



## The effect of different enzymatic pretreatment processes on the production of nanocellulose from wheat straw

Selva Sertkaya<sup>1\*</sup>, Recai Arslan<sup>1</sup>, Ayhan Tozluoğlu<sup>2</sup>, Hakan Fidan<sup>3</sup>, Özlem Erol<sup>4</sup>, Halil İbrahim Ünal<sup>4</sup>, Zeki Candan<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Recycling of Agricultural Wastes to Industry Application and Research Center, Düzce University, 81620, Düzce, Türkiye

<sup>2</sup>Forest Industrial Engineering Department, Faculty of Forest, Düzce University, 81620, Düzce, Türkiye

<sup>3</sup>Forest Industrial Engineering Department, Faculty of Forest, İzmir Katip Çelebi University, 35620, İzmir, Türkiye

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Gazi University, 06560, Ankara, Türkiye

<sup>5</sup>Faculty of Forest, Forest Industrial Engineering Department, Istanbul University, Cerrahpaşa, 34473, Istanbul, Türkiye

### Highlights:

- Experimental research of enzymatic pretreatment effect on bleached soda-NaBH<sub>4</sub> pulp fibers
- CNF production via enzymatic hydrolysis and homogenization from wheat straw
- Investigation of the changes in chemical, morphological, thermal, and rheological properties of CNF

### Graphical/Tabular Abstract

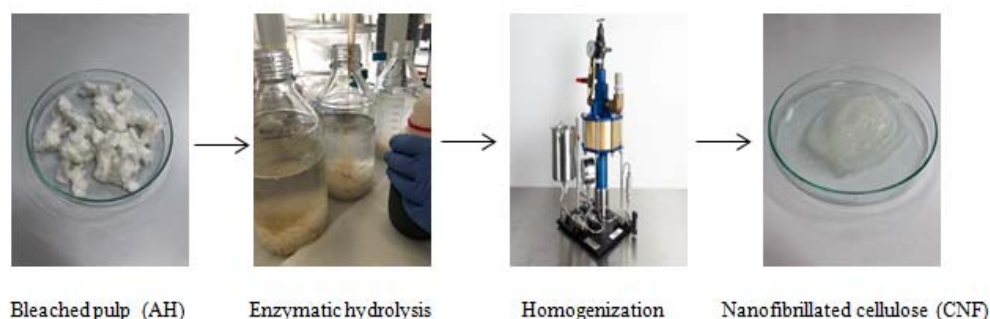


Figure A. CNF production process via enzymatic hydrolysis

### Keywords:

- Wheat straw
- Pretreatment
- Enzymatic hydrolysis
- CNF
- Homogenization

### Article Info:

Research Article

Received: 31.08.2021

Accepted: 25.09.2022

### DOI:

10.17341/gazimmfd.981836

### Correspondence:

Author: Selva Sertkaya

e-mail:

seltasertkaya@duzce.edu.tr

phone: +90 534 772 4899

**Purpose:** The purpose of this study is to investigate the changes in the chemical, morphological, thermal and rheological properties of nanocellulose (CNF) obtained after different enzymatic pretreatments applied to soda-NaBH<sub>4</sub> bleached pulp fibers of wheat straw and homogenization process as shown in Figure A.

**Theory and Methods:** Soda-NaBH<sub>4</sub> method was used for pulping of wheat straws and then bleaching process were carried out. Fiber production was carried out in the reactor and chlorite bleaching process was applied to the soda-NaBH<sub>4</sub> pulp fibers obtained after the pulping stage. Viscosity and kappa numbers of the fibers were determined before and after the bleaching process. Chemical analyzes (HPLC) of the fibers were also carried out before and after the bleaching process. Afterwards, the fibers obtained by using Pulpzyme HC 2500 and Celluclast 1.5 L commercial enzymes were pretreated. The processes of reducing the fibers obtained after enzymatic treatment to micro and nano size were carried out using a high pressure homogenizer. Chemical (HPLC, FTIR, <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR), morphological (SEM), thermal (TGA, DSC) and rheological properties of all were determined.

**Results:** HPLC analyzes recorded after enzymatic pretreatment showed that Pulpzyme HC 2500 enzyme was very effective on xylose and Celluclast 1.5 L enzyme was very effective on glucose and more carbohydrates were removed from the structure with increasing enzyme concentrations. In FTIR analysis, a slight decrease in the permeability intensities of the peaks was observed in general, depending on the change in the physical structure of the fibers and the decrease in the surface area dimensions. <sup>13</sup>C-NMR analyzes revealed that the crystal/amorphous structure changed. Rheology analyzes revealed that as a result of the applied treatments, the tension between the fibers decreased, the viscosity values decreased, and therefore the samples showed shear thinning behavior. On the other hand, SEM images revealed that the fibers were homogeneously (fully) reduced to nano size as a result of the homogenization. Thermal analyzes revealed that the decomposition temperature of the samples obtained decreased due to the decrease in the crystalline ratio in the polymer structure as a result of the glucose units being affected.

**Conclusion:** In this study, Pulpzyme HC 2500 and Celluclast 1.5 L commercial enzymes used in CNF production and showed comparable results with traditionally used enzymes. It has been observed that higher quality CMF/CNF products can be produced, especially with the use of Celluclast 1.5 L enzyme.



## Buğday sapından nanoselüloz üretiminde farklı enzimatik ön muamele işlemlerinin etkisi

Selva Sertkaya<sup>1\*</sup>, Recai Arslan<sup>1</sup>, Ayhan Tozluoğlu<sup>2</sup>, Hakan Fidan<sup>3</sup>, Özlem Erol<sup>4</sup>, Halil İbrahim Ünal<sup>4</sup>, Zeki Candan<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Düzce Üniversitesi, Tarımsal Atıkların Endüstriye Geri Kazanımı Uygulama ve Araştırma Merkezi, 81620, Düzce, Türkiye

<sup>2</sup>Düzce Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü, 8160, Düzce, Türkiye

<sup>3</sup>İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü, 35620, Çiğli, İzmir, Türkiye

<sup>4</sup>Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 06560, Yenimahalle, Ankara, Türkiye

<sup>5</sup>İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü, 34473, Sarıyer, İstanbul, Türkiye

### ÖNEÇIKANLAR

- Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuru lifleri üzerinde enzimatik ön-muamele etkisinin deneysel araştırması
- Buğday samanından enzimatik hidroliz ve homojenizasyon yoluyla CNF üretimi
- CNF'nin kimyasal, morfolojik, termal ve reolojik özelliklerindeki değişikliklerin incelenmesi

### Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 31.08.2021

Kabul: 25.09.2022

DOI:

10.17341/gazimmfd.981836

### Anahtar Kelimeler:

Buğday sapı,  
ön muamele,  
enzimatik hidroliz,  
CNF, homojenizasyon

### ÖZ

Kök, sap, saman, yaprak ve kabuk vb. gibi lignoselülozik hammadde kaynaklarından elde edilebilen nanoselüloz, kullanım potansiyeli ile orman ürünleri alanında önemli bir malzemedir. Tarımsal faaliyetler sonucu ortaya çıkar ve sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve morfolojik özellikleri ile kullanıldığı nihai ürünlere olumlu etkiler sağlar. Literatürde nanoselüloz üretim yöntemi olarak sıklıkla kullanılan alkali veya asidik üretim yöntemine nazaran enzimatik hidroliz yöntemi daha az araştırılmıştır. Genel olarak, enzimatik hidroliz yoluyla nanoselüloz üretim süreçleri ile selüloz nanofibriller (CNF) üretilirken, enzimatik olmayan işlemler ile kristal nanoselülozlar (CNC) üretilmektedir. Bu çalışmada ilk kez buğday sapından elde edilen soda-NaBH<sub>4</sub> ağartılmış kağıt hamuru liflerine iki farklı enzimatik ön muamele (hemiselülaz Pulpzyme HC 2500 ve selülaz Celluclast 1.5 L ticari enzimleri) ve ardından gerçekleştirilen homojenizasyon işlemi ile CNF elde edilmiş, homojenizasyon işlemi sonrası elde edilen CNF'nin kimyasal, morfolojik, termal ve reolojik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Enzimatik ön muamele işlemleri sonrasında gerçekleştirilen HPLC analizleri; artan enzim konsantrasyonlarında yapıdan daha fazla miktarda karbonhidratın uzaklaştırıldığını ve yüksek basınç altında gerçekleştirilen homojenizasyon sonrasında alınan SEM görüntüleri liflerin CNF üretiminde homojen bir şekilde nano boyuta indirildiğini (ortalama 20-50 nm lif çapı) ortaya koymuştur.

## The effect of different enzymatic pretreatment processes on the production of nanocellulose from wheat straw

### HIGHLIGHTS

- Experimental research of enzymatic pretreatment effect on bleached soda-NaBH<sub>4</sub> pulp fibers
- CNF production via enzymatic hydrolysis and homogenization from wheat straw
- Investigation of the changes in chemical, morphological, thermal, and rheological properties of CNF

### Article Info

Research Article

Received: 31.08.2021

Accepted: 25.09.2022

DOI:

10.17341/gazimmfd.981836

### Keywords:

Keywords:  
Wheat straw,  
pretreatment,  
enzymatic hydrolysis,  
CNF, homogenization

### ABSTRACT

Nanocellulose is an important material in the field of forest products with its application potential which can be obtained from lignocellulosic raw materials such as roots, stems, straw, leaves and bark. It emerges as a result of agricultural activities and gives positive effects on the final products obtained due to its physical, chemical, and morphological properties. Compared to the alkaline or acidic production method, which is frequently used as a nanocellulose production method in the literature, the enzymatic hydrolysis method has been less studied. In general, cellulose nanofibrils (CNF) are produced by nanocellulose production processes via enzymatic hydrolysis, while crystalline nanocelluloses (CNC) are produced by non-enzymatic processes. In this study, CNF was obtained by two different enzymatic pretreatments (hemicellulase Pulpzyme HC 2500 and cellulase Celluclast 1.5 L commercial enzymes) followed by homogenization on soda-NaBH<sub>4</sub> bleached pulp fibers obtained from wheat straw for the first time and the changes in chemical, morphological, thermal, and rheological properties the CNF obtained after the homogenization process were investigated. HPLC analyses performed after enzymatic pretreatment showed that more carbohydrates were removed from the structure at increasing enzyme concentrations, and SEM images taken after homogenization under high pressure showed that the fibers were homogeneously reduced to nano size (average fiber diameter of 20-50 nm) in CNF production.

\*Sorumlu Yazar/Yazarlar / Corresponding Author/Authors : \*selvasertkaya@duzce.edu.tr, recaiarslan@duzce.edu.tr, ayhantozluoglu@duzce.edu.tr, hakan.fidan@ikc.edu.tr, oerol@gazi.edu.tr, hiunal@gazi.edu.tr, zekic@istanbul.edu.tr / Tel: +90 534 772 4899

## 1. Giriş (Introduction)

Son yıllarda tüm dünyada değer kazanan ve üzerine çalışmaların hızla arttığı konulardan biri olan yenilikçi malzemelerin geliştirilmesine yönelik araştırma ve geliştirme faaliyetleri, ekonomiye katkıları ile büyük önem taşımaktadır. İçlerinde Türkiye'nin de bulunduğu birçok ülke, Ar-Ge'ye eskisinden çok daha fazla değer vermekte ve politikalarını Ar-Ge üzerine kurmaktadır [1]. Günümüzde ise araştırmacılar geleneksel hammadde kaynaklarından uzaklaşarak geleceğin ihtiyaçlarına cevap verebilecek özellikte yenilikçi nanomalzemelerin geliştirilmesine odaklanmıştır. İnsanoğlu son yıllarda nano boyutlarda imalatlara yönelme suretiyle nanoteknoloji ile tanışmış ve özellikle endüstriyel anlamda çevreye duyarlı ve biyobozunur olma özelliklerinden dolayı nanoselüloz doğal polimerine büyük ilgi göstermektedir. [2]. Kağıdı ve yapı malzemelerini güçlendirmek için gereken özellikler ve nitelikler tamamen doğal, bereketli ve kolayca yenilenebilen doğanın en yaygın yapısal molekülü olan selülozun nano boyutlu yapı taşlarında bulunmaktadır [3]. Ülkemizde tarımsal atıkların değerlendirilmesi ve/veya katma değerli ürünlere dönüştürülmesi konusunda yapılan çalışmaların büyük bölümünde laboratuvar ortamında çeşitli tarımsal atıklardan endüstriyel değeri bulunan biyomalzemeler üretilmiştir. Tarımsal atıkların nanoselüloz üretiminde kullanılmasının başlıca sebepleri; kolay ulaşılabilir olması, miktar açısından fazla olması, düşük maliyetli ve çevre dostu olmasıdır. Bunun yanında yüksek selüloz, düşük lignin içeriğine sahip olması ve lignini uzaklaştırmak amacıyla daha az kimyasal gereksinim duyulması da nanoselüloz üretimindeki en önemli avantajlardan biridir [4].

Nanoselüloz tarımsal faaliyetler sonucu ortaya çıkan kök, sap, saman, yaprak ve kabuk vb. gibi lignoselülozik hammadde kaynaklarından elde edilebilen ve fiziksel, kimyasal ve morfolojik özellikleri dolayısıyla elde edilen son ürünlere olumlu etkiler kazandıran ve orman ürünleri alanında bu potansiyeli ile büyük önem arz eden bir materyaldir. Nanoselüloz, glukoz monomer birimlerinden selüloz polimerleri inşa etmek suretiyle ya da selüloz mikro ve nanoliflerinin ve nanokristallerinin açığa çıkması için bitki hücreci duvarları ve liflerini kıran metotlarla üretilebilir. Nanoselüloz, liflendirilmiş nanoselüloz (CNF), kristal nanoselüloz (CNC) ve bakteriyel nanoselüloz (BNC) olmak üzere üç farklı türde bulunmaktadır [5]. Bu nanoselüloz türleri içerisinde yüksek/en boy oranına ve uygun fiziksel özelliklere sahip olan CNF ürünü, malzeme üretiminde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [6]. Bilinen nanoselüloz üretim prosesleri arasında CNC üretimi için asit hidrolizi ve CNF üretimi için yüksek basınçlı homojenizasyon yer almakla birlikte, yeni prosesler geliştirilmektedir. Bilim insanları, geniş bir bitki ve biyolojik malzeme yelpazesinden faydalanarak uzun ve ince yapıdaki CNF ve daha kısa ve daha çok çubuk şeklinde olan CNC yapılarını çıkartmak için mekanik, kimyasal ve enzimatik metotlar geliştirmiştir [3]. CNF üretiminde, kullanılan hammadde, hemiselüloz ve lignin içeriği ile birlikte uygulanan kimyasal, enzim ve mekanik işlemlerin, elde edilen nanoselülozun fiziksel özellikleri üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Farklı üretim metotlarına bağlı olarak elde edilen ürünler, benzer morfolojik özellikler gösterirken çap ve uzunluk gibi boyutsal özellikler açısından farklılıklar göstermektedirler [6]. Yüksek polimerizasyon derecesi (DP) ve en boy oranına sahip CNF'ler liflerin daha yüksek oranda bağlantı oluşturabiliyor olması sebebiyle daha güçlü malzemelerin üretimine imkân vermektedir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle üretilen ürünlerdeki en büyük sorun yüksek enerji tüketimidir. Üretimde yüksek enerji tüketiminden kaynaklı maliyetleri düşürmenin yolu, homojenleştirme işlemi öncesinde veya sonrasında bir kısım ön muamele işlemlerinin uygulanmasından geçmektedir. Bu nedenle enzimatik yöntemlerle üretimi geliştirme ve yatırım yapma gerekliliği doğmuştur. Nanoselülozun enzimatik hidroliz yoluyla üretim yöntemi literatürde

genellikle alkali veya asidik üretim yöntemlerine nazaran daha az yer almaktadır. Genel olarak, enzimatik hidroliz yoluyla nanoselüloz üretim süreçleri ile CNF üretilirken, enzimatik olmayan işlemler ile CNC üretilmektedir [5]. CNC'ler daha fazla hidrolize amorf bölgelere sahip olmaları ve boylarının daha kısa olması nedeniyle genellikle diğer nanoselüloz türlerinden daha yüksek kristalinite indeksine (CrI) sahiptirler. CNF'ler ise bazı amorf bölgelere sahip daha uzun bir yapının mevcudiyeti nedeniyle daha fazla esneklik sunarken, bu özellik bu tip nanoselülozların daha büyük bir mekanik dirence sahip olmasını sağlamaktadır [5].

Daha önce araştırma grubumuzca [7] odun materyalinden (ökaliptus) kraft ve kraft-NaBH<sub>4</sub> modifikasyonları ile elde edilen hamur lifleri üzerinde hemiselüloz Pulpzyme HC 2500 ve selüloz Celluclast 1.5 L ticari enzimleri ile çalışılmış olup bu çalışmada ise ilk kez buğday sapından elde edilen soda-NaBH<sub>4</sub> ağartılmış kağıt hamuru liflerine uygulanan iki farklı enzimatik ön muamele ve bu ön muameleler sonrasında gerçekleştirilen homojenizasyon işleminin ardından elde edilen nanoselülozun (CNF) kimyasal, morfolojik, termal ve reolojik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir.

## 2. Deneysel Metot (Experimental Method)

### 2.1. Malzemeler ve Hazırlama Teknikleri (Materials and Preparation Techniques)

Çalışma kapsamında ana hammadde kaynağı olarak Kütahya ilinden temin edilen buğday sapları kullanılmıştır. Temin edilen buğday sapları Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Örnek Hazırlama Laboratuvarları'na getirilip içinde bulunan çeşitli yabancı otlar ayıklanarak 3-5 cm uzunluğunda boyutlandırılmıştır. Buğday sapları, hava kurusu hale getirildikten sonra rutubet miktarları belirlenerek her bir pişirme işlemi için 500 g (fırın kurusu) olacak şekilde paketlenmiştir. Selüloz (lif) üretimi ve enzimatik muamele işlemlerinde kullanılan sodyum hidroksit (NaOH), sodyum bor hidrür (NaBH<sub>4</sub>), sodyum klorit (NaClO<sub>2</sub>), sodyum asetat (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>), asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH), formik asit (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), mono potasyum fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ve disodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) kimyasalları Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Selüloz ve hemiselüloz yapılarını parçalamak için kullanılan selüloz (endo-β-1,4-glucanase) ve hemiselüloz (endoxylanases) enzimleri Novozymes A.Ş. (Bagsvaerd, Danimarka) firmasından temin edilmiştir.

#### 2.1.1. Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamur lifi üretimi (Production of bleached soda-NaBH<sub>4</sub> pulp fiber)

Buğday saplarından soda-NaBH<sub>4</sub> metoduyla hamur üretimi ve sonrasında ağartma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda aktif alkali oranı (% Na<sub>2</sub>O cinsinden) %14, NaBH<sub>4</sub> oranı %0,5, maksimum sıcaklık 140°C, maksimum sıcaklığa çıkış süresi 40 min. maksimum sıcaklıkta pişirme süresi 40 min. ve çözelti/yonga oranı 6/1 olacak şekilde reaksiyon kazanında (Uniterm Rotary Digester, Uniterm Lab.) lif üretimi gerçekleştirilmiş ve esmer hamur EH olarak Tablo 1'de kodlanmıştır. İşlemler sonrasında elde edilen malzeme 150 mesh'lik elek üzerinde bol su ile siyah renkli çözelti uzaklaştıncaya kadar yıkanarak laboratuvar tipi disintegratörde 10 min. süreyle açılıp, yarık açıklığı 0,15 mm olan sarsıntılı vakum eleğinde elenerek (TAPPI T 275 sp-02) liflenmeyen kısımları ayrılmış ve elenme sonrası verim ve atık oranları (TAPPI T 210 cm-03) tespit edilmiştir. Pişirme aşamasından sonra elde edilen soda-NaBH<sub>4</sub> hamur liflerine (%5 konsantrasyonda) klorit ağartma işlemi (NaClO<sub>2</sub> oranı %15, sodyum asetat %3, asetik asit %7, formik asit %0,5) uygulanmıştır. Bu bağlamda lifler 16 h. süresince 25°C'de ağartma işlemine tabi tutulmuş ve ağartılmış hamur AH olarak Tablo 1'de kodlanmıştır. Ağartma işlemi öncesi ve sonrasında liflerin viskozite (SCAN-CM

**Tablo 1.** Lif türleri ve kodlamaları (Fiber types and codifications.)

Lif Türü	Uygulanan Enzim Türü	Homojenizasyon	Konsantrasyon	Kod
Ağartılmamış Hamur (Esmer Hamur)	-	-	-	EH
Ağartılmış Hamur	-	-	-	AH
Ağartılmış Hamur	Hemiselülaz Pulpzyme HC	-	25 AXU/g	AH1
Ağartılmış Hamur	Hemiselülaz Pulpzyme HC	-	100 AXU/g	AH2
Ağartılmış Hamur	Hemiselülaz Pulpzyme HC	-	250 AXU/g	AH3
Ağartılmış Hamur	Celluclast 1.5 L	-	2 EGU/g	AH4
Ağartılmış Hamur	Celluclast 1.5 L	-	5 EGU/g	AH5
Ağartılmış Hamur	Celluclast 1.5 L	-	10 EGU/g	AH6
Ağartılmış Hamur	Hemiselülaz Pulpzyme HC	2x200 µm (14000 psi) + 4x100 µm (24000 psi)	25 AXU/g	AHEn1
Ağartılmış Hamur	Celluclast 1.5 L	2x200 µm (14000 psi) + 4x100 µm (24000 psi)	2 EGU/g	AHEn4

15-62) ve kappa numaraları (TAPPI T 236 om-99) tespit edilerek ağartma işleminin lignin ve polisakarit yapısı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Ağartma işlemi öncesi ve sonrasında liflerin ayrıca kimyasal analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile (HPLC) gerçekleştirilmiştir.

### 2.1.2. Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamur lifine uygulanan enzimatik muamele işlemi (Enzymatic treatment of bleached soda-NaBH<sub>4</sub> pulp fiber)

Bu kademede ksiloz üzerinde aktif etkisi olduğu bilinen hemiselülaz Pulpzyme HC 2500 ve selüloz üzerinde aktif degrade etkisi olduğu bilinen selülaz Celluclast 1.5 L ticari enzimleri kullanılmıştır. Her bir enzim uygulaması için 50 g (fırın kurusu) lif 2,5 L fosfat tamponunda (%2 w/w derişiminde) 50°C'de 2 h. (pH=7) süreyle sıcak su banyosunda muamele edilmiştir. Fosfat tamponu 11 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> kullanılarak hazırlanmıştır. Hemiselülaz Pulpzyme HC enzimi 25, 100 ve 250 AXU/g ve selülaz Celluclast 1.5 L enzimi 2, 5, 10 EGU/g ve derişimlerinde hazırlanarak %2 w/w derişimdeki lifler ile muamele edilmiştir. Muamele süresince her 30 dakikada bir örnekler karıştırılmış ve işlem sonunda örnekler saf suyla yıkanmıştır. Enzimatik muameleyi sonlandırmak için örnekler 80°C'de 30 min. sıcak su banyosunda muamele edilmiştir. Süre sonunda hamurlar saf suyla tekrar tekrar yıkanmıştır. Elde edilen lifler AHE1, AHE2, AHE3, AHE4, AHE5 ve AHE6 olarak Tablo 1'de kodlanmıştır.

### 2.1.3. Homojenizasyon işlemi (Homogenization process)

Enzimatik muamele sonrasında elde edilen liflerin mikro ve nano boyuta indirgenmesi işlemleri Microfluidics M-110 Y marka yüksek basınçlı homojenizatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda %2 w/w derişimdeki lifler 2 kere 200 µm çapındaki odacıktan (14000 psi) sonra 4 kere 100 µm çapındaki odacıktan yüksek basınç altında (24000 psi) geçirilerek nanoselüloz üretimleri gerçekleştirilmiştir. Ağartılmış hamur (AH) ve enzimatik muamele işlemi sonrasında optimum olarak seçilen örnekler (AHE1 ve AHE4) homojenizasyon işlemi sonrasında AHEn, AHEn1 ve AHEn4 olarak Tablo 1'de vurgulanmıştır.

## 2.2. Malzemelerin Karakterizasyonu (Characterization of Materials)

### 2.2.1. Analitik metotlar (Analytical methods)

Çalışma kapsamında elde edilen tüm örneklerin kimyasal, morfolojik, termal ve reolojik özellikleri belirlenmiştir.

#### 2.2.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri (HPLC analyses)

Çalışma kapsamında elde edilen tüm örnekler Ulusal Yenilenebilir Enerji Laboratuvarı (NREL) tarafından belirlenen Laboratuvar Analitik Prosedürleri'nde (LAP) belirtilen yöntemlere göre hidroliz

işlemine tabi tutulmuştur [8]. HPLC analizleri kırılma indisi dedektörü (RID) bağlı cihazda (Agilent 1200) 20 µL enjeksiyon hacmi, mobil faz olarak ultra saf su ve 0,6 mL/min. akış hızında SHODEX SP 0810 kolonda 80°C'de gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hidroliz sonrası asitte çözünmeyen lignin içeriği tartımla, asitte çözünen lignin içeriği ise 320 nm dalga boyunda saf suya karşı UV spektrofotometresinde (Agilent) belirlenmiş olup her ikisinin toplamı toplam lignin olarak çalışma kapsamında sunulmuştur.

#### 2.2.1.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi analizleri (FTIR analyses)

FTIR spektroskopisi (Shimadzu, IR-Prestige 21) analizinde kütlece %2 derişimde 0,5 mL örnek alınmış ve ZnSe kristalinin üzerine damlatılmıştır. Karakteristik moleküler absorpsiyon pikleri 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlüğünde ve 20 tarama sonucunda 600-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında bulunan bölgede belirlenmiştir.

#### 2.2.1.3. <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR analizleri (<sup>13</sup>C-CP/MAS NMR analyses)

Bruker AVANCE III marka nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrometresi cihazı kullanılarak numunelerin <sup>13</sup>C-NMR spektrumu alınmıştır. Bu kapsamda daha önce belirtilen tüm aşamalarda kullanılan kütlece %2 derişimde bulunan örnekler (lif, CMF ve CNF) 105°C'de 24 h. kurutulduktan sonra, havanda toz haline getirilmiştir. Ardından cihazın uygun bölgesine yerleştirilmiş olup, analizlerde, NMR cihazı 300 MHz ve 7 Tesla değerinde iken, manyetik alana uygulanan bir spesifik açıda döndürme yöntemi olan MAS yöntemi (8500 Hz) ve <sup>13</sup>C çekirdeğine ait manyetik rezonans sinyalinin çapraz polarizasyon yöntemi olan Cross Polarization kullanılarak örnekler için spektrumların alınması sağlanmıştır.

#### 2.2.1.4. Morfolojik analizler (SEM) (Morphological analyses – SEM)

Morfolojik analizler taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Quanta FEG250, FEI) kullanılarak yapılmıştır. Bu kapsamda %2 derişimdeki örnekler 105°C'de 24 h kurutulduktan sonra sputter cihazının kafesine yerleştirilerek, plazma ortamında yaklaşık 5 nm kalınlıkta Au-Pd ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. Ölçümler sırasında 1-15 kV voltaj uygulanmıştır ve FEG tabancasından çıkan ışık ile etkileştirilerek ikincil elektron dedektörü yardımıyla 1 µ ve 100 µ skalasında görüntüler alınmıştır.

#### 2.2.1.5. Termal analizler (TGA ve DSC) (Thermal analyses – TGA and DSC)

Çalışmada Shimadzu DTG60H ve Shimadzu DSC60 marka termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazları ile örneklerin ısıl özellikleri ve ısıl bozunma

sıcaklıkları belirlenmiştir. 5-10 mg (fırın kurusu) arasında alınan örnekler TGA cihazındaki platin potanın içine yerleştirilmiştir. Analizler azot atmosferinde 10°C/min. ısıtma hızıyla oda sıcaklığı ile 700°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. DSC analizleri için alüminyum potaya 9-10 mg örnek alınmış ve 50 mL/min. N<sub>2</sub> akışı ve 10°C/min. ısıtma hızında, 20°C-500°C sıcaklık aralığında ölçümler alınmıştır. DSC verilerine bakıldığında iki tane endotermik pik elde edilmiştir. Bunlardan ilk pik 100-200°C bandındaki pik T<sub>1</sub> olarak, diğer 200-350°C bandında olan pik ise T<sub>2</sub> olarak adlandırılmıştır. T<sub>1</sub> pikinin alanı ΔH<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> pikinin alanı ise ΔH<sub>2</sub> olarak hesaplanmıştır.

### 2.2.1.6. Reolojik analizler (Rheological analyses)

Örneklerin enzimatik muamele ve homojenizasyon işlemleri sonrasındaki akış özelliklerinin değişimleri akış deneyleri (kayma hızı-kayma gerilimi, kayma hızı-viskozite ölçümleri) ile viskoelastik özellikleri ise salınım deneyleri (frekans-elastik&viskoz modülü ölçümleri) ile 25°C sıcaklıkta incelenmiştir. Reolojik ölçümler öncesi örnekler ultraturax'ta 15000 rpm karıştırma hızında 5 min. karıştırılıp homojen halde kalması sağlanmıştır. Deneylerde kütlece %2 derişimde örnekler kullanılmıştır. Kayma hızı-kayma gerilimi ve kayma hızı-viskozite gibi akış deneyleri cone-plate (37,5 mm) geometrisine sahip Brookfield RST-CPS Rheometer cihazı ile gerçekleştirilirken, salınım testi frekans taraması paralel plaka (35,0 mm) geometrisine sahip Thermo-Haake RS600 model reometre cihazı ile lineer viskoelastik bölgede gerçekleştirilmiştir. Salınım testlerinde lineer viskoelastik bölgeyi belirlemek amacı ile öncelikle sabit frekansta (1 Hz) kayma gerilimi taraması yapılmıştır.

Reolojik ölçümlerin sağlıklı gerçekleştirilmesi için belirli bir minimum tork değerine ulaşılması gerekmektedir. Bunun yanında her reometrenin ve kullanılan ölçüm geometrisinin belirli ölçüm limitleri vardır. Bu nedenle seçilen gerilim değerlerinin algılanabilir deformasyona yol açacak yeterli büyüklükte olması gerekmektedir. Diğer taraftan malmelerin viskoelastik özelliklerinin seçilen gerilim değerine bağlı olmayan davranış gösterdiği lineer viskoelastik bölgede kalacak kadar da düşük olması gereklidir. Özellikle uygulanan yüksek frekans değerlerinde ve düşük viskoziteli örneklerde ölçümler sırasında gerçekleşen ve limitleri olan eylemsizlik (inertia) düzeltmesinde bu şartlar problemlere neden olabilir ve yeterli veri toplanamamasına yol açabilir. Bu nedenle frekans taraması ölçümlerinde her bir örneğin doğasına bağlı olarak farklı frekans aralıkları içinde güvenilir veri toplanabilmiştir [9].

## 3. Sonuçlar ve Tartışmalar (Results and Discussion)

### 3.1. Verim, Kappa ve Viskozite Analizleri (Yield, Kappa and Viscosity Analyses)

Ağartma öncesi ve sonrası elde edilen hamur liflerinin verim, kappa ve viskozite değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Tablo 2'deki değerler incelendiğinde, ağartma işleminin hamurun kappa ve viskozitesini önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Kappa değeri ağartma işlemleri sonrasında ağartma öncesine göre %76,6 düşüş göstermiştir. Viskozite ise ağartma işlemi sonrasında %10,7 oranında azalma göstermiştir. Ağartma kademesinde viskozitede meydana gelen düşüşler polisakarit degradasyonuna atfedilebilir [10].

**Tablo 2.** Ağartılmamış ve ağartılmış hamurda elde edilen toplam verim, kappa ve viskozite değerleri (Total yield, kappa and viscosity values obtained in unbleached and bleached pulp.)

	Toplam Verim	Kappa	Viskozite (cP)
Ağartılmamış Hamur (EH)	46,0	22,0	798
Ağartılmış Hamur (AH)	81,6	5,14	713

### 3.2. Kimyasal Analizler (Chemical Analyses)

#### 3.2.1. HPLC analizleri (HPLC analyses)

Çalışma kapsamında üretilen tüm örneklerin HPLC analiz sonuçları Tablo 3 ve Tablo 4'te verilmiştir. Tablo 3'te görüldüğü üzere buğday sapları %40,7 glukoz, %17,7 ksiloz ve %23,3 toplam lignin içeriğine sahip olmakla birlikte elde edilen veriler literatür ile karşılaştırılabilir niteliktedir [11-14]. Pişirme ve ağartma işlemleri sonrasında ligninin yapıdan önemli ölçüde uzaklaşmasına bağlı olarak karbonhidrat içeriğinin oransal olarak artış gösterdiği görülmektedir. Ağartma işlemi sonrasında ligninin (tam kuru buğday sapında var olan lignin miktarına oranla) %90,4'ü, glukozun (tam kuru buğday sapında var olan glukoz miktarına oranla) %36,3'ü ve ksilozun (tam kuru buğday sapında var olan ksiloz miktarına oranla) %56,7'si serbest hale geçmiştir.

Pulpzyme HC 2500 enziminin ksiloz üzerinde ve Celluclast 1.5 L enziminin ise glukoz üzerinde oldukça etkin olduğu ve artan enzim derişimlerinde yapıdan daha fazla miktarda karbonhidrat uzaklaştırıldığı görülmektedir. Optimum Pulpzyme HC 2500 ve Celluclast 1.5 L enzim derişimlerinin belirlenmesi noktasında muamele işlemleri sonrasında hammaddelerin yapısında kalan ksiloz/glukoz değeri baz alınmış olup, bu değer maksimum olduğu nokta optimum olarak kabul edilmiştir (Ksilozun daha fazla yapıda kaldığı, glukozun ise daha fazla yapıdan uzaklaştığı nokta maksimum değeri vermektedir). Zira, literatür çalışmaları incelendiğinde yüksek hemiselüloz içeriğine sahip liflerde hemiselüloz selüloz nanofibrilleri arasındaki bağlantıyı engelleyerek homojenleştirme işleminin verimliliğini artırdığı [15], öte yandan selüloz üzerindeki etkisi daha fazla olan muamelelerin hücre çeperi delaminasyonunu artırarak homojenleştirme işleminde kullanılan odacıklarda tıkanma problemi minimize ettiği belirtilmiştir [16]. Bu bağlamda AH için 0,30 olan bu değer, AHE1 (25 AXU/g) ve AHE4 (2 EGU/g) için sırasıyla 0,20 ve 0,35 olarak tespit edilmiş ve optimum enzim muamelesi belirlenmiştir (Tablo 3).

Artan Pulpzyme HC 2500 enzim derişimlerinde AH'a oranla, AHE1, AHE2 ve AHE3 için sırasıyla %17,0, 17,8 ve 18,4 oranlarında glukoz ve %42,6, 46,4 ve 46,8 oranlarında ksiloz serbest hale geçerken, artan Celluclast 1.5 L enzim derişimlerinde AH'a oranla, AHE4, AHE5 ve AHE6 için sırasıyla %25,7, 31,8 ve 38,3 oranlarında glukoz ve %12,1, 25,0 ve 34,4 oranlarında ksilozun serbest hale geçtiği tespit edilmiştir. Homojenleştirme işlemi sonrası elde edilen nanoselüloz ürünlerinde (AHn, AHEn1 ve AHEn4) glukoz, ksiloz ve toplam lignin miktarlarında % ve kütsel değişimlerin düşük miktarlarda olduğu görülmektedir. Bu, homojenleştirme işleminin mekanik bir muamele olması ve odacıklardan geçiş sayısına göre kimyasal yapıda önemli bir değişimin olmamasından kaynaklanmaktadır.

#### 3.2.2. FTIR analizleri (FTIR analyses)

Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuruna uygulanan enzimatik muamele ve sonrasında gerçekleştirilen homojenleştirme işlemleri sonrası elde edilen numunelere ait spektrumlar Şekil 1'de ve elde edilen titreşimler ise Tablo 5'te incelenmiştir.

Şekil 1 incelendiğinde, 3330 cm<sup>-1</sup>'de görülen yayvan pik polisakaritlerdeki hidroksil grubunun (-OH) gerilme titreşimi için karakteristik olup, selüloz molekülünde molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklı titreşimleri içermektedir [17, 18]. 2900 cm<sup>-1</sup>'deki pik ise polisakaritlerdeki hidrokarbon bileşenlerin asimetrik metilen (-CH<sub>2</sub>-) gerilme titreşimine karşılık gelmektedir [18-20]. Uygulanan enzimatik muamele ve homojenleştirme işlemlerinin her iki bölgede de minimal değişimlere neden olduğu Tablo 4'te görülmektedir. 1650-1750 cm<sup>-1</sup>'de aldehit, ester ve

**Tablo 3.** Tüm aşamalar sonrasında elde edilen ürünlerin glukoz, ksiloz ve toplam lignin miktarları (%) (% changes in glucose, xylose and total lignin amounts of the products obtained after all stages)

Kimyasal Bileşenler (%)	Glukoz	Ksiloz	Toplam Lignin
Sap	40,7 ± 0,35	17,7 ± 2,69	23,3 ± 0,12
EH	67,3 ± 0,00	20,4 ± 0,14	8,26 ± 0,33
AH	69,1 ± 0,50	20,4 ± 0,88	5,94 ± 0,03
AHE1	68,5 ± 2,13	14,0 ± 0,30	5,45 ± 0,06
AHE2	68,1 ± 0,00	13,1 ± 0,21	4,64 ± 0,27
AHE3	68,0 ± 0,00	13,1 ± 0,14	4,54 ± 0,39
AHE4	60,7 ± 0,42	21,2 ± 0,28	2,92 ± 0,24
AHE5	61,9 ± 0,57	20,1 ± 0,12	3,47 ± 0,05
AHE6	62,1 ± 0,57	19,5 ± 0,29	3,07 ± 0,02
AHn	74,8 ± 0,76	22,2 ± 0,72	5,79 ± 0,04
AHEn1	74,0 ± 0,00	16,0 ± 0,00	5,05 ± 0,41
AHEn4	69,1 ± 0,00	21,6 ± 0,07	2,69 ± 0,14

**Tablo 4.** Tüm aşamalar sonrasında elde edilen ürünlerin glukoz, ksiloz ve toplam lignin miktarlarında meydana gelen değişimler (Mass changes in the glucose, xylose and total lignin amounts of the products obtained after all stages)

Tam Kuru (g)	Toplam Hammadde	Glukoz	Ksiloz	Toplam Lignin	Hammaddede Kalan Ksiloz/Glukoz Oranı
Sap	500,0	203,5	88,5	116,5	-
EH	230,0	154,8	46,9	19,0	-
AH	187,7	129,7	38,3	11,1	0,30
AHE1	157,1	107,6	22,0	8,80	0,20
AHE2	156,5	106,6	20,5	8,66	0,19
AHE3	155,6	105,8	20,4	8,03	0,19
AHE4	158,8	96,4	33,7	5,76	0,35
AHE5	142,8	88,4	28,7	5,11	0,32
AHE6	128,8	80,0	25,1	3,89	0,31
AHn	144,6	108,2	32,1	8,37	-
AHEn1	121,0	89,6	19,4	6,05	-
AHEn4	122,3	84,5	26,4	5,38	-

karboksil gruplarına ait C=O titreşimleri [21-23] görülmemiştir. Selülozda adsorbe edilen su moleküllerinin titreşimi (-OH eğilme) ise 1600-1650 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir [18, 19, 24, 25]. 1420-1430 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik selülozun kristal yapısı ilgili olup, 6. karbondaki -CH<sub>2</sub> simetrik eğilme titreşimini, 890-900 cm<sup>-1</sup>'de gözlenen pik ise selülozun amorf yapısını temsil etmektedir. 1100-1160 cm<sup>-1</sup>'de görülen pik C<sub>1</sub>-O-C<sub>4</sub> moleküller arası β-glikozidik bağı, 1030-1050 cm<sup>-1</sup>'de görülen pik ise C<sub>1</sub>-O-C<sub>5</sub> piranoz halkasındaki eter bağı ile ilişkilendirilmektedir [17, 19, 26].

### 3.2.3. <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR analizleri (<sup>13</sup>C-CP/MAS NMR analyses)

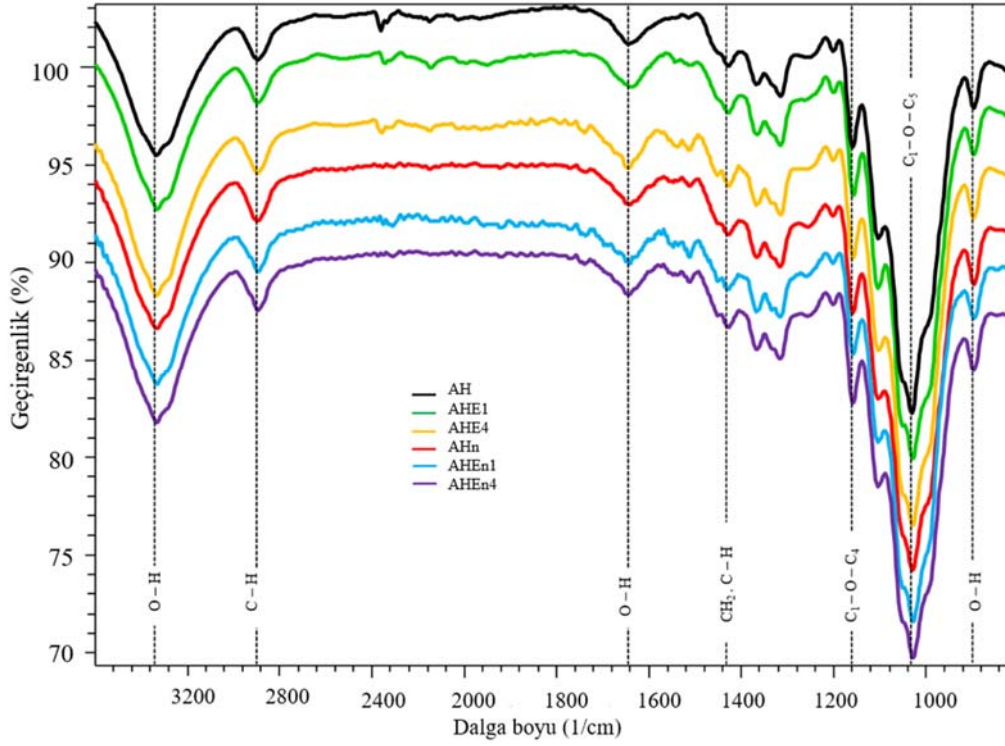
Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuruna uygulanan enzimatik muamele ve sonrasında gerçekleştirilen homojenleştirme işlemleri sonrası elde edilen numuneler için katı hal <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR spektrumları Şekil 2'de verilmiştir. Selüloz allomorflarından bağımsız olarak angidroglukoz birimlerindeki farklı karbon atomlarından gelen sinyaller, NMR spektrumunda izotropik <sup>13</sup>C kimyasal kaymalarında görülmektedir (Şekil 2). Selüloz molekülünün C<sub>1</sub> karbonuna ait kimyasal kayma değeri 100-106 ppm arasında [30], C<sub>4</sub> karbonuna ait kimyasal kayma değeri 82-90 ppm arasında [31], C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ve C<sub>5</sub> karbonlarına ait kimyasal kayma değerleri 70-78 ppm arasında [17], C<sub>6</sub> karbonuna ait kimyasal kayma değeri ise 60-68 ppm arasında [31] görülmektedir. C<sub>4</sub> ve C<sub>6</sub> karbonlarına ait spektrumlarında birinci keskin pik selüloz molekülündeki kristal bölgeyi (düzenli fibril yüzeyi), ikinci yayvan pik ise amorf bölgeyi (dağınık fibril yüzeyi) temsil etmektedir [32]. Enzimatik muamele ve homojenleştirme ön işlemlerinin selüloz moleküllerinin kimyasal yapısını çok fazla deforme etmediği için, genel anlamda anhidroglukoz birimlerindeki karbon atomlarına ait kimyasal kayma değerlerinin değişmediği

görülmektedir. FTIR spektrumunda β-glikozidik bağları gösteren titreşim seviyelerinde çok fazla değişim görülmemesi de bu yorumu destekler niteliktedir. C<sub>4</sub> ve C<sub>6</sub> bölgelerinde pik şiddeti ve pik alanlarında görülen minimal değişimler ise ön işlemlerin yapıdaki kristallik/amorfluk oranını etkilemesi ile açıklanabilir.

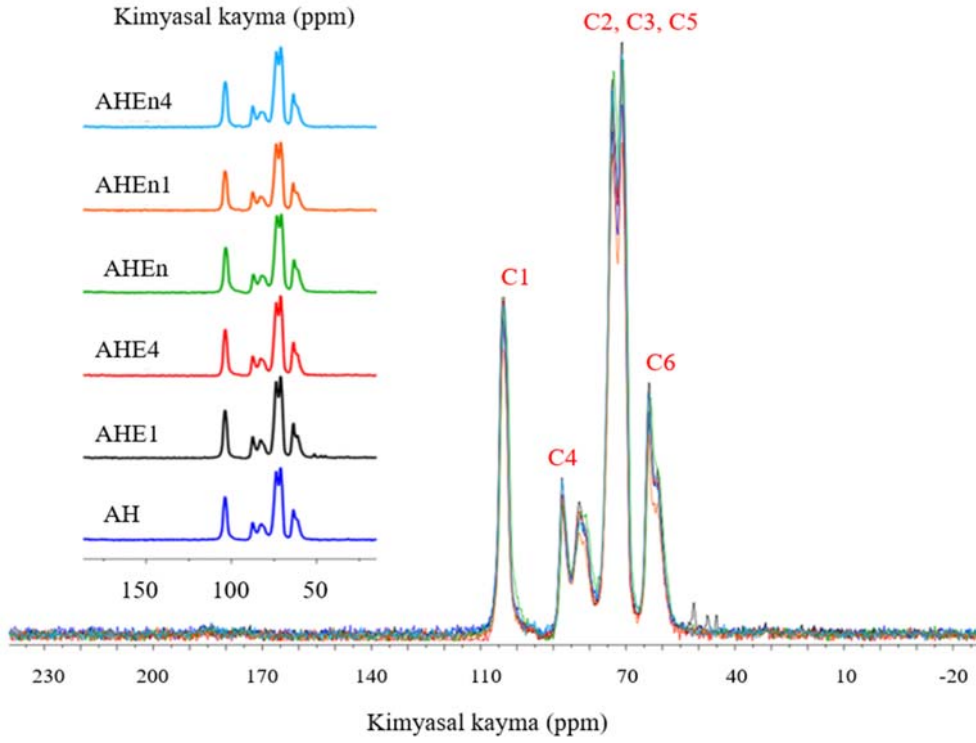
### 3.2.4. Morfolojik analizler (SEM) (Morphological analyses – SEM)

Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuru (AH, Şekil 3a) ile optimum Pulpzyme HC 2500 (25 AXU/g) ve Celluclast 1.5 L (2 EGU/g) enzim uygulamaları sonucu elde edilen ürünler (AHE1, Şekil 3b ve AHE4, Şekil 3c) 100 µm skalasında, enzimatik ön muamele edilmeksizin homojenleştirme işlemine tabi tutulan ürün (AHn, Şekil 3d) ile enzimatik ön muamele işlemleri sonrasında homojenleştirme işlemine tabi tutulan ürünlerin (AHEn1, Şekil 3e ve AHEn4, Şekil 3f) ise 1 µm skalasındaki SEM görüntüleri Şekil 3'te verilmiştir.

Optimum enzimler karşılaştırıldığında, Celluclast 1.5 L enzim uygulamasının Pulpzyme HC 2500 enzim uygulamasına göre liflerde hücre çeperi delaminasyonunu daha fazla artırdığı görülmektedir. Pulpzyme HC 2500 enzim uygulaması gerçekleştirilen örneklerin lif boyları 4-6 µm aralığında gözlemlenirken Celluclast 1.5 L enzim uygulaması sonucunda lif boylarının ortalama 10-12 µm aralığında seyrettiği gözlemlenmiştir. Homojenleştirme işlemi sonrası örnekler için SEM görüntüleri incelendiğinde oldukça homojen bir üretimin gerçekleştirildiği açıkça çıkarılmış olup, mikron seviyesinde genişliğe sahip hiçbir lif tespit edilmemiştir. Bu çalışma kapsamında ağartılmış hamur liflerinden enzimatik muamele ve homojenleştirme işlemleri sonrasında 20-50 nm arasında değişen genişliklere sahip nanofibrillerin elde edildiği sonucuna varılmıştır.



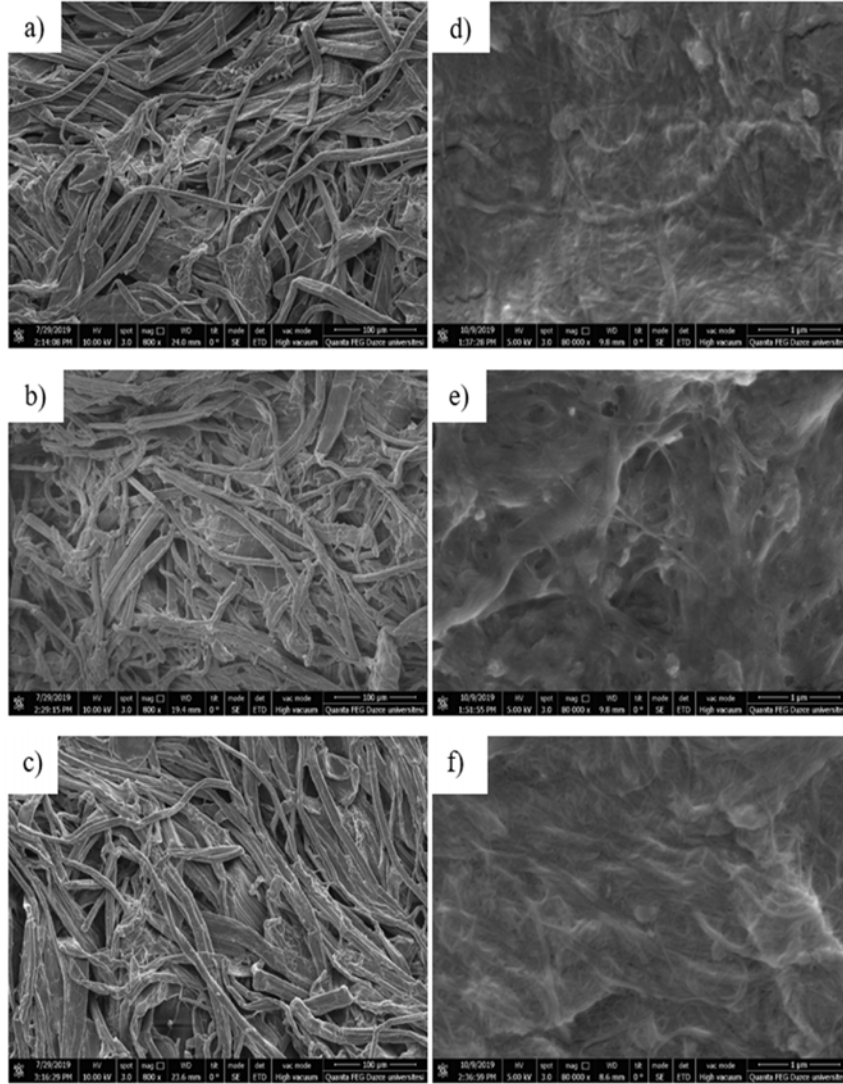
Şekil 1. Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamur liflerinden optimum enzim uygulanması ve CNF üretimleri sonucu elde edilen ürünlerin FTIR spektrumları  
(FTIR spectrums of the products obtained as a result of optimum enzyme application and CNF production from bleached soda-NaBH<sub>4</sub> pulp fibers)



Şekil 2. Tüm aşamalar sonunda elde edilen numunelerin <sup>13</sup>C-CP/MAS NMR spektrumları  
(<sup>13</sup>C-CP/MAS NMR spectrums of the samples obtained at the end of all stages)

**Tablo 5.** FTIR analizinde örneklerde gözlenen titreşimler (Vibrations of the samples observed from FTIR analyses)

Madde/Titreşim( $\text{cm}^{-1}$ )	OH	CH	OH	$\text{CH}_2, \text{CH}$	$\text{C}_1\text{-O-C}_4$	$\text{C}_1\text{-O-C}_5$	OH
AH	3334	2896	1647	1427	1160;1104	1050;1031	896
AHE1	3332	2898	1635	1427	1159;1103	1051;1031	896
AHE4	3335	2897	1649	1427	1159;1103	1049;1030	896
AHn	3333	2897	1647	1427	1160;1104	1050;1031	896
AHEn1	3332	2896	1649	1427	1159;1103	1051;1030	896
AHEn4	3334	2896	1648	1427	1159;1103	1050;1030	896



**Şekil 3.** Ağartılmış soda- $\text{NaBH}_4$  hamur liflerinden optimum enzim uygulanması ve CNF üretimleri sonucu elde edilen numunelerin SEM analizleri a) AH, b) AHE1, c) AHE4, d) AHn, e) AHEn1, f) AHEn4

(SEM analysis of samples obtained as a result of optimum enzyme application and CNF production from bleached soda- $\text{NaBH}_4$  pulp fibers)

Literatürde rapor edilen çalışmalar incelendiğinde yüksek hemiselüloz içeriğinin tek başına homojenleştirme işleminde homojenizatördeki odacıkların tıkanmasını engellemeye yeterli olmayacağı, ancak selüloz enziminin hücre çeperi delaminasyonunu artırmasıyla odacıklardaki tıkanmanın daha etkin bir şekilde önlenebileceği belirtilmektedir [16]. Zimmermann vd. [33] yapmış oldukları çalışmada hemiselülozca zengin sülfite hamurunu önce mekanik ön muamele işlemine tabi tutmuş ve sonrasında elde edilen lifleri mikrofluidizardan geçirerek 100 nm altında genişliğe ve yüksek en/boy oranına sahip nanofibrillerin elde edilebildiğini ortaya koymuşlardır. Taniguchi ve Okamura [34] yaptıkları bir çalışmada

süper öğütme (super-grinding) yöntemiyle odun hamurundan 20-90 nm genişliğinde nanofibrillerin elde edilebildiğini ortaya koymuşlar ve lif boyuna eksenine kayma gerilmelerine maruz kaldığında liflerin nano boyuta indirgenebileceğini belirtmişlerdir. Bunun yanında homojenleştirme işlemlerinde kullanılan mikrofluidizelerin da benzer bir etkiyle yüksek basınç altında lifleri nano boyuta indirgelediği görülmektedir [35]. Lif boyuna eksenine uygulanan kayma gerilmeleri (kullanılan homojenizatör tipi, 1500 bar üzerinde uygulanan basınç ve 75-200  $\mu\text{m}$  arasında değişen Y veya Z morfolojisi), süre ve odacıklardan geçiş sayısı gibi faktörler elde edilecek son ürünün boyutları üzerinde oldukça etkilidir. Ankerfors



vd. [36] de sülfite hamurunu mekanik ve enzimatik ön muamele işlemleri sonrasında mikrofluidizerdan geçirmiş ve 10-20 nm genişliğinde nanofibrillerin elde edilebildiğini ortaya koymuşlardır.

### 3.2.5. Termal analizler (Thermal analyses)

#### 3.2.5.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre - DSC (Differential scanning calorimetry - DSC)

Tüm örneklerin DSC analizleri sonrasında elde edilen DSC eğrileri Şekil 4'te,  $T_1$  ve  $T_2$  sayısal değerleri ise ayrıntılı olarak Tablo 6'da verilmiştir. Elde edilen örneklerin DSC termogramları incelendiğinde ısı davranışlarının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir [37]. 20-100°C arasında görülen endotermik pikler yapıdaki su kaybını temsil etmektedir [7]. 100-200°C arasındaki  $T_1$  endotermik piki, selülozdeki amorf bölgelerin bozunmasını temsil etmektedir. 200-350°C arasındaki  $T_2$  endotermik piki ise glikozidik bağların kırılmasını ve selülozun depolimerizasyonuna karşılık gelen selüloz bozunmasını temsil etmektedir. Tablo 6'da verilen değerler incelendiğinde, ağartılmış hamur lifinin (AH)  $T_1$  ve  $T_2$  sıcaklıkları sırasıyla 152,4 ve 269,5°C'dir. Pulpzyme HC enzim muamelesinin hemiselüloz yapılarındaki glukoz birimlerine doğrudan etki ederek hidrojen bağı sayısını, polimerizasyon derecesini ve kristallik/amorfluk oranını değiştirerek  $T_1$  ve  $T_2$  sıcaklıklarını düşürdüğü görülmektedir. Celluclast 1.5 L enzim muamelesinin ise kristallik oranını ve termal kararlılığı artırarak AH örneğine göre  $T_1$  ve  $T_2$  sıcaklığını yükselttiği görülmektedir. CNF üretmek için uygulanan homojenizasyon işlemi ise  $T_1$  sıcaklığında az da olsa düşüşe sebep olmuştur [38, 39].

#### 3.2.5.2. Termogravimetrik Analiz - TGA (Thermogravimetric Analyses - TGA)

Tüm örneklerin TGA analizleri sonucu elde edilen grafikleri Şekil 5'te verilmiştir. TGA eğrilerine bakıldığında üç termal olay

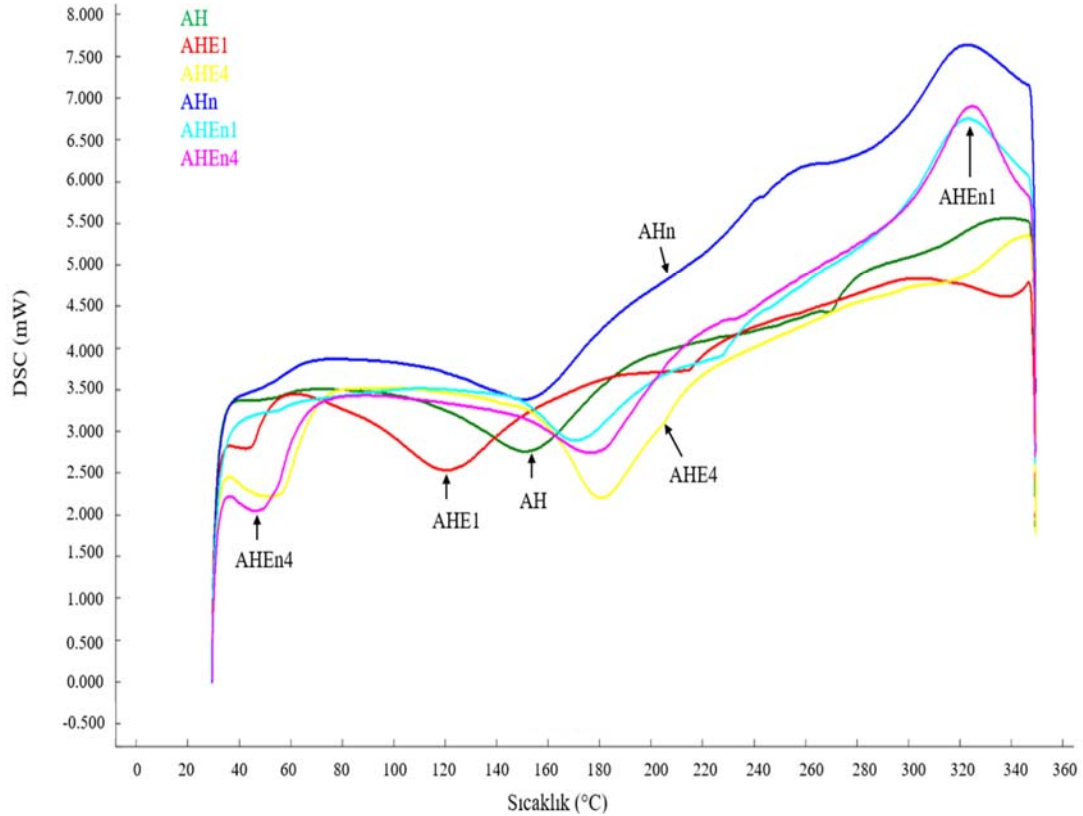
görülmektedir. İlk olarak 25–150°C aralığında bazı düşük molekül ağırlıklı bileşikler ve selüloza adsorbe olan su moleküllerinden kaynaklı kütle kaybı görülmektedir. İkinci olarak 250-400°C aralığında selülozun termal degradasyonu ile kütle kaybı oluşmaktadır. Bu sırada yapıda bulunan hemiselüloz ve lignin moleküllerinin bozunması ile de kütle kaybı oluşmaktadır. Üçüncü olarak 400°C'den sonra yoğun ısı sebebiyle CO ve CO<sub>2</sub> termal ayrışması meydana gelir [40, 7]. Ağartılmış hamur (AH) ve enzim uygulaması sonucu elde edilen örneklerin (AHE1 ve AHE4), CNF örneklerine (AHn, AHEn1 ve AHEn4) göre daha yüksek termal kararlılık gösterdiği görülmektedir. Bu CNF örneklerinin daha yüksek yüzey alanına ve daha düşük kristallik oranına sahip olması ile ilişkilendirilebilir [41].

**Tablo 6.** Tüm örneklerin DSC analizleri sonrası  $T_1$  ve  $T_2$  sıcaklıkları. ( $T_1$  ve  $T_2$  temperatures of all samples after DSC analysis.)

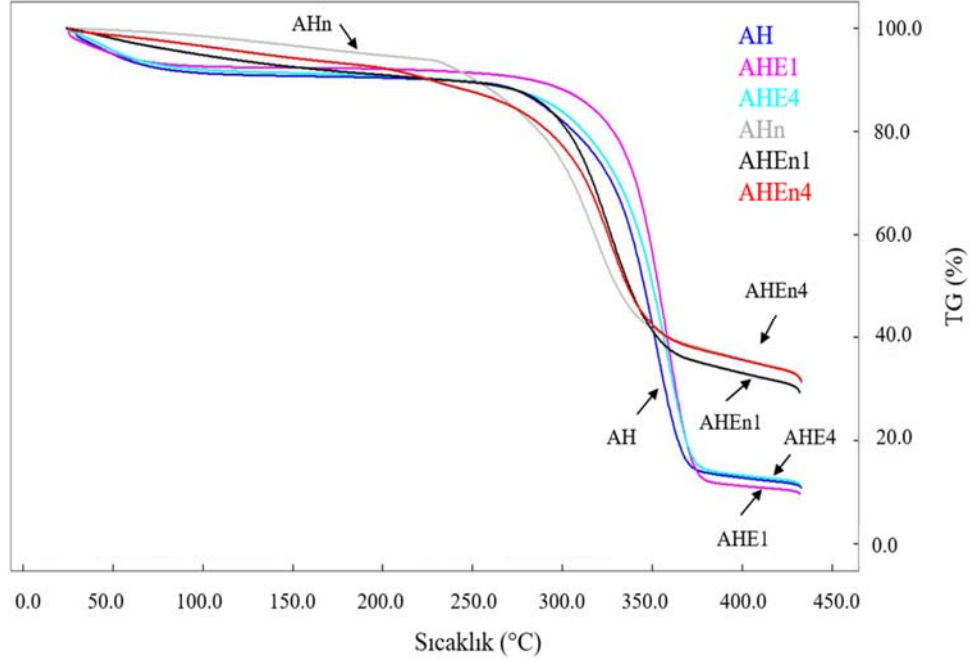
Örnek	$T_1$ (°C)	$\Delta H_1$ (mJ/mg)	$T_2$ (°C)	$\Delta H_2$ (mJ/mg)
AH	152,4	71,9	269,5	0,80
AHE1	121,5	99,3	214,4	3,29
AHE4	181,0	92,0	319,5	5,90
AHn	151,1	32,7	-	-
AHEn1	120,4	32,7	227,9	4,03
AHEn4	178,3	57,6	-	-

#### 3.2.6. Reolojik analizler (Rheological analyses)

Nanoselüloz süspansiyonların reolojik özellikleri nanoselülozun olası uygulama alanını belirlemede oldukça yararlı bilgiler sağlar. Bunun yanı sıra nanoselülozun özelliklerine saklanma koşulları ya da



**Şekil 4.** Tüm örneklerin DSC analizleri (DSC analyses of all samples)



Şekil 5. Tüm örneklerin TGA analizleri (TGA analyses of all samples.)

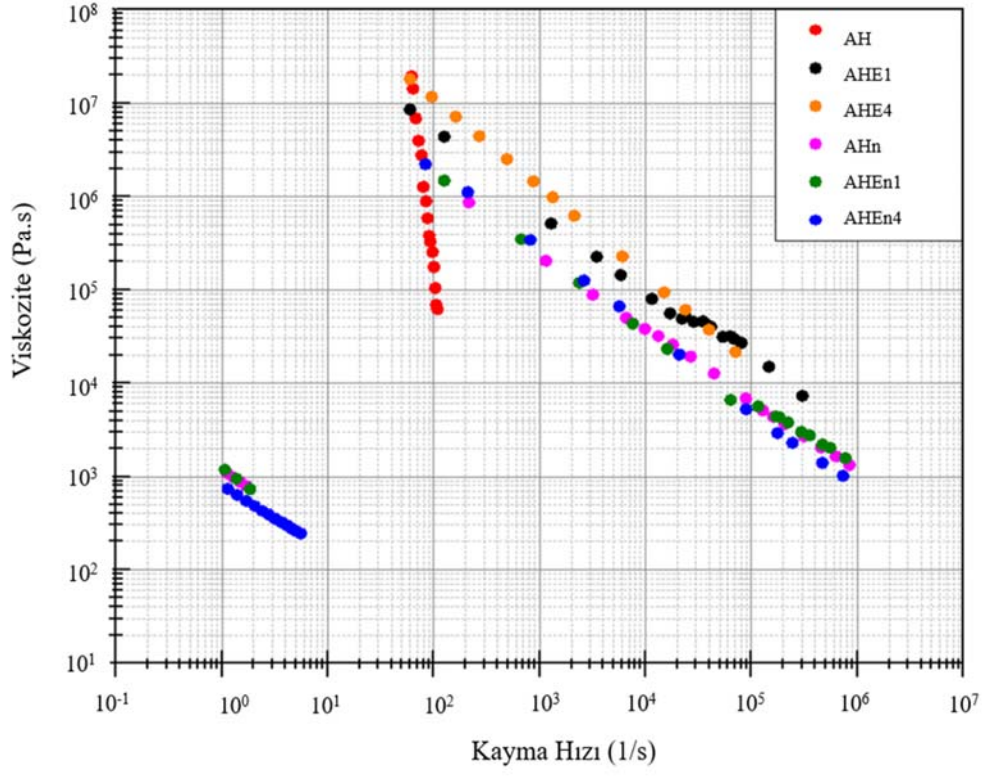
uygulanacak daha ileri işlemlerin etkisini açığa çıkarmada reolojik analizler önemlidir. Nanoselüloz süspansiyonları geniş yüzey alanları ve yüzey yükleri sayesinde su tutma kapasiteleri yüksek olmasının yanında düşük hacim kesirlerinde dahi yüksek fiberler arası etkileşimlerden dolayı yüksek viskoziteye sahiptirler. Fakat nanoselüloz süspansiyonları kayma incelmeleri ve tiksotropik davranış sergilediklerinde dolayı bazı uygulamalarda avantaja sahiptirler. Örneğin, bir yüzeyi kaplama uygulaması sırasında malzemenin kayma kuvveti altında viskozitesinin düşmesi proses edilebilirliği arttıracak ve kayma kuvveti kaldırıldığında tekrar yeniden viskoz bir tabaka oluşturma imkânı sağlayabilecektir. Böylece malzemenin yüzeye homojen dağıtılması avantaj sağlar. Bu özelliklerinden dolayı reolojik özellikleri kontrol etmede katkı maddesi olarak nanoselüloza başvurulur [42].

Bir süspansiyonunun reolojik davranışları, dağılımı taneciklerin tanecik boyutuna, geometrisine, yüzey yüküne ve dispersiyonun mikro yapısına oldukça bağlıdır. Ağartılmış soda- $\text{NaBH}_4$  hamuruna uygulanan enzimatik muamele ve sonrasında gerçekleştirilen homojenleştirme işlemleri sonrası elde edilen numunelere ait kayma hızı-viskozite grafiği Şekil 6'da verilmiştir. Kayma hızındaki artış ile tüm örneklerin viskozitesi azalmış olup, malzemeler kayma incelmeleri davranışı göstermiştir [43]. Kayma incelmeleri davranışı, dağılımı fiberler arasındaki güçlü hidrojen veya iyonik bağı gibi ikincil etkileşimlerin artan kayma hızı etkisi ile kırılmasından kaynaklanmaktadır. Ağartılmış soda- $\text{NaBH}_4$  hamuruna uygulanan enzimatik muamele işlemleri sonrasında viskozite değerlerinin düştüğü görülmektedir. Homojenleştirme işlemi sonrası elde edilen CNF süspansiyonlarında ise viskozitenin daha da azaldığı gözlemlenmektedir. Homojenleştirme işlemleri sonrasında fibril boyutlarında meydana gelen kısımla ile fiberler arasındaki dolaşıklık ve topraklanma azalmakta ve yüksek spesifik yüzey alanına sahip nanoselüloz süspansiyonu ortaya çıkmaktadır. Bu, ağartılmış soda- $\text{NaBH}_4$  hamuruna oranla nanoselüloz süspansiyonlarının daha düşük viskoziteye sahip olmasını açıklar niteliktedir. Furtado vd. tarafında rapor edilen bir çalışmada [44], püskürtürerek kurutulmuş okaliptüsten

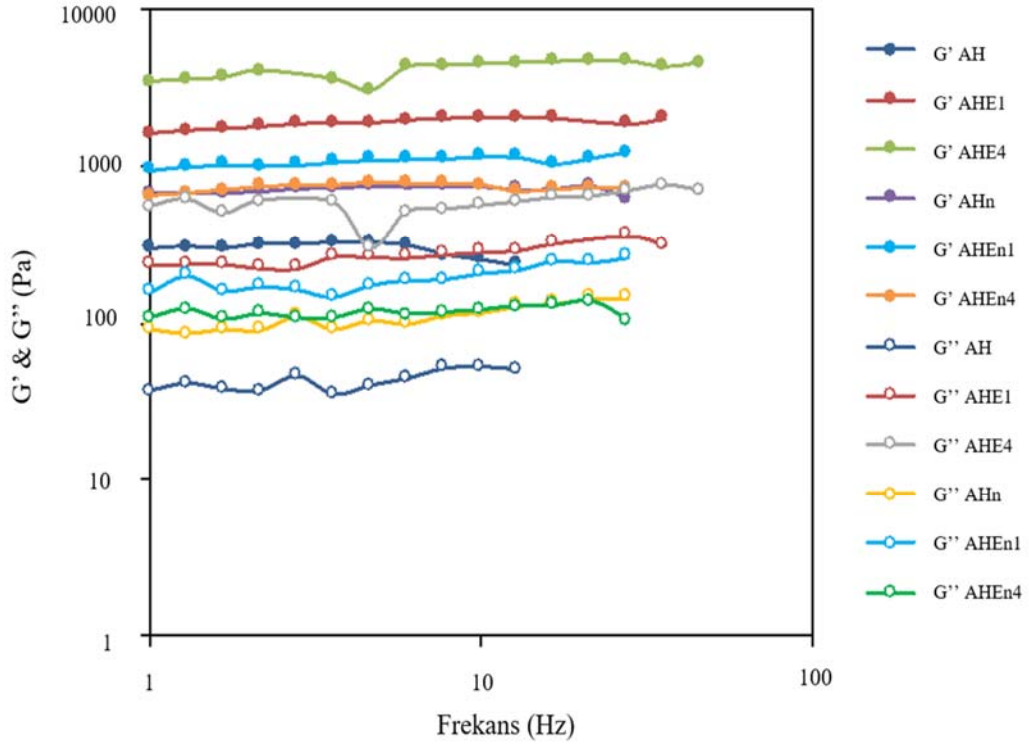
çeşitli homojenizasyon yöntemleri ile elde edilen nanofibrillenmiş selüloz süspansiyonlarında artan kayma hızı ile görünür viskozitede azalmalar gözlenmiş ve bu kayma incelmeleri davranışı yüksek kayma hızlarında süspansiyonda dağılan fiberlerin kayma hızı yönünde yönelmesine ve bunun viskozitede azalmaya yol açmasına atfedilmiştir.

Elastiklik ( $G'$ ) ve viskoz modül ( $G''$ ) süspansiyonlarda viskoelastik özellikleri belirleyen önemli parametrelerdendir [16]. Viskoelastik katılarda  $G' > G''$  olarak gözlenirken; viskoelastik sıvılarda  $G'' > G'$  olarak karşımıza çıkar. Hazırlanan süspansiyonların viskoelastik özelliklerini belirlemek için gerçekleştirilen salınım testleri iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci aşamada her bir örneğin lineer viskoelastik davranış sergilediği kayma gerilimi değerleri tespiti için sabit frekansta (1Hz) kayma gerilimi taraması yapılmıştır. İkinci aşamada ise örneklerin belirlenen lineer viskoelastik bölgede kalacağı sabit gerilim değerlerinde frekans taraması yapılmıştır. Örneklerin frekans ile  $G'$  ve  $G''$  değerlerindeki değişim Şekil 7'de görülmektedir.

Tüm örneklerin incelenen frekans aralığında  $G'$  değerlerinin  $G''$  değerlerinden oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu da tüm örneklerin elastik baskın karaktere sahip, tipik jel benzeri bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Az da olsa  $G'$  ve  $G''$  değerlerinde artan frekans ile artışlar gözlenmesi nispeten kararlı bir ağ oluşumunun korunmasına atfedilebilir. Enzimatik muamele işlemleri ile elde edilen örneklerin elastiklik modüllerinde belirgin artışların görüldüğü anlaşılmaktadır. Enzimatik muamele ile ortalama daha uzun lif uzunluğuna sahip örnek daha yüksek mekanik özellikler sergilemiştir. Bu davranışta baskın faktör, daha uzun lifler arasındaki dolaşıklığın daha yüksek olmasına atfedilebilir. SEM analizi ile açığa çıkarılan homojenizasyon ile lif genişliklerinde ve uzunluklarında belirgin azalmalar dolaşıklık olasılığını azalttıktan sonra modül değerlerinde düşüş ya da jel sertliğinde azalma ile sonuçlanmıştır. Literatürde de homojenizasyon sonucu elde edilen nanofiber selüloz süspansiyonlarının mekanik karakteristiklerinde benzer azalmalar olduğu rapor edilmektedir [44].



Şekil 6. Tüm örneklerin kayma hızı-viskozite grafiği (Shear rate-viscosity graph of all samples.)



Şekil 7. Tüm örneklerin frekans-G' ve G'' grafiği (Frequency-G' and G'' graph of all samples)

#### 4. Sonuçlar (Conclusions)

Bu çalışmada buğday sapından yararlanılarak elde edilen ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuru selüloz (Celluclast 1.5 L) ve hemiselüloz (Pulpzyme HC 2500) enzimleri ile ayrı ayrı muamele edilmiştir. Gerçekleştirilen HPLC analizleri ile kullanılması gereken optimum enzim derişimleri belirlenmiştir. Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuru ile enzimatik muamele işlemi sonrasında optimum olarak seçilen örnekler homojenizatörden geçirilerek nanoselülozlar elde edilmiştir. Ağartılmış soda-NaBH<sub>4</sub> hamuru ile optimum enzimatik muamele sonucu elde edilen örnekler ve nanoselüloz örneklerinde liflerin yapısal (HPLC, FTIR ve NMR), morfolojik (SEM), termal (DSC ve TGA) ve reolojik (reometre) özellikleri belirlenmiştir. CNF üretiminde enzimatik ön muamele işlemleri sonrasında kaydedilen HPLC analizleri, Pulpzyme HC 2500 enziminin ksiloz üzerinde ve Celluclast 1.5 L enziminin ise glukoz üzerinde oldukça etkin olduğunu ve artan enzim derişimlerinde yapıdan daha fazla miktarda karbonhidratın uzaklaştırıldığını ortaya koymuştur. Enzimatik ön muamele işlemleri sonrasında kaydedilen FTIR analizlerinde liflerin fiziksel yapılarının değişmesine ve yüzey alan boyutlarının da azalmasına bağlı olarak genel anlamda piklerin geçirgenlik şiddetlerinde ve kimyasal kayma değerlerinde küçük değişimler gözlemlenmiştir. Enzimatik ön muamele ve homojenizasyon kademeleri sonrasında kaydedilen <sup>13</sup>C-NMR analizleri C<sub>4</sub>'ün ve C<sub>6</sub>'nın yanındaki piklerin alanında küçük değişimlerin gözlenmesine bağlı olarak kristal/amorf yapının değiştiğini ortaya koymuştur. Enzimatik ön muamele işlemleri ile birlikte hücre çeperi delaminasyonu artarak morfolojik özelliklerin değiştiği görülmektedir. Elde edilen SEM görüntüleri enzimatik muamelede Celluclast 1.5 L enziminin Pulpzyme HC 2500 enzimine nazaran çok daha fazla etkili olduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan homojenizasyon işleminden sonra elde edilen SEM görüntüleri lifsel yapının tamamen değiştiğini ve yüksek basınç altında gerçekleştirilen homojenizasyon neticesinde liflerin CNF üretiminde homojen bir şekilde nano boyuta indirildiğini (ortalama 20-50 nm lif çapı) ortaya koymuştur. CNF üretiminde enzimatik ön muamele işlemleri sonrasında kaydedilen termal analizler, glukoz birimlerinin etkilenmesi sonucunda, polimer yapıdaki kristalinite oranında meydana gelen değişiklikler neticesinde bozunma sıcaklıklarında değişimlere yol açmıştır. Özellikle Celluclast 1.5 L enzim muamelesi sonrası elde edilen numunede ağartılmış soda NaBH<sub>4</sub> hamur lifine göre termal kararlılığın arttığı sonucuna varılmıştır. Reolojik analizlerde ise, uygulanan işlemler ile birlikte lifler arasındaki gerilim azalarak, vizkozite değerlerinin düştüğü ve bu nedenle numunelerin kayma incelmeleri davranışı gösterdiği açığa çıkarılmıştır. Enzim ile muamele sonucu örneklerin elastiklik özelliklerinde yükselmeler gözlenmiştir.

Bu çalışmada CNF üretiminde kullanılan Pulpzyme HC 2500 ve Celluclast 1.5 L ticari enzimleri geleneksel olarak kullanılan enzimlerle karşılaştırılabilir sonuçlar ortaya koymuştur. Çalışma sonucunda elde edilen CNF'nin morfolojik, viskoelastik, termal ve kimyasal özellikleri daha üstün olmakla birlikte özellikle Celluclast 1.5 L enzim kullanımıyla daha yüksek kalitede CNF üretilebildiği gözlemlenmiştir. Bu bağlamda enzimatik ön muamele ve homojenizasyon işlemleri sonrası elde edilen CNF'nin morfolojik, viskoelastik, termal ve kimyasal özelliklerinin, CNF'nin kullanım alanı olan kağıt, kozmetik, sağlık, gıda ve tekstil gibi sektörler tarafından üretilebilecek nihai ürünler üzerinde belirleyici bir parametre olacağı düşünülmektedir.

#### Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma TÜBİTAK 1505 5180044 no'lu proje ile desteklenmiştir.

#### Kaynaklar (References)

1. Yıldırım N., Nanoteknoloji ve Geleceğin Çevreci Polimeri Nanoselüloz, Ormancılık Araştırma Dergisi, 5 (2), 185-195, 2018.
2. Güven O., Monteiro S.N., Mourac E.A.B., Drelich J.W., Re-emerging field of lignocellulosic fiber-polymer composites and ionizing radiation technology in their formulation, Polymer Reviews, 56 (4), 702-736, 2016.
3. GEA Company. Doğa, yenilenemeyen malzemelere yeşil bir alternatif sunmaktadır. <https://www.gea.com/tr/stories/nanoselulose.jsp>. Yayın tarihi Aralık 13, 2016. Erişim tarihi Aralık 13, 2016.
4. Bilek S., Yalçın Melikoğlu A., Cesur S., Tarımsal Atıklardan Selüloz Nanokristallerinin Eldesi, Karakteristik Özellikleri ve Uygulama Alanları, Akademik Gıda, 17 (1), 140-148, 2019.
5. Ribeiro R.S., Pohlmann B.C., Calado V., Bojorge N., Pereira N., Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges, Engineering in Life Sciences, 19, 279-291, 2019.
6. Poyraz B., Arslan R., Akıncı A., Tozluoğlu Modifiye nanoselüloz kimyasal ve morfolojik analizi, Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 1-9, 2018.
7. Tozluoğlu A., Poyraz B., Candan Z., Yavuz M., Arslan R., Biofilms from micro/nanocellulose of NaBH<sub>4</sub>-modified kraft pulp, Bulletin of Materials Science, 40 (4), 699-710, 2017.
8. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., NREL Biomass Program: Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Biomass Analysis Technology Team, Laboratory Analytical Procedure 2004, Department of Energy, A.B.D., 2004.
9. Moberg T., Sahlin K., Yao K., Geng S., Westman G., Zhou Q., Oksman K., Rigdahl M., Rheological properties of nanocellulose suspensions: effects of fibril/particle dimensions and surface characteristics. Cellulose 24 (6), 2499-2510, 2017.
10. Barroca M. J. M. C., Marques P. J. T. S., Seco I. M., Castro J. A. A. M., Selectivity Studies of Oxygen and Chlorine Dioxide in the Pre-Delignification Stages of a Hardwood Pulp Bleaching Plant, Ind. Eng. Chem. Res., 40, 5680-5685, 2001.
11. Linde M., Jakobson E.-L., Galbe M., Zacchi G., Steam Pretreatment of Dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Impregnated Wheat Straw and SSF With Low Yeast and Enzyme Loadings for Bioethanol Production, Biomass Bioenergy, 32, 326-332, 2008.
12. Rajan K., Carrier D.J., Effect of Dilute Acid Pretreatment Conditions and Washing on the Production of Inhibitors and on Recovery of Sugars During Wheat Straw Enzymatic Hydrolysis, Biomass and Bioenergy, 62, 222-227, 2014.
13. Marcos M., Garcia-Cubero M.T., Benito G.G., Coca M., Bolado S., Lucas S., Optimization of the Enzymatic Hydrolysis Conditions of Steam-Exploded Wheat Straw for Maximum Glucose and Xylose Recovery, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 88, 237-246, 2013.
14. Fu D., Mazza G., Optimization of processing conditions for the pretreatment of wheat straw using aqueous ionic liquid, Bioresources Technology, 102, 8003-8010, 2011.
15. Kolakovic R., Nanofibrillar Cellulose in Drug Delivery, Doctorate Thesis, Division of Pharmaceutical Technology Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Finland, 2013.
16. Pääkko M., Ankerfors M., Kosonen H., Nykänen A., Ahola S., Österberg M., Ruokolainen J., Laine J., Larsson P. T., Ikkala O., Lindström T., Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels, Biomacromolecules, 8 (6), 1934-1941, 2007.
17. Qiao H., Zhou Y., Yu F., Wang E., Min Y., Huang Q., Pang L., Ma T., Effective removal of cationic dyes using carboxylate-functionalized cellulose nanocrystals, Chemosphere, 141, 297-303, 2015.
18. Liang C. Y., Marchessault R. H., Infrared spectra of crystalline polysaccharides. I. hydrogen bonds in native celluloses, Journal of Polymer Science, 37, 385- 395, 1959.
19. Zhu W., Liu L., Liao Q., Chen X., Qian Z., Shen J., Liang J., Yao J., Functionalization of cellulose with hyperbranched polyethylenimine for selective dye adsorption and separation, Cellulose, 23, 3785-3797, 2016.
20. Salama A., Shukry N., El-Sakhawy M., Carboxymethyl cellulose-g-poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) hydrogel as adsorbent for dye removal, International Journal of Biological Macromolecules, 73, 72-75, 2015.

21. [21] Chan C. H., Chia C. H., Zakaria S., Sajab M. S., Chin S. X., Cellulose nanofibrils: a rapid adsorbent for the removal of methylene blue, *RSC Advances*, 5, 18204–18212, 2015.
22. Jin L., Li W., Xu Q., Sun Q., Amino-functionalized nanocrystalline cellulose as an adsorbent for anionic dyes, *Cellulose*, 22, 2443–2456, 2015.
23. Yu H. Y., Zhang D. Z., Lu F. F., Yao J., New approach for single-step extraction of carboxylated cellulose nanocrystals for their use as adsorbents and flocculants, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4, 2632–2643, 2016.
24. Jin L., Sun Q., Xu Q., Xu Y., Adsorptive removal of anionic dyes from aqueous solutions using microgel based on nanocellulose and polyvinylamine, *Bioresource Technology*, 197, 348–355, 2015.
25. Pei A., Butchosa N., Berglund L. A., Zhou Q., Surface quaternized cellulose nanofibrils with high water absorbency and adsorption capacity for anionic dyes, *Soft Matter*, 9, 2047–2055, 2013.
26. Chan H. C., Chia C. H., Zakaria S., Ahmad I., Dufresne A., Production and Characterisation of Cellulose and Nano-Crystalline Cellulose from Kenaf Core Wood, *Bioresources*, 8 (1), 786–794, 2013.
27. Tozluoğlu A., Poyraz B., Candan Z., Examining The Efficiency of Mechanic/Enzymatic Pretreatments in Micro/Nanofibrillated Cellulose Production, *Maderas*, 20 (1), 67 – 84, 2018.
28. Abraham E., Deepa B., Pothen L. A., Cintil J., Thomas S., John M. J., Anandjiwala R., Narine S. S., Environmental Friendly Method for the Extraction of Coir Fibre And Isolation of Nanofibre, *Carbohydrate Polymers*, 92 (2), 1477–1483, 2013.
29. Poletto M., Pistor V., Zattera A. J., Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose, *Cellulose - Fundamental Aspects*, Editors: Van De Ven, T., Godbout, L., InTech, Rijeka, Croatia, 2013.
30. VanderHart D.L., Atalla R.H., Studies of Microstructure in Native Celluloses Using Solid-state <sup>13</sup>C NMR, *Macromolecules*, 17, 1465–1472, 1984.
31. Wang Y., Wei X., Li J., Wang F., Wang Q., Zhang Y., Kong L., Homogeneous Isolation of Nanocellulose From Eucalyptus Pulp By High Pressure Homogenization, *Industrial Crops & Products*, 104, 237–241, 2017.
32. Mariño M., Silva L. L. D., Durán N., Tasic L., Enhanced Materials from Nature: Nanocellulose from Citrus Waste, *Molecules*, 20, 5908–5923, 2015.
33. Zimmermann T., Pöhler E., Geiger T., Cellulose Fibrils for Polymer Reinforcement, *Adv. Eng. Material*, 6 (9), 754–761, 2004.
34. Taniguchi T., Okamura K., New Films Produced from Microfibrillated Natural Fibers, *Polymer Int.*, 47 (3), 291–294, 1998.
35. Zimmermann T., Bordeanu N., Strub E., Properties of Nanofibrillated Cellulose from Different Raw Materials and Its Reinforcement Potential, *Carbohydrate Polymers*, 79, 1086–1093, 2010.
36. Ankerfors M., Lindström T., Henriksson G., Method for the Manufacture of Microfibrillated Cellulose, *US Pat.* 20090221812 A1, 2009.
37. Ciolacu D., Ciolacu, F., Popa V. I., Amorphous Cellulose–Structure and Characterization, *Cellulose Chem. Technol.*, 45 (1-2), 13–21, 2011.
38. Draman S.F.S., Daik R., Latif F.A., El-Sheikh S.M., Characterization and Thermal Decomposition Kinetics of Kapok (*Ceiba pentandra* L.)-Based Cellulose, *BioResources*, 9 (1), 8–23, 2014.
39. Hosoya T., Sakaki S., Levoglucosan Formation from Crystalline Cellulose: Importance of a Hydrogen Bonding Network in the Reaction, *ChemSusChem*, 6, 2356–2368, 2013.
40. Ludueña L., Fasce D., Alvarez V.A., Stefani P.M., Nanocellulose from Rice Husk Following Alkaline Treatment to Remove Silica, *BioResources*, 6, 1440–1453, 2011.
41. Thomas M.G., Abraham E., Jyotishkumar P., Maria H.J., Pothen L.A., Thomas S., Nanocelluloses from jute fibers and their nanocomposites with natural rubber: Preparation and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, 81, 768–777, 2015.
42. Dimic-Misic K., Gane P. A. C., Paltakari J., Micro- and nanofibrillated cellulose as a rheology modifier additive in CMC-containing pigment-coating formulations, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, 16066–16083, 2013.
43. Bercea M., Navard P., Shear Dynamics of Aqueous Suspensions of Cellulose Whiskers, *Macromolecules*, 33, 6011–6016, 2000.
44. Furtado M. R., Carvalho C. W. P., Magalhães W. L. E., Rossi A. L., Tonon R. V., Characterization of spray-dried nanofibrillated cellulose and effect of different homogenization methods on the stability and rheological properties of the reconstituted suspension, *Cellulose*, 28, 207–221, 2021.

