :a.

Paperi koostuu halkaisijaltaan 10 - 30 μm ontoista kuiduista, pienemmistä kuituosista, fibrilleistä sekä paperin valmistuksessa lisätyistä partikkeleista, kuten täyteaineista. Paperissa kuidut muodostavat kuituverkoston. Kuidut ovat muodoltaan ja rakenteeltaan hyvin erilaisia ja erikokoisia ottaen huomioon niiden prosessointihistorian, kuidun alkuperän, kuituvauriot ja -muutokset. Puukuidun osien kontrastin lisääminen on

tärkeää, sillä puukuitu koostuu pääosin heikosti säteilyä absorboivista kemiallisista rakenneosista: selluloosasta, hemiselluloosasta ja ligniinistä. Ne eivät sisällä kontrastia lisääviä alkuaineita, kuten korkeamman molekyylipainon omaavia metallialkuaineita vaan suhteellisen saman molekyylipainon omaavia alkuaineita; hiiltä, vetyä ja happea. Röntgensäteet eivät absorboidu kevyisiin alkuaineisiin yhtä hyvin kuin raskaampiin alkuaineisiin, jolloin rakenteiden yksityiskohtainen erottelu jää heikoksi.

Merkintä- ja värjäysmenetelmillä kuidun kontrastia voidaan lisätä, jolloin näytteen rakenne voidaan havainnoida yksityiskohtaisemmin röntgentomografia-kuvista. Mikroskooppisissa menetelmissä käytettyjä värjäys- ja merkintämenetelmiä ovat värjäykset epäorgaanisilla suoloilla, kuten osmiumtetroksidilla, kaliumperman-ganaatilla ja uranyyliasetaatilla, ja atsoväriaineilla, joita esimerkiksi Simonsin menetelmässä käytetään. Vasta-aineisiin perustuvilla menetelmillä kohdemolekyyli paikallistetaan vasta-aineen, joka voi olla esimerkiksi hiilihydraattiin sitoutuva palikka kuten sellulaasien selluloosaan sitoutuva entsyymien osa, ja sen tunnistaman antigeenin avulla. Kohdeaineen tunnistanut vasta-aine voidaan visualisoida, kun siihen liitetään sopiva merkkiaine esimerkiksi metalliatomi, -partikkeli tai fluoresoiva molekyyli. Esimerkiksi PARA-kulta-merkitsemismenetelmän avulla selluloosahienoaines on pystytty paikallistamaan massasulpun joukosta elektronimikroskooppisin kuvauksin. Menetelmä perustuu voimakkaaseen biotiiniin ja avidiiniin väliseen vuorovaikutukseen, missä selluloosaketjun biotinyloituihin kohtiin on kiinnitetty streptavidini-konjugaatti, johon on liitetty joko fluoresoiva merkkiaines tai kultananopartikkeli.

Muita mahdollisia merkintämenetelmiä voisivat olla metallikalvopäällystyksen perustuvat kontrastin lisäysmenetelmät, kuten atomikerrossaostuma- ja sputterointitekniikat, joissa näyte päällystetään metalliatomikerroksilla. Kirjallisuudesta löytyi myös menetelmiä, joissa hiilihydraatteja, joiden rakennetta ei ole muutettu, on kytketty kultananopartikkeleihin perustuen aryyliatsidin fotokemiaan. Menetelmää voisi soveltaa esimerkiksi nanoselluloosien paikallistamiseen kuitusulpun joukosta. Ioninesteisiin perustuvassa selluloosa/kultananokidehybridien valmistuksessa tetrakloorikultahaposta ja selluloosasta, joka liukenee 1-butyyl-3-metyyliimidatsoliumkloridi-ioninesteeseen, on muodostettu kolloidisia kultananopartikkeli-selluloosahybridisaostumia. Menetelmässä selluloosakuidut toimivat rakennepalikkoina nanopartikkelin kasvulle tai ryhmittymiselle. Menetelmän avulla voitaisiin

tomografialla nähdä nano-/mikroselluloosakuituverkoston rakennetta. Menetelmän haittapuolena on, että selluloosa ensin liuotetaan ja lopuksi saostetaan, jolloin selluloosakuidun alkuperäinen rakenne muuttuu.

Metallinanopartikkeleita on syntetisoitu kirjallisuuden mukaan myös kuidun huokosiin sekä kuituja on käytetty metallinanopartikkeleiden, kuten kobolttiferriitinano-partikkeleiden, kasvutemplaatteina. Näitä menetelmiä voisi myös ajatella kontrastia lisäävänä keinona, etenkin kuidun huokosrakenteiden tai kuidun paikallistamistutkimuksissa kuidun kokonaiskontrastia lisäämään. Yhtenä ideana kontrastia voisi lisätä tomografianäytteisiin myös painekyllästykseen käytetyillä aineilla. Paineekyllästyksessä suoja-ainekemikaalit, joita ovat C-, CC- ja CCA-kyllästeet, pystyvät tunkeutumaan puun soluainekseen. Tehoaineina niissä ovat kupari-, kromi- ja arseeniyhdisteet. Yhdisteet reagoivat ligniinin ja selluloosayhdisteiden funktionaalisten ryhmien, kuten karbonyylin, karboksyylihapporyhmän, metoksyylin ja fenolisen hydroksyylin, kanssa joko kompleksoituen, saostuen tai adsorpoituen.

Menetelmiä, joita tomografiakuvantamisessa ensimmäisenä olisi hyvä kokeilla, olisi PARA-kultamerkintämenetelmä, jota voisi kokeilla nimenomaan hienoaineksen ja nanoselluloosan paikallistamiseksi paperiarkin kuituverkostosta. Yhtenä mahdollisuutena voisi olla myös kuitujen pelkkä liuottelu metallisuolaliuoksissa ja pelkistimen, kuten natriumboorihydridin käyttö. Metallisuolaliuoksena voisi käyttää esimerkiksi tetrakloorikultahappoa, ja kulta pelkistettäisiin kuidun pinta- ja sisäosiin natriumboorihydridillä.

Kirjallisuusviitteet

1. J. Bloch ja S. Rolland du Roscoat, Three Dimensional Structural Analysis, *Advances in Pulp and Paper research. Transactions of the 14th Fundamental Research Symposium*. Oxford, 9/2009, ss. 599-664.
2. P. Atkins ja J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, 7. Painos, Oxford University Press Inc, United States, New York, 2002.
3. B. M. Patterson ja C. E. Hamilton, Dimensional Standard for Micro X-ray Computed Tomography, *Anal. Chem.* 2010, 82(20), 8537-8543.
4. C. L. Lin ja J. D. Miller, Network analysis of filter cake pore structure by high resolution X-ray microtomography, *Chem. Eng. J.* 2000, 77(1-2), 79-86.
5. S. R. Stock, *MicroComputed Tomography: Methodology and Applications*, 1. Painos, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2009.
6. C. Antoine, P. Nygård, Ø. W. Gregersen, R. Holmstad, T. Weitkamp ja C. Rau, 3D images of paper obtained by phase-contrast X-ray microtomography: image quality and binarisation, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2002, 490(1-2), 392-402.
7. Säteily- ja ydinturvakeskus, Säteilyn käyttö, www.stuk.fi/julkaisut_määräykset/kirjasarja/fi_FI/kirjasarja3_files/12222632510_021001/default/kirja3_1.pdf, Säteilyturvakeskus, (08.03.2011).
8. S. H. Lau, A. Tkachuk, M. Feser, H. Cui, F. Duewer, W. Yun ja D. Vallet, Non destructive failure analysis technique with a laboratory based 3D X-ray nanotomography system, *LSI Testing Symposium*, Osaka, Japan, 2006.

9. S. Jaarinen ja J. Niiranen, *Laboratorion analyysitekniikka*, 3.-4. Painos, AEL, Helsinki, 2002.
10. A. C. Kak, M. Slaney, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*, 1. Painos, Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, 2001.
11. L. Salvo, P. Cloetens, E. Maire, S. Zabler, J. J. Blandin, J. Y. Buffière, W. Ludwig, E. Boller, D. Bellet ja C. Josserond, X-ray micro-tomography an attractive characterisation technique in materials science, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2003, 200 273-286.
12. J. Bache-Wiig ja P. C. Henden, *Individual fiber segmentation of three-dimensional microtomograms of paper and fiber-reinforced composite materials*, Master's Thesis in Computer Science, NTNU, 2005.
13. Our Technology. 3D X-ray Computed Tomography, <http://www.xradia.com/technology/index.php>, Xradia, (28.05.2011).
14. M. Feser, J. Gelb, H. Chang, H. Cui, F. Duerwer, S. H. Lau, A. Tkachuk ja W. Yun, Sub-micron resolution CT for failure analysis and process development, *Measurement science and technology*, 2008, 19(9).
15. O. Leroux, F. Leroux, E. Bellefroid, M. Claeys, M. Couvreur, G. Borgonie, Hoorebeke L. Van, B. Masschaele ja R. Viane, A new preparation method to study fresh plant structures with X-ray computed tomography, *J Microsc.* 2009, 233, 1-4.
16. C. L. Lin ja J. D. Miller, Network analysis of filter cake pore structure by high resolution X-ray microtomography. *Chem. Eng. J. (Lausanne)*. 2000, 77, 79-86.

17. J. H. Dunsmuir, S. Bennett, L. Fareria, A. Mingino ja M. Sansone, X-ray microtomographic imaging and analysis for basic research. *Powder Diffr.* 2006, *21*, 125-131.
18. J. Van den Bulcke, M. Boone, J. Van Acker ja L. Van Hoorebeke, High-resolution X-ray imaging and analysis of coatings on and in wood, *J. Coat. Technol. Res.* , *7*(2), 271-277.
19. D. Attwood, Microscopy: Nanotomography comes of age, *Nature*, 2006, *442* 642-643.
20. S. Väisälä, Röntgensäteily, Säteilyturvakeskus, Pohto.
21. P. J. Withers, X-ray nanotomography, *Materials Today*. 2007, *10*(12), 26-34.
22. M. Kataja, *Suullinen tiedonanto*. 6/2011.
23. T. Walther ja H. Thoemen, Synchrotron X-ray microtomography and 3D image analysis of medium density fiberboard (MDF). *Holzforschun*, 2009, *63*, 581-587.
24. J. Lux, C. Delisee ja X. Thibault, 3D Characterization of wood based fibrous materials: An Application, *Image Anal Stereol.* 2006, *25*(1), 25-35.
25. R. Alén, *Structure and chemical composition of wood*. Kirjassa: *Stenius, P. Forest Products Chemistry*, 1. Painos, Finnish Paper Engineers' Association and TAPPI, 2000, ss. 12-57.
26. K. Isotalo, *Puu-ja sellukemia*, 3. Painos, Opetushallitus, Edita Prima Oy, 2004.
27. U. Häggblom-Ahnger ja P. Komulainen, *Paperin ja kartongin valmistus*, 3-1. Painos, Opetushallitus, Jyväskylä, 2003.

28. W. Chen, H. Yu, Y. Liu, P. Chen, M. Zhang ja Y. Hai, Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments, *Carbohydr. Polym.* 2011, 83, 1804-1811.
29. T. Pöhler, T. Lappalainen, T. Tammelin, P. Eronen, P. Hiekkataipale, A. Vehniäinen ja T. M. Koskinen, Influence of fibrillation method on the character of nanofibrillated cellulose (NFC), *TAPPI International Conference on Nanotechnology for the Forest; Product Industry*, Dipoli Congress Centre, Espoo, Finland, 2010, ss. 22.
30. S. Ahola, J. Salmi, L. -S Johansson, J. Laine ja M. Österberg, Model films from native cellulose nanofibrils. Preparation, swelling, and surface interactions, *Biomacromolecules*. 2008, 9(4), 1273-1282.
31. T. Zimmermann, N. Bordeanu ja E. Strub, Properties of nanofibrillated cellulose from different raw materials and its reinforcement potential, *Carbohydr. Polym.* 2010, 79(4), 1086-1093.
32. I. Rauvanto, *The Intrinsic Mechanisms of Softwood Fiber Damage in Brown Stock Fiber Line Unit Operations*, Degree of Doctor of Science, Lappeenranta University of Technology, Lappeenranta, 2010.
33. O. Joutsimo, *Effect of Mechanical Treatment on Softwood Kraft Fiber Properties*, Degree of Doctor of Technology, Oy Keskuslaboratorio, Espoo, 2004.
34. R. Wathén, *Studies on fiber strength and its effect on paper properties*, Degree of Doctor of Science in Technology, KCL Communications, Espoo, 2006.
35. G. Henriksson, Wood Chemistry and Wood Biotechnology, Pulp and Paper Chemistry and Technology, Chapter 6. Lignin, 2009 121-146.

36. M. J. Seppälä, U. Klemetti, V-A Kortelainen, J. Lyytikäinen, H. Siitonen ja R. Sironen, *Paperimassan valmistus. Kemiallinen metsäteollisuus 1*, 2-2. Painos, Opetushallitus, Saarijärvi, 2004.
37. G. Henriksson ja H. Lennholm, *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, 1. Painos, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2009, ss. 71.
38. A. Teleman ja STFI -Packforsk AB., *Chapter 5. Hemicelluloses and pectins, Kirjassa: Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, Painos, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2009, ss. 101.
39. A. Heikkurinen, *Pulp and Paper Testing*, 1. Painos, Fapet Oy, Helsinki, Finland, 1999, ss. 18-37.
40. P. Fardim ja N. Durán, Modification of fibre surfaces during pulping and refining as analysed by SEM, XPS and ToF-SIMS, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects*. 2003, 223(1-3), 263-276.
41. D. H. Page, R. S. Seth, B. D. Jordan ja M. C. Barbe, Curl, Crimps, Kinks and Microcompressions in Pulp Fibres - Their Origin, Measurement and Significance, Papermaking Raw materials, *Transactions of the Eight Fundamental Research Symposium*, Pulp and Paper Research Institute of Canada, Oxford, 1985, ss. 183-227.
42. P. Ander, L. Hildén ja G. Daniel, Cleavage of Softwood Kraft Pulp Fibres by HCl and Cellulases, *BioRes*. 2008, 3(2), 477-490.
43. Solubiologia - Mikroskopia, <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/mikroskopia/2/>, Solunetti, (17.05.2011).
44. J. F. Beecher, C. G. Hunt ja J. Y. Zhu, *The Nanoscience and Technology of Renewable Biomaterials*, 1. Painos, Blackwell Publishing Ltd, 2009, ss. 61.

45. Y. Sugawara, *Atomic Force Microscopy. Kirjassa: Roadmap of Scanning Probe Microscopy*, Morita, S.(ed.), 1. Painos, Springer-Verlag, Japan, 2007.
46. J. Fahlén ja L. Salmén, Cross-sectional structure of the secondary wall of wood fibers as affected by processing, *J. Mater. Sci.* 2003, 38(1), 119-126. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1021174118468>.
47. T. Zimmermann, V. Thommen, P. Reimann ja H. J. Hug, Ultrastructural appearance of embedded and polished wood cell walls as revealed by Atomic Force Microscopy, *J. Struct. Biol.* 2006, 156, 363-369.
48. D. E. Bland, R. C. Foster ja A. F. Logan, The mechanism of permanganate and osmium tetroxide fixation and the distribution of lignin in the cell wall of *Pinus radiata*, *Holzforschung*, 1971, 25. Band(Heft 5),.
49. M. Rous, E. Ingolic ja K. Schuster, Visualisation of the fibrillar and pore morphology of cellulosic fibres applying transmission electron microscopy, *Cellulose*, 2006, 13(4), 411-419.
50. J. Fromm, B. Rockel, S. Lautner, E. Windeisen ja G. Wanner, Lignin distribution in wood cell walls determined by TEM and backscattered SEM techniques, *J. Struct. Biol.* 2003, 143(1), 77-84.
51. Fiber analysis of paper and paperboard, www.tappi.org/content/tag/sarg/t401.pdf, TAPPI, (6.6.2011).
52. Solubiologia, <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/tutkimus/2/>, Solunetti, (17.05.2011).
53. T. Teeri ja G. Henriksson, *Chapter 10. Enzymes Degrading Wood Components*, Kirjassa: Monica Ek (edit.), Göran Gellerstedt, Gunnar Henriksson, *Wood Chemistry and Wood Biotechnology, Pulp and Paper Chemistry and Technology*, 1. Painos, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 2009, ss. 245-272.

54. X. Yu, J. L. Minor ja R. H. Atalla, Mechanism of action of Simons' stain, *Tappi Journal*. 1995, 78(6), 175-180.
55. M. Rusu, K. Mörseburg, Ø. Gregersen, A. Yamakawa ja S. Liukkonen, Relation between fibre flexibility and cross-sectional properties, *BioRes*. 2011, 6(1), 641-655.
56. L. Hildén ja G. Johansson, Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity, *Biotechnology Letters*, 2004, 26(22), 1683-1693.
57. L. Filonova, Å. Kallas, L. Greffe, G. Johansson, T. T. Teeri ja G. Daniel, Analysis of the Surfaces of Wood Tissues and Pulp Fibers Using Carbohydrate-Binding Modules Specific for Crystalline Cellulose and Mannan, *Biomacromolecules*, 2007, 8(1), 91-97.
58. S. Ding, Q. Xu, Ali K. M.K., J. O. Baker, E. A. Bayer, Y. Barak, L. Raphael, J. Sugiyama, C. Rumbles ja M. Himmel, Versatile derivatives of carbohydrate-binding modules for imaging of complex carbohydrates approaching the molecular level of resolution, *Biotechniques*, 2006, 41(4), 435-443.
59. Q. Xu, M. Tucker, P. Arenkiel, X. Ai, G. Rumbles, J. Sugiyama, M. Himmel ja S. Ding, Labeling the planar face of crystalline cellulose using quantum dots directed by type-I carbohydrate-binding modules, *Cellulose*, 2009, 16(1), 19-26.
60. I. Duchesne, K. Takabe ja G. Daniel, Ultrastructural Localisation of Glucomanan in Kraft Pulp Fibres, *Holzforschung*, 2003, 57(1), 62-68.
61. C. M. Altaner, E. N. Tokareva, M. C. Jarvis ja P. J. Harris, Distribution of (1→4)-β-galactans, arabinogalactan proteins, xylans and (1→3)-β-glucans in tracheid cell walls of softwoods, *Tree Physiology*, 2010, 30(6), 782-793.

62. M. Arend, Immunolocalization of (1,4)- β -galactan in tension wood fibers of poplar, *Tree Physiology*, 2008, 28(8), 1263-1267.
63. J-P Joseleau, V. Chevalier-Billosta ja K. Ruel, Tracing cellulose elements adsorbed on composite cellulose biomaterials by a new labeling method, *Biomacromolecules*, 2008, 9(3), 767-771.
64. N. Kim, T. Imai, M. Wada ja J. Sugiyama, Molecular Directionality in Cellulose Polymorphs, *Biomacromolecules*, 2006, 7(1), 274-280.
65. A. Holmberg, A. Blomstergren, O. Nord, M. Lukacs, J. Lundeberg ja M. Uhlén, The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures, *Electrophoresis*, 2005, 26 501-510.
66. M. Sillanpää, E. Repo, M. Sopanen, H. Lipsanen, S. Suihkonen, M. Leskelä, M. Heikkilä ja M. Putkonen, DELETE – LED-avusteisen fotokatalyyttisen vedenkäsittelymenetelmän kehittäminen, TEKES-projekti, Esitysmateriaali, 2010.
67. M. Kemell, V. Pore, M. Ritala, M. Leskelä ja M. Lindén, Atomic Layer Deposition in Nanometer-Level Replication of Cellulosic Substances and Preparation of Photocatalytic TiO₂/Cellulose Composites, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127(41), 14178-14179.
68. L. Donaldson, Cellulose microfibril aggregates and their size variation with cell wall type, *Wood Science and Technology*, 2007, 41(5), 443-460.
69. Sputter Coating, <http://www.emcourses.com/sputter.htm>, ProTrain, (04.05.2011).
70. X. Wang, O. Ramström ja Migdi Yan, Glyconanomaterials: synthesis, characterization, and ligand presentation, *Adv. Mater.* 2010, 22 1946-1953.
71. Z. Li ja A. Taubert, Cellulose/Gold nanocrystals hybrids via an ionic liquid/aqueous precipitation route, *Molecules*, 2009, 14 4682-4688.

72. J. He, T. Kunitake ja A. Nakao, Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers, *Chem. Mater.* 2003, 15(23), 4401-4406.
73. R. T. Olsson, S. M. A. S. Azizi, G. Salazar-Alvarez, L. Belova, V. Ström, L. A. Berglund, O. Ikkala, J. Nogués ja U. W. Gedde, Making flexible magnetic aerogels and stiff magnetic nanopaper using cellulose nanofibrils as templates, *Nat Nano.* 2010, 5(8), 584-588.
74. Puukoulussa painekyllästetty puutavara - Kestopuu, <http://www.rakentaja.fi/index.asp?s=/suorakanava/verkkolehti/puukoulu/puukoulu13.htm>, Rakentaja.fi, (16.04.2011).
75. K. Van den Broeck, L. Helsen, C. Vandecasteele ja E. Van den Bulck, Determination and Characterisation of Copper, Chromium and Arsenic in Chromated Copper Arsenate (CCA) Treated Wood and Its Pyrolysis Residues by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analyst.* 1997, 122(7), 695-700.
76. Briefing Package: Petition to Ban Chromated Copper Arsenate (CCA)-Treated Wood in Playground Equipment, Petition HP 01-3, <http://www.cpsc.gov/library/foia/foia03/brief/cca1.pdf>, U.S Consumer Product Safety Commission, (16.04.2011).
77. S. A. Katz ja H. Salem, Chemistry and toxicology of building timbers pressure-treated with chromated copper arsenate: a review, *J. Appl. Toxicol.* 2005, 25(1), 1-1-7.
78. N. W. Tame, B. Z. Dlugogorski ja E. M. Kennedy, Assessing Influence of Experimental Parameters on Formation of PCDD/F from Ash Derived from Fires of CCA-Treated Wood, *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37(18), 4148-4156.