



TEKNILLINEN TIEDEKUNTA

KARBOKSYyliHAPPOJEN KEMIALLINEN JA ENTSYMAATTINEN POLYMEROINTI

Rebecca Helanen

PROSESSITEKNIikka

Kandidaatintyö

Marraskuu 2024

TIIVISTELMÄ

Karboksyylihappojen kemiallinen ja entsyymaattinen polymerointi

Rebecca Helanen

Oulun yliopisto, Prosessitekniikan tutkinto-ohjelma

Kandidaatintyö 2024, 34 s.

Työn ohjaaja(t) yliopistolla: Johanna Panula-Perälä

Tässä työssä perehdyttiin yksinkertaisten karboksyylihappojen polymerointiin. Työn tarkoituksena oli selvittää, millaisia entsyymejä ja entsyymaattisia katalyysivaihtoehtoja on polyestereiden valmistuksessa. Tarkoituksena oli tutkia ja verrata teollisuudessa käytössä olevia kemiallisesti katalysoituja polyestereiden valmistusprosesseja vaihtoehtoisin entsyymaattisesti katalysoituihin menetelmiin. Entsyymaattinen polymerointi on yksi mahdollinen keino, jolla voitaisiin ratkaista muovin kasvavaan tarpeeseen ja ympäristöystävällisyyteen liittyvät haasteet. Tutkimuksessa esiteltiin polylaktidien ja polyglykolidien perinteiset valmistusmenetelmät ja käyttökohteet. Tutkimuksessa esiteltiin polyestereiden mahdolliset polymerointimenetelmät: polykondensaatio- ja renkaanavauspolymerointireaktio. Lisäksi työssä esiteltiin eri biokatalyyttejä ja niiden ominaisuuksia sekä sivuttiin entsyymaattisen katalysoinnin historiaa.

Tutkimuksesta saadut tulokset osoittavat, että aihetta on tutkittu laajasti. Polymeroinnissa käytettyjä karboksyylihappoja voidaan valmistaa useammasta eri raaka-aineesta. Tutkimuksen perusteella eri karboksyylihapoista valmistuilla polyestereiden valmistusprosesseilla on merkittäviä yhteneväisyyksiä. Lisäksi karboksyylihapoista valmistetuilla polyestereillä on laajat käyttökohteet. Tuloksista voidaan todeta, että entsyymaattisesti katalysoiduissa polymerointimenetelmissä voidaan hyödyntää samoja polymerointireaktioita kuin kemiallisesti katalysoiduissa polymerointimenetelmissä. Tutkimustulokset osoittavat hyviä konversiotuloksia eri entsyymeillä ja monomeereillä. Erityisesti lipaasi ja *cutinase*-entsyymillä katalysoituja polymerointireaktioita on suoritettu onnistuneesti. Huomionarvoisesti esiin nousi immobilisoitu *Candian anatarctica* -lipaasi B, johtuen sen korkeasta selektiivisyydestä sekä tehokkuudesta, helposta talteenotosta ja uudelleenkäytettävyydestä.

Asiasanat: entsymaattinen polymerointi, karboksyylihappo, polykondensaatioreaktio, polyesteri, renkaanavauspolymerointi

ABSTRACT

Chemical and enzymatic polymerization of carboxylic acids

Rebecca Helanen

University of Oulu, Degree Programme of Process Engineering

Bachelor's thesis 2024, 34 pp.

Supervisor(s) at the university: Johanna Panula-Perälä

This work focused on the polymerization of simple carboxylic acids. The study examined the various enzymatic catalysis options in the production processes of polyesters. The aim was to investigate and compare chemically catalyzed polyester production processes used in the industry with alternative enzymatically catalyzed production methods. Enzymatic polymerization is a potential breakthrough method that could solve the growing demand for plastics and the environmental challenges with it. The study described the traditional production methods and uses of polylactides and polyglycolides. The study also presented possible polymerization methods for polyesters: polycondensation and ring-opening polymerization reactions. Additionally, various biocatalysts and their features are introduced. The work also briefly touched on the history of enzymatic catalysis.

The received results showed that this topic has been widely researched. The work demonstrated that carboxylic acids can be produced from a variety of raw materials. Based on the research, the manufacturing processes of polyesters made from different carboxylic acids show significant similarities. Additionally, polyesters made from carboxylic acids have broad applications. The results showed that the same polymerization reactions used in chemically catalyzed polymerization methods can also be applied in enzymatically catalyzed polymerization methods. The research results demonstrated good conversion outcomes with different enzymes and monomers. Polymerization reactions catalyzed by lipase and cutinase-enzymes have been successful. One notable enzyme that emerged from the studies was immobilized *Candida antarctica* –lipase B due to its high selectivity and efficiency, easy separation and reusability.

Keywords: carboxylic acid, enzymatic polymerization, polycondensation, polyester, ring opening polymerization

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ

ABSTRACT

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	6
2 KARBOKSYYLIHAPPOJEN POLYMEROINTI.....	8
3 MONOMEERIEN VALMISTUS JA KEMIALLINEN POLYMEROINTI.....	10
3.1 Polylaktidi	10
3.1.1 Polylaktidien valmistus.....	11
3.1.2 Polylaktidien käyttökohteet	15
3.2 Polyglykolidi	15
3.2.1 Polyglykolidin valmistus	16
3.2.2 Polyglykolidin käyttökohteet.....	19
4 ENTSYMAATTINEN POLYMEROINTI JA BIOKATALYYSIT	20
4.1 Biokatalyytit.....	21
4.2 Polykondensaatioreaktioiden entsyymattinen katalysointi	23
4.2.1 Lipaasi katalysoitu polykondensaatioreaktio.....	23
4.2.2 <i>Cutinase</i> -entsyymillä katalysoitu polykondensaatioreaktio	24
4.3 e-ROP –menetelmä	24
4.3.1 Lipaasi katalysoitu renkaanavauspolymerointireaktio	25
4.3.2 <i>Cutinase</i> -entsyymillä katalysoitu renkaanavauspolymerointireaktio	26
5 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET.....	27

LÄHDELUETTELO

1 JOHDANTO

Muovin tarve on suurta ihmisten jokapäiväisessä elämässä ja sen tarve tulee kasvamaan jatkuvasti maailmassa kiihtyvissä määrin. Vielä 1950-luvulla tuotettiin vain noin 1,5 miljoonaa tonnia muovia vuodessa, kun vuonna 2018 vuodessa tuotettiin jo huimat 400 miljoonaa tonnia. Vuoteen 2050 mennessä maailman muovituotannon on ennustettu kasvavan 1800 miljoonaa tonniin muovia per vuosi. (Qualman 2017) Lisäksi arviolta vain noin 9 % kaikesta maailman muovijätteestä pystytään kierrättämään onnistuneesti. Kierrätysmäärät vaihtelevat maantieteellisestä sijainnista, muovityypistä ja käyttökohteista riippuen. Loput noin 91 % muovijätteestä jakautuu seuraavasti: noin 79 % sijoitetaan kaatopaikalle tai päätyy luontoon ja noin 12 % poltetaan. (UNDP 2023) Edellä luetelluiden syiden takia on löydettävä ja kehitettävä uusia prosesseja tuottamaan tarvittavat määrät muovia, mutta samalla pienennettävä ympäristöön jätettävää jälkeä. Yksi merkittävä tekijä olisi mahdollistaa materiaalien uudelleenkäytettävyys tai kokonaan uusi käyttötarkoitus, eli vahvistaa jo olemassa olevien tuotteiden kiertotaloutta. Toinen merkittävä tekijä olisi kehittää sellaisia prosesseja, joissa voitaisiin hyödyntää täysin luonnonmukaisia lähtöaineita ja katalyyttejä.

Biopohjaisilla tuotteilla viitataan kaupallisiin tai teollisiin tuotteisiin, jotka koostuvat kokonaan tai merkittävien osin biologisista raaka-aineista, uusiutuvista materiaaleista tai metsätalouden materiaaleista. Biohajoavat biopolymeerit voidaan hajottaa termokemiallisin menetelmin hiilidioksidiksi (CO_2) ja vedeksi (H_2O) tietyssä ajassa ja määrättyssä hävitysympäristössä. (Greene 2014) Biomuovit, biopohjaiset materiaalit ja ympäristöystävällisemmät ratkaisut ovat saaneetkin valtavasti huomiota viimeisten vuosien aikana, mikä liittyy vahvasti ilmastonlämpenemiseen ja uusiutumattoman muovin aiheuttamiin saasteisiin. Yksinkertaisesti uusiutumattomaan muoviin ja sen valmistukseen on kohdistettu lisääntyvissä määrin voimakkaita ympäristöpaineita. (Jem ja Tan 2020)

Tässä kirjallisuuskatsauksessa perehdytään erilaisten karboksyylihappon kemiallisiin ja entsymaattisiin polymerointimenetelmiin vertaillen niiden valmistusprosesseja keskenään. Tutkielman tarkoituksena on syventyä tarkemmin erityisesti ympäristöystävällisempien ja biohajoavien karboksyylihappon polymerointireaktioihin. Tässä työssä aihe rajataan käsittelemään perinteisiä sekä tunnettuja kemiallisesti katalysoituja polylaktidien ja polyglykolidien

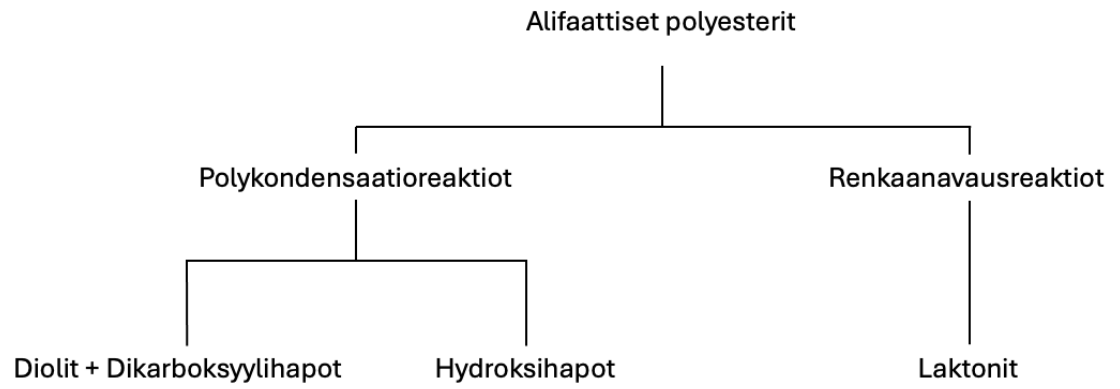
valmistusprosesseja ja verrataan niitä entsymaattisiin vaihtoehtoisin valmistusmenetelmiin. Lisäksi tutkielmassa perehdytään tarkemmin erilaisiin biokatalyytteihin ja niiden käyttömahdollisuuksiin entsymaattisessa polymeroinnissa.

2 KARBOKSYYLIIHAPPOJEN POLYMEROINTI

Karboksyylihappo on yksinkertaisimmillaan hiilestä, vedystä ja hapesta koostuva funktionaalinen orgaaninen yhdiste, jonka funktionaalisena ryhmänä toimii karboksyyliryhmä $-\text{COOH}$. Polymeeri puolestaan tarkoittaa yksittäisistä monomeereistä, oligomeereistä tai lyhytketjuisista polymeereistä muodostunutta pidempää ketjua, jossa toistuu sama tai eri yksittäinen rakennuspalikka. Polymerointi tarkoittaa näiden yksittäisen monomeerien, oligomeerien tai lyhytketjuisten polymeerien kiinnittämistä toiseen monomeeriin, oligomeeriin tai lyhytketjuiseen polymeeriin kemiallisten tai entsymaattisten reaktioiden avulla. Käytännössä tämä tarkoittaa molekyylien, eli yksittäisten rakennuspalikoiden, funktionaalisten ryhmien keskinäistä vuorovaikuttamista, mikä johtaa muodostuvan uuden molekyylin välisten sidosten muodostumiseen. Polymerointireaktioissa voidaan hyödyntää joko additioreaktiota tai kondensaatioreaktiota. (Napari 2007; Douka et al. 2018)

Tässä tutkielmassa monomeerinä toimii jokin orgaaninen karboksyylihappoyhdiste. Monomeerit liitetään toisiinsa kondensaatioreaktion avulla katalyysin vaikutuksesta muodostaen pidempiä ketjuja. Kyseistä reaktiota kutsutaan polykondensaatioreaktioksi. Polykondensaatioreaktiot ovat tasapainoreaktioita, mikä tarkoittaa, että yhtäaikaisesti tapahtuu sekä etenevä pääreaktio että palautuva käänteisreaktio. Tässä yhteydessä käänteinen reaktio viittaa muodostuneiden polymeerien depolymeroitumiseen, eli hajoamiseen. Depolymeroitumisen nopeus määräytyy pääasiassa reaktion tasapainovakion, eli K -arvon mukaan. Toinen vaihtoehtoinen polymeerien valmistusreitti karboksyylihappoyhdisteistä on renkaanavausreaktio. Renkaanavausreaktio on nimensä mukainen reaktio, missä reaktion monomeereinä toimivat orgaaniset rengasrakenteiset yhdisteet. Reaktiossa orgaaniset rengasrakenteet avataan katalyyttisesti katalyytin tai katalyytin ja initiaattorin vaikutuksesta, jolloin niistä voidaan muodostaa pidempiä polymeeriketjuja. (Douka et al. 2018) Polymerointimenetelmänä renkaanavausreaktio on kasvavissa määrin lisääntynyt vaihtoehto polyestereiden tuottamiselle teollisesti (Nuyken ja Pask 2013). Tässä tutkielmassa renkaanavausreaktiopolymeroinnissa tutkitaan monomeereinä karboksyylihappojen syklisiä dimeerejä.

Kun karboksyylihappoja polymeroidaan, muodostuu alifaattisia polyestereitä, joista käytetään yleisesti lyhennettä PE. Polyestereitä voidaan valmistaa myös dioleista, dikarboksyylihapoista sekä laktoneista. (Douka et al. 2018)

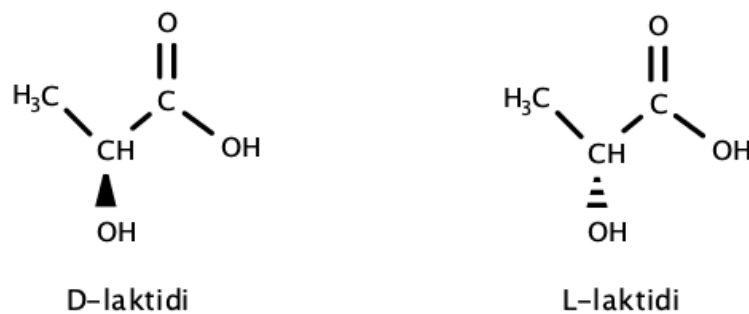


Kuva 1 Alifaattisten polyestereiden mahdolliset reaktiot Douka et al. (2018) mukaan.

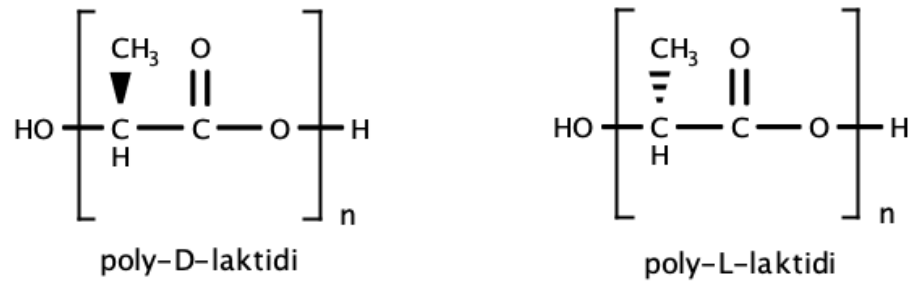
3 MONOMEERIEN VALMISTUS JA KEMIAALLINEN POLYMEROINTI

3.1 Polylaktidi

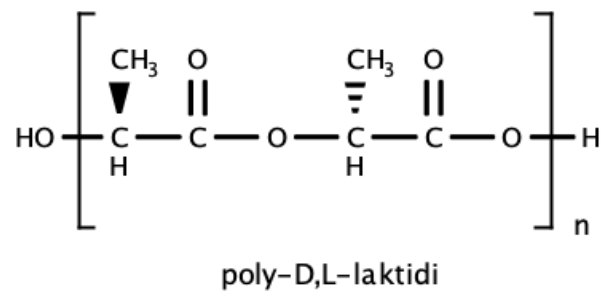
Polylaktidi, eli polymaitohappo, on yksi tunnetuimmista, käytetyimmistä ja tärkeimmistä biopohjaisista ja biohajoavista polymeereistä (Syväne 2020). Polylaktidista käytetään yleisesti lyhennettä PLA, joka tulee yhdisteen englanninkielisestä nimestä: Poly Lactic Acid. Yhdisteen kemiallinen kaava on $(C_3H_4O_2)_n$. Polylaktidien monomeereinä toimivat laktidit, eli maitohapot, joiden kemiallinen kaava on $C_3H_6O_3$. (Greene 2014) Maitohappo on yksinkertainen hydroksidihappo, jossa on asymmetrinen hiiliatomi (Ghaffar et al. 2014). Maitohapolla on kaksi erilaista optista isomeerimuotoa (Kuva 2): D-maitohappo tai L-maitohappo. Isomeerimuodoista D-maitohappo on yleisempi muoto. (Syväne 2020; Greene 2014) Polylaktidilla on puolestaan kolme mahdollista optista isomeerimuotoa (Kuva 3 ja Kuva 4): poly-L-laktidi, poly-D-laktidi sekä poly-D,L-laktidi. Polymeerin isomeerimuoto riippuu sen monomeerin isomeerimuodosta. Poly-L-laktidin monomeereinä on pelkästään L-maitohappoa ja poly-D-laktidin monomeereinä on pelkästään D-maitohappoa, kun puolestaan poly-D,L-laktidin monomeereinä ovat molemmat maitohapon isomeerimuodot. (Greene 2014)



Kuva 2 D-maitohapon ja L-maitohapon rakennekaavat.



Kuva 3 Poly-D-laktidin ja poly-L-laktidin rakennekaavat.



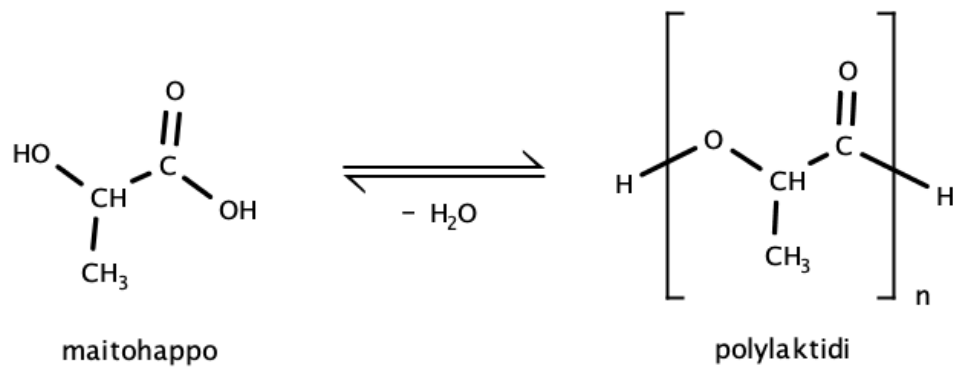
Kuva 4 Poly-D,L-laktidin rakennekaava.

3.1.1 Polylaktidien valmistus

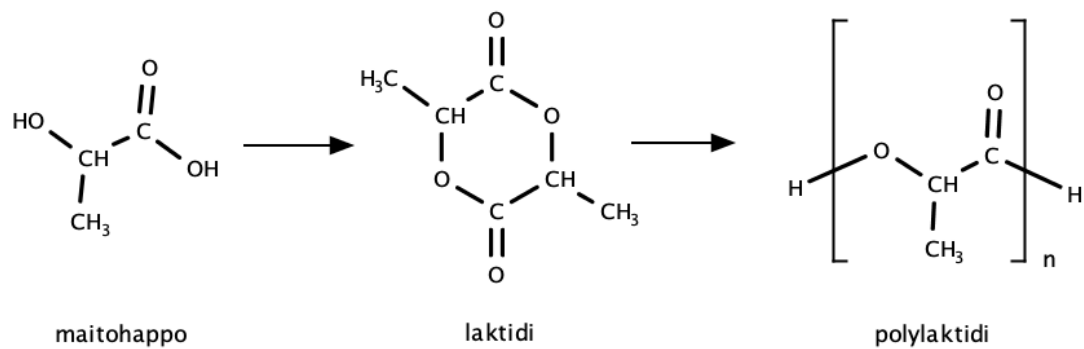
Polylaktidin monomeerien, eli laktidin valmistus voi tapahtua joko kemiallisen synteesin tai mikrobiologisen fermentointiprosessin kautta. Kemiallisessa synteesissä raaka-aineena käytetään öljypohjaisia kemiakaaleja ja saatu tuote on raseeminen seos, eli sisältää molempia laktidin isomeerimuotoja. (Farooq et al. 2010) Kemiallisesti syntetisoitua laktidia ei kuitenkaan pääasiassa käytetä polylaktidin valmistukseen (Jem et al. 2010; Lim et al. 2008). Polylaktidien mikrobiologisen fermentointiprosessin raaka-aineena käytetään yleensä maissia, mutta myös muita raaka-aineita, joissa sokeri on peräisin hiilihydraattilähteistä, voidaan hyödyntää (Greene 2014). Muita raaka-aineita, joissa sokeri on peräisin hiilihydraattilähteitä ovat esimerkiksi sokerijuurikas, ohramallas, vehnäöljet ja lignoselluloosan biomassa (Ghaffar et al. 2014). Myös esimerkiksi orgaaninen jäte voi toimia raaka-aineena polylaktidien valmistusprosessissa (Greene 2014). Esimerkiksi omenista, banaaneista, sokerijuurikkaista tai granaattiomenista peräisin oleva orgaaninen jäte sopii raaka-aineeksi valmistusprosessille (Ghaffar et al. 2014).

Kun polylaktidia valmistetaan maissista, on valmistusprosessi kaikessa yksinkertaisuudessaan seuraavanlainen. Maissin maissitärkkelys muutetaan glukoosiksi, joka edelleen muutetaan maitohapoksi bakteerikäymisen avulla. Tämän jälkeen saatu maitohappo fermentoidaan laktidiksi. Muodostuneet laktidit polymeroidaan PLA:ksi esimerkiksi laktidin renkaanavausreaktion avulla. (Greene 2014)

Polylaktidin valmistusprosessin tarkempi kuvaus tapahtuu nelivaiheisella menetelmällä, joka pohjautuu selluloosan valmistusprosessiin. Ensimmäisessä vaiheessa hiilihydraatit esikäsitellään, jotta sokeri saadaan vapautettua. Käytännössä tämä tarkoittaa menetelmän raaka-aineen käsittelemistä happoseoksella. Happoseoksena voidaan käyttää rikkihappoa sisältävää liotinta, joka katkaisee tärkkelyksen kolmiulotteisen rakenteen kemialliset sidokset. Näin saadaan vapautettua glukoosimolekyylejä. Toisessa vaiheessa tapahtuu sokerimonomeerien, eli glukoosin, muuntaminen maitohapoksi käymisreaktion avulla. Ensimmäisestä prosessivaiheesta saatu glukoosi fermentoidaan bakteerien avulla maitohapoksi. Bakteerina käytetään yleisesti *Lactobacillus rhamnosus*-bakteeria, joka fermentoi glukoosin anaerobisesti ainoastaan maitohapoksi ilman, että prosessissa syntyy muita sivutuotteita. Fermentoinnista saatu maitohappo on joko L-maitohappo tai D-maitohappo isomeerimuodossa. (Greene 2014) Muita biologisia aineita, joiden avulla voidaan myös tuottaa maitohappoa ovat *Rhizopus*-, *Escherichia*-, *Bacillus*-, *Kluyveromyces*- ja *Saccharomyces*-kannat (Ghaffar et al. 2014). Kolmannessa vaiheessa maitohappo puhdistetaan käymisliemestä. Puhdistuksessa hyödynnetään ioninvaihtotekniikoita, kuten esimerkiksi kromatografista kolonni-ioninvaihtoa. Maitohapon puhdistaminen on erityisen tärkeä prosessivaihe polylaktidien valmistuksen mahdollistamiseen. PLA-tuotteet, joilla on korkeat mekaaniset ominaisuudet vaativat vähintään noin 95 % puhtausasteista maitohappoa. Tuotteen korkeilla mekaanisilla ominaisuuksilla tarkoitetaan esimerkiksi, että tuote omaa korkean vetolujuuden, korkean taipumislämpötilan tai nopean biohajoamisnopeuden teollisissa kompostointiolosuhteissa. Menetelmän neljäs ja viimeinen vaihe käsittää maitohapon polymeroinnin PLA:ksi. Polymerointi voidaan toteuttaa suoraan polykondensaatioreaktiolla (Kuva 5), polykondensaatioreaktiolla atseotrooppisen dehydraation kautta tai renkaanavausreaktiolla (Kuva 6). (Greene 2014)



Kuva 5 Polyaktidin valmistus maitohaposta polykondensaatioreaktion avulla.



Kuva 6 Polyaktidin valmistus maitohaposta renkaanavausreaktion avulla.

Polyaktidin valmistus suoraan polykondensaatioreaktion kautta on edullisin polymerointimenetelmä, mutta menetelmän avulla on vaikeaa tuottaa korkean molekyylipainon omaavia polymeerejä. Polykondensaatioreaktiossa tarvitaan kytkentä- tai esteröintiä edistäviä kemikaaliyhdisteitä, joiden avulla voidaan kasvattaa muodostuvan ketjun pituutta. Kytkentäaineiden tehtävä on reagoida karboksyylihapon funktionaalisen ryhmän kanssa, jolloin muodostuu telekeelisiä polymeerejä. (Avérous 2013) Telekeeliset polymeerit ovat polymeerisiä molekyyliä, joissa on reaktiivisia funktionaalisia ryhmiä polymeerimolekyylien päissä, jotka kykenevät jatkamaan polymeroitumista (Tasdelen et al. 2011). Polykondensaatioreaktiossa käytettäviä kytkentäaineita ovat esimerkiksi anhydritit, epoksidit ja isosyanaatit. Vaikka polykondensaatioreaktio itsessään on edullisin polymerointimenetelmä, ei se ole laajasti käytössä, sillä reaktiossa tarvittavat kytkentäaineet nostavat huomattavasti valmistusmenetelmän kustannuksia. Kustannusten nousu johtuu reaktiovaiheiden

määrästä ja kytkentäaineiden muodostamien sivutuotteiden jäännöspuhdistuksesta. (Avérous 2013)

Atseotrooppisessa polykondensaatiomenetelmässä puolestaan polymerointi tapahtuu ilman kytkentäaineita, mikä poistaa niiden aiheuttamat haitat. Valmistusmenetelmän avulla saadaan tuotettua korkean molekyylipainon omaavia polymeerejä korkean lämpötilan, matalan paineen ja katalyyttien avulla. Ensin menetelmässä alipainetislataan maitohappoa noin 2-3 tunnin ajan käyttäen noin 130 °C, jolloin suurinosa kondensoitavasta vedestä saadaan poistettua. Tämän jälkeen reaktioastiaan lisätään katalyytti ja difenyylietteriä, jonka jälkeen reaktioseoksen annetaan reagoita 30-40 tuntia 130 °C:ssa. (Avérous 2013) M. H. Hartmann (1998) ja M. Ajioka et al. (1995) artikkeleiden mukaan atseotrooppisessa polykondensaatiomenetelmässä katalyytteinä voidaan hyödyntää esimerkiksi tinaa, tinan eri yhdisteitä kuten tina(II)oksidia (SnO) ja tina(II)kloridia ($SnCl_2$) sekä nikkeliastetaattia ($Ni(AcO)_2$) kun halutaan tuottaa mahdollisimman korkean molekyylipainon omaavia polymeerejä (Ramezani Dana ja Ebrahimi 2023). Lopuksi saatu PLA puhdistetaan. Atseotrooppisen polykondensaatiomenetelmän avulla tuotettu PLA sisältää kuitenkin suuria määriä katalyyttijäännöksiä, joita voidaan vähentää eri toimenpiteillä. Katalyyttijäännöksiä voidaan deaktivoida lisäämällä fosforihappoa tai saostaa ja suodattaa pois tuotteesta vahvojen happojen, kuten esimerkiksi rikkihapon avulla. (Avérous 2013)

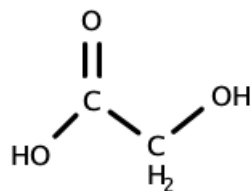
Renkaanavauspolymerointi on paras vaihtoehto polymerointimenetelmistä puhtaan ja korkean molekyylipainon omaavien polymeerien tuottamiseen (Avérous 2013). Kun polylaktidien valmistukseen käytetään renkaanavauspolymerointia täytyy saatu maitohappo ensin muuttaa maitohapon sykliseen dimeeri muotoon, eli laktidiksi. Tämän jälkeen voidaan suorittaa polymerointi renkaanavausreaktiolla. (Lim et al. 2008) Renkaanavauspolymerointia voidaan suorittaa käyttämällä eri menetelmiä, kuten liuos-, bulkki-, sulate- tai suspensioprosessia. Teollisessa tuotannossa on kuitenkin edullista suorittaa renkaanavauspolymerointi joko bulkki- tai sulapolymeroinnilla. Tutkimusten perusteella on havaittu, että korkean molekyylipainon omaavia polylaktideja saadaan tuotettua helposti kun reaktiokatalyyttinä käytetään tinan siirtymämetalliyhdisteitä, sinkkiä (Zn), rautaa (Fe), tai alumiinia (Al). Erityisesti tinaoktoaattia $Sn(Oct)_2$ hyödynnetään katalyyttinä polylaktidin valmistuksessa renkaanavauspolymeroinnissa, johtuen pääasiassa sen korkeasta katalyyttisestä tehokkuudesta ja alhaisesta myrkyllisyydestä. (Avérous 2013)

3.1.2 Polylaktidien käyttökohteet

Polylaktidi on ominaisuuksiltaan useimmiten jäykkä, hauras ja läpinäkyvä. PLA-materiaalia on saatavilla kuitenkin eri käyttökohteisiin, erilaisia laatuja eri ominaisuuksin. (Syväne 2020) Koska PLA on termoplastinen polyesteri, voidaan sitä kehrätä kuiduksi, venyttää jäykäksi kalvoksi, puristaa levyiksi lämpömuovattuja pakkauksia varten sekä ruiskuttaa muotteihin (Lim et al. 2008). Tämän ansiosta PLA:lla on laajalti eri käyttökohteita. Polylaktidista valmistetun muovin yleisimpiä käyttökohteita ovat esimerkiksi elintarvikepakkaukset, kuitukangas tekstiilit, kertakäyttöaterimet ja -astiat, terveydenhuollossa käytettäviä sovelluksia, kuten ompeleet, sekä 3D-tulostuksessa käytettävä muovi. (NatureWorks 2024; Jem & Tan 2020) PLA:ta voidaan myös sekoittaa muiden erilaisen muovien ja biohajoavien muovien kanssa, jotta saavutetaan erilaisia mekaanisia ominaisuuksia, ja näin myös laajennetaan PLA:n hyödyntämismahdollisuuksia edelleen erilaisiin ja laajempiin tarpeisiin (Lim et al. 2008).

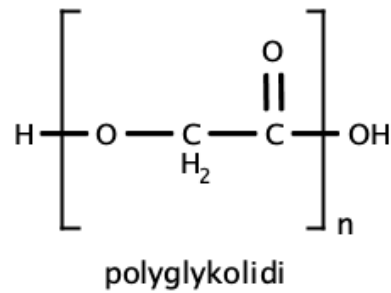
3.2 Polyglykolidi

Polyglykolidi, eli polyglykoli happo (Kuva 8) on yksi vähemmän tunnettu, mutta hyvin potentiaalinen biopohjainen ja biohajoava biopolymeeri. Siitä käytetään yleisesti lyhennettä PGA, joka tulee yhdisteen englanninkielisestä nimestä: Poly Glycolic Acid. Yhdisteen kemiallinen kaava on $(C_2H_2O_2)_n$. (Jem ja Tan 2020) PGA on yksinkertaisin alifaattisista polyestereistä. Polyglykolidin monomeerinä toimii glykoli happo (Kuva 7), joka on pienin mahdollinen alfahydroksi happo (Sanko et al. 2019). Glykolihapon kemiallinen kaava on $C_2H_4O_3$ (Jem ja Tan 2020).



glykolihappo

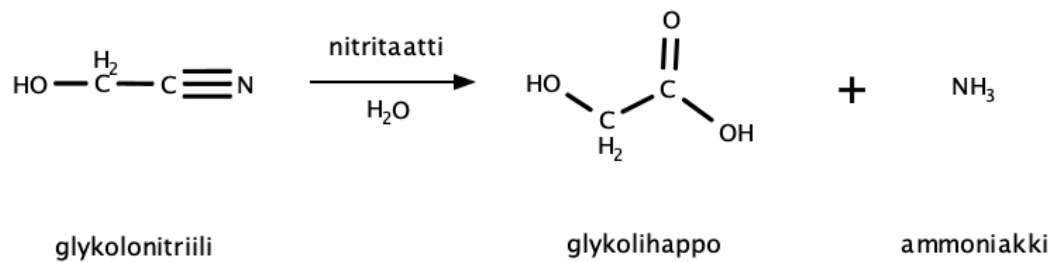
Kuva 7 Glykolidihapon rakennekaava.



Kuva 8 Polyglykolidin rakennekaava.

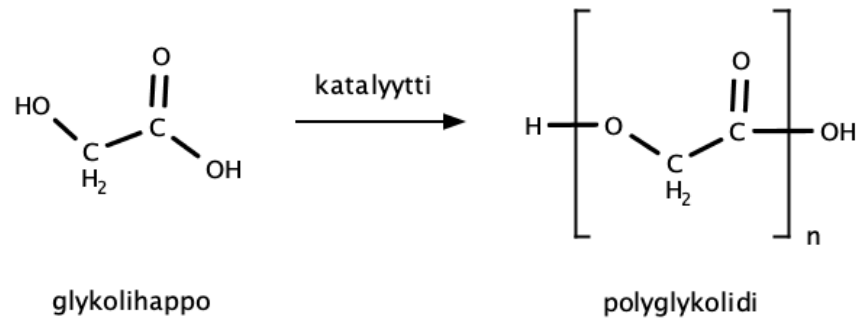
3.2.1 Polyglykolidin valmistus

Polyglykolidin monomeeriä, eli glykolihappoa voidaan tuottaa uusiutuvista luonnonvaroista, kuten esimerkiksi sokeriruo'osta tai sokerijuurikkaasta (Yunhai et al. 2011). Lisäksi glykolihappoa voidaan tuottaa maaöljystä. Vallitsevin valmistustapa teollisesti on kuitenkin tuottaa glykolihappoa petrokemian lähteistä. (Jem ja Tan 2020) Reaktiossa formaldehydiä ja hiilimonoksidia sekoitetaan keskenään ja katalyytin avulla saadaan tuotettua glykolihappoa. Reaktiossa käytetään happokatalyyttiä. (Gokturk et al. 2016) Vaihtoehtoinen valmistusmenetelmä on tuottaa glykolihappoa vesiliuoksessa glykolonitriilistä entsyymikatalyytin avulla (Kuva 9). Reaktiossa käytetään nitritaatti-entsyymiä katalysaattorina ja reaktion sivutuotteena syntyy ammoniakkia. (DiCosimo et al. 2007)

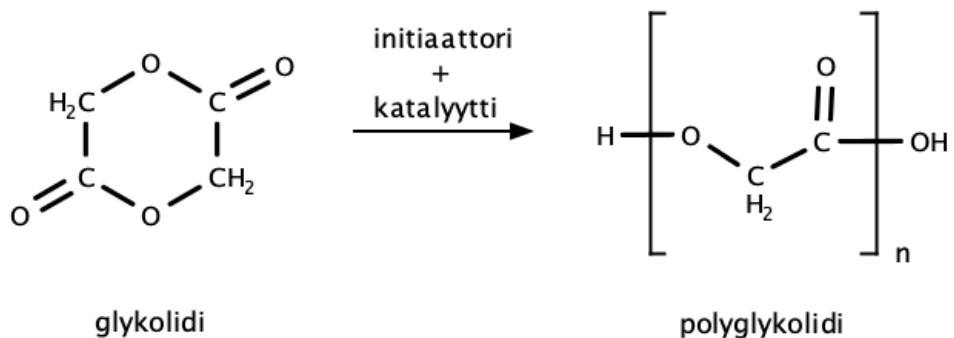


Kuva 9 Glykolihapon valmistus glykolonitriilistä nitriaatti-entsyymien katalysoimana.

Polyglykolidia voidaan valmistaa kahdella eri polymerointimenetelmällä. Niistä ensimmäinen on glykolihapon polykondensaatioreaktio (Kuva 10) ja toinen glykolidin renkaanavautumispolymeroitireaktio (Kuva 11). (Ayyoob et al. 2017)



Kuva 10 Polyglykolidin valmistus glykolihaposta kondensaatioreaktion avulla.



Kuva 11 Polyglykolidin valmistus glykolidista renkaanavausreaktion avulla.

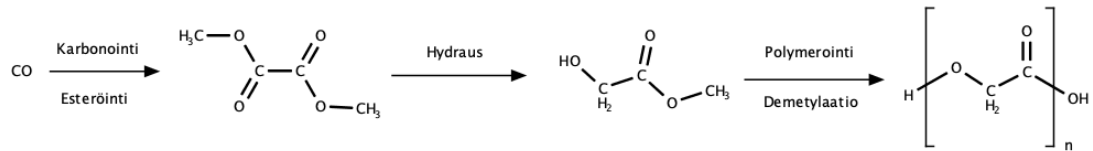
Polykondensaatioreaktion avulla tuotettu polyglykolidi on valmistusprosessina yksinkertaisempi, mutta ei kovin tehokas, johtuen reaktiossa sivutuotteena muodostuvan veden (H_2O) takia. Reaktiossa syntyvä sivutuote, eli vesi, rajoittaa muodostuvan PGA:n molekyyliainoa. (Singh ja Tiwari 2010) Tämän lisäksi polykondensaatioreaktion reaktiolämpötila on hyvin lähellä PGA:n sulamispistettä. Koska PGA:lla on heikko lämpöstabiilisuus sulamislämpötilan yläpuolella, voi se johtaa yhdisteen hajoamiseen, eli depolymerisoitumiseen helposti polykondensaatioreaktion aikana. (Ayyoob et al. 2017) Edellä mainituiden huomioiden takia, polykondensaatioreaktiolla valmistettu PGA on mekaanisilta ominaisuuksiltaan heikko. Valmistusprosessi on kuitenkin laajalti käytössä

lääkkeen saatossa käytetyissä sovelluksissa (drug delivery systems), juuri sen heikkojen mekaanisten ominaisuuksien takia, koska saatu lopputuote on erittäin amorfinen ja bioyhteesopiva. Polykondensaatioreaktion sivutuotteen, eli veden, aiheuttamat haasteet voitaisiin ratkaista aseotrooppisella kondensaatiopolymeroinnilla, jolloin voitaisiin valmistaa korkeampi molekyylipainoisempaa PGA:ta. Menetelmässä sivutuotteena syntynyt vesi poistettaisiin atseotrooppisesti, jonka jälkeen muodostunut liuos kuivattaisiin ja kierrätettäisiin takaisin reaktioon. Atseotrooppisen polykondensaatioreaktion reaktiolämpötila on PGA:n sulamispisteen alapuolella, mikä voisi myös johtaa depolymeroinnin estymiseen reaktion aikana. (Singh ja Tiwari 2010) Menetelmää ei ainakaan toistaiseksi käytetä teollisessa mittakaavassa, johtuen reaktiossa käytettävän orgaanisen liuottimen hankalan jatkokäsittelyn takia (Jem ja Tan 2020).

Tehokkaampi ja käytetympi valmistusmenetelmä PGA:n tuotannossa on renkaanavautumispolymerointi. Sen avulla saadaan tuotettua korkeaa molekyylipainoista lopputuotetta hyvällä saantoprosentilla. Reaktiomenetelmässä glykolidista muodostetaan polyglykolidia katalyytin avulla. Glykolidi on glykolihapon syklinen dimeeri, joka voidaan depolymeroida PGA-oligomeeristä. PGA:n valmistus renkaanavauspolymerointi-reaktion avulla on hyvin kehittynyt, mutta samalla kallis ja monimutkainen valmistusmenetelmä. Glykolidin renkaanavauspolymerointi on monimutkaisempi valmistusprosessi verrattuna polykondensaatioreaktioon, koska se vaatii kyseiselle prosessille sopivia katalyyttejä ja lähtöaineen korkeaa puhtautta. (Ayyoob et al. 2017) Gautier et al. (2009) julkaiseman artikkelin mukaan reaktiossa yleisesti käytettävä katalyytti teollisessa tuotannossa on tinaoktoaatti $Sn(Oct)_2$. Myös eri metallikatalyyttejä, kuten kaliumia, tinaa ja sinkkiä sekä eri ligandeja, kuten alkoksia ja heksaanimetyylidisilatisidiä on tutkittu. Gautier E. et al. tutkivat lisäksi artikkelissaan reaktiossa käytettäviä eri initiaattoreita erilaisissa reaktio-olosuhteissa. On tutkittu, että renkaanavautumispolymerointi-reaktio voi tapahtua sekä liuotin- että sulaolosuhteessa. (Jem ja Tan 2020)

Kiinassa Pujing Chemical Industry Co., Ltd (PJCHEM) niminen yritys on tuottanut PGA:ta innovatiivisen valmistusmenetelmän avulla hiilimonoksidista. Kysellä valmistusmenetelmällä voidaan valmistaa PGA:ta kivihiilen kemianteollisuuden jätteenkaasuista (Kuva 12). Tämä valmistusmenetelmä perustuu hiilimonoksidin uuttamiseen teollisuuden jätteenkaasuista, jonka jälkeen hiilimonoksidille suoritetaan sarja karbonointi- ja esteröinti-reaktioita, jolloin tuotteeksi saadaan dimetyylioksalaattia.

Tämän jälkeen dimetyylioksaalaatti hydrataan metyyliiglykolaatiksi ja polymeroidaan edelleen PGA:ksi. Teollisuuden jätekaasuista valmistettu polyglykolidi vaatii tosin huomattavasti enemmän reaktioita verrattuna polykondensaatio- tai renkaanavautumispolymerointireaktioon. (Jem ja Tan 2020)



Kuva 12 Polyglykolidin valmistusprosessi teollisuuden jätekaasuista.

3.2.2 Polyglykolidin käyttökohteet

Kemialliselta rakenteeltaan polyglykolidi on hyvin samanlainen kuin aiemmin käsitelty polylaktidi, mutta polyglykolidi omaa hyvin erilaiset ominaisuudet (Jem ja Tan 2020). PGA:lla on hyvät mekaaniset ominaisuudet, mikä mahdollistaa sen laajat käyttömahdollisuudet (Sanko et al. 2019). Esimerkiksi PGA:n vetolujuus on noin 115 MPa ja se liukenee huonosti yleisimmissä orgaanisissa liuottimissa. PGA:n etuna katsotaan olevan sen nopea hajoaminen, minkä takia PGA:ta hyödynnetään paljon kertakäyttötuotteissa, joilla on lyhyt käyttöikä. (Jem ja Tan 2020) PGA:n tavallisimpia käyttökohteita ovat muun muassa eri lääketieteelliset sovellukset kuten ompeleet ja kudostekniikat, sillä yhdisteen hajoamistuotteet ovat täysin myrkyttömiä (Polylactide 2023; Sanko et al. 2019). PGA:ta voidaan hyödyntää myös kaasu- ja öljyteollisuudessa sekä erilaisissa pakkaussovelluksissa (Value Market Research 2024).

4 ENTSYMAATTINEN POLYMEROINTI JA BIOKATALYYSI

Entsymaattisella polymeroinnilla viitataan polymerointireaktioon, missä reaktion katalyyttinä käytetään jotakin prosessille sopivaa entsyymiä. Entsyymit ovat proteiineja ja ne määritellään biokatalyyteiksi, sillä niiden lähde on biologinen. Entsyymit ovat suuressa roolissa niin tieteellisissä tutkimuksissa kuin myös teollisuudessa. (ScienceDirect 2024a) Koska entsyymit ovat peräisin uusiutuvista luonnonvaroista, ovat ne täysin kierrätettäviä, ympäristöystävällisiä ja myrkyttömiä (Varma et al. 2005). Entsyymien hyödyntäminen polymeerisynteesimenetelmissä on noussut vihreämmäksi vaihtoehdoksi perinteisiin kemiallisiin katalyytteihin verrattuna (Hevilla et al. 2021).

Kun entsyymaattista polymerointia verrataan perinteisiin kemiallisesti katalysoituihin polymerointiprosesseihin, voidaan huomata merkittäviä eroja valmistusmenetelmien välillä. Varma et al. (2005) julkaiseman artikkelin mukaan suurimmat edut entsyymaattisessa polymeroinnissa verrattuna kemialliseen polymerointiin liittyvät entsyymien enantio- ja regioselektiivisyyteen, myrkyttömyyteen ja ympäristöystävällisyyteen. Entsyymaattinen polymerointi tarjoaa etuja myös esimerkiksi reaktion tarvitsemassa reaktio-olosuhteissa, kuten lämpötilaan, paineeseen ja pH-alueeseen sekä sen myrkyttömyyteen liittyen. Myöskään kosteuden ja hapen poistaminen reaktioastiasta ei ole yhtä kriittistä kuin kemiallisesti katalysoiduissa prosesseissa, johtuen entsyymien kyvystä säilyttää monomeerien termisesti tai kemiallisesti herkkien osien rakenteet polymerointireaktion aikana. Entsyymejä voidaan siis hyödyntää laajalti eri valmistusympäristöissä, kuten esimerkiksi bulkki- ja kaksifaasisissa orgaanisissa väliaineissa sekä erilaisissa rajapinnoissa. (Varma et al. 2005) Biokatalyysi on kuitenkin suhteellisen uusi ja tuntematon valmistusreitti, vaikka esimerkiksi alifaattisten polykondensaatiopolymeerien entsyymaattista polymerointia on tutkittu aktiivisesti jo viimeisten reilun 30 vuoden aikana. Suurin läpimurto tähän mennessä liittyen entsyymaattiseen polymerointiin saavutettiin, kun onnistuttiin tuottamaan lineaarisia korkean molekyylipainon omaavia polyestereitä, joita voidaan hyödyntää kuituina, kalvoina ja kestonuoveina. (Douka et al. 2018)

Biokatalyyttisten prosessien tehokkuuteen vaikuttavat samat muuttujat kuin perinteisessä kemiallisesti katalysoiduissa valmistusprosesseissa. Reaktiossa olevat muuttujat voivat olla esimerkiksi entsyymi- ja monomeerityypit, reaktioaika ja -lämpötila,

polymerointimenetelmä sekä sivutuotteiden poistomenetelmät. Polykondensaatioreaktioissa ja renkaanavausreaktioissa vallitsevia biokatalyyttejä ovat vapaat tai immobilisoidut lipaasit sekä *Cutinase* -entsyymit. (Varma et al. 2005; Pellis et al. 2016)

Yksi merkittävä mahdollisuus, jonka biokatalyyttisesti tuotetut polymeerit ja biomuovit mahdollistavat on niiden entsyymaattinen hajottaminen. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että esimerkiksi lipaasi katalyysillä tuotettua polylaktidia voidaan depolymeroida tietyissä reaktio-olosuhteissa. Menetelmä perustuu siis siihen, että polykondensaatio- ja renkaanavauspolymerointireaktio ovat molemmat kaksisuuntaisia reaktioita monomeerien ja polymeerien välillä. Valitsemalla oikeat reaktio-olosuhteet voidaan reaktiota viedä kohti haluttua suuntaa. (Kobayashi 2009)

4.1 Biokatalyytit

Luonnossa esiintyvät entsyymit voidaan jakaa seitsemään eri luokkaan seuraavasti riippuen entsyymin substraattityypistä (ExplorEnz 2024).

1. Oksidoreduktaasit
2. Transferaasit
3. Hydrolaasit
4. Lyaasit
5. Isomeraasit
6. Ligaasit
7. Translokaasit

Näistä kuitenkin vain kolme entsyymiluokkaa, oksidoreduktaasit, transferaasit sekä hydrolaasit ovat tutkitusti onnistuneet katalysoimaan polymerointia *in vitro* (Douka et al. 2018).

Stavila E. ja Loos K. (2015) julkaiseman artikkelin mukaan yllä listattuja entsyymiluokkia kuvaillaan seuraavasti: Oksidoreduktaasit katalysoivat redox-reaktioita elektronisiirrolla. Tyypillisiä oksidoreduktaasi luokkaan kuuluvia entsyymejä ovat peroksidaasit ja lakkaasit, jotka katalysoivat esimerkiksi polyfenolien, polystyreenien ja

poly(metyylimetakrylaatin) valmistusta. Transferaasit katalysoivat funktionaalisten ryhmien siirtymistä yhdestä yhdisteestä toiseen. Tyypillisiä transferaasi luokkaan kuuluvia entsyymejä ovat polyhydroksialkanoaattisyntaasi (PHA), hyaluronaanisyntaasi sekä fosforylaasi, jotka katalysoivat esimerkiksi polyestereiden, hyaluronaanin ja amyloosin valmistusta. Hydrolaasit katalysoivat erilaisten sidosten hydrolyysiä. Tyypillisiä hydrolaasi luokkaan kuuluvia entsyymejä ovat sellulaasi, kitinaasi ja lipaasi, jotka osallistuvat selluloosan, kitiinin, polyestereiden ja polykarbonaattien hydrolyysiin hajottamalla ne monomeereiksi. Vallitsevimista biokatalyyteistä lipaasit ja *Cutinase*-entsyymit kuuluvat molemmat hydrolaasiluokkaan. (Douka et al. 2018)

Cutinase-entsyymit ovat solunulkoisia sienientsyymejä, joiden luonnollisena tehtävänä on katalysoida esterisidosten hydrolyysiä kutiinissa, mikä on kasvien kutikulassa esiintyvä lipidipolyesteri. Suurimmassa osassa *Cutinase*-entsyymeihin liittyvistä katalyyttisistä tutkimuksista ja julkaisuista tarkastellaan alifaattisten polyestereiden hajoamista sekä pienten molekyylien esteröitymistä ja transesteröitymistä. On kuitenkin saatu selville, että *Cutinase*-entsyymeistä löytyy lupaavia entsyymejä katalysoimaan renkaanavaus- sekä polykondensaatioreaktioita. (Hunsen et al. 2006) Lipaasit ovat yleensä monomeerisiä ja vesiliukoisia entsyymejä, jotka katalysoivat yleisesti veteen liukenemattomien esterisubstraattien entsyymireaktioita (Brockman 2004). Lipaasit ovat tutkitusti hyviä entsyymejä katalysoimaan polykondensaatio- ja renkaanavausreaktioita, transesteröimistä sekä modifioimaan polymeerejä (Douka et al. 2018). Syy miksi lipaasit ovat tällä hetkellä tutkituista entsyymaattisista katalyytti vaihtoehdoista paras, johtuu lipaaseille ominaisista ominaisuuksista. Osa lipaaseista on stabiileja orgaanisissa liuottimissa kohtuullisissa lämpötiloissa, ne kattavat laajan pH-alueen, ovat helposti käsiteltäviä sekä spesifisiä esterisidoksille, mikä eliminoi ei-toivottujen sivutuotteiden muodostumisen. (Varma et al. 2005)

Isoimpana haasteena entsyymien hyödyntämiseen teollisessa ympäristössä liittyen katalysoituihin polykondensaatioreaktioihin ovat olleet entsyymien alhainen stabiilisuus kemiallisissa reaktoreissa sekä korkea reaktiolämpötila. Tähän on kuitenkin löydetty toimiva ratkaisu, entsyymien immobilisaatio, mikä tarkoittaa entsyymien sitomista tai absorboimista johonkin kiinteään kantajamateriaaliin tai esteen taakse. (Ortiz et al. 2019) Immobilisointi parantaa entsyymien kierrätettävyyttä sekä uudelleenkäyttöä, stabiloi entsyymiä ja parantaa entsyymien suorituskykyä lisäämällä entsyymien ja substraatin välistä kosketuspintaa (Douka et al. 2018; Lu et al. 2019). Kirjallisuudessa ja

teollisuudessa tunnetuin ja tutkituin immobilisoitu entsyymi on Novozym 435® (N435®). Kyseinen entsyymi koostuu *Candian anatarctica* –lipaasi B:stä (CALB), joka on fyysisesti immobilisoitu poly(metyylimetakrylaatin) hydrofobiseen makrohuokoiseen hartsiin. (Ortiz et al. 2019) Syy miksi *Candian anatarctica* –lipaasi B (CALB) on tunnetuin ja käytetyin entsyymaattinen katalyytti, johtuu sen korkeasta selektiivisyydestä ja tehokkuudesta. Lisäksi immobilisoinnista johtuen *Candian anatarctica* –lipaasi B (CALB) on vakaa, mikä lisää entsyymien stabiilisuutta sekä se on helppo ottaa talteen ja käyttää uudelleen. (Lu et al. 2019) *Candian anatarctica* on hiivalajike, jonka biokemiallisia ominaisuuksia ja rakenteita on tutkittu laajalti ja josta saadaan uutettu lipaasia menestyksekkäästi (Shi et al. 2020). Polyestereiden synteesissä on tutkittu ja käytetty perinteisten immobilisoitujen entsyymien lisäksi ionisella nesteellä pinnoitettuja lipaaseja (Dong et al. 2012; Wu et al. 2013).

4.2 Polykondensaatioreaktioiden entsyymaattinen katalysointi

Yksinkertaisin polykondensaatioreaktion muoto on dehydraatiopolykondensaatio, eli polymerointireaktion aikana sivutuotteeksi lohkeaa vettä (Kobayashi 2009). Polykondensaatioreaktioiden entsyymaattista katalysointia on tutkittu laajasti eri entsyymaattisilla katalyysivaihtoehdoilla. Entsyymaattisissa polykondensaatioreaktioissa on tutkimusten mukaan käytetty muun muassa eri lipaaseja sekä *Cutinase*-entsyymejä onnistuneesti. (Hunsen et al. 2006)

4.2.1 Lipaasi katalysoitu polykondensaatioreaktio

Lipaaseja on tutkimusten mukaan mahdollista hyödyntää laajasti polyestereiden valmistuksessa polykondensaatioreaktioiden avulla. Ensimmäinen raportoitu lipaasi katalysoitu polykondensaatioreaktiota käsittelevä artikkeli Okumura et al. (1984) julkaistiin jo vuonna 1984, jossa tutkittiin *Aspergillus niger* –lipaasilla katalysoimista. (Kobayashi 2009) Tällä hetkellä tehokkaimmaksi polykondensaatioreaktioiden entsyymiksi on todettu akryylihartsiin immobilisoitu *Candian anatarctica* –lipaasi B (CALB) (Adhami et al. 2021). Myös muun muassa *Mucor miehei* –lipaasin (lipaasi MM), *Pseudomonas fluorescens* –lipaasin (lipaasi PF), *Pseudomonas cepacia* –lipaasin (lipaasi

PC), *Candida rugosa* –lipaasin sekä sian haimalipaasin (lipaasi PPL) aktiivisuutta on tutkittu onnistuneesti sekä saatu suhteellisen hyvä konversio polykondensaatioreaktioille. (Kobayashi 2009) Lipaasi-katalysoitujen polykondensaatioreaktioiden tutkimuksessa on tullut myös ilmi, että ioniset nesteet toimivat hyvänä väliaineena polyestereiden tuotannossa (Kobayashi 2009).

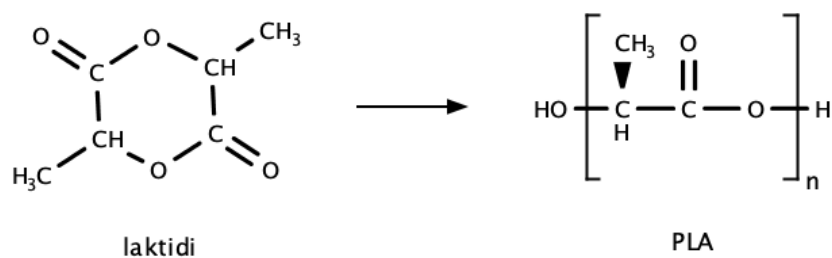
4.2.2 *Cutinase*-entsyymillä katalysoitu polykondensaatioreaktio

Cutinase -entsyymien osalta polykondensaatioreaktioiden tutkimuksissa on noussut esiin *Humicola insolens cutinase* –entsyymi (HiC). Esimerkiksi M. Hunsen et al. (2006) suorittamassa tutkimuksessa selvitettiin *Humicola insolens cutinase* –entsyymien (HiC) aktiivisuutta polyesterisynteesissä polykondensaatioreaktioiden kautta. Tutkimuksessa valittiin sarja eri dioleja sekä dihapoja joilla lähdettiin toteuttamaan tutkimusta eri lämpötiloissa. Reaktiossa käytettävä entsyymattinen katalyytti *Humicola insolens cutinase* –entsyymi immobilisoitiin fysikaalisella absorptiolla ioninvaihtohartseihin, mikä tutkitusti lisää entsyymien lämpöstabiilisuutta. (Ortiz et al. 2019) Reaktion lähtöaineet kuumennettiin 100 °C:seen, jotta saavutettiin lähtöaineiden yksifaasinen liuos. Seuraavaksi reaktioastiaan lisättiin immobilisoitu *Humicola insolens Cutinase* –entsyymi ja reaktion annettiin reagoida kaksi vuorokautta. Reaktio lopetettiin ja *Humicola insolens Cutinase* –entsyymi poistettiin reaktioastiasta. Muodostunut tuote puhdistettiin, kuivattiin ja tutkittiin. Tutkimus osoitti, että *Humicola insolens Cutinase* –entsyymien avulla on mahdollista katalysoida polykondensaatioreaktioita ja tuottaa korkean molekyylipainon omaavia polyestereitä. Tutkimuksen tuloksena todettiin myös reaktion optimaalisimmaksi reaktiolämpötilaksi 70 °C. (Hunsen et al. 2006)

4.3 e-ROP –menetelmä

Entsyymattisen renkaanavauspolymeeroinnin, eli e-ROP –menetelmän avulla voidaan tuottaa polymeeriketjuja menetelmän nimen mukaisesti. Menetelmässä polymeeriketjut valmistetaan laktoneista, eli syklistä estereistä entsyymattisten katalyyttien avulla (Kuva 13). (ScienceDirect 2024b) e-ROP menetelmä on yksi transesteröinnin muodoista, sillä siinä ei muodostu poistuvaa ryhmää reaktioiden aikana, toisin kuin tyypillisessä polykondensaatioreaktiossa. Samoin kuin entsyymattisissa polykondensaatioreaktioiden valmistusmenetelmissä käytetyt lipaasit sekä *Cutinase*-entsyymit ovat nousseet esiin

myös renkaanavauspolymeroitireaktioita tutkittaessa. Esimerkiksi polylaktidia voidaan valmistaa e-ROP menetelmää käyttäen. Tällöin e-ROP reaktion lähtöaineena on maitohapon syklinen dimeeri, eli laktidi. Myös tunnetun ja paljon tutkitun biopolymeerin polykaprolaktonin (PCL) valmistuksessa hyödynnetään e-ROP –menetelmää. (Douka et al. 2018)



Kuva 13 Polymaitohapon valmistus laktidista entsyymikatalysoidun renkaanavausreaktion avulla.

4.3.1 Lipaasi katalysoitu renkaanavauspolymeroitireaktio

Kobayashin vuonna 2009 julkaiseman artikkelin mukaan ensimmäiset onnistuneesti lipaasilla katalysoidut renkaanavauspolymeroitireaktiot löydettiin jo vuonna 1993 ϵ -kaprolaktonille sekä δ -valerolaktonille kahden eri itsenäisen tutkijaryhmän suorittamissa tutkimuksissa: Uyama et al. (1993) ja Knani et al. (1993). (Kobayashi 2009) Sitten lipaasi katalysoituja renkaanavauspolymeroitireaktioita on tutkittu laajasti eri lipaaseilla ja eri monomeereillä vaihdellen eri reaktio-olosuhteita. Tehokkaimmaksi renkaanavautumis entsyymiksi polymeroitireaktioihin on todettu olevan Novozyme 435®, eli akryylihartsiin immobilisoitu *Candida antarctica* –lipaasi B (CALB). (Adhami et al. 2021) Myös esimerkiksi *Candida cylindracea* –lipaasi (lipaasi CC), *Pseudomonas fluorescens* –lipaasi (lipaasi PF), *Pseudomonas cepacia* –lipaasi (lipaasi PC) sekä sian haimalipaasi (lipaasi PPL) on osoittanut aktiivisuutta ja suhteellisen hyvää konversiota monomeerien renkaanavauspolymeroitireaktioissa (Kobayashi 2009).

Vuonna 1997 raportoitiin onnistuneesta polylaktidien polymeroitireaktioista *Candida cylindracea* –lipaasilla, *Pseudomonas cepacia* –lipaasilla sekä sian haimalipaasilla tosin

vielä hyvin alahaisilla saantoprosenteilla (Hans et al. 2009). Polylaktidin valmistuksessa hyödynnetään nykypäivänä pääasiassa Candian anatarctica –lipaasi B:tä (CALB) katalysoimaan renkaanavauspolymerointireaktiota. Esimerkiksi M. Hans, H. Keul ja M. Moller vuonna 2009 suorittamassa tutkimuksessa valmistusprosessissa muodostettiin seos, joka sisälsi lähtöaineena laktidia ja liuottimena tolueenia. Seokseen lisättiin CALB–entsyymiä katalysoimaan renkaanavauspolymerointireaktiota. Reaktio-olosuhteina käytettiin 70 °C sekä typpi-atmosfääriä ja reaktioseosta sekoitettiin jatkuvatoimisesti. Reaktion jälkeen käytetty CALB –entsyymi poistettiin suodattamalla ja muodostuneet polymeerit eristettiin saostamalla ne metanolissa. Edellä kuvatulla menetelmällä ja reaktio-olosuhteilla saavutettiin D-maitohapon osalta 100 % saanto 25 painoprosentilla katalysoidulla CALB-entsyymillä kahdessa vuorokaudessa ja puolestaan 25 % saannon 10 painoprosentilla katalysoidulla CALB-entsyymillä. (Hans et al. 2009)

4.3.2 *Cutinase*-entsyymillä katalysoitu renkaanavauspolymerointireaktio

Cutinase -entsyymien osalta myös renkaanavauspolymerointireaktioiden tutkimuksissa on noussut esiin *Humicola insolens cutinase* –entsyymi (HiC). Esimerkiksi M. Hunsen ym. vuonna 2006 suorittamassa tutkimuksessa selvitettiin *Humicola insolens cutinase* –entsyymien (HiC) aktiivisuutta polyesterisynteesissä e-ROP menetelmään, kun oli jo saatu lupaavia tuloksia kyseisen entsyymien aktiivisuudesta polykondensaatioreaktioissa. Tutkimuksessa valittiin sarja eri laktonirenkaita, joilla lähdettiin toteuttamaan tutkimusta eri lämpötiloissa. Tutkimuksessa suoritettiin kokeita sekä bulkkityylillä että tolueeniin liuotettuna typpi-atmosfäärissä. Reaktiossa käytettävä entsyymaattinen katalyytti *Humicola insolens cutinase* immobilisoitiin fysikaalisella absorptiolla ioninvaihtohartseihin, mikä tutkitusti lisää entsyymien lämpöstabiilisuutta. (Ortiz et al. 2019) Reaktioon annettiin reagoida yhden vuorokauden ajan, jonka jälkeen *Humicola insolens Cutinase* –entsyymi poistettiin reaktioastiasta. Muodostunut tuote puhdistettiin, kuivattiin ja tutkittiin. Tutkimus osoitti, että *Humicola insolens Cutinase* –entsyymien avulla on mahdollista katalysoida renkaanavauspolymerointireaktioita ja tuottaa korkean molekyylipainon omaavia polyestereitä. Myös renkaanavauspolymerointireaktion optimaalisimmaksi reaktiolämpötilaksi todettiin 70 °C. (Hunsen et al. 2006)

5 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Kirjallisuuskatsauksen alussa perehdyttiin karboksyylihappoihin ja niiden polymerointiin. Tarkasteltiin mitä karboksyylihapot ovat ja millaisia eri polymerointimenetelmiä niille on olemassa. Seuraavaksi kirjallisuuskatsauksessa perehdyttiin karboksyylihappojen monomeerien valmistukseen ja perineisiin kemiallisesti katalysoituihin karboksyylihappoista polymeroituihin polymeereihin. Tässä tutkimuksen osassa käsiteltiin tarkemmin polylaktidien ja polyglykolidien perinteisiä teollisuudessa jo käytössä olevia valmistusmenetelmiä. Tarkasteltiin prosesseissa käytettäviä raaka-aineita, polymeerien monomeerien valmistusta ja millaisia reaktioita polymeroinnissa hyödynnetään. Lisäksi esiteltiin polylaktidien ja polyglykolidien tavallisimpia käyttökohteita ja sovelluksia. Kirjallisuuskatsauksen perusteella eri karboksyylihappoista valmistettujen polyestereiden valmistusprosesseissa on merkittäviä yhteneväisyyksiä liittyen esimerkiksi valmistusmenetelmiin ja prosessissa käytettäviin katalyytteihin. Karboksyylihappoja voidaan valmistaa useammasta eri raaka-aineesta, mutta yhteneväistä on se, että karboksyylihapposta voidaan valmistaa polyestereitä joko polykondensaatio- tai renkaanavausreaktion avulla. Kirjallisuuskatsauksen perusteella myös karboksyylihappoista valmistetuilla polyestereillä on laajat käyttökohteet, riippumatta siitä mikä polyesteri on kyseessä.

Lopuksi kirjallisuuskatsauksessa perehdyttiin tarkemmin biokatalyytteihin ja niiden mahdollistamiin eri entsyymaattisesti katalysoitujen polymerointireaktioiden mahdollisuuksiin. Alkuun selviteltiin mitä biokatalyytit ovat ja millaisia biokatalyyttejä on tutkimusten perusteella löydetty. Lisäksi perehdyttiin eri polymerointimenetelmiin, joissa on mahdollista hyödyntää entsyymaattista katalysointia. Tuloksista voidaan todeta, että myös entsyymaattisesti katalysoiduissa polymerointimenetelmissä voidaan hyödyntää samoja polymerointireaktioita kuin perinteisissä valmistusprosesseissa. Sekä polykondensaatio- että renkaanavausreaktioita voidaan katalysoida myös entsyymaattisesti. Kirjallisuuskatsauksessa löydettiin ja esiteltiin tällä hetkellä tunnetuimpia entsyymaattisia katalyyttejä. Esiin nousivat eri lipaasit sekä *cutinase*-entsyymit. Sekä lipaaseilla että *cutinase*-entsyymillä katalysoituja polymerointireaktioita on suoritettu onnistuneesti eri monomeereillä eri reaktio-olosuhteissa. Tärkeimmäksi entsyymaattiseksi katalyytiksi todettiin immobilisoitu *Candian anatarctica* –lipaasi B, johtuen sen korkeasta selektiivisyydestä sekä tehokkuudesta. Lisäksi immobilisoitu *Candian anatarctica* –lipaasi B on helposti erotettava ja uudelleenkäytettävä. Lopuksi

voitiin vielä todeta, että entsyymaattisesti katalysoitujen polymerointireaktioiden tutkimustulokset ovat olleet erinomaisia konversiotasolla, mutta niiden hyödyntämiseen teollisuudessa dominoivana valmistusmenetelmänä on vielä työn alla.

Lisäksi kirjallisuuskatsauksessa sivuttiin lyhyesti muoveihin ja biomuoveihin liittyvää ympäristöpainetta. Tiivistetysti voidaan todeta, että muoveihin kohdistuva ympäristöpaine on todellinen ja uusia ympäristöystävällisempiä ratkaisuja ja valmistusmenetelmiä on löydettävä. Tutkimuksessa ei kuitenkaan otettu kantaa sen tarkemmin, mikä menetelmistä on ympäristönäkökulmasta paras vaihtoehto. Kirjallisuuskatsauksessa tutkimus rajattiin karboksyylihapoista valmistettuihin polyestereihin, mutta tutkimusta voisi seuraavaksi jatkaa eri lähtöaineisiin sekä laajentaa kirjallisuuskatsauksessa esitettyihin biokatalyytteihin, niiden käyttäytymiseen ja erilaisiin ominaisuuksiin. Kirjallisuuskatsauksessa nousi esiin entsyymikatalysoitujen biopolymeerien mahdollinen kierrätysmenetelmä, jossa entsyymaattisesti katalysoidut biomuovit voisi kierrättää takaisin raaka-aineiksi entsyymaattisen depolymeroinnin avulla. Tutkimusta voitaisiin seuraavaksi jatkaa myös tämän menetelmän tutkimiseen.

LÄHDELUETTELO

Adhami, W., Bakkour, Y. and Rolando, C., 2021. Polylactones synthesis by enzymatic ring opening polymerization in flow. *Polymer*, 230, 124040.

Avérous, L., 2013. 9 - Synthesis, Properties, Environmental and Biomedical Applications of Polylactic Acid. In: Ebnesajjad, S., ed. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Boston: William Andrew Publishing, 171–188. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455728343000094> [viitattu: 11.11.2024].

Ayyoob, M., Lee, D. H., Kim, J. H., Nam, S. W. and Kim, Y. J., 2017. Synthesis of poly(glycolic acids) via solution polycondensation and investigation of their thermal degradation behaviors. *Fibers and Polymers*, 18 (3), 407–415.

Brockman, H. L., 2004. Lipases. In: Lennarz, W. J. and Lane, M. D., eds. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. New York: Elsevier, 571–575. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0124437109003598> [viitattu: 5.11.2024].

DiCosimo, R., Payne, M. S., Panova, A., Thompson, J. and O’Keefe, D. P., 2007. Enzymatic production of glycolic acid. Saatavilla: <https://patents.google.com/patent/US7198927B2/en> [viitattu: 4.11.2024].

Dong, F.-X., Zhang, L., Tong, X.-Z., Chen, H.-B., Wang, X.-L. and Wang, Y.-Z., 2012. Ionic liquid coated lipase: Green synthesis of high molecular weight poly(1,4-dioxan-2-one). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, 46–52.

Douka, A., Vouyiouka, S., Papaspyridi, L.-M. and Papaspyrides, C. D., 2018. A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: The case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides. *Progress in Polymer Science*, 79, 1–25.

ExplorEnz, 2024. *ExplorEnz: Contents*. Saatavilla: <https://www.enzyme-database.org/class.php> [viitattu: 4.11.2024].

Farooq, U., Anjum, F. M., Zahoor, T., Randhawa, M. A., Ahmed, A. and Akram, K., 2010. OPTIMIZATION OF LACTIC ACID PRODUCTION FROM CHEAP RAW MATERIAL: SUGARCANE MOLASSES. Saatavilla: [http://pakbs.org/pjbot/PDFs/44\(1\)/49.pdf](http://pakbs.org/pjbot/PDFs/44(1)/49.pdf) [viitattu: 5.11.2024].

Gautier, E., Fuertes, P., Cassagnau, P., Pascault, J.-P. and Fleury, E., 2009. Synthesis and rheology of biodegradable poly(glycolic acid) prepared by melt ring-opening polymerization of glycolide. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47 (5), 1440–1449.

Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N. and Mehmood, S., 2014. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7 (2), 222–229.

Gokturk, E., Pemba, A. G. and Miller, S. A., 2016. Polyglycolic acid and copolymers thereof from C1 feedstocks. Saatavilla: <https://patents.google.com/patent/US9303118B2/en> [viitattu: 4.11.2024].

Greene, J. P., 2014. *Sustainable Plastics; Enviromental Assessments of Biobased, Biodegradable, and Recycled Plastcs*. John Wiley & Sons, Ltd.

Hans, M., Keul, H. and Moeller, M., 2009. Ring-Opening Polymerization of DD-Lactide Catalyzed by Novozyme 435. *Macromolecular Bioscience*, 9 (3), 239–247.

Hevilla, V., Sonseca, A., Echeverría, C., Muñoz-Bonilla, A. and Fernández-García, M., 2021. Enzymatic Synthesis of Polyesters and Their Bioapplications: Recent Advances and Perspectives. *Macromolecular Bioscience*, 21 (10), 2100156.

Hunsen, M., Azim, A., Mang, H., Wallner, S. R., Ronkvist, A., Xie, W. and Gross, R. A., 2006. *A Cutinase with Polyester Synthesis Activity | Macromolecules*. Saatavilla: <https://pubs-acscs-org.pc124152.oulu.fi:9443/doi/full/10.1021/ma062095g> [viitattu: 3.10.2024].

Jem, K. J., van der Pol, J. F. and de Vos, S., 2010. Microbial Lactic Acid, Its Polymer Poly(lactic acid), and Their Industrial Applications. *In: Chen, G. G.-Q., ed. Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer, 323–346. Saatavilla: https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_13 [viitattu: 5.11.2024].

Jem, K. J. and Tan, B., 2020. The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3 (2), 60–70.

Knani, D., Gutman, A. and Kohn, D., 1993. Enzymatic Polyesterification in Organic Media - Enzyme-Catalyzed Synthesis of Linear Polyesters .1. Condensation Polymerization of Linear Hydroxyesters .2. Ring-Opening Polymerization of Epsilon-Caprolactone. *JOURNAL OF POLYMER SCIENCE PART A-POLYMER CHEMISTRY*, 31 (5), 1221–1232.

Kobayashi, S., 2009. Recent Developments in Lipase-Catalyzed Synthesis of Polyesters. *Macromolecular Rapid Communications*, 30 (4–5), 237–266.

Lim, L.-T., Auras, R. and Rubino, M., 2008. Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, 33 (8), 820–852.

Lu, Y., Lv, Q., Liu, B. and Liu, J., 2019. Immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed synthesis of biodegradable polymers for biomedical applications. *Biomaterials Science*, 7 (12), 4963–4983.

Napari, P., 2007. *Orgaaninen Kemia*. 7. tarkistettu painos. Helsinki: Edita.

NatureWorks, 2024. *NatureWorks | Applications*. Saatavilla: <https://www.natureworksllc.com/applications> [viitattu: 17.9.2024].

Nuyken, O. and Pask, S. D., 2013. Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers*, 5 (2), 361–403.

Okumura, S., Iwai, M. and Tominaga, Y., 1984. Synthesis of Ester Oligomer by *Aspergillus niger* Lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48 (11), 2805–2808.

Ortiz, C., Ferreira, M. L., Barbosa, O., Santos, J. C. S. dos, Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Briand, L. E. and Fernandez-Lafuente, R., 2019. Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catalysis Science & Technology*, 9 (10), 2380–2420.

Pellis, A., Herrero Acero, E., Ferrario, V., Ribitsch, D., Guebitz, G. M. and Gardossi, L., 2016. The Closure of the Cycle: Enzymatic Synthesis and Functionalization of Bio-Based Polyesters. *Trends in Biotechnology*, 34 (4), 316–328.

Poly lactide, 2023. *Polyglycolic Acid(PGA) Polymer for sale* | CAS: 26124-68-5. Saatavilla: <https://polylactide.com/polyglycolide/> [viitattu: 4.10.2024].

Qualman, D., 2017. Global plastics production, 1917 to 2050. *Darrin Qualman*. Saatavilla: <https://www.darrinqualman.com/global-plastics-production/> [viitattu: 5.11.2024].

Ramezani Dana, H. and Ebrahimi, F., 2023. Synthesis, properties, and applications of polylactic acid-based polymers. *Polymer Engineering & Science*, 63 (1), 22–43.

Sanko, V., Sahin, I., Aydemir Sezer, U. and Sezer, S., 2019. A versatile method for the synthesis of poly(glycolic acid): high solubility and tunable molecular weights. *Polymer Journal*, 51 (7), 637–647.

ScienceDirect, 2024a. *Enzyme - an overview* | *ScienceDirect Topics*. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/enzyme> [viitattu: 18.9.2024].

ScienceDirect, 2024b. *Lactone - an overview* | *ScienceDirect Topics*. Saatavilla: <https://www-sciencedirect-com.pc124152.oulu.fi:9443/topics/chemistry/lactone> [viitattu: 24.9.2024].

Shi, K., Jing, J., Song, L., Su, T. and Wang, Z., 2020. Enzymatic hydrolysis of polyester: Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by *Candida antarctica* lipase and *Fusarium solani* cutinase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 183–189.

Singh, V. and Tiwari, M., 2010. Structure-Processing-Property Relationship of Poly(Glycolic Acid) for Drug Delivery Systems 1:Synthesis and Catalysis. *International Journal of Polymer Science*, 2010 (1), 652719.

Stavila, E. and Loos, K., 2015. Synthesis of Polyamides and Their Copolymers via Enzymatic Polymerization. *Journal of Renewable Materials*, 3 (4), 268–280.

Syvänne, J., 2020. Biopohjaiset ja biohajoavat muovit. *Muoviyhdistyksen jäsenlehti*, January 2020. Saatavilla: <https://muoviyhdistys.fi/wp-content/uploads/2024/04/Muoviplast-1-2020.pdf> [viitattu: 17.9.2024].

Tasdelen, M. A., Kahveci, M. U. and Yagci, Y., 2011. Telechelic polymers by living and controlled/living polymerization methods. *Progress in Polymer Science*, 36 (4), 455–567.

UNDP, 2023. *Why aren't we recycling more plastic? - United Nations Development Programme | UNDP*. Exposure. Saatavilla: <https://stories.undp.org/why-arent-we-recycling-more-plastic> [viitattu: 18.9.2024].

Uyama, H., Takeya, K. and Kobayashi, S., 1993. Synthesis of Polyesters by Enzymatic Ring-Opening Copolymerization Using Lipase Catalyst. *PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY SERIES B-PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES*, 69 (8), 203–207.

Value Market Research, 2024. *Polyglycolic Acid Market Size & Growth Analysis Report 2032*. Saatavilla: <https://www.valuemarketresearch.com/report/polyglycolic-acid-pga-market> [viitattu: 5.11.2024].

Varma, I. K., Albertsson, A.-C., Rajkhowa, R. and Srivastava, R. K., 2005. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. *Progress in Polymer Science*, 30 (10), 949–981.

Wu, C., Zhang, Z., He, F. and Zhuo, R., 2013. Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone) in monocationic and dicationic ionic liquids. *Biotechnology Letters*, 35 (6), 879–885.

Yunhai, S., Houyong, S., Haiyong, C., Deming, L. and Qinghua, L., 2011. Synergistic Extraction of Glycolic Acid from Glycolonitrile Hydrolysate. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50 (13), 8216–8224.