# POTENTIAL APPLICATIONS OF PINE WASTE

**AKANSHA GUPTA**

**CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY**

**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

**FEBRUARY 2024**

# POTENTIAL APPLICATIONS OF PINE WASTE

*by*

**AKANSHA GUPTA**

**CENTRE FOR RURAL DEVELOPMENT AND TECHNOLOGY**

***Submitted***

**In fulfillment of the requirements of the Degree of Doctor of Philosophy**

**to the**


**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

**FEBRUARY 2024**

# CERTIFICATE

This is to certify that thesis entitled **"Potential applications of Pine waste"**, being submitted by **Akansha Gupta** to the **'Indian Institute of Technology-Delhi'** for the award of **"Doctor of Philosophy"** is a record of bonafide research work carried out by her. She is worked under our guidance and supervision, and has also fulfilled the requirements for the submission of this thesis. To the best of our knowledge the results obtained in this thesis has not been submitted in part or full to any other institute and university for the award of any degree or diploma.


**Prof. Satyawati Sharma**
Professor
Center for Rural Development &Technology
Indian Institute of Technology
New Delhi-110016

**Prof. Pooja Ghosh**
Assistant Professor
Centre for Rural Development & Technology
Indian Institute of Technology
New Delhi – 110016

**Dr. Kalpana Arora**
Programme Lead
CTD, SESS

# ACKNOWLEDGEMENTS

*It will be good to begin with thanking my parents **Mrs. Madhu** and **Mr. Narendar Kumar Gupta**, who bought me into this world and made me capable enough to study that much and achieve the position where I am. Also to provide me all the necessary resources, guidance, love, care and believing in me as always…*

*Next I would like to thank **Sai Nath**… who was always there as a shadow in my life and protecting me from all the bad elements of the society and guiding me towards the correct path. Thank you for blessing me with such a brain that can read study and conclude such higher level of studies.*

*Next it would be worth mentioning my supervisors, **Prof. Satyawati Sharma**, the person I always follow and her immense motherly love and affection has been the strongest pillar in the PhD journey and personal life. Her thoughts, beliefs and kind support are something that I will not forget in my life. Thank you so much mam for blessing me with your teachings and love. I would further like to thank **Dr. Kalpana Arora**, who introduced me to this wonderful and novel topic of research. She was always like an elder sister and a frank senior to guide me in most tough time of this PhD journey. Thank you so much mam for your kind support and guidance. It would be further worth mentioning a warm gratitude and token of thanks and respect to **Prof. Pooja Ghosh**, who came bit late in my PhD journey but was the biggest support and pillar of it. She always stood beside me during all the profession and personal situations and gave me the best piece of advice in all the conditions.*

*Special thanks to my SRC committee members Prof. Vivek Kumar (Chairperson), Prof. AK Nema (External Expert) and Prof. JK Sahu (Internal Expert) for their valuable support and guidance.*

*Thank you to my beloved family, cousins and everyone I am forgetting this time. I would like to specially mention, Ms. Nandini, Raagini and Mr. Ayush Gupta my younger cousins who were always there to light up my mood and listen to my sad stories in need. Further I would like to thank my friends Ms. Shivani Yadav, Mr. Adarsh Yadav, Mr. Sunny Singh and Ms. Jhalak Jauhari to be the best part of this journey.*

*Special thanks to my fiancé **Mr. Vaibhav Puri** who entered my PhD journey in the end, being not from this subject he gave best for his efforts for helping me and guiding me till*

*completion. Further warm thanks of token to my in laws* ***Mr. Sumir*** *and* ***Ms. Namita Puri*** *who are more than my parents and treated me like their daughter always, understanding my studies and constrains associated with it…*

*Special thanks to Prof. Anil Haritash (Head of Department) Civil Engineering, Delhi Technological University, who introduced me to CRDT department in IIT Delhi and supported me all way this journey. Further vote of thanks to Prof. Swati Diwaker and Prof. Chirashree Ghosh, my master's professor who guided me all day long and helped me crack UGC-NET/ JRF.*

*I would further like to mention unconditional support of my seniors, Dr. Sonal Yadav, Dr. Garima Singh, Dr. Kanika Choudhary, Dr. Aamir Khan, Dr. Ashwini Gautam, Dr. Mandira Kapri, Dr. Anita Srivastva, Dr. Pratibha Yadav, Dr. Monica Verma and Dr. Madan Kumar. They made lab and experiments easy to understand and provided me with best of comfort and family atmosphere at work always.*

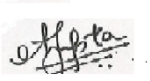
*Special thanks to Mr. Abhay Tiwari, Mr. Himanshu Arora, for their friendship and guidance always. Further thanks to my lab mates Mr. Lahur Mani Verma, Mr. Raju, Ms. Pooja Tiwari and Mr. Umesh Singh for helping me wherever in need.*

*I would further like to thank my friends whom I met in IIT- Ms. Gargi Vats, Ms. Namrata Agrahari, Mr. Kapil Tomar, Mr. Marut Jain, Mr. Vinay Kumar and Ms. Amrita Preetam for their true friendship and support throughout. Thanks to my labmates, Mr. Sachin Bhujbal., Ms. Deepti Surana, Mr. Vivek Nair, Ms. Prerna Patel, and Ms. Shubhanjali Binkar for helping me wherever necessary.*

*It would be worth mentioning thanking Mr. Ramkumar, Mr. Hridayram, Mr. Vinod and CRDT Staff for their constant help and physical support during experimentation, raw material collection and all other way possible.*

*Lastly thanks to AIRF- JNU facility, IIT-Delhi - CRF& NRF and IIT Delhi- Sonipat Campus for providing me with analysis and experimentation work. In case I am forgetting someone, forgive me I would thank everyone who came in my life during PhD tenure and enlightened me with their thoughts.*

*Lots of love and Respect……*



*Akansha Gupta*

# ABSTRACT

Paddy straw (PS) and pine needles (PN) are one of the challenging biomasses in terms of disposal and compost making due to their high silica and tannin contents. Particulate air pollution, loss of biodiversity and respiratory impairments are some of the disastrous outcomes ofburning. However, high percentage of cellulose and hemicellulose makes them potential substrate for paper and pulp industries. The main aim of work was to study and utilize a combinatorial approach of weak chemical treatment and lignin degrading fungal species as agents of effective production of lignin modifying enzymes (LME's) for lignin depolymerisation from the biomasses. Three fungal agents were experimented in the study which included *Trichorma reesei*, *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Phanerochaete chrysosporium* was found to be the best degrader of lignin (47.11% in PS+PN in 28 days) with maximum LME's production between $10^{th}$-$17^{th}$ days. Efficient lignin degradation in the PS and PN biomass will aid further application in pulp production supporting the transition to a circular economy in a greener way.

The study further aims at providing a cleaner technology by employing a combinatorial approach of mild chemical treatment of 1% $Ca(OH)_2$ as optimized followed by *Phanerochaete chrysosporium* (laccase producer) on PS+ PN in a novel combinatorial ratio of 1:1, for getting cellulose-rich pulp for making biodegradable paper sheets. Response surface methodology was adopted by choosing two response parameters – cellulose content and residual lignin content after pulping to optimize the cooking conditions. The pulp derived after optimizing the parameters i.e., solid: liquid ratio (1:7), temperature (160℃), time of digestion (60 mins), and NaOH concentration (4%) was characterized. SEM and FTIR analysis showed a more condensed cellulose network and -OH bonds when compared with alpha-cellulose.

Best pulp (kappa no. 24 and °SR 59) was casted to produce biodegradable paper sheets of different GSM types (40, 50, 75, 100 GSM), and their different mechanical properties were tested. The maximum tensile strength (110 Nm/g) and Cobb index (345.77 g/$m^2$) were seen in 100 GSM sheets which is comparable with regular corrugated sheets. Such an alternative application could serve as a perfect replacement to cardboard or wood-based paper.

Plastic cutlery for food packaging and serving has long been in trend due to its versatile properties. However, accumulation of the single used plastic cutlery creates disposal problem, and their degradability is also a major concern. Binding agents such as carboxymethyl cellulose, gum acacia and potato starch along with cross-linking polymer were blended with pulp in binding matrix to cast durable and non-brittle biodegradable cups. PLA (bio-plastic) polymer was applied in the form of a thin film over the developed tableware to avoid fibrous material of tableware to enter food. The developed tableware was further verified for anti-microbial properties by testing it with common food-poisoning pathogens.

Mechanical stiffness and rigidity were estimated along with thermal stability examined over a wide temperature range by dynamic scanning colorimetric (DSC). Tableware was also checked for water and oil solubility and absorptivity along with studying its functional group by FTIR spectroscopy. Lattice structure and morphology was studied by SEM and XRD analyses. Based on the analytical analyses, the two biomasses selected are prospective biomasses for development of biodegradable tableware and can be a suitable alternative to combat plastic cutlery menace. Three binders that were used to optimize the binder ratio in the pulp for developing biodegradable cups were carboxy-methylcellulose (CMC), gum acacia and potato starch. Among the three, CMC showed the best binding properties with pulp in the ratio of 2:3. Similarly, for bowls, 75 GSM sheets casted the best bowls among all the combinations experiment with different GSM types.

Fungal infestations are a major problem in the pulp and paper production industries. The lignocellulosic nature of pulp attracts fungal growth, thereby causing huge losses to this vital sector. Essential oils and plant extracts act as potent inhibitors of various fungal pathogens. To overcome this problem, the present study aimed to test the emulsifiable concentrates (EC) formulation of botanicals to control severe fungal infestations in paper and pulp industry. Purposely, EC formulations were prepared using *Curcuma longa* (Turmeric) and *Pongamia pinnata* (Karanja) oils which were mixed with solvents (polar, non-polar) and surfactants in varying ratios (1.5, 1.25, 1.0, and 0.75%). The formulations were screened and the shelf-life of formulations was evaluated under hot and cold conditions.

Two EC formulations were finally obtained (particle size of 550–660 nm) and bio-efficacy trials (growth inhibition studies) were performed against selected paper pulp-infesting fungal pathogens (*Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*). The formulations TEC-3 (Turmeric oil-based EC) and TKEC-29 (Turmeric and Karanja oil-based EC) exhibited the best efficacy showing 100% inhibition against *R. solani* with 1.5% (10.5 g/L) concentration. The presence of curcuminoids and terpenoids, along with other bioactive molecules in Turmeric oil and karanjin in Karanja oil might have been responsible for the antifungal activity of the bio-formulations.

# सारांश

धान का भूसा (पीएस) और पाइन सुई (पीएन) अपनी उच्च सिलिका और टैनिन सामग्री के कारण निपटान और खाद बनाने के मामले में चुनौतीपूर्ण बायोमास में से एक हैं। कणीय वायु प्रदूषण, जैव विविधता की हानि और श्वसन संबंधी हानियाँ जलने के कुछ विनाशकारी परिणाम हैं। हालाँकि, सेलूलोज़ और हेमिकेलुलोज़ का उच्च प्रतिशत उन्हें कागज और लुगदी उद्योगों के लिए संभावित सब्सट्रेट बनाता है। काम का मुख्य उद्देश्य बायोमास से लिग्निन डीपोलाइमराइजेशन के लिए लिग्निन संशोधित एंजाइमों (एलएमई) के प्रभावी उत्पादन के एजेंट के रूप में कमजोर रासायनिक उपचार और लिग्निन को नष्ट करने वाली फंगल प्रजातियों के संयोजन दृष्टिकोण का अध्ययन और उपयोग करना था। अध्ययन में तीन फंगल एजेंटों का प्रयोग किया गया जिसमें ट्राइकोर्मा रीसी, प्लुरोटस ओस्ट्रीटस और फेनेरोचेटे क्राइसोस्पोरियम शामिल थे। फेनरोचैटे क्राइसोस्पोरियम को लिग्निन का सबसे अच्छा डिग्रेडर (28 दिनों में पीएस+पीएन में 47.11%) पाया गया, जिसमें 10वें-17वें दिनों के बीच अधिकतम एलएमई उत्पादन होता है। पीएस और पीएन बायोमास में कुशल लिग्निन क्षरण से लुगदी उत्पादन में आगे के अनुप्रयोग में मदद मिलेगी, जिससे हरित तरीके से एक परिपत्र अर्थव्यवस्था में संक्रमण का समर्थन होगा।

अध्ययन का उद्देश्य 1% Ca(OH)2 के हल्के रासायनिक उपचार के संयोजनात्मक दृष्टिकोण को नियोजित करके एक स्वच्छ तकनीक प्रदान करना है, जिसके बाद 1:1 के नवीन संयोजन अनुपात में PS+ PN पर फेनेरोचेटे क्राइसोस्पोरियम (लैकेस उत्पादक) का उपयोग किया जाता है। बायोडिग्रेडेबल पेपर शीट बनाने के लिए सेलूलोज़-समृद्ध लुगदी प्राप्त करना। खाना पकाने की स्थितियों को अनुकूलित करने के लिए पल्पिंग के बाद दो प्रतिक्रिया मापदंडों - सेल्यूलोज सामग्री और अवशिष्ट लिग्निन सामग्री को चुनकर प्रतिक्रिया सतह पद्धति को अपनाया गया था। मापदंडों को अनुकूलित करने के बाद प्राप्त गूदा, यानी ठोस: तरल अनुपात (1: 7), तापमान (160 °C), पाचन का समय (60 मिनट), और NaOH एकाग्रता (4%) की विशेषता थी। एसईएम और एफटीआईआर विश्लेषण ने अल्फा-सेल्युलोज की तुलना में अधिक संघनित सेल्युलोज नेटवर्क और -ओएच बांड दिखाया।

विभिन्न जीएसएम प्रकार (40, 50, 75, 100 जीएसएम) की बायोडिग्रेडेबल पेपर शीट बनाने के लिए सर्वश्रेष्ठ लुगदी (कप्पा नंबर 24 और एसआर 59) का उपयोग किया गया और उनके विभिन्न यांत्रिक गुणों का परीक्षण किया गया। अधिकतम तन्यता ताकत (110 एनएम/जी) और कॉब इंडेक्स (345.77 ग्राम/एम2) 100 जीएसएम शीट में देखी गई जो नियमित नालीदार शीट के साथ तुलनीय है। ऐसा वैकल्पिक अनुप्रयोग कार्डबोर्ड या लकड़ी-आधारित कागज के लिए एक आदर्श प्रतिस्थापन के रूप में काम कर सकता है।

खाद्य पैकेजिंग और परोसने के लिए प्लास्टिक कटलरी अपने बहुमुखी गुणों के कारण लंबे समय से चलन में है। हालाँकि, एकल उपयोग वाली प्लास्टिक कटलरी का संचय निपटान की समस्या पैदा करता है, और उनकी गिरावट भी एक बड़ी चिंता का विषय है। टिकाऊ और गैर-भंगुर बायोडिग्रेडेबल कप बनाने के लिए क्रॉस-लिंकिंग पॉलिमर के साथ कार्बोक्सिमिथाइल सेलूलोज़, गोंद बबूल और आलू स्टार्च जैसे बाइंडिंग एजेंटों को बाइंडिंग मैट्रिक्स में लुगदी के साथ मिश्रित किया गया था। टेबलवेयर की रेशेदार सामग्री को भोजन में प्रवेश करने से रोकने के लिए विकसित टेबलवेयर पर एक पतली फिल्म के रूप में पीएलए (बायो-प्लास्टिक) पॉलिमर लगाया गया था। विकसित टेबलवेयर को आम खाद्य-विषाक्तता रोगजनकों के साथ परीक्षण करके एंटी-माइक्रोबियल गुणों के लिए और अधिक सत्यापित किया गया था।

डायनेमिक स्कैनिंग कलरिमेट्रिक (डीएससी) द्वारा व्यापक तापमान सीमा पर जांच की गई थर्मल स्थिरता के साथ-साथ यांत्रिक कठोरता और कठोरता का अनुमान लगाया गया था। एफटीआईआर स्पेक्ट्रोस्कोपी द्वारा इसके कार्यात्मक समूह का अध्ययन करने के साथ-साथ पानी और तेल की घुलनशीलता और अवशोषण के लिए टेबलवेयर की भी जाँच की गई। जाली संरचना और आकारिकी का अध्ययन एसईएम और एक्सआरडी विश्लेषण द्वारा किया गया था। विश्लेषणात्मक विश्लेषणों के आधार पर, चयनित दो बायोमास बायोडिग्रेडेबल टेबलवेयर के विकास के लिए संभावित बायोमास हैं और प्लास्टिक कटलरी खतरे से निपटने के लिए एक उपयुक्त विकल्प हो सकते हैं। बायोडिग्रेडेबल कप विकसित करने के लिए गूदे में बाइंडर अनुपात को अनुकूलित करने के लिए जिन तीन बाइंडरों का उपयोग किया गया था, वे थे कार्बोक्सी-मिथाइलसेलुलोज (सीएमसी), गोंद बबूल और आलू स्टार्च। तीनों में से, सीएमसी ने 2:3 के अनुपात में लुगदी के साथ सबसे अच्छा बंधन गुण दिखाया। इसी तरह, कटोरे के लिए, 75 जीएसएम शीट ने विभिन्न जीएसएम प्रकारों के साथ सभी संयोजन प्रयोगों के बीच सर्वश्रेष्ठ कटोरे का चयन किया।

लुगदी और कागज उत्पादन उद्योगों में फंगल संक्रमण एक बड़ी समस्या है। गूदे की लिग्नोसेल्यूलोसिक प्रकृति फंगल विकास को आकर्षित करती है, जिससे इस महत्वपूर्ण क्षेत्र को भारी नुकसान होता है। आवश्यक तेल और पौधों के अर्क विभिन्न फंगल रोगजनकों के शक्तिशाली अवरोधक के रूप में कार्य करते हैं। इस समस्या को दूर करने के लिए, वर्तमान अध्ययन का उद्देश्य कागज और लुगदी उद्योग में गंभीर फंगल संक्रमण को नियंत्रित करने के लिए वनस्पति के पायसीकारी सांद्रता (ईसी) फॉर्मूलेशन का परीक्षण करना है। जानबूझकर, ईसी फॉर्मूलेशन कर्कुमा लोंगा (हल्दी) और पोंगामिया पिनाटा (करंजा) तेलों का उपयोग करके तैयार किया गया था, जिन्हें अलग-अलग अनुपात (1.5, 1.25, 1.0 और 0.75%) में सॉल्वैंट्स (ध्रुवीय, गैर-ध्रुवीय) और सर्फेक्टेंट के साथ मिलाया गया था। फॉर्मूलेशन की जांच की गई और गर्म और ठंडी परिस्थितियों में फॉर्मूलेशन की शेल्फ-लाइफ का मूल्यांकन किया गया।

अंततः दो ईसी फॉर्मूलेशन प्राप्त किए गए (कण आकार 550-660 एनएम) और चयनित पेपर पल्प-इन्फेक्टिंग फंगल रोगजनकों (एस्परगिलस फ्लेवस, राइजोक्टोनिया सोलानी और फ्यूसेरियम ऑक्सीस्पोरम) के खिलाफ जैव-प्रभावकारिता परीक्षण (विकास अवरोध अध्ययन) किए गए। फॉर्मूलेशन TEC-3 (हल्दी तेल-आधारित EC) और TKEC-29 (हल्दी और करंजा तेल-आधारित EC) ने 1.5% (10.5 ग्राम/लीटर) सांद्रता के साथ आर सोलानी के खिलाफ 100% निषेध दिखाते हुए सर्वोत्तम प्रभावकारिता प्रदर्शित की। हल्दी तेल में अन्य बायोएक्टिव अणुओं और करंज तेल में करंजिन के साथ-साथ करक्यूमिनोइड्स और टेरपेनोइड्स की उपस्थिति, जैव-सूत्रों की एंटीफंगल गतिविधि के लिए जिम्मेदार हो सकती है।

# TABLE OF CONTENTS

# LIST OF FIGURES

# LIST OF TABLES

# ABBREVIATIONS

PS- Paddy Straw

PN – Pine Needle (s)

TR- *Trichoderma ressei*

PO- *Pleurotus ostreatus*

PC- *Phanerochaete chrysosporium*

IARI- Indian Agriculture Research Institute

PDB/A - Potato Dextrose Agar/ Broth

ADF- Acid Detergent Fiber

NDF- Neutral Detergent Fiber

LME- Lignin Modifying Enzymes

SSF- Solid State Fermentation

Lac- Laccase

LiP- Lignin Peroxidase

MnP- Manganese Peroxidase

°SR – Schoppler Reigler

GSM- Gram per meter Square

RSM- Response Surface Methodology

CCD- Central Composite Design

PFT- Poison Food Agar Test

GCMS- Gas Chromatography Mass Spectrometry

FTIR- Fourier Transform Infrared Spectroscopy

DSC- Differential Scanning Calorimeter

XRD- X-Ray Diffraction

CMC- Carboxy Methyl Cellulose

EC- Emulsifiable Concentrate

PLA- Poly Lactic Acid

WVPT- Water Vapour Permeability Test

DLS- Dynamic Light Scattering

TEC- Turmeric oil based Emulsifiable Concentrate

TKEC- Turmeric Karanjin oil based Emulsifiable Concentrate

TLC- Thin Layer Chromatography

ANOVA- Analysis of Variance

CFU- Colony Forming Units

Fig.- Figure

DMRT- Duncan‘s new Multiple Range Test

EC- Electrical Conductivity

PDI- Poly Dispersity Index

M- Molar

d- Days

h- Hour

s- Seconds

g- Gram

mg- Milligram

cm- Centimeter

mm- Millimeter

rpm- Rotations Per Minute

$gL^{-1}$ - Gram per litre

mL- Milliliter

µL- Microlitre

ºC- Degree centigrade

mV – milli volts