

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Dovilė VASILIAUSKIENĖ

**MIKROORGANIZMŲ POVEIKIS IŠ
CELIULIOZĖS PAGAMINTŲ MEDŽIAGŲ
FIZIKINĖMS IR MECHANINĖMS SAVYBĖMS
IR BIOSKAIDYMU**

DAKTARO DISERTACIJA

TECHNOLOGIJOS MOKSLAI,
MEDŽIAGŲ INŽINERIJA (T 008)

Vilnius, 2022

Disertacija rengta 2017–2022 metais Vilniaus Gedimino technikos universitete.

Vadovas

dr. Jaunius URBONAVIČIUS (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, medžiagų inžinerija – T 008).

Vilniaus Gedimino technikos universiteto Medžiagų inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba:

Pirmininkas

dr. Valentin ANTONOVIČ (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, medžiagų inžinerija – T 008).

Nariai:

prof. dr. Edita BALTRĖNAITĖ-GEDIENĖ (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, aplinkos inžinerija – T 004),

dr. Ina PUNDIENĖ (Vilniaus Gedimino technikos universitetas, medžiagų inžinerija – T 008),

dr. Janis RIŽIKOVŠ (Latvijos valstybinis medienos chemijos institutas, medžiagų inžinerija – T 008),

dr. Živilė STRAZDAITĖ-ŽIELIENĖ (Gamtos tyrimų centras, biochemija – N 004).

Disertacija bus ginama viešame Medžiagų inžinerijos mokslo krypties disertacijos gynimo tarybos posėdyje **2022 m. spalio 6 d. 13 val.** Vilniaus Gedimino technikos universiteto senato posėdžių salėje.

Adresas: Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius, Lietuva.

Tel.: (8 5) 274 4956; faksas (8 5) 270 0112; el. paštas doktor@vilniustech.lt

Pranešimai apie numatomą ginti disertaciją išsiųsti 2022 m. rugsėjo 5 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Gedimino technikos universiteto talpykloje <http://dspace.vgtu.lt> ir Vilniaus Gedimino technikos universiteto bibliotekoje (Saulėtekio al. 14, LT-10223 Vilnius, Lietuva).

Vilniaus Gedimino technikos universiteto 2022-043-M mokslo literatūros knyga
doi:10.20334/2022-043-M

© Vilniaus Gedimino technikos universitetas, 2022

© Dovilė Vasiliauskiėnė, 2022

dovile.vasiliauskiene@vilniustech.lt

VILNIUS GEDIMINAS TECHNICAL UNIVERSITY

Dovilė VASILIAUSKIENĖ

**EFFECT OF MICROORGANISMS ON
THE PHYSICAL AND MECHANICAL
PROPERTIES AND BIODECAY OF
CELLULOSE-BASED MATERIALS**

DOCTORAL DISSERTATION

**TECHNOLOGICAL SCIENCES,
MATERIAL ENGINEERING (T 008)**

Vilnius, 2022

Doctoral dissertation was prepared at Vilnius Gediminas Technical University in 2017–2022.

Supervisor

Dr Jaunius URBONAVIČIUS (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008).

The Dissertation Defense Council of Scientific Field of Materials Engineering of Vilnius Gediminas Technical University:

Chairman

Dr Valentin ANTONOVIČ (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008).

Members:

Prof. Dr Edita BALTRĖNAITĖ-GEDIENĖ (Vilnius Gediminas Technical University, Environmental Engineering – T 004),

Dr Ina PUNDIENĖ (Vilnius Gediminas Technical University, Materials Engineering – T 008),

Dr Janis RĪŽIKOVS (Latvian State Institute of Wood Chemistry, Materials Engineering – T 008),

Dr Živilė STRAZDAITĖ-ŽIELIENĖ (Nature Research Centre, Biochemistry – N 004).

The dissertation will be defended at the public meeting of the Dissertation Defense Council of Materials Engineering in the Senate Hall of Vilnius Gediminas Technical University at **1 p.m. on 6 October 2022**.

Address: Saulėtekio al. 11, LT-10223 Vilnius, Lithuania.

Tel.: +370 5 274 4956; fax +370 5 270 0112; e-mail: doktor@vilniustech.lt

A notification on the intended defense of the dissertation was sent on 5 September 2022.

A copy of the doctoral dissertation is available for review at Vilnius Gediminas Technical University repository <http://dspace.vgtu.lt> and at the Library of Vilnius Gediminas Technical University (Saulėtekio al. 14, LT-10223 Vilnius, Lithuania).

Reziumė

Disertacijoje nagrinėjamos lignoceliuliozinės kilmės kompozitinės plokštės, impregnuotos kanapių sėklų, linų sėmenų bei tungų medžio aliejais, bei tokių plokščių fizikinės ir mechaninės savybės. Mikroorganizmų bendrijos sudėtis lignoceliuliozinėse medžiagose ir poveikis šioms. Disertacijoje atliekamų tyrimų tikslas – sukurti ekologišką apsauginę dangą iš augalinių aliejų ant lignoceliuliozinės kilmės kompozitinių plokščių, kuri pasižymėtų atsparumu mechaniniam, vandens bei destruktiviam mikroorganizmų poveikiams, bei nustatyti mikroorganizmų bendrijų, skaidančių (ligno) celiuliozę, sudėtį.

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai, bendrosios išvados, naudotos literatūros ir autorės publikacijų disertacijos tema sąrašai, santrauka anglų kalba. Įvadiniamе skyriuje aptariama tiriamoji problema, darbo aktualumas, aprašomas tyrimų objektas, formuluojamas darbo tikslas bei uždaviniai, aprašoma tyrimų metodika, darbo mokslinis naujumas, darbo rezultatų praktinė reikšmė bei ginamieji teiginiai. Įvado pabaigoje pristatomos disertacijos tema autorės paskelbtos publikacijos ir pranešimai konferencijose bei disertacijos struktūra.

Pirmasis disertacijos skyrius skirtas literatūros analizei. Jame pateikiama informacija apie termoizoliacinių kompozitinių medžiagų sudėtį. Aprašomi dažniausiai aptinkami mikroorganizmai, kurie gali skaidyti lignoceliuliozines medžiagas. Apžvelgtas hidrofobinių dangų susidarymas iš kanapių sėklų, linų sėmenų, tungų medžio aliejų.

Antrajame skyriuje aprašomos tyrime naudotos medžiagos ir jų savybės, metodai ir priemonės, bei apsauginės aliejinės (hidrofobinės) dangos suformavimo būdas. Pateiktos klasikinės ir molekulinės mikrobiologijos tyrimams naudotos medžiagos, įranga, mikroorganizmų identifikavimo ir jų produkuojamų fermentų aktyvumo nustatymo metodai.

Trečiajame skyriuje aprašyta rastų ant kanapių spalių, ekologiškos termoizoliacinės medžiagos (perdirbtas popierius), lignoceliuliozinių plokščių mikroorganizmų bendrijų sudėtis. Pateikti nustatyti tiriamų medžiagų trumpalaikės vandens sugerties, storio išbrinkio, dimensijų stabilumo, atsparumo gniuždymui esant santykinei 10 % deformacijai, šiluminio laidumo parametrai, pateikta lignoceliuliozinių plokščių su apsaugine aliejine danga mikrostruktūra. Ištirtas mikroorganizmų poveikis celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių mechaninėms savybėms ir jų mikrostruktūra.

Disertacijos tema paskelbti penki straipsniai: keturi – mokslo žurnaluose, įtrauktuose į Clarivate Analytics Web of Science leidinių sąrašą, turintį citavimo indeksą, vienas – recenzuojamame mokslo žurnale. Disertacijos tema pristatyti 6 pranešimai nacionalinėse ir tarptautinėse mokslinėse konferencijose.

Abstract

The dissertation investigates the physical and mechanical properties of the cellulose-based composite boards impregnated with hemp seed, linseed, or tung tree oil and the composition of the microorganism community affecting such materials. The investigations described in the dissertation aim to create the ecological protective coating from natural oils on the composite boards of lignocellulosic origin so that these would be resistant to mechanical, water effects, and the destructive impact of microorganisms and to elucidate the composition of microorganism community that degrades the lignocellulose.

The dissertation consists of an introduction, three chapters, general conclusions, references, a list of the author's publications on the dissertation's topic, and a summary in English. The introduction chapter describes the research problem, the relevance of the dissertation, the research object, formulates the aim and objectives of the dissertation, describes the research methodology, raises the scientific novelty of the dissertation, the practical value of the research findings and statements to defend. At the end of the introductory chapter, the author's dissertation publications, conference reports, and the structure of the dissertation are presented.

The first chapter presents a literature review. It analyses the information regarding the chemical composition of the thermal insulation composite materials and describes the most commonly found microorganisms capable of degrading cellulose. The formation of hydrophobic coatings using hemp seed, linseed, and tung tree oil is reviewed.

The second chapter describes materials and their properties, test methods, equipment, and the method of forming the protective oil coatings. It presents materials and equipment used for classical and molecular microbiology research, microorganisms identification and determination methods of their produced enzyme activity.

The third chapter presents the composition of microorganism communities found on hemp shives, ecological thermal insulation material. The parameters of short-term water absorption, swelling in thickness, compressive strength at relative 10% deformation, and thermal conductivity of lignocellulosic boards are determined. The effect of microorganisms on the mechanical properties of cellulose-based composite boards and their microstructure were investigated.

Five articles have been published on the topic of the dissertation: four in scientific journals included in the list of Clarivate Analytics (Web of Science publications with a citation index), and one in another peer-reviewed journal. Six presentations on the topic of the dissertation have been made at national and international scientific conferences.

Žymėjimai

Simboliai

ρ – tankis;
 W – vandens įmirkis;
 $\Delta\epsilon_d$ – matmenų stabilumas.

Santrumpos

BCT – biri celiuliozinė termoizoliacinė vata;
FI – fermentinis indeksas;
CKP – celiuliozinė kompozitinė plokštė;
CMC – karboksimetilceliuliozė;
CAZy – angliavandenius skaidančių fermentų duomenų bazė;
DNS – 3,5-dinitrosalicilo rūgštis;
MIX A, B, C – kompostuojami celiulioziniai mišiniai su žaliosiomis atliekomis;
NCBI – Jungtinių Amerikos Valstijų nacionalinis biotechnologijų informacijos centras;
NGS – naujos kartos sekoskaita;
RH – aplinkos drėgmė.

Sąvokos

Fermentinis indeksas – tai santykis tarp mikroorganizmo kolonijos ir susidariusios Halo zonos skersmenų ant atrankios terpės.

Turinys

IVADAS	1
Problemos formulavimas.....	1
Darbo aktualumas.....	2
Tyrimų objektas	3
Darbo tikslas	3
Darbo uždaviniai	3
Tyrimų metodika.....	3
Darbo mokslinis naujumas	4
Darbo rezultatų praktinė reikšmė	4
Darbo rezultatų aprobavimas	5
Disertacijos struktūra	5
Padėka	6
1. CELIULIOZINIŲ KOMPOZITINIŲ MEDŽIAGŲ SUDEDAMŲJŲ DALIŲ IR JŲ IRIMO PROCESŲ MOKSLINIŲ TYRIMŲ APŽVALGA	7
1.1. Termoizoliacinės medžiagos iš antrinių žaliavų.....	7
1.2. Augalinės kilmės kompozitų cheminė sudėtis.....	8
1.2.1. Celiuliozė	11
1.2.2. Hemiceliuliozė	14
1.2.3. Ligninas	14
1.2.4. Pektinas.....	15
1.2.5. Neorganinės medžiagos (pelenai)	16
1.2.6. Krakmolas	17

1.3. Dažniausiai aptinkami lignoceliuliozines medžiagas skaidantys mikroorganizmai.....	18
1.3.1. Celiuliozės skaidymas.....	20
1.3.2. Krakmolo skaidymas	24
1.4. Aliejinės dangos	25
1.4.1. Kanapių sėklų aliejus	26
1.4.2. Linų sėmenų aliejus	27
1.4.3. Tungų medžio aliejus	28
1.5. Plėtrusis grafitas kaip antipireninis priedas celiulioziniame kompozite.....	29
1.6. Pirmojo skyriaus išvados ir disertacijos uždavinių formulavimas.....	30
 2. IŠ CELIULIOZĖS PAGAMINTŲ KOMPOZITINIŲ MEDŽIAGŲ TYRIMO METODAI IR NAUDOTOS MEDŽIAGOS.....	33
2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir reagentai	33
2.1.1. Tyrimo metu naudotos augalinės kilmės plokštės.....	34
2.1.2. Kompostuojami celiulioziniai mišiniai su žaliosiomis atliekomis	35
2.1.3. Biri celiuliozinė termoizoliacinė vata	35
2.1.4. Mikrobiologinės terpės	35
2.1.5. Hidrofobinei dangai formuoti naudoti aliejai.....	36
2.1.6. Molekulinės biologijos rinkiniai	36
2.1.7. DNR pradmenys.....	37
2.1.8. Darbe naudoti pradmenys bakterijų ir mikromicetų nustatymui	37
2.2. Fizikiniai metodai.....	37
2.2.1. Gniuždymo įtempio nustatymas.....	37
2.2.2. Trumpalaikės vandens sugerties nustatymas.....	38
2.2.3. Storio išbrinkio po mirkymo vandenyje nustatymas.....	39
2.2.4. Matmenų stabilumo nurodytomis temperatūros ir drėgmės sąlygomis nustatymas	40
2.2.5. Šilumos laidumo koeficiento matavimai	40
2.2.6. Augalinės kilmės kompozito mikrostuktūros tyrimas.....	40
2.2.7. Mikrogravimetrinis metodas aliejaus plėvelės masės pokyčiui nustatyti	41
2.2.8. Hidrofobinės dangos formavimas ant augalinės kilmės kompozitinių medžiagų	42
2.3. Mikrobiologiniai tyrimo metodai	42
2.3.1. Mikroorganizmų mikroskopavimas	42
2.3.2. Mikroorganizmų išskyrimas ir išsaugojimas.....	43
2.3.3. Pelėsinų grybų sporų paruošimas.....	43
2.3.4. Bakterijų kultūros suspensijos paruošimas.....	43
2.3.5. Mikroorganizmų, pasižyminčių celiulaziniu ir amilaziniu aktyvumu, atranka.....	44
2.3.6. Mikroorganizmų užsėjimas ant augalinės kilmės plokščių.....	44
2.4. Fermentinio aktyvumo matavimas naudojant DNS reagentą	45
2.5. Molekulinės biologijos tyrimo metodai.....	45
2.5.1. Genominės DNR išskyrimas	45

2.5.2 Genominės DNR amplifikacija polimerazine grandinine reakcija.....	46
2.5.3. PGR fragmentų gryninimas	46
2.5.4. Elektroforezė agaroziniame gelyje.....	47
2.5.5. Naujos kartos sekoskaita.....	47
2.5.6. Bioinformatinė analizė.....	47
2.6. Antrojo skyriaus išvados	47
 3. SUKURTA IR IŠTIRTA HIDROFOBINĖ DANGA IŠ NATŪRALIOS KILMĖS ALIEJŲ ANT CELIULIOZINĖS KOMPOZITINĖS PLOKŠTĖS BEI PLOKŠČIŲ SUDĖTINIŲ MEDŽIAGŲ TYRIMAI.....	49
3.1. Ant celiuliozinės kilmės medžiagų aptinkamų mikroorganizmų tyrimas.....	50
3.1.1. Ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių nustatytos bakterijos ..	50
3.1.2. Bakterinių celiulazių producentų nustatymas	52
3.1.3. Ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių nustatyti pelėsiniai grybai	54
3.1.4. Pelėsinių grybų celiulazinių producentų nustatymas	56
3.1.5. Amilazinių producentų atranka	58
3.2. Kompozitinių plokščių iš kanapių spalių užpildo su apsaugine danga fizikiniai tyrimai.....	60
3.2.1. Apsauginės hidrofobinės dangos susiformavimo greičio nustatymas	60
3.2.2. Aliejaus įsigėrimas į kompozitines plokštes	62
3.2.3. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga trumpalaikės vandens sugerties tyrimas.....	63
3.2.4. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga storio išbrinkio tyrimas	65
3.2.5. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga matmenų stabilumo tyrimas	66
3.2.6. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių atsparumas gniuždymui esant santykinei 10 % deformacijai	68
3.2.7. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su aliejine apsaugine danga tankis	70
3.2.8. Kanapių spalių su aliejine apsaugine danga mikrostruktūros tyrimai	71
3.2.9. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su aliejine apsaugine danga mikrostruktūra	72
3.2.10. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga šiluminio laidumo tyrimas	73
3.2.11. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga atvirų porų nustatymas.....	74
3.3. Mikroorganizmų poveikis kompozitinėms plokštėms.....	75
3.3.1. <i>Rhizopus oryzae</i> ir <i>Pseudomonas putida</i> augimas ant kompozitinių plokščių.....	75
3.3.2 Mikrostruktūrinė celiuliozinių kompozitinių plokščių analizė.....	78
3.3.3. Celiuliozinės kompozitinės plokštės fizikinės savybės po poveikio mikroorganizmais	80
3.3.4. Celiulazinių ir amilazinių fermentų aktyvumo nustatymas.....	82

3.4. Naujos kartos DNR sekoskaitos tyrimai.....	85
3.4.1. Sekoskaitos būdu nustatytų bakterinių bendrijų sudėtis.....	85
3.4.2. Sekoskaitos būdu nustatytų grybų bendrijų sudėtis	87
3.5. Trečiojo skyriaus išvados	88
 BENDROSIOS IŠVADOS.....	 91
REKOMENDACIJOS	93
LITERATŪROS SĄRAŠAS	95
AUTORĖS MOKSLINIŲ PUBLIKACIJŲ DISERTACIJOS TEMA SĄRAŠAS.....	107
SUMMARY IN ENGLISH	109

Contents

INTRODUCTION	1
Formulation of the problem	1
The relevance of the dissertation	2
The object of the research	3
The aim of the dissertation	3
The objectives of the dissertation	3
Research methodology	3
The scientific novelty of the dissertation	4
The practical value of the research findings	4
Defended statements	4
The approval of the research findings	5
The structure of the dissertation	5
Acknowledgments	6
1. LITERATURE REVIEW OF THE CELLULOSE-BASED COMPOSITE BOARD COMPONENTS AND THEIR DECOMPOSITION PROCESSES	7
1.1. Thermal insulation materials from secondary raw materials	7
1.2. Chemical composition of composites of plant origin	8
1.2.1. Cellulose	11
1.2.2. Hemicellulose	14
1.2.3. Lignin	14
1.2.4. Pectin	15
1.2.5. Inorganic substances (ashes)	17

1.2.6. Starch	17
1.3. The most common microorganisms that degrade lignocellulosic substances ..	19
1.3.1. Decomposition of cellulose	21
1.3.2. Decomposition of starch	25
1.4. The oil coating	26
1.4.1. Hempseed oil	27
1.4.2. Linseed oil	28
1.4.3. Tung tree oil	28
1.5. Expanded graphite as an antipyrene additive in a cellulosic composite	9
1.6. Conclusions of the first chapter and formulation of the dissertation tasks	31
 2. RESEARCH METHODS AND MATERIALS USED OF THERMAL INSULATION MATERIALS FROM CELLULOSE-BASED	 33
2.1. Materials and reagents used in the studies	34
2.1.1. Boards of plant origin used in the investigation	35
2.1.2 Compostable cellulosic mixes with green waste	35
2.1.3. Loose cellulose thermal insulation wool	35
2.1.4. Microbiological media	36
2.1.5. Oils used to form a hydrophobic coating	36
2.1.6. Molecular biology kits	37
2.1.7. Standard reagents for molecular biology	37
2.1.8. DNA primers	37
2.2. Physical methods.....	38
2.2.1. Determination of the compressive stress	38
2.2.2. Determination of short-term water absorption	38
2.2.3. Determination of thick swelling after soaking in water	39
2.2.4. Determination of dimensional stability under specified temperature and humidity conditions	40
2.2.5. Thermal conductivity measurements	40
2.2.6. Investigation of the microstructure of a composite of plant origin	40
2.2.7. Microgravimetric method for the determination of the change in mass of an oil film	41
2.2.8. Formation of hydrophobic coatings on composite materials	43
2.3. Microbiological research methods.	43
2.3.1. Microscopy of microorganisms	43
2.3.2. Isolation and preservation of microorganisms	44
2.3.3. Preparation of spores of fungi	44
2.3.4. Preparation of bacteria culture	44
2.3.5. Selectivity of microorganism production of cellulase and amylase	45
2.3.6. Inoculation of microorganisms on cellulose-based boards	45
2.4. Measurement of enzymatic activity with DNA reagent	46
2.5. Molecular biology research methods	47
2.5.1. Isolation of genomic DNA	47
2.5.2 Amplification of genomic DNA by polymerase chain reaction	47
2.5.3. Purification of the PCR product	48

2.5.4. Agarose gel electrophoresis	48
2.5.5. Next-generation sequencing	48
2.5.6. Bioinformatics analysis	48
2.6. Conclusions of the second chapter	48
3. THE CREATED AND TESTED HYDROPHOBIC COATING USING NATURAL OILS ON CELLULOSE-BASED COMPOSITE BOARDS AND INVESTIGATION OF THEIR COMPONENTS	49
3.1. Microorganisms detected on the cellulose-base composite boards research	49
3.1.1. Identification of bacteria	50
3.1.2. Selection of cellulase producers from bacteria	52
3.1.3. Identification of fungi	56
3.1.4. Selection of cellulase producers from fungi	58
3.1.5. Selection of amylase producers	61
3.2. Physical testing cellulose-based composite boards with a protective coating ..	60
3.2.1. Determination of the rate of formation of hydrophobic coating	60
3.2.2. Absorption of natural oil into cellulose-based composite boards	63
3.2.3. Investigation of short-term water absorption on the cellulose-based composite boards with the protective coatings	65
3.2.4. Investigation of the thick swelling of the cellulose-based composite boards with the protective coating	66
3.2.5. Investigation of dimensional stability on the cellulose-based composite boards with the protective coating	70
3.2.6. Investigation of compressive strength at 10% relative deformation of the cellulose-based composite boards with the protective coating	71
3.2.7. Investigation of the density of the cellulose-based composite boards with the protective coatings	74
3.2.8. Microstructural analyses of oil coatings at hemp shives	75
3.2.9. Microstructure analyses of the cellulose-based composite boards with the protective coatings	77
3.2.10. Investigation of thermal conductivity of cellulose-based composite boards with protective coating	78
3.2.11. Identification of porosity of cellulose-based composite boards with protective coating	74
3.3. Effects of microorganisms on cellulose-based composite boards	75
3.3.1. Growth of <i>Rhizopus oryzae</i> and <i>Pseudomonas putida</i> on cellulose-based composite boards	78
3.3.2. Microstructural analyses of the cellulose-based composite boards	80
3.3.3. Physical properties of cellulose-based composite boards after incubation with the microorganisms	82
3.3.4. Determination of the enzymatic activities of cellulases and amylases ..	85
3.4. Investigations using next-generation sequencing	85
3.4.1. Composition of sequentially determined bacterial communities	87
3.4.2. Composition of sequential bacterial communities	88
3.5. Conclusions of the third chapter.....	97

GENERAL CONCLUSIONS	91
RECOMMENDATIONS	93
REFERENCES	95
THE LIST OF SCIENTIFIC PUBLICATIONS BY THE AUTHOR ON THE TOPIC OF THE DISSERTATION	107
SUMMARY IN ENGLISH	109

Įvadas

Problemos formulavimas

Pasaulyje vis labiau skatinamas atsakingas požiūris į vartojimą, siekiama, kad žmogus tenkindamas savo poreikius nekenktų gamtai, kiek galima labiau naudotų nekenksmingas aplinkai medžiagas, gamybos metu būtų kuo mažesnis atliekų kiekis, kad jos būtų ekonomiškos ir ekologiškos. Norima, kad, baigus eksploatuoti šias medžiagas, jas būtų galima pakartotinai panaudoti arba jos natūraliai degraduotų. Šios tendencijos vyrauja ir statybinių termoizoliacinių medžiagų gamyboje. Jau nuo seno Lietuvoje tradiciškai statant namus naudotos pluoštinės kanapės, mediena, linai, nendrės, medžių apdirbimo metu atsiradusios atliekos, iš kurių formuojami įvairūs kompozitai. Jie naudojami kaip statybinės ar apšiltinimo medžiagos. Šiuos augalinės kilmės kompozitų užpildus sieja panašūs gamtiniai polimerai: celiuliozė, ligninas, hemiceliuliozė, pektinas, pelenai (neorganinės medžiagos) (Li et al., 2007). Tokios sudėties medžiagos pasižymi hidrofiliškumu, nors celiuliozė ir padeda išlaikyti organizmo formą ir stabilumą, tačiau polisacharide esanti hidroksi grupė laisvai jungiasi prie vandens molekulės. Linuose, kanapėse, medvilnėje, celiuliozės molekulės išsidėsčiusios lygiagrečiai ir sudaro pluoštą, kuris suformuotas iš linijinių molekulių, lygiagrečiai sujungtų per 1,4-β-glikozidinius ryšius. Pluoštui, kuris susidaręs iš celiuliozinių grandinių, būdingi kristaliniai ir amorfiniai regionai. Amorfinėse vietose celiuliozės

molekulės sąveikauja silpniau, todėl tarpai tarp molekulių yra didesni, į juos patenka vandens molekulė, sudaro vandenilinius ryšius su celiuliozės makromolekulėmis. Dėl šių priežasčių ypač svarbu šias hidrofilines vietas paversti hidrofobinėmis, kuriose nesikaupytų vanduo ir negalėtų vystytis mikroorganizmų bendrijos. Kuriant naujas statybines termoizoliacines medžiagas iš atsinaujinančių šaltinių būtina atsižvelgti į jų hidrofilumą, padarant medžiagas hidrofobines ir kartu nepabloginant jų fizikinių bei mechaninių savybių.

Darbo aktualumas

Statybinių ekologiškų termoizoliacinių medžiagų gamyboje yra naudojamos pirminės augalinės kilmės žaliavos, tokios kaip pluoštinės kanapės, linai, bambukai, arba pakartotinai perdirbtos, tokios kaip tekstilės (medvilnė) ar popieriaus atliekos (mediena). Kurias žaliavas naudoti (pirmines ar perdirbtas), lemia valstybių vykdoma politika ekologiniais klausimais. Tose šalyse, kuriose yra sudėtingos klimato sąlygos auginti medvilnę, bambuką, linus, kanapes ir kitus augalus, vyrauja tendencijos naudoti tekstilines ir popieriaus atliekas. Lietuvos klimato zonoje dažniausiai kaip atsinaujinantys energijos šaltiniai biokurui auginami gluosniai, o pluoštinės kanapės – kaip ekologiška tekstilinė ir termoizoliacinė medžiaga. Pluoštinių kanapių spaliai naudojami augalinės kilmės kompozituose, susidedantys iš užpildo – spalių bei organinės kilmės rišiklio – krakmolo. Kompozitai, kurių sudėtyje yra augalinės kilmės organinių medžiagų, turi atitikti technologinius reikalavimus, tokius kaip šiluminis laidumas, mechaninis atsparumas, atsparumas ugniai ir vienas svarbiausių – ilgalaikiškumas. Augalinės kilmės organinės medžiagos, tokios kaip celiuliozė, ligninas, hemiceliuliozė bei rišikliai, eksploatacijos metu neišvengiamai patiria aplinkoje esančių mikroorganizmų poveikį. Destruktyvus mikroorganizmų poveikis lemia kompozitinių medžiagų mikro- ir makrostruktūrą bei defektų susidarymą, dėl to gali itin pakisti kompozitinių plokščių fizikinės savybės ir sumažėti ilgalaikiškumas.

Iš natūralių aliejų suformuota apsauginė danga ant augalinės kilmės kompozitinių plokščių, sudarytų iš pluoštinių kanapių spalių ir kukurūzų krakmolo, leistų sukurti visiškai gamtinės kilmės kompozitus, kurie taptų atsparesni destruktiviam išoriniam ir mikroorganizmų poveikiams eksploatacijos metu.

Tyrimų objektas

Darbo tyrimų objektas – kompozitinės medžiagos, pagamintos iš natūralios kilmės celiuliozinių komponentų, kurios pasižymi hidrofilinėmis savybėmis bei lengvai paveikiamos aplinkos mikroorganizmais.

Darbo tikslas

Šio darbo tikslas – celiuliozines kompozitines medžiagas padengti ekologiška apsaugine danga iš natūralių aliejų, ištirti jų fizikines savybes bei įvertinti jų struktūrai įtaką turinčių mikroorganizmų bendrijų sudėtį.

Darbo uždaviniai

Darbo tikslui pasiekti reikia spręsti šiuos uždavinius:

1. Sukurti ir ištirti kompozitinių plokščių, pagamintų iš celiuliozinių medžiagų, padengtų natūralios kilmės aliejais, fizikines savybes.
2. Nustatyti ant celiuliozinių kompozitinių plokščių augančių mikroorganizmų rūšis, jų poveikį plokščių mechaninėms savybėms ir bioskaidymo aktyvumą.
3. Ištirti mikroorganizmų bendrijų sudėtį ant augalinės kilmės kompozitinių plokščių, kurios celiuliozinės termoizoliacinės vatos, kompostuojamų celiuliozės mišinių su žaliosiomis atliekomis bei kanapių spalioose.

Tyrimų metodika

Darbe celiuliozinės kilmės kompozitinėms plokštėms tirti taikyti šie metodai: tankio, šilumos laidumo koeficiento, gniuždymo įtempio esant 10 % santykinei deformacijai, trumpalaikės vandens sugerties, storio išbrinkio po mirkymo vandenyje, mikrostruktūros analizės (skenuojančioji elektroninė mikroskopija).

Darbe taikyti mikrobiologijos ir molekulinės biologijos metodai: mikroorganizmų išskyrimas ir išsaugojimas, genominės DNR išskyrimas, polimerazinė grandininė reakcija (PGR), naujos kartos sekoskaita, fermentinio aktyvumo nustatymas.

Darbo mokslinis naujumas

Rengiant disertaciją gauti šie medžiagų inžinerijos mokslui nauji rezultatai:

- Nustatytas mikroorganizmų poveikis celiuliozinės kilmės kompozitinėms plokštėms, pasireiškiantis atsparumo gniuždymui sumažėjimu apie 22 % po inkubacijos su bakterija *Pseudomonas putida*, o su pelėsiniu grybu *Rhizopus oryzae* – apie 42 %.
- Sukurta apsauginė danga ant augalinės kilmės kompozitinių plokščių iš kanapių sėklų, linų sėmenų ir tungų medžio aliejų efektyvi tik tada, kai ji kietinama 90 °C ir 120 °C temperatūroje. Taip apsaugotos kompozitinės plokštės tapo atsparios aplinkos drėgmei.
- Sukurtas būdas, padidinantis celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga atsparumą gniuždymui nuo 2 iki 4,5 kartų, pagerinantis matmenų stabilumą, kuris neviršijo 2,5 %, sumažinantis trumpalaikę vandens sugertį iki 3 kartų, storio išbrinkį 10,4 % – 48 %.
- Nustatyta, kad mikrobiotos įvairovę celiuliozinėse medžiagose lemia esantys priedai, tokie kaip antipirenai ar sunkieji metalai, slopinantys kai kurių rūšių mikroorganizmų augimą.

Darbo rezultatų praktinė reikšmė

Sukurtos ir ištirtos celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės su apsaugine danga buvo atsparesnės gniuždymui, sumažėjo jų išbrinkis ir trumpalaikė vandens sugertis, dėl to žalingas mikroorganizmų poveikis mažesnis. Plokštės, kurių savybės pagerintos, galima pritaikyti ekologiškuose gaminiuose ir statiniuose. Kadangi jos tapo atsparesnės vandens poveikiui, jas galima pritaikyti naudoti patalpose esant padidėjusiai drėgmei.

Ginamieji teiginiai

1. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių atsparumą gniuždymui galima padidinti ir kartu sumažinti mikroorganizmų bei vandens poveikį jas padengiant apsaugine danga iš natūralių aliejų.
2. Iš kanapių spalių ir kukurūzų krakmolo rišiklio suformuotos celiuliozinės kompozitinės plokštės skaido mikroorganizmų bendrijų sintetinami fermentai: celiulazės ir amilazės.

3. Celiuliozinių medžiagų sudėtis lemia mikrobiotos įvairovę, tačiau jose esantys priedai ir (ar) priemaišos slopina kai kurių rūšių mikroorganizmų augimą.

Darbo rezultatų apibavimas

Disertacijos tema paskelbti 5 moksliniai straipsniai: 4 moksliniai straipsniai įtraukti į *Clarivate Analytics Web of Science* duomenų bazę ir 1 kituose recenzuojamuose leidiniuose.

Disertacijoje atliktų tyrimų rezultatai paskelbti 6 mokslinėse konferencijose Lietuvoje ir užsienyje:

- Jaunųjų mokslininkų tarptautinėje konferencijoje „BTechPro2022“, balandžio 27–29 d., 2022 m., Ryga, Latvija.
- Tarptautinėje konferencijoje (forume) „World Microbe Forum: ASM and FEMS collaboration“, birželio 20–24 d., 2021 m., nuotoliniu būdu.
- Tarptautinėje konferencijoje „1st Corrosion and Materials Degradation Web Conference session Composite and Bonded Structures“, gegužės 17–19 d., 2021 m., nuotoliniu būdu.
- Tarptautinėje konferencijoje „1st International Electronic Conference on Microbiology“, lapkričio 2–30 d., 2020 m., nuotoliniu būdu.
- Tarptautinėje konferencijoje „FEMS Online Conference on Microbiology“, spalio 28–31 d., 2020 m., nuotoliniu būdu.
- 21-ojoje Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Mokslas – Lietuvos ateitis“ kovo 20 d., 2018 m., Vilnius, Lietuva.

Disertacijos struktūra

Disertaciją sudaro įvadas, trys skyriai, bendrosios išvados, literatūros ir autoriaus publikacijų sąrašai.

Darbo apimtis (be priedų) 125 puslapiai, neskaitant priedų, tekste panaudotos 7 numeruotos formulės, 48 paveikslai ir 17 lentelių. Rašant disertaciją panaudoti 131 literatūros šaltiniai.

Padėka

Dėkoju darbo vadovui Jauniui Urbonavičiui už vadovavimą ir pagalbą rengiant disertaciją. Taip pat dėkoju VILNIUS TECH Statybinių medžiagų instituto darbuotojams, daug prisidėjusiems ugdant mano medžiagotyrinį mąstymą. Dėkoju VILNIUS TECH Chemijos ir bioinžinerijos katedros kolegoms už palaikymą. Jaučiu didelį dėkingumą a.a. Tėvams paskatinusiems žengti šiuo keliu ir kantriai šeimai.

Celiuliozinių kompozitinių medžiagų sudedamųjų dalių ir jų irimo procesų mokslinių tyrimų apžvalga

Skyriuje analizuojama celiuliozinių kompozitinių plokščių bei jų užpildo cheminė sudėtis, specifinės medžiagų savybės, turinčios įtakos struktūrai. Trumpai aprašyti mikroorganizmai, kurie rasti ant augalinės kilmės kompozitų.

Skyriaus tematika paskelbti trys autorės straipsniai (Vasiliauskienė et al., 2018, 2020a, 2020b).

1.1. Termoizoliacinės medžiagos iš antrinių žaliavų

Pakartotinis medžiagų naudojimas kelia didelį susidomėjimą pramonėje (1.1 lentelė). Dėl susidarančio didelio kiekio atliekų visame pasaulyje, įvairiose pramonės ir ūkinėse veiklose yra skatinama kuo daugiau jas panaudoti antrą kartą. Yra žinoma, kad antrines žaliavas galima panaudoti statybų pramonės sektoriuje. Tačiau būtina atsižvelgti į pačias atliekas, jų pritaikomumą garso ar šilumos izoliacijai arba apdailai (Briga-sá et al., 2013). Šias savybes lemia galutinės medžiagos fizikinės savybės, tokios kaip tankis, porėtumas, matmenų dydis.

1.1 lentelė. Termoizoliacinės medžiagos iš tekstilės, augalų ir gyvūnų atliekų (Jordeva et al., 2014; Briga-sá et al., 2013)

Table 1.1. Thermal insulation materials from recycled textile, plant and animal waste

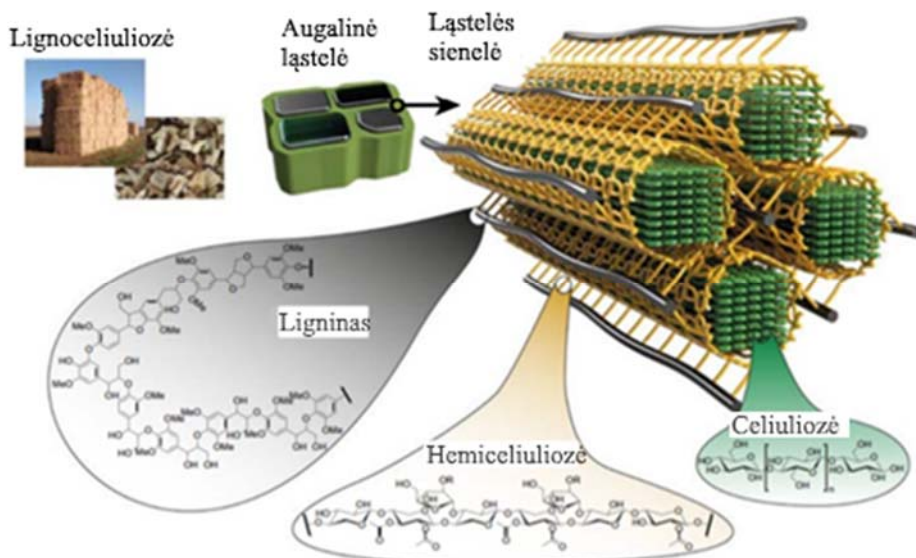
Perdirbta medžiaga	Pritaikymas	Savybės
Poliesteris	Šilumos ir garso izoliacijai Sienoms ir stogui	Nealergizuojantis, atsparus ugniai, nepalanki terpė mikroorganizmų augimui
Tekstilės atliekos	Šilumos ir garso izoliacijai, esant trumpoms atraizoms Garso izoliacija po grindimis, esant ilgoms atraizoms.	Nesudėtingas perdirtimas antriam panaudojimui
Augalinės kilmės pluoštai / spalvai	Šilumos ir garso izoliacijai Sienoms, stogui ir grindims	Iš kanapių pagamintos pasižymi geromis termoizoliacinėmis savybėmis vasaros ir žiemos sezonais
Gyvūninės kilmės (vilna, plunksnos)	Šilumos ir garso izoliacijai Sienoms ir stogui	Ypač tinkamas su medžio konstrukcijomis

Daugelis lentelėje išvardintų medžiagų pasižymi geromis šilumos ir garso izoliacijos savybėmis. Tačiau tik sintetinės kilmės medžiagoms nebūdingas mikroorganizmų augimas, o visas kitas reikia apsaugoti nuo mikroorganizmų poveikio. Augalinės kilmės ir tekstilės atliekas sudaro iki 78 % celiuliozės, kurią iki pavienių gliukozės molekulių gali skaidyti mikroorganizmai, o tai yra maistinių medžiagų šaltinis kitiems gyviesiems organizmams.

1.2. Augalinės kilmės kompozitų cheminė sudėtis

Lietuvoje naudojamos įvairios augalinės kilmės žaliavos, t. y. pluoštinės kanapės, medžio drožlės, linai, nendrės. Kanapės (*Cannabis sativa*) yra daugiavandis augalas, suteikiantis vertingos žaliavos: maisto pramonėje – kanapių sėklų aliejaus, tekstilės pramonėje – pluošto, o liekantieji spalvai yra naudojami kaip kraikas arklidėse arba kaip užpildas gaminant augalinės kilmės kompozitus (Mussing, 2010).

Gamtinės kilmės pluoštų sienelės sudarytos iš celiuliozės, hemiceliuliozės, lignino, aromatinių junginių, tokių kaip vaškai ir kiti lipidai, bei neorganinių medžiagų (pelenų). 1.1 paveiksle parodyta tipinė augalinės kilmės ląstelės sienelės struktūra ir sudėtis. Gamtinės kilmės pluoštų cheminė sudėtis ir struktūra lemia jų savybes, funkcionalumą ir apdirbimo būdus (Jankauskiene et al., 2015).



1.1 pav. Augalinės ląstelės sienelės sudėtis ir struktūra (Brethauer et al., 2020)

Fig. 1.1. Composition and structure of the plant cell wall

Visus augalinės kilmės kompozitus sieja panaši cheminė sudėtis (1.2 lentelė): celiuliozė, ligninas, hemiceliuliozė, pektinas, pelenai (neorganinės medžiagos) (Li et al., 2007).

1.2 lentelė. Augalinės kilmės pluoštinių kompozitų cheminė sudėtis (Li et al., 2007)

Table 1.2. Chemical composition of fibrous composites of plant origin

Pluošto tipas pagal augalo dalį	Celiuliozė %	Ligninas %	Hemiceliuliozė %	Pektinas %	Pelenai (neorganinės medžiagos) %
Linai	71	2,2	18,6–20,6	2,3	–
Kenefas	31–57	15–19	21,5–23	–	2–5
Mediena	40,7–78	6,9–27,4	8,1–32	2,6–4,2	0,3–1,7
Džiutas	45–71,5	12–26	13,6–21	0,2	0,5–2
Kanapės	57–77	3,7–13	14–22,4	0,9	0,8

1.2. lentelės pabaiga

Pluošto tipas pagal augalo dalį	Celiuliozė %	Ligninas %	Hemiceliuliozė %	Pektinas %	Pelenai (neorganinės medžiagos) %
Pluoštinė bėmerija	68,6–91	0,6–0,7	5–16,7	1,9	–
Lapų pluoštai					
Abaka (manila)	56–63	7–9	15–17	–	–
Sizalis	47–78	7–11	10–24	10	0,6–1

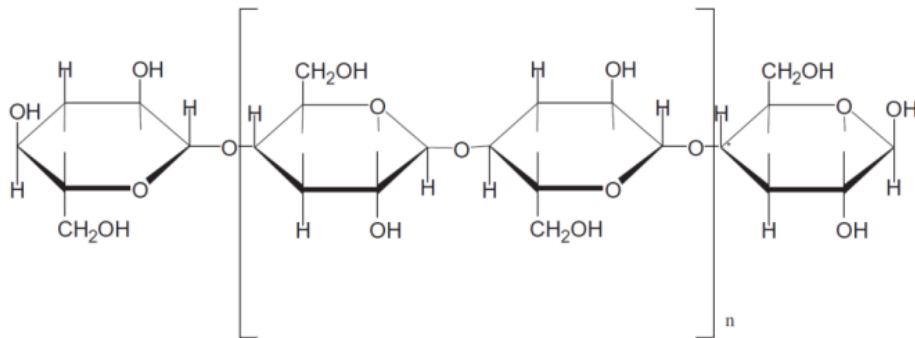
Kiekvieną iš šių gamtinių polimerų sudaro biomolekulės, dažniausiai angliavandeniai $C_n(H_2O)_n$ ir jų dariniai, t. y. polihidroksiangliavandeniliai su viena ar keliomis aldehido arba ketono grupėmis (1.3 lentelė).

1.3 lentelė. Augalinės ląstelės sienelės struktūra ir cheminė sudėtis (Chen, 2014)**Table 1.3.** Structure and composition of the plant cell

	Ligninas	Hemiceliuliozė	Celiuliozė
Subvienetai	Guacilpropanas(G), siringilo propanas (S), hidroksifenilpropanas (H)	D-ksilozė, D-manozė, L-arabinozė, galaktozė, gliukurono rūgštis.	D-gliukozė
Ryšiai tarp subvienetų	Įvairūs esterifikacijos metu susidarę ryšiai. C-C ryšys	Grandinėje β-1,4-glikozidiniai; grandinės išorėje β-1,2-; β-1,3-; β-1,6-glikozidiniai ryšiai	β-1,4-glikozidiniai ryšiai
Polimerizacija	4000	Mažiau nei 200	Nuo kelių dešimčių iki tūkstančių.
Polimerai	G ligninas, GS ligninas, GSH ligninas	Poliksilozė, galaktogliukomananas, gliukomananas.	Celiobiozė
Struktūra	Amorfinė, nehomogeninė, nelinijinė, trijų dimensijų polimerai	Trijų dimensijų, nehomogeninė, molekulės su mažais kristaliniais regionais	Trijų dydžių, linijinės molekulės, sukomponuotos iš kristalinių ir amorfinių regionų
Ryšiai tarp komponentų	Siejasi su hemiceliulioze	Siejasi su ligninu	Jokių sąsajų

1.2.1. Celiuliozė

Celiuliozė (1.2 pav.) yra polisacharidas, kuris žmogaus organizme neskaidomas ir neįsisavinamas, tačiau atrajojantys gyvuliai geba ją virškinti.



1.2 pav. Celiuliozės struktūra

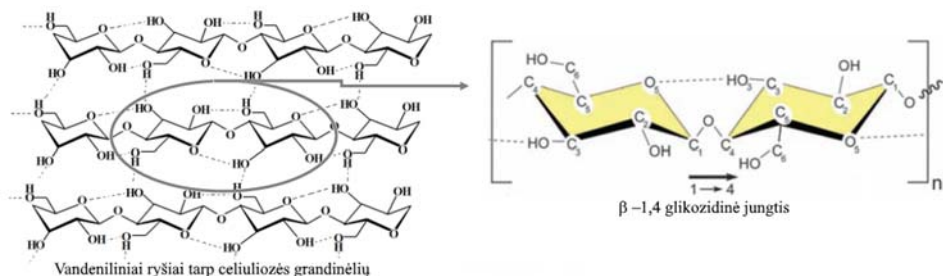
Fig. 1.2. Bonds of the cellulose polymer

Celiuliozę gamina ne tik augalų karalystės atstovai, ją taip pat produkuoja jūrų gyviai – gaubtagyvių klasei priklausantys ascidijos, oomicetai, kitaip žinomi kaip dumbliagybiai, kai kurie protistai, dumbliai ir bakterijos (Moon et al., 2011). Nepaisant to, kad celiuliozę gamina labai skirtingi organizmai, jos pagrindinė funkcija yra mechaninė, t. y. palaikyti organizmo formą ir stabilumą. Supinti celiuliozės plaušeliai sudaro popieriaus pagrindą (filtravimo popierius – praktiškai gryna celiuliozė), o kai kuriuose augaluose – linuose, kanapėse, medvilnėje – celiuliozės molekulės išsidėsčiusios lygiagrečiai ir sudaro pluoštą.

Celiuliozė – labiausiai paplitęs polisacharidas, savo kiekiu užimantis pirmą vietą tarp kitų organinių junginių. Apie 10^{12} tonų kasmet jos pagamina augalai biosintezės būdu (Tosh et al., 2014). Ypač daug celiuliozės turi medvilnė, linai, kanapės, medžiai (1.2 lentelė). Augaluose pagrindinė ląstelių sienelių sudedamoji dalis yra celiuliozė, kurią sudaro anglis 44,44 %, vandenilis 6,17 % ir deguonis 49,39 %. Cheminė celiuliozės formulė yra $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Chen, 2010). Ji yra gamtinis linijinis polisacharidas, susidedantis iš celiobiozės dimerų, kurie sudaryti iš D-gliukozės molekulių, sujungtų 180° kampu β -1,4 gliukozidinėmis jungtimis (1.3 pav.). Tokių D-gliukozės liekanų būna iki 15 000, o molekulinė masė nuo 400 kD iki 1–2 MDa, ir tai lemia, kad celiuliozė yra vienas ilgiausių gamtinių polimerų. Pirminė celiuliozės struktūra labai paprasta, o antrinė struktūra nulemia pagrindines celiuliozės biologines ir technologines savybes.

Glikozidinis β -1,4 ryšys (1.3 pav.) lemia polimerinės molekulės tiesiškumą, kuris dar labiau sustiprinamas vandenilinėmis jungtimis grandinėje. Todėl

celiuliozė turi ne tik gerą mechaninį atsparumą ir pluoštines savybes, bet taip pat netirpsta vandenyje ir yra chemiškai stabili.



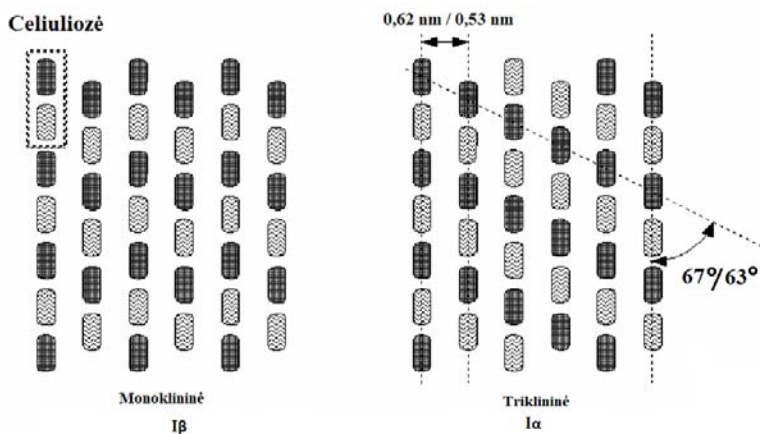
1.3 pav. Celiuliozės polimero ryšiai (Ek & Gellerstedt, 2009b)

Fig. 1.3. Bonds of the cellulose polymer

Tarpai tarp celiuliozės sluoksnių vienas su kitu siejami veikiami van der Valso jėgos. Priklausomai nuo to, kaip jie išsidėsto, susiformuoja I α ir I β celiuliozės tipai. Taip yra dėl to, kad skirtingų sluoksnių gliukozės molekulės gali sąveikauti ta pačia kryptimi (formuojasi I α tipas) arba pasislinkti priešinga, formuojasi I β (1.4 pav.). Celiuliozė I α ląstetėje būna triklininės kristalinės struktūros, t. y. matmenys yra nevienodo ilgio ir nė viena iš atitinkamų ašių nesudaro 90° kampo. Celiuliozė I β būna monoklininės kristalinės struktūros, kai dvi ašys yra statmenos 90° viena kitai, o trečioji – ne. Manoma, kad abi kristalinės formos egzistuoja celiuliozėje. Celiuliozė I α yra pusiau stabili ir gali būti transformuojama į stabilesnį I β tipą, esant aukštai temperatūrai ir slėgiui, arba šarminiame ar rūgštiniame tirpale (Ek & Gellerstedt, 2014).

Gamtinės kilmės celiuliozė būna I α ir I β kristalinės struktūros (1.4 pav.), tačiau ją apdorojus gaunama celiuliozė II, III, IV. Svarbiausia iš jų yra II, kuri daugiausia naudojama techniniams ir technologiniams poreikiams. Celiuliozė II skiriasi nuo celiuliozės I tuo, kad grandinės yra lygiagrečios, bet priešingų kryptei. Tuo galima paaiškinti, kodėl celiuliozė II yra stabilesnės formos negu celiuliozė I.

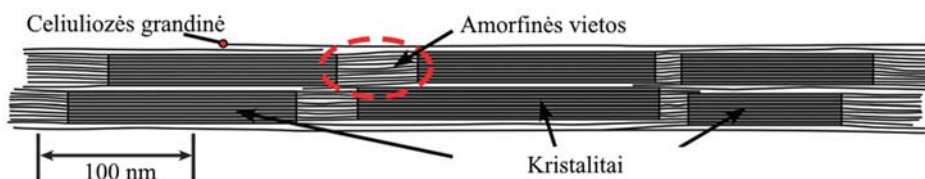
Celiuliozė yra balta, pluoštinė, beskonė, bekvapė medžiaga. Rentgenostruktūrinės analizės metodu nustatyta, kad dalis celiuliozės pluošto sudaryta iš kompaktiškų vandenilniais ryšiais susijungusių makromolekulių. Tokios pluošto vietos, remiantis medžiagos rentgenogramomis, parodo medžiagos kristalinę struktūrą, ir jos vadinamos kristalitais.



1.4 pav. Celiuliozės sluoksnių išsidėstymas (Lienemann, 2010)

Fig. 1.4. Arrangement of cellulose layers

Be jų, celiuliozėje yra amorfinių vietų, kur tarpai tarp molekulių yra didesni, o sąveika – silpnesnė (1.5 pav.). Kristalitų kiekis ir tūris lemia celiuliozės savybes. Ji netirpsta vandenyje bei daugelyje organinių tirpiklių, sugeria nedidelį kiekį vandens garų. Vandenyje šiek tiek išbrinksta. Mirkymo metu pluoštų ilgis nesikeičia, tačiau šiek tiek padidėja skersmuo. Rentgenogramos parodė, kad vandens molekulės nesugeba įsiskverbti į kristalitų vidų, bet patenka į amorfinės sritis, sudarydamos vandenilinius ryšius su celiuliozės makromolekulėmis (Escalante et al., 2018).



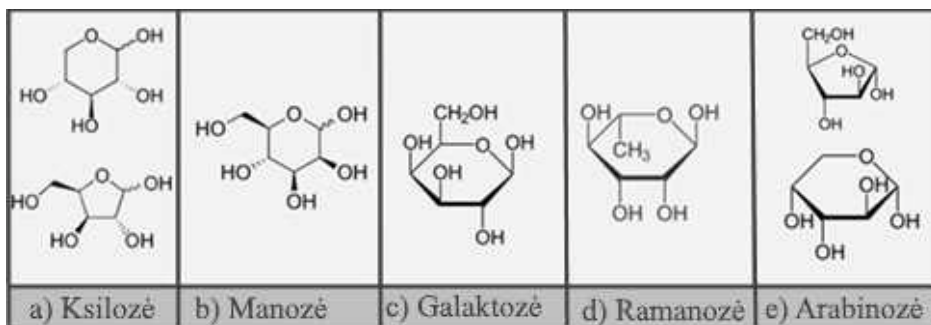
1.5 pav. Celiuliozės kristalinės ir amorfinės vietos (Moon et al., 2011)

Fig. 1.5. Crystallinity and amorphous sites of cellulose

Celiuliozės pluoštas yra hidrofobinis polimeras, pasižymintis dideliu tempiamuoju stipriu. Augalinių ląstelių sienelėse celiuliozė sudaro mikrofibriles (pvz., 2–20 nm skersmens ir 100–40 000 nm ilgio), tai užtikrina linijinę ir struktūriškai stiprią sistemą.

1.2.2. Hemiceliuliozė

Po celiuliozės kitas labiausiai augalų ląstelės sienelėse paplitęs angliavandenis yra hemiceliuliozė, kurios kiekis ir struktūra įvairiuose augaluose skiriasi. Hemiceliuliozė yra vienas iš gausiausių polisacharidų, esančių augalų audiniuose kaip struktūrinė medžiaga, įterpta tarp lignino ir celiuliozės (Hu et al., 2018; Huang et al., 2021). Hemiceliuliozė – heteropolisacharidas, susidedantis iš kelių monomerų, tokių kaip D-gliukozė, D-ksilozė, D-manozė, D-galaktozė, L-arabinozė, ir kitokių glikozidų, prisijungusių angliavandenių (1.6 pav.). Daugiausia augalinėse ląstelėse randama ksilozės (Hearle, 1958; Viel et al., 2018).



1.6 pav. Monomeriniai cukrūs, būdingi hemiceliuliozei (Rytioja et al., 2014)

Fig. 1.6. Abundant monomers of hemicelluloses

Pagrindinė hemiceliuliozės funkcija yra palaikyti ląstelinės sienelės struktūrą ir poringumą. Taip pat kai kuriuose šaltiniuose teigiama, kad hemiceliuliozė, prisijungusi prie lignino ar celiuliozės molekulių, sumažina fermentinį poveikį ląstelių sienelėms bei padidina netirpių neorganinių cheminių elementų kiekį (Liu et al., 2016; Nykter et al., 2008).

1.2.3. Ligninas

Tai yra hidrofobinis polimeras, esantis tarp celiuliozės mikrofibrilių ir hemiceliuliozės, kuris jas fiksuoja vieną prie kitos ir taip suteikia ląstelės sieniei „sumedėjusias“ savybes. Taip pat kitos lignino funkcijos augalinių ląstelių sienelėse: tvirtumas, standumas ir apsauga nuo patogeninių mikroorganizmų (Chen 2014). Kiekviename augale ir jo dalyje lignino kiekis ir struktūra skiriasi. Ligninas yra organinis polimeras, sudarytas iš įvairių monomerų, todėl jo negalima laikyti griežtai apibrėžtu cheminiu junginiu (Viretto et al., 2018). Cheminiais metodais išskirtas ligninas nėra identiškas ligninui, esančiam ląstelių sienelėse, nes jam išskirti reikia labai reaktyvių cheminių junginių, todėl atsiranda pokyčių jo struktūroje. Lignino sandara labai sudėtinga, jam priskiriama daugybė

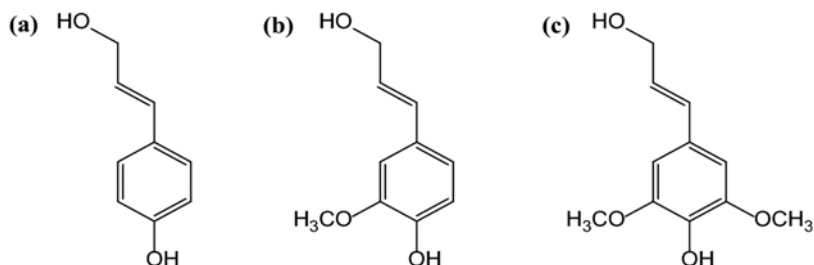
įvairių empirinių ir struktūrinių formulių, todėl tai nėra grynas polisacharidas, lipidai ar baltymas (Ek, Gellerstedt, 2009). Pagal elementinę sudėtį ligninas nuo celiuliozės skiriasi didesniu anglies ir mažesniu deguonies kiekiu (1.4 lentelė).

1.4 lentelė. Lignino ir celiuliozės elementinės sudėties palyginimas

Table 1.4. Elemental composition of lignin and cellulose

	C (anglis)	O (deguonis)	H (vandenilis)
Ligninas	63 %	31 %	6 %
Celiuliozė	44 %	49 %	6 %

Ligninas yra polifenilpropanoidų kompleksas (600–15,000 kDa dydžio), susidedantis iš vieno arba kelių alkoholių. Paprastai ligninas apibūdinamas kaip polifenolio polimeras su hidroksicinamilo alkoholiais, dar kitaip – monolignoliais, t. y. p-kumarilo, koniferilo ir sinapilo alkoholiais (1.7 pav.) (Pollegioni et al., 2015; Oregui-Bengoechea et al., 2019). Jie skiriasi metoksigrupės aromatiniam žiede padėtimi ir monolignolių skaičiumi. Todėl patį ligniną galima skirstyti į tris grupes. Skirtingi monolignolių kiekiai apibūdina skirtingus augalus, jų subrendimo lygį (Ganewatta et al., 2019; Ralph et al., 2004).



1.7. pav. Hidroksicinamilo alkoholiai: a) p-kumarilo alkoholis, b) koniferilo alkoholis, c) sinapilo alkoholis

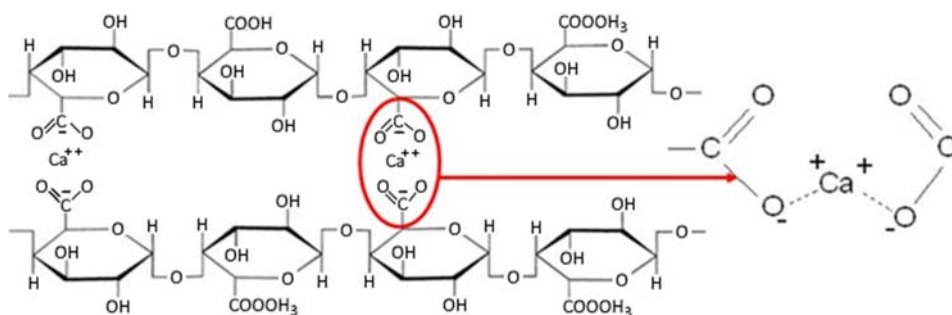
Fig. 1.7. Hydroxycinnamyl alcohols: a) p-coumaryl, b) coniferyl, c) sinapyl alcohol

Ligninas mažiau atsparus vandeniui už celiuliozę ir lengviau pereina į tirpalą. Veikiamas sieros rūgštimi arba šarmais, jis ištirpsta, kuomet paruošiami techniniai celiuliozės gavimo iš medienos procesai (Jönsson et al., 2016).

1.2.4. Pektinas

Pagrindinė pektino funkcija – suteikti mechaninį tvirtumą augalinės kilmės ląstelėms, siurbti vandenį iš išorės, būti apsauginiu barjeru. Pektinas yra vienas iš pagrindinių komponentų, esančių tarp ląstelės sienelės mikrofilamentų, tai yra

polisachridų kompleksas, sudarytas iš 1,4-D-galakturono rūgšties, L-ramnozės ir L-arabinozės (1.8 pav.). Priklausomai nuo polimerų kombinacijų ir fizikinių bei cheminių charakteristikų pektinas gali būti skirstomas į pektino rūgštį, pektiną, protopektiną (de Souza et al., 2021). Pektino rūgštis yra sudaryta iš α -1-4 ryšiu grandine sujungtų apie 100 galakturoninės rūgšties liekanų. Ši rūgštis tirpsta vandenyje ir lengvai reaguoja su kalcio jonais (Ca^{2+}), sudarydama gelinę struktūrą. Pektino molekulinė masė gali būti nuo 25 000 iki 50 000, o kiekvieną grandinę gali sudaryti apie 200 galakturoninės rūgšties liekanų. Protopektinas, kurio molekulinė masė didesnė nei pektino rūgšties ar pektino, dažniausiai randamas pirminėje augalinės kilmės ląstelės sienelėje, netirpus vandenyje, bet paveikus protopektinaze tampa tirpus (Martens-Uzunova et al., 2008). Kadangi tarp pektino rūgšties, pektino ir protopektino susidaro kalcio jonų tilteliai, o pektino molekulės jungiasi tarpusavyje, susidaro tinklo struktūra (1.8 pav.). Šis tarpląstelinis sluoksnis leidžia vandens molekulėms laisvai judėti bei lemia augalinių ląstelių sienelių elastingumą ir tamprumą. Priklausomai nuo kalcio tiltelių kiekio, tokia būna ir ląstelių sienelių matrica (Chen 2014; Ek, Gellerstedt G., 2009; Hýsková et al., 2020).



1.8 pav. Augalo tarpląstelinė struktūra iš pektino rūgšties ir kalcio tiltų, suteikianti gelinį pobūdį (Mishra et al., 2012)

Fig. 1.8. Intercellular structure of the plant from pectic acid and calcium bridges, giving it a gel-like character

Pektinai yra rūgštiniai, netaisyklingos struktūros, jautrūs vandeniui polisacharidai. Jie lengvai tirpsta ir skaidomi šarminiais tirpalais.

1.2.5. Neorganinės medžiagos (pelenai)

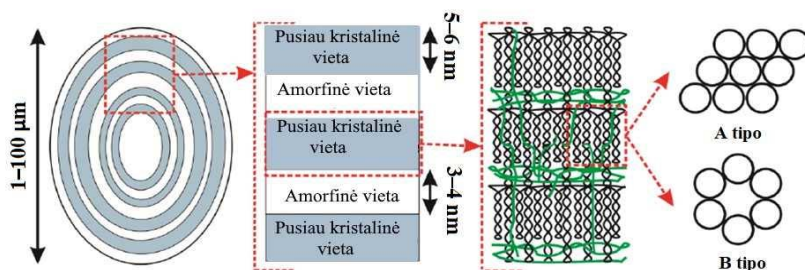
Augaluose, be pagrindinių cheminių elementų, tokių kaip anglis (C), deguonis (O), vandenilis (H), dar yra azoto (N), sieros (S), fosforo (P), kalcio (Ca), magnio (Mg), geležies (Fe), vario (Cu), natrio (Na), kalio (K), mangano (Mn) ir chloro (Cl) (Schwarzova et al., 2017). Šie netirpūs mineralai iš neorganinių druskų

nustatomi įvairiais metodais, tokiais kaip atominės sugerties, emisijos spektroskopijos, indukuotos plazmos optinės emisijos spektrometrijos (sunkiesiems metalams). Daugiausia pelenai sudaro 2–3 % nuo bendro medžiagos kiekio. Taip pat augalai iš aplinkos gali kaupti sunkiuosius metalus, tokius kaip šviną (Pb), cinką (Zn), kadmį (Cd) (Musio et al., 2022; Tlustoš et al., 2006). Mikroelementų tipas ir kiekis labiausiai priklauso nuo augalo, jo dalies, subrendimo lygio bei augimvietės.

1.2.6. Krakmolas

Kraskmolo granulės yra mažai tirpios vandenyje ir organiniuose tirpikliuose, o sausos – labai higroskopinės. Krakmolas yra dviejų polisacharidų junginys, sudarytas iš amilozės ir amilopektino. Šių dviejų polisacharidų santykis priklauso nuo to, koks augalas jį sintetina. Krakmolo granulės gali būti 1–100 μm skersmens dydžio (1.9 pav.). Gali vyrauti vieno arba kelių dydžių granulės, forma gali būti apvali, ovali, pailga, išgaubta ar įgaubta kaip lęšis arba daugiakampė (Tester et al., 2004). Krakmolo granulėje esanti amilozė ir amilopektinas išsidėsto sluoksniais, t. y. augimo žiedais. Didėjant kraskmolo granulėi daugėja ir sluoksnių, kadangi augimas vyksta nuo centro link kraštų. Krakmolo granulę sudaro pusiau kristaliniai bei amorfiniai regionai (1.9 pav.). Pusiau kristalinį regioną sudaro dvigrandis amilopektinas, o amorfinį – amilozės viengrandis polimeras kartu su šakotais amilopektino segmentais (Dome et al., 2020). Amilozė yra nešakota linijinė D-gliukozės monomerinė grandinė, sujungta α -1,4-glikozidiniais ryšiais, jos ilgis 50–1000 D-gliukozės vienetų.

Amilopektinas yra šakotas polisacharidas, susijungiantis per α -1,6-gliukozidinį ryšį, grandinės ilgis 200–1000. Atsižvelgiant į kraskmolo augalinę kilmę, santykinis amilozės procentas yra nuo 10 % iki 30 %, o amilopektino – nuo 70 % iki 80 % (Yu et al., 2021).



1.9 pav. Grafinė kraskmolo granulės struktūros schema

Fig. 1.9. Graphical illustration of the starch granule structure

Pagrindinės krakmolo savybės, kurios lemia jo panaudojimą, yra:

- Amilozės ir amilopektino santykis, nuo jų priklauso klampa ir gelio susidarymas.
- Amilozės ir amilopektino molekulių struktūra.
- Krakmolo granulių molekulinė masė, dydis ir forma, nuo jų priklauso brinkimo greitis.
- Kleisterizacijos temperatūra.

Krakmolo savybės, į kurias atsižvelgiama norint jį tikslingai panaudoti, yra šios: kristališkumas, jo tipas (A, B, C), granulės dydis. Kristališkumo laipsnis lemia krakmolo fizikines ir chemines savybes, tokias kaip kietumas, tankumas, skaidrumas ir reakingumas. Tačiau šios savybės priklauso ne tik nuo kristališkumo laipsnio, joms taip pat turi įtakos granulių dydis ir kristalų struktūros tipas. Šios krakmolo savybės lemia, kokioje pramonės šakoje jis bus naudojamas: maisto (pvz., jogurtai, saldainiai guminukai), vaistų (pvz., tablečių užpildas), popieriaus (pvz., klijai) gamyboje. Dažnai natūralus krakmolas nepasižymi stabiliomis savybėmis, todėl norint turėti polimerą, kuriam būdingos tikslinės savybės, būtina jį modifikuoti. Modifikaciją galima atlikti cheminiais, fermentiniais arba mechaniniais metodais (Dome et al., 2020; Jiang et al., 2020).

1.3. Dažniausiai aptinkami lignoceliuliozines medžiagas skaidantys mikroorganizmai

Visus gamtinius polimerus, esančius natūralioje aplinkoje, veikia mikroorganizmai. Tiek sausumoje, tiek vandenyje pagrindiniai skaidytojai yra grybai (siūliniai grybai, bazidiomicetai, aktinomicetai), aerobinės ir anaerobinės bakterijos, hemofilinės, termofilinės bakterijos. Mikroorganizmai yra labai svarbūs anglies, kaip cheminio elemento, apykaitos cikle Žemėje. Visa tai veikia pasaulio ekologiją, biogeochemiją, žemės ūkį bei pramonę (Juturu et al., 2014). Augalai, įskaitant kanapes (*Cannabis sativa subsp. sativa*), turi skirtingų naudingų mikroorganizmų bendruomenių ant savo audinių ir jų viduje nuo to momento, kai yra pasėjami į dirvą. Mikrobiota prisideda prie augalų augimo skatinimo, palengvina mineralinių maistinių medžiagų pasisavinimą, stimuliuoja gynybinio atsparumo patogenams mechanizmą, nulemia didesnę derlių ir moduliuoja antrinius augalų metabolitus (Taghinasab et al., 2020). Gaminant augalinės kilmės kompozitines plokštes, šios mikroorganizmų bendrijos iš dalies išlieka gyvybingos ant kanapių spalų arba jų viduje. Susidarius palankioms sąlygoms, mikroorganizmai pradeda augti, maistinių medžiagų šaltiniu tampa pats augalinės kilmės kompozitas, todėl įvyksta jo degradacija.

Kristalinės celiuliozės biologinės degradacijos metu reikalingi įvairūs fermentai, kurių veikimas pasižymi sinergija. Įvairūs mikroorganizmai, įskaitant

ir siūlinius (filamentinius) grybus, išskiria celiuliozę degraduojančius fermentus. Grybų, daugiausia gaminančių celiulazinius fermentų kompleksus, rūšys yra šios: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophillum* ir *Aspergillus*. Šių rūšių produkuojami fermentai yra termostabilūs. Skaidantys celiuliozę mikroorganizmai gamina ląstelės sienelės ardančius fermentus, bet tik nedaugelis jų geba sintetinti tokius fermentus, kurie ardytų natūralią celiuliozę. Miceliniai grybai ardo celiuliozės substratus ir yra pagrindiniai organizmai, turintys visą celiuliozei transformuoti reikalingą fermentų rinkinį (Zhang et al., 2004).

Celiuliozės turintys augalų likučiai, t. y. šiaudai, durpės, nukritę lapai, žolėdžių mėšlas, naudojami norint pagerinti dirvos struktūrą. Dirvožemyje esantys mikroorganizmai skatina bei greitina celiuliozės irimą augalinės kilmės liekanose. Mikroorganizmų gebėjimas ardyti celiuliozę svarbus biosferai, nes dalyvauja medžiagų apytakos procesų rate (Strain et al., 2002).

Aspergillus fumigatus – pelėsinis grybas, priklausantis eurotiomicetų klasei bei labiau paplitęs negu kiti jo genties atstovai, nes, palyginus su kitomis rūšimis, ši rūšis turi daugiau galimybių išgyventi ir augti įvairesnėmis aplinkos sąlygomis. Ši rūšis taip pat aptinkama kaip saprofitas, atliekantis esminį vaidmenį perdirbant anglį ir azotą dirvožemyje, kuris yra natūrali *A. fumigatus* buveinė. Manoma, kad ši rūšis virulentiška (Hong et al., 2005).

Rhizopus oryzae, priklausantis zigomicetų klasei (mucormycetes), seniau vadintas *Rhizopus arrhizus*, siūlinis grybas. Jie randami visame pasaulyje ir dažnai siejami su yrančiomis augalinės kilmės medžiagomis, maisto atliekomis, vaisiais, riešutais, įvairiomis grūdinėmis kultūromis, žaliosiomis atliekomis (Horwitz, 2013). *Rh. oryzae*, kaip saprofitinis ir patogeninis grybas, gamina daug įvairių metabolitų, todėl svarbus tiek komerciniu, tiek medicininio požiūriu (Barnita et al., 2011). Šiai grybų rūšiai būdingas lytinis dauginimasis zigosporomis ir nelytinis sporomis arba hifais. Pramonėje *Rhizopus* rūšies grybai naudojami keliose Azijos šalyse, tradiciškai fermentuojant maisto produktus, tokius kaip tempė (t. y. fermentuota sojų masė). Jie žinomi kaip metabolitų, organinių rūgščių (pvz., pieno, fumaro), etanolio ir hidrolizinių fermentų (pvz., gliukoamilazės, poligalakturonazės) gamintojai iš cukraus ir žemės ūkio atliekų, tokių kaip miežiai, valgomasis manijokas, kukurūzai, bulvės, avižos (Battaglia et al., 2011). Klinikinės šių pelėsinų grybų sukeltos infekcijos apibūdinamos kaip zigomikozinės, ~70 % jų sukelia *Rhizopus* rūšys. Taip pat *Rh. oryzae* genomo struktūra labai siejasi su saprofitine veikla, t. y. gebėjimu skaidyti angliavandenius.

Palyginus su kitais grybais (1.5 lentelė), tokiais kaip askomicetais ir bazidiomicetais, aktyvių genų randama daugiau negu mielėse, bet mažiau nei siūliniuose askomicetuose, pvz., *Aspergillus fumigatus*.

1.5 lentelė. Genų, koduojančių fermentus, kurie geba skaidyti angliavandenius, skaičius (Battaglia et al., 2011)

Table 1.5. Number of genes encoding putative carbohydrate-degrading enzymes

Gentis	Rūšis	Glikozidazės	Glikoziltransferazės	Polisacharidų liazės	Karbohidrato esterazės	Angliavandenių surišantys moduliai
Zigomicetai	<i>Rhizopus oryzae</i>	116	130	6	41	24
Askomicetai	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45	68	0	3	12
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	267	103	14	33	57

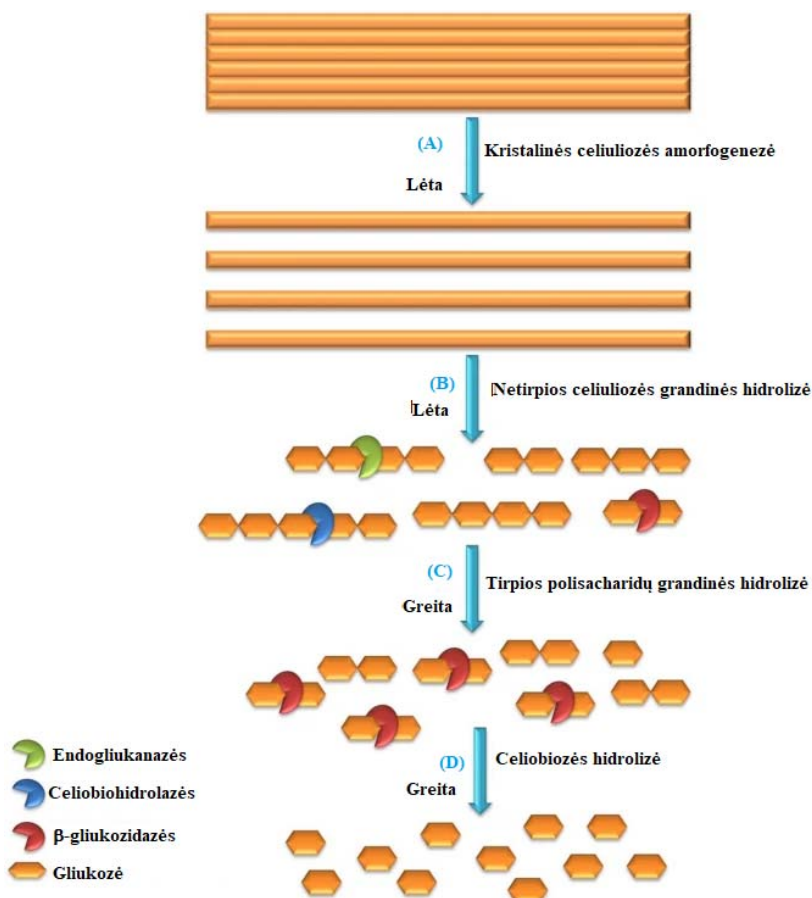
Pseudomonas putida yra lazdelės formos, sporų neformuojančios, saprotrofinės bakterijos, kurios formuoja biofilmus ant biotinių ir abiotinių paviršių (Molina et al., 2020). Dažnai jos naudojamos biotechnologijos pramonėje bei cheminių medžiagų gamyboje (Weimer et al., 2020). *P. putida* yra gramneigiama bakterija, kuri dėl savo universalios medžiagų apykaitos ir mažų mitybos poreikių auga įvairiose ekologinėse buveinėse, geba prisitaikyti prie sudėtingų sąlygų, tokių kaip aukšta temperatūra, pH ir toksinai, todėl randama užterštose ekosistemose (Silby et al., 2011; Martins et al., 2004). Ji taip pat skaido aromatinčius ir alifatinius angliavandenilius, pavojingas chemines medžiagas, pavyzdžiui, tokias, kurios susidaro deginant kurą, anglį, tabaką ir kitas organines medžiagas (Ward et al., 2005). Mikroorganizmai suskaido teršalus į nepavojingus produktus, pavyzdžiui, CO₂ ir H₂O. *P. putida*, palyginus su kitomis teršalus skaidančiomis *Pseudomonas* rūšimis, yra saugesnė, skirtingai negu *P. aeruginosa*, kuri žmogui patogeniška (Folkesson et al., 2012). *P. putida* nesudėtinga genetiškai modifikuoti, tai leidžia ją panaudoti įvairiems tikslams, tokiems kaip organinių junginių, skirtų farmacijai ar žemės ūkiui, sintezei naudojant įvairius substratus (Poblete-Castro et al., 2012).

1.3.1. Celiuliozės skaidymas

Daugelis siūlinių (filamentinių) grybų išskiria aktyvių fermentų kompleksus (Payne et al., 2015), kurie daugiausia būna sudaryti iš glikozidazės EC 3.2.1 (GH)

klasės fermentų, skaidančių polimerinį junginį celiuliozę iki gliukozės molekulių, dalyvaujant vandeniui, bei kitokių fermentų, reikalingų ligninui, hemiceliuliozei, pektinui skaidyti (Thygesen, et.al., 2005; Payne et al., 2015). Tai priklauso nuo paties mikroorganizmo, jo substrato, funkcijų.

Celiuliozė yra tvarkingos ir kompaktiškos struktūros netirpus polimeras, turintis amorfinių vietų, per kurias lengviausiai įvyksta struktūrinės pažaidos. Šios pažaidos dar kitaip vadinamos amorfogenezėmis. Jas lemia baltymai, kuriuos gamina kai kurie celiuliotiniai mikroorganizmai, pvz., *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bjerkandera adusta*, *Aspergillus fumigatus*. Šie amorfogeneziniai baltymai paveikia celiuliozės kristalinę struktūrą (1.10 pav.), kuri tampa lengviau prieinama mikroorganizmų išskiriamiems fermentų kompleksams.



1.10 pav. Celiuliozės skaidymo schema (Gourlay et al. 2013)

Fig. 1.10. Scheme of cellulose degradation

Celiuliozės fermentinei degradacijai būdingi keli etapai:

1. Celiuliolitinių fermentų komplekso difuzija ant celiuliozės substrato.
2. Celiuliolitinių fermentų komplekso adsorbicija į celiuliozės mikroplausus.
3. Aktyvaus celiulazės ir substrato komplekso susidarymas.
4. Celiuliozės polimero glikozidinių ryšių hidrolizė.
5. Hidrolizės produktų difuzija.
6. Celiuliozinių fermentų komplekso desorbicija iš hidrolizuoto substrato.

Šiuo metu pasaulyje tiriami biocheminiai/fermentiniai principai, lemiantys pirmąją celiuliozinio plaušo hidrolizę. Teoriškai sumodeliavus celiuliozės struktūrą, kuri yra nepralaidi vandeniui, sunku paaiškinti, kodėl prasideda hidrolizė. Molekulinės dinamikos būdu gauti modeliai parodė, kad norint fermentais dekrystalizuoti celiuliozę iki vienetinės grandinės, reikia didelių energetinių sąnaudų. Tyrimų duomenimis nustatyti papildomi baltymai, kurie palengvina celiuliozės pluošto skaidymą. Šis poveikis – celiuliozės amorfogenezė, apibūdinamas kaip nehidrolizuojantis atpalaidavimas arba celiuliozės substrato sutrikimas, vis labiau pripažįstamas vienu iš pagrindinių fermentinių dekonstrukcijos etapų celiuliozės biomasės skaidymo procese. Terminas „amorfozė ar amorfogenezė“ pasiūlytas norint apibūdinti bet kurią iš šių nehidrolitinių baltymų sukeltų reiškinių: atsluoksniavimą, defibriliavimą, išbrinkinimą, atpalaidavimą, šurkštėjimą, ruplėjimą / duobėjimą (angl. *pitting*), silpnėjimą, arba lignoceliuliozės ir celiuliozės dekrystalizavimą (Arantes et al., 2010).

Baltymai, indukuojantys amorfogenezę, nėra iki galo ištirti. Dabar jau manoma, kad gali būti, kad jie dalyvauja visuose celiuliozės hidrolizės etapuose. Numanoma, kad yra dvi grupės nehidrolitinių baltymų. Tokių, kurių katalitinis mechanizmas nežinomas: tai yra išbrinkio (angl. *swollenening*), atpalaiduojantys (angl. *loosening*), plečiantys (angl. *expansins*) ir keletas pirmos bei antros CBMs (angliavandenių prisijungimo modulis) šeimų. Kiti yra tokie, kurių katalitinis mechanizmas yra tiesioginis oksidacinis kelias, pvz., GH6, ir CBM 33 šeimos fermentai. Manoma, kad abiejų grupių baltymai skirtingai atpažįsta substratą. Pavyzdžiui išbrinkinantis (angl. *swollenening*), atpalaiduojantis (angl. *loosening*), plečiantys (angl. *expansins*) baltymai sutrikdo vandenilinius ryšius. Kita grupė yra oksiduojantys baltymai, kurių katalitinis centras tiesiogiai veikia ant substrato paviršiaus per specifinius radikalus, kurie sukelia celiuliozės grandinių skilimą. Šias dvi fermentų grupes sieja bendras tikslas – padaryti celiuliozės polimerą tirpų (1.6 lentelė) (Gourlay et al., 2012), lengvai prieinamą kitiems hidrolizės baltymams.

1.6 lentelė. Nehidrolitiniai baltymai, dalyvaujantys lignoceliuliozės skaidymo procese
Table 1.6. Non-hydrolytic proteins involved in lignocellulose deconstruction

Baltymai, kurių katalitinis mechanizmas neaiškus	Galima baltymų funkcija
1 ir 2 CBMs šeima	Plaušo šiurkštinimas, duobėjimas, mažų dalelių atskėlimas
Plėtros / plečiantys (ekspansiniai)	Augalinės ląstelės sienelių susilpninimas, oligomerinių angliavandenių soliubilizavimas
Brinkimo fermentai	Celiuliozės dispersija į agregatus
Baltymai, formuojantys fibriles	Filtrinio popieriaus fibrilių atskyrimas / paleidimas
Galimas baltymų (oksidacinis) katalitinis mechanizmas	Galima baltymų funkcija
GH61	Kristalinės celiuliozės oksidacinis skėlimas
CBM33	Kristalinės celiuliozės oksidacinis skėlimas

Plečiantys (angl. *expansins*) baltymai dažniausiai randami augaluose, kai kuriais atvejais ir grybuose. Šie baltymai augimo metu atpalaiduoja ląstelės sienelės kompaktišką bei griežtą struktūrą arba kartu su endotransglikozilaze suardo celiuliozės kristališkumą (Enongene et al., 2013). Daugelis tyrimų rodo, kad šie nehidrolitiniai baltymai ardo vandenilinius ryšius tarp polisacharidų, taip padarydami „skyles“ tarp celiuliozės mikrofibrilių. Manoma, kad plečiantys baltymai veikia kaip atitraukiamas užtrauktukas, t. y. atskiria vieną nuo kitos mikrofibrilės, o tai padidina galimybę celiulazės kompleksų fermentams prieiti prie celiuliozės grandinių. Nepaisant to, kad plečiantys baltymai neturi hidrolitinio aktyvumo, jie padidina celiulazės veikimo efektą, pvz., grybų *Trichoderma reesei* celiuliozės skaidymą padidino 13 % (Barcelos et al., 2016).

Brinkimo (angl. *swollening*) baltymai – grybinės kilmės, panašūs į plečiančius (angl. *expansins*) baltymus savo funkcijomis – amorfogenezės stadijoje išardo vandenilinius ryšius tarp celiuliozės mikrofibrilių, taip atpalaiduodami celiuliozės struktūrą, ją disperguodami. Tuomet atsiranda pavienių grandinių ir tai padidina galimybę greičiau suveikti celiulazėms. Šie fermentai taip pavadinti, nes pirmiausia pastebėti išbrinkinant medvilnės plaušus (Barcelos et al., 2016; Meng et al., 2014).

Ilgai manyta, kad svarbiausi celiuliozės ir hemiceliuliozės depolimerizavimo fermentai yra hidrolazės. Dabar jau nustatyta, kad oksidacinių fermentų, polisacharidinės monooksigenazės (PMO iš AA9 fermentų šeimos) kombinacija su celobiozės dehidrogenaze (CDH) padidina hidrolizinių fermentų poveikį. Šie fermentai (priklausantys nuo vario jonų) veikia celiuliozės skilimą oksidaciniais

būdu įtraukiant mažos molekulinės masės reduktorių arba CDH. Keletas tyrimų parodė, kad CDH/PMOs kombinacija paspartina celiuliozės degradaciją (Barcelos et al., 2016; Segers et al., 2016).

Po kanapių pluošto atskyrimo nuo spalio jame lieka iki 34–44 % celiuliozės (Thomsen et al., 2005). Celiuliozė tampa lengviau prieinama celiulazėms, todėl prasideda jos depolimerizacija veikiant endogliukanazėms (EC 3.2.1.4), egzogliukanazėms, arba kitaip celiobiazėms (EC 3.2.1.91), bei β -gliukozidazėms (EC 3.2.1.21). Šie fermentai hidrolizuoja β -1,4 kovalentinius ryšius, jungiančius gliukozės molekules į celiuliozės grandinę. Endogliukanazė atsitiktinai hidrolizuoja β -1,4 amorfinės celiuliozės vietas padarydama redukuotus arba neredukuotus galus. Jie klasifikuojami CAZy duomenų bazėje kaip GH5, GH7, GH12 ir GH45. Celiobiazė (CBHs, cellulose 1,4-b-cellobiosidasės, EC 3.2.1.91) dalyvauja procese atskeliant celiobiozę nuo bet kurio redukuoto (GH7 CBHs) arba neredukuoto galo (GH6 CBHs), kai jau dalį celiuliozės yra suskaldžiusios endogliukanazės. CBH yra tunelinės struktūros, tai leidžia fermentui judėti grandinės paviršiumi iki kitos skilimo vietos, atskiriant produktą. Fermentas β -gliukozidazė (GH1 ir GH3) hidrolizuoja celobiozę iki gliukozės. Šis fermentas apibūdinamas kaip turintis topologinę kišenę, kuri aptinka celiuliozės grandinėje neredukuotą galą ir atskelia vieną angliavandenio liekaną. Tiek egzogliukanazė, tiek β -gliukozidazė stipriai slopinamos reakcijų produktais, t. y. celiobioze ir gliukoze (Gupta et al., 2016).

Pagrindinės pluoštinių termoizoliacinių medžiagų sudėtinės dalys yra celiuliozė, ligninas, hemiceliuliozė, pektinas. Visus šiuos polimerinius junginius veikia mikroorganizmai. Pasaulyje yra labai daug darbų, nagrinėjančių, kaip pagreitinti biomasės (t. y. lignoceliuliozės ir hemiceliuliozės komplekso) skilimą, siekiant kuo daugiau gauti bioetanolio. Tuo pat metu nepakankamai plačiai išnagrinėta, kaip apsaugoti pluoštinių kanapių struktūrą nuo žalingo mikroorganizmų poveikio. Natūraliai degraduojant celiuliozei, formuojasi ir natūralūs inhibitoriai, pvz., aromatiniai, fenoliniai junginiai, organinės rūgštys. Taip pat nemažą įtaką turi ir neorganiniai junginiai, t. y. druskos CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , NH_4Cl , KH_2PO_4 ir t.t. Norint apsaugoti pluoštines termoizoliacines medžiagas, pirmiausia reikia neleisti įvykti amorfogenezei, ir tai galima padaryti pluoštą padengiant lipidų sluoksniu (Gourlay et al., 2013).

1.3.2. Krakmolo skaidymas

Ekologiškuose augalinės kilmės kompozituose kaip risiklis dažnai naudojamas krakmolas. Krakmolą skaido amilaziniai fermentai, kurie hidrolizuoja glikozidinius ryšius. Šie fermentai paplitę alaus, tekstilės, popieriaus, ploviklių ir farmacijos pramonėse. Jie taip pat naudojami maltozės, oligosacharidų mišinių ir fruktozės sirupo gamybai.

Amilolitiniai fermentai susideda iš trijų pagrindinių pogrupių. Jie geba hidrolizuoti α -gliukozidinius ryšius krakmole, pasižymi tarpusavyje struktūriniais ir kataliziniais skirtumais (Carrasco et al., 2016). Amilazių grupės:

α -amilazė (1,4- α -D-gliukano gliukanohidrolazė, EC 3.2.1.1) yra endoamilazė, kuri atsitiktiniu būdu hidrolizuoja α -1,4 glikozidinius ryšius krakmolo polimero vidinėje dalyje. Taip susidaro skirtingo grandinės ilgio linijiniai ir šakoti oligosacharidai (maltotriozė, dekstrinai) bei maltozė ir gliukozė (Mojsov et al. 2018; Shoa 2019).

β -amilazė (1,4- α -D-gliukano maltohidrolazė, EC 3.2.1.2) yra egzoamilazė, kuri veikdama nuo neredukuoto galo katalizuoja antrosios α -1,4 glikozidinės jungties hidrolizę, vienu metu atskirdama du gliukozės vienetus, kurie sudaro maltozė (Mojsov et al., 2018; Visvanathan et al., 2020). Bręstant vaisiams, β -amilazė krakmolą skaido į maltozė, todėl gaunamas saldus prinokusių vaisių skonis (Fadhil et al., 2020)

γ -amilazė (gliukoamilazė, EC 3.2.1.3) – egzoamilazė, hidrolizuojanti α -1,4 ir α -1,6 glikozidinius ryšius nuo išorinių amilozės ir amilopektino gliukozės liekanų nuo neredukuoto galo, reakcijos produktas yra gliukozė (Robledo-Mahón et al., 2020).

1.4. Aliejinės dangos

Klasikinis lignoceliuliozinės kilmės medžiagų konservavimo būdas yra impregnavimas augalinės kilmės aliejais. Kadangi aliejaus pramonė visame pasaulyje yra išvystyta, iš jų gaunamos riebalų rūgštys, kurios naudojamos polimerų chemijoje. Perdurbant aliejų gali būti taikomos įvairios cheminės modifikacijos, dėl kurių atsiranda daugybė monomerų ir polimerų bei reikiamų savybių (Chaiyasit et al., 2007; Hussain et al., 2018). Svarbiausia, kad naudojant šią atsinaujinančią žaliavą gamtos potencialas labai didelis, todėl norint gauti tinkamus monomerus įvairioms paskirtims, reikia atlikti tik keletą modifikavimo reakcijų (Montero De Espinosa et al., 2011). Augalinės kilmės aliejai gali būti labai veiksmingi medienos apsaugai ir konservavimui dėl savo priešgrybinių ir antibakterinių savybių, taip pat veikia prieš termitus ir nematodus, yra veiksmingi vandens repelentai ir kaip apsauginės dangos nuo UV spindulių. Todėl modifikavimo procesai cheminiais ir terminiais metodais veiksmingai taikomi augaliniams aliejams, dalyvaujantiems apsauginių dangų formavimo procese (Teacă et al., 2019).

Priklausomai nuo augalo rūšies ir vietovės, kurioje jis augo, aliejus gali geriau arba blogiau formuoti apsaugines dangas. Kadangi aliejai daugiausia sudaryti iš trigliceridų, kurie skiriasi sočiųjų ir nesočiųjų rūgščių kiekiu (1.7 lentelė), išskiriamos trys pagrindinės aliejų kategorijos: džiūstantys, pusiau džiūstantys

aliejai ir visai nedžiūstantys. Dvi pirmosios paminėtos aliejų kategorijos naudojamos medienai impregnuoti ir kaip rišamosios medžiagos dažų ir lakų gamyboje. Pusiau džiūstantys ir nedžiūstantys aliejai naudojami kaip alkidų modifikatoriai ir kaip plastifikatoriai nitroceliuliozės pagrindo dangose.

1.7 lentelė. Džiūstančių aliejų sudėtis

Table 1.7. Composition of the drying oils

Sočiosios rūgštys ir jų kiekis aliejuose (%)	Tungų medžio aliejus (Oyman et al., 2005; Xu et al., 2017)	Linų sėmenų aliejus (Dotan 2014; Bayrak et al., 2010; Teh et al., 2013)	Kanapių sėklų aliejus (Teh et al., 2013; Callaway 2004)
Palmitino rūgštis (C16:0)	3–5,2	6–7	4–8
Oleino rūgštis (C18:1)	4–11	14–24	8–17
Stearino rūgštis (18:0)	2	3–6	2–3
Linolo rūgštis (C18:2)	7,5–15	14–19	50–70
α-linoleno rūgštis (C18:3n3)	3	48–60	12–25
γ-linoleno rūgštis (C18:3n6)	n*	n*	0–6,8
α-eleostearinė rūgštis (C18:3)	59–83,3	n*	n*

*nenustatyta

Hidrofobinė danga susiformuoja keliais etapais: pirmiausia vyksta aliejaus pirminė ir antrinė (vykstanti, kol aliejus galutinai sustingsta) oksidacija, tada garavimas, t. y. masės mažėjimas, ir galiausiai aliejaus sustingimas (Lazzari et al., 1999). Aliejui garuojant išsiskiria alkoholiai, ketonai, aldehydai, epoksidai ir kiti mažamolekuliniai junginiai, kurie susidaro pirminės oksidacijos metu suskilus susidariusiems hidroperoksidams. Po garavimo etapo likęs aliejus klampesnis ir mažiau takus, prasideda jo stingimas. Stingimui / kietėjimui būdinga keletas etapų: pirmasis iš dalies sutampa su garavimu, t. y. iki erdvinės struktūros atsiradimo, takumo ir tirpumo praradimo (iki gelio susidarymo taško), o antrasis – po gelio susidarymo taško, iki ribinių kietėjimo fazių susidarymo, kai susiformuoja apsauginė danga (Chen et al., 2011).

1.4.1. Kanapių sėklų aliejus

Kanapės (lot. *Cannabis sativa*) yra vienas iš seniausių universaliųjų augalų, kurie auginami kaip maisto, aliejaus, pluošto ir vaistų šaltinis jau tūkstančius metų Europoje ir Kinijoje. Nepaisant universalumo, kanapių auginimas buvo

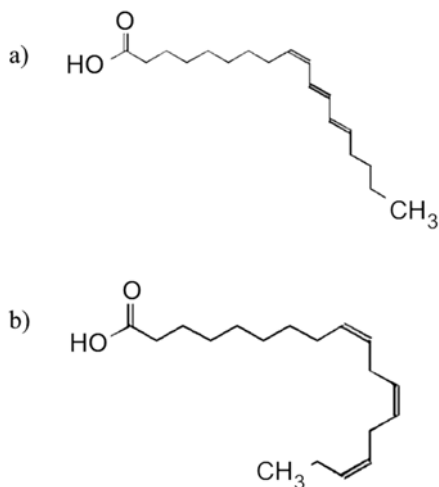
uždraustas daugelyje vakarų šalių nuo 1930 m., nes jos turi vaistinio komponento δ -9-tetrahidrokanabinolio (THC) (Siano et al., 2019). Kanapių sėklose aliejus yra vienas pagrindinių komponentų, jo yra apie 35 %. Šis produktas dėl naudos sveikatai labai vertinamas, nes veikia kaip antioksidantas, puikiai tinka cholesterolio ir kraujospūdžio bei širdies ir kraujagyslių ligoms bei onkologiniams susirgimams gydyti. Be to, šis aliejus taip pat naudojamas farmacijos ir kosmetikos pramonėje kaip drėkiklis, mažinantis odos sausumą (Callaway 2004). Kanapių sėklų aliejaus pagrindinė sudedamoji dalis yra triacilgliceroliai (TAG). Likusi dalis sudaro apie 1,5–2 % ne TAG medžiagų. Kai kurie iš šių komponentų, pavyzdžiui, tokoferoliai ir polifenoliai, pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, kurios apsaugo oksidacijos metu gaunamą aliejų, gali būti naudingi sveikatai, bet, kita vertus, jie nepageidaujami, nes blogina aliejaus kokybę veikdami spalvą, skaidrumą, maistinę vertę ir oksidacinį stabilumą. Kiti komponentai, tokie kaip karotenoidai, fitosteroliai, kiti vitaminai ir maisto mineralai, daro įtaką aliejaus maistinei vertei ir kokybei. Žinomi keturi skirtingi tokoferolių ir tokotrienolių izomerai: α -, β -, γ - ir δ , iš kurių γ -tokoferolis pasižymi didžiausiu antioksidaciniu aktyvumu. Kanapių sėklų aliejuje tokoferolių yra daug daugiau lyginant su kitais maistiniais aliejais, o tokotrienolių yra labai mažai (Liang et al., 2015). Todėl kanapių sėklų aliejaus gamintojai paprastai parduoda savo produktus kaip gerą vitamino E šaltinį, pasižymintį dideliu antioksidaciniu aktyvumu. Kanapių sėklų aliejuje bendras tokoferolių kiekis yra nuo 80 iki 150 mg/100 g aliejaus, kuriame vyraujantis izomeras γ -tokoferolis sudaro 85–91 % viso tokoferolių kiekio. Šis kiekis skiriasi priklausomai nuo veislės, agronominių sąlygų, perdirbimo būdo ir laikymo sąlygų. Kitų izomerų yra daug mažiau, α -, β -, γ -, δ - tokoferolių santykis yra atitinkamai 5:2:90:3.

1.4.2. Linų sėmenų aliejus

Nuo XV amžiaus linų (lot. *Linum usitatissimum*) sėmenų aliejus buvo plačiai naudojamas lakuose ir aliejiniuose dažuose, taip pat gydymui, medienos apsaugai bei gaminant grindų dangas iš natūralių medžiagų mišinio. Šiais laikais jis taip pat naudojamas pramoniniuose tepaluose, gydymui, odos gaminiuose. Kadangi linai auginami keliose geografinėse vietovėse, tokiose kaip Europa, Šiaurės ir Pietų Amerika (ypač Argentina) ir Azija (ypač Indija), sėmenų aliejaus sudėtis atspindi augimo, agronomines ir aplinkos sąlygas. Klimatas ypač daro įtaką nesočiųjų riebalų rūgščių kiekiui aliejuje: kuo šaltesnis klimatas, tuo daugiau nesočiųjų riebalų rūgščių (Chang et al., 2019). Linų sėmenyse randama apie 37,1 % aliejaus, 28,9 % angliavandenių, 20,3 % baltymų, 4,8 % maistinių skaidulų, 6,5 % vandens ir 2,4 % mineralinių medžiagų (Suri et al., 2020). Linų sėmenų aliejus yra vienas iš augalinės kilmės aliejų, gausiausiai turinčių ω -3 riebiųjų rūgščių, pavyzdžiui, α -linoleninės rūgšties, kurios gali būti 48–60 % (Goyal et al., 2014).

1.4.3. Tungų medžio aliejus

Nuo senų laikų dar iki Kristaus gimimo Kinijoje tungų medžio kaulavaisių aliejus buvo dažnai naudojamas medinių dirbinių, tokių kaip laivai, buities įrankiai ir priemonės, apsaugai. Dabar šiuo aliejumi konservuojami istorinę vertę turintys medienos dirbiniai. Į Europą tungų medžio aliejus įvežtas devyniolikto amžiaus pabaigoje ir pradėtas naudoti apsauginių dangų pramonėje (Oyman et al. 2005; Janesch et al., 2020). Tungo medžio aliejus priklauso džiūstančių aliejų grupei. Jis išgaunamas iš tungų medžio *Aleuritis fordii* kaulavaisių branduolių. Yra žinoma ir keletas tungų medžio rūšių, t. y. japoniškų *Aleuritis cordata* ir *Aleuritis montana* aliejai. Visi labai panašūs savo chemine kompozicija: jų sudėtyje yra 70–86 % α -eleosterinės rūgšties, cis9, trans11, trans13-oktadekatrieno rūgšties, konjuguotos polieno rūgšties (1.11 pav.) ir su ja susijusių trigliceridų (Johns et al., 2016).



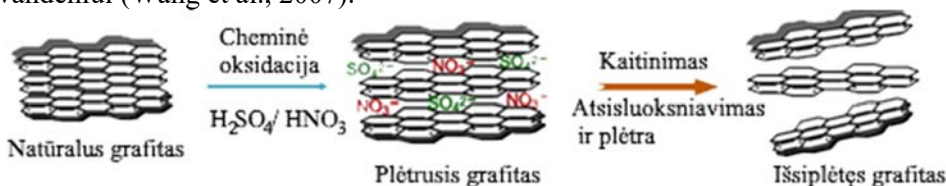
1.11 pav. a) α -Eleostearinė rūgštis (cis, trans, trans-9, 11, 13-oktadekatrieno rūgštis);
 b) linoleno rūgštis (cis, cis, cis, 9, 12, 15 oktadekatrieno rūgštis)
Fig. 1.11. a) α -Eleostearic acid (cis, trans, trans - 9, 11, 13 octadecatrienoic acid);
 b) Linolenic acid (cis, cis, cis, 9, 12, 15 octadecatrienoic acid)

Dėl didelio trigliceridų kiekio su trigubomis nesočiosiomis konjuguotomis riebalų rūgštimis šis aliejus greitai autooksiduojasi, kai jungiasi polimerų grandinės viena su kita (angl. *crosslinking*). Dėl šių cheminių reakcijų džiūvimo metu susiformuoja dangos (Oyman et al., 2005; Xu et al., 2017; Chalapud et al., 2020).

1.5. Plėtrusis grafitas kaip antipireninis priedas celiulioziniame kompozite

Natūralūs pluoštai, gauti iš kanapių, linų, medvilnės, džiuoto, naudojami tekstilės pramonėje, o likusios augalų dalys, kuriose yra celiuliozės, statybų, bioetanolio, biodujų ar biokuro pramonės šakose. Medvilnės, kanapių ir linų pluoštai naudojami drabužių, tekstilės ir apmušalų pramonėje, o jų stiebai kaip statybinių kompozitų užpildai. Natūralios gamtinės kilmės celiuliozinės medžiagos, be daugybės privalumų, turi ir tam tikrų trūkumų, pvz., degumas ir vandens sugertis. Abi savybės lemia, kad celiuliozines medžiagas reikia apdoroti hidrofobizatoriais ir antipireniais. Degumą galima sumažinti veikiant juos įvairiais junginiais, tarp kurių svarbiausi yra chloro, bromo druskos (halogeniniai), fosforo dariniai, azoto pagrindo druskos, fosforo ir azoto kompozicijos, plėtrusis grafitas (Przybylak et al., 2016).

Plėtrusis grafitas pasižymi ne tik degumą mažinančiomis savybėmis, bet ir gerina atsparumą vandeniui bei mikroorganizmams, ypač kai jis įmaišytas į apsaugines dangas (Wang et al., 2007). Plėtrusis grafitas pasidengia ant paviršiaus kaip žvynai, t. y. išsidėsto lygiagrečiai sudarydamas daugiasluoksnę dangos struktūrą. Lygiagrečiai išdėstyta plėtriojo grafito dribsnių struktūra dangoje padidina vandens ir jonų difuzijos kelio (trajektorijos) ilgį per dangą. Tai sulėtina vandens ir jonų prasiskverbimą per plėvelę. Taigi, specifinės plėtriojo grafito barjerinės savybės sulėtina liepsnos plitimą bei padidina dangos atsparumą vandeniui (Wang et al., 2007).



1.12 pav. Plėtriojo grafito veikimo principinė schema (Hung et al., 2017)

Fig. 1.12. Mechanism of action for expandable graphite

Plėtrusis grafitas gaunamas sumaišius natūralios kilmės grafitą dažnai su H_2SO_4 ir H_3PO_4 arba HNO_3 santykiu 1:3:9. Šie oksidatoriai įsiterpia į grafito struktūrą, migruoja tarp grafeno sluoksnių grafito kristale, tačiau kovalentiniai ryšiai išlieka stabilūs (Hu et al., 2014). Kaitinimo metu toks grafitas su įterptomis medžiagomis plečiasi, t. y. išsisluoksniuoja ir išsiplėčia. Kylant temperatūrai, šie interkaliacijos junginiai skyla į dujinius produktus, kurie kelia slėgį tarp grafeno sluoksnių, tokiu būdu jie vienas nuo kito atsisluoksniuoja. Pvz., kaitinant grafitą su H_2SO_4 vyksta redokso reakcija, kurios metu išsiskiria CO_2 , SO_2 ir vanduo.

Grafito tūris padidėja iki 300 kartų, taip sumažinamas jo tankis ir padidinamas paviršiaus plotas iki 10 kartų. Išsiplėtęs plėtrusis grafitas, kurio plotas padidėjęs sudaro „slikeinį“ izoliacinį anglies apsauginį sluoksnį, apsaugo medžiagas nuo karščio ir užkerta kelią ugnies / šilumos plitimui. Vandens ir dujų išsiskyrimas taip pat slopina liepsnos degimą (Zheng et al., 2004; Acuña et al., 2019).

1.6. Pirmojo skyriaus išvados ir disertacijos uždavinių formulavimas

1. Natūralios kilmės termoizoliacinės medžiagos iš celiuliozės pasižymi jautrumu mikroorganizmų ir vandens poveikiui.
2. Celiuliozinių kompozitinių plokščių, kurios formuojamos iš kanapių spalių, savybės nulemia celiuliozės struktūrą, t. y. celiuliozės grandinės struktūroje esančių kristalinės ir amorfinės sričių kiekis, koncentracija ir vieta. Kuo daugiau amorfinių vietų, tuo lengviau į celiuliozinę kompozitą skverbiasi vanduo.
3. Modifikuotas kukurūzų krakmolas, kuris naudojamas popieriaus ar kartono pramonėje, yra tinkamas rišiklis celiuliozinių kompozitų gamybai. Jis pasižymi stabilesnėmis savybėmis, tokiomis kaip klampa ir gelio susidarymas, nei natūralus krakmolas.
4. Celiuliozės destrukcijos mechanizmus lemia grybų išskiriami fermentai celiulazės. Angliavandenių (celiuliozės ir krakmolo), kurių gausu celiuliozinėse kompozitinėse plokštėse, skaidymą efektyviausiai atlieka askomicetų ir zigomicetų klasės grybai. Šie grybai lemia celiuliozinės kompozitinės plokštės degradaciją ir angliavandenių skaidymą.
5. Natūralios kilmės aliejai, tokie kaip kanapių sėklų, linų sėmenų ir tungų medžio, vartojami kaip medienos impregnatoriai, gali būti tinkami padengti apsaugine hidrofobine danga ir celiuliozines kompozitines plokštes.
6. Plėtrusis grafitas, kuris naudojamas celiuliozinėse kompozitinėse plokštėse kaip antipirenas, pasižymi absorbcinėmis ir galimai antimikrobinėmis savybėmis. Norint nustatyti, kokią įtaką daro plėtrusis grafitas mikrobiotos kokybinei sudėčiai, reikia atlikti naujos kartos sekoskaitą.

Atsižvelgiant į literatūros analizės išvadas darbo tikslui pasiekti darbe reikia spręsti šiuos uždavinius:

1. Sukurti ir ištirti kompozitinių plokščių, pagamintų iš celiuliozinių medžiagų, padengtų natūralios kilmės aliejais, fizikines savybes.

2. Nustatyti ant celiuliozinių kompozitinių plokščių augančių mikroorganizmų rūšis, jų poveikį plokščių mechaninėms savybėms ir biodegradavimo aktyvumą.
3. Ištirti mikroorganizmų bendrijų sudėtį celiuliozinės kilmės kompozitinėse plokštėse, birioje celiuliozinėje termoizoliacinėje vatoje, kompostuojamuose celiuliozės mišiniuose su žaliosiomis atliekomis bei kanapių spalvuose.

Iš celiuliozės pagamintų kompozitinių medžiagų tyrimo metodai ir naudotos medžiagos

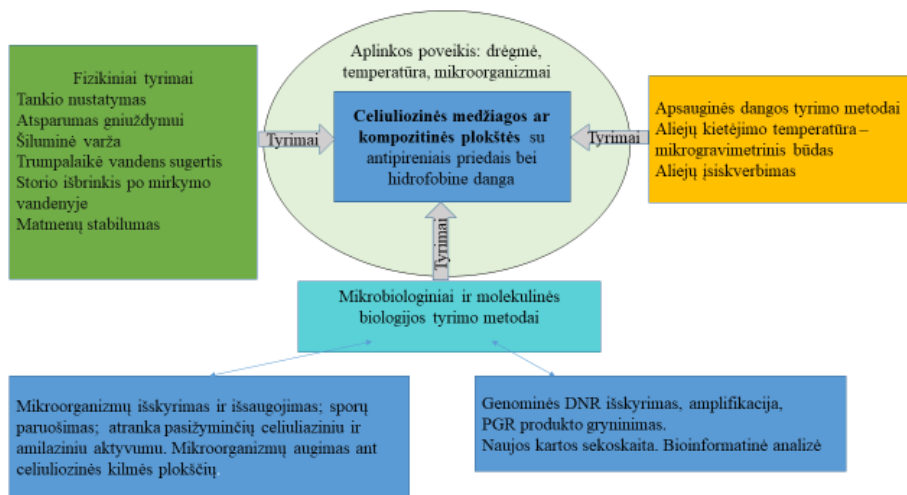
Šiame skyriuje aprašomi fizikiniai, klasikinės ir molekulinės mikrobiologijos metodai. (2.1 pav), tyrimams naudotos medžiagos, įranga.

Celiuliozinės kompozitinės plokštės, kai užpildas kanapių spaliai ir kukurūzų krakmolo ryšiklis, tirtos fizikiniais tyrimais: mikrostruktūrinė analizė, šilumos laidumas, atsparumas gniuždymui, trumpalaikis vandens poveikis.

Morfologiškai mikroorganizmai tirti su optiniu arba elektroniniu skenuojančiu mikroskopu. Mikroorganizmai identifikuotji molekulinės mikrobiologijos metodais, gauti duomenys palyginti su tarptautinėmis duomenų bazėmis. Nustatytas pelėsinių grybų produkuojamų fermentų aktyvumas, pagal spalvinės reakcijos pokyčius.

Taip pat aprašytas apsauginės aliejinės (hidrofobinės) dangos suformavimo metodas.

Skyriaus tematika paskelbti keturi autorės straipsniai (Vasiliauskienė et al., 2020a, 2020b, 2021, 2022).



2.1 pav. Celiuliozinių plokščių tyrimo schema
Fig. 2.1. Scheme of research of cellulose-based composites boards

2.1. Tyrimams naudotos medžiagos ir reagentai

2.1.1. Tyrimo metu naudotos augalinės kilmės plokštės

Augalinės kilmės kompozitinės plokštės pagamintos (dr. Arūno Kremenso) panaudojant kaip užpildą pluoštinių kanapių spalius (dydis 2,5–5 mm), susidarančius po pluošto atskyrimo nuo stiebų. Kukurūzų krakmolos (10 % nuo kanapių spalio svorio, gamintojas *Roquette*, Prancūzija) buvo naudojamas kaip rišiklis, piltinis tankis – apie 550 kg/m³, grynumas ~99,5 %, biologiškai skaidus, netoksiškas, baltos spalvos, bekvapis.

Tyrimo metu naudotos trijų tipų plokštės (2.1 lentelė) F, G, H. Jos skiriasi naudotais antipireniniais priedais.

2.1 lentelė. Celiuliozinių kompozitinių plokščių sudėtis
Table 2.1. Structure of the cellulose-based composites

F tipo plokštė	G tipo plokštė	H tipo plokštė
Kanapių spaliai	Kanapių spaliai	Kanapių spaliai
Kukurūzų krakmolos	Kukurūzų krakmolos	Kukurūzų krakmolos
Fosforo ir azoto neorganinės druskos antipireninis tirpalas	Plėtriojo grafito milteliai kaip antipireninis priedas	–

Fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalo Flovan CGN-01 gamintojas Hunstmann, Šveicarija. Šis antipireninis priedas naudotas F tipo celiuliozinėse kompozitinėse plokštėse.

Plėtriojo grafito miltelių (*Expandable Graphite* 96 M100 10 ($C_{24}(HSO_4)(H_2SO_4)_2$) gamintojas *ProGraphite GmbH*, Vokietija. Šis antipireninis priedas naudotas G tipo celiuliozinėse kompozitinėse plokštėse.

2.1.2. Kompostuojami celiulioziniai mišiniai su žaliosiomis atliekomis

Kompostuojami celiuliozės mišiniai (MIX) buvo sudaryti iš tekstilės atliekų, kurios surinktos iš MULTIWACH tekstilės įmonės, esančios Sidi Ibrahim Feze (Marokas) (2.2 lentelė). Šios tekstilės atliekos iš atraizų, kurių sudėtyje medvilnė su sintetiniais priedais ir kurių liko po naudojimo gamyboje. Visas mišinys laikomas 200 l talpose 44 savaites.

2.2 lentelė. Kompostuojamų celiuliozės mišinių sudėtis
Table 2.2. Composition of compostable cellulose mixtures

Kompostuojamų celiuliozės mišinių sudėtis	Mišinys Mix A	Mišinys Mix B	Mišinys Mix C
Tekstilės atliekos (%)	40	60	80
Žaliosios atliekos (%)	30	20	10
Popieriaus ir kartono atliekos (%)	30	20	10

2.1.3. Biri celiuliozinė termoizoliacinė vata

Vykdam daugiabučio namo rekonstrukciją Vilniaus mieste, viename iš butų sumažinus patalpų aukštingumą, kaip termoizoliacinę medžiaga virš lubų panaudota biri termoizoliacinė medžiaga *Ecovata* (toliau CTM) celiuliozės pagrindu (pagaminta iš perdirbto popieriaus atliekų), ji nepasibaigus rekonstrukcijos darbams buvo užlieta lietaus vandens (2019 m. liepos–rugpjūčio mėn.) Praėjus 3–4 mėnesiams (mėginiai rinkti 2019 m. spalio 28 d., oro temperatūra patalpose lygi lauko, 12 °C) ant pačios CTM mikroorganizmų vizualiai nesimatė, ant baltų lubų buvo aiškiai matyti pelėsinų grybų augimas.

2.1.4. Mikrobiologinės terpės

Mikroorganizmai auginti ant standartinių ir atrankių mikrobiologinių terpių.

- Luria-Bertani LB) terpė: 10 g peptono, 5 g mielių ekstrakto, 10 g natrio chlorido (agarizuotai terpei pagaminti dar pridedama 20 gramų agarų),

1 l distiliuoto vandens. Autoklavuojama 1 atm slėgyje, 121 °C temperatūroje.

- Bulvių dekstrozės agaras (PDA) terpė: 39 g PDA, 1 l distiliuoto vandens. Autoklavuojama 1 atm slėgyje, 121 °C temperatūroje.
- Mikroelementų tirpalas: 100 ml distiliuoto vandens, 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ir 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Viskas gerai išmaišoma ir laikoma +4 °C.
- Čapeko terpė: 250 ml distiliuoto vandens, 2,5 ml Čapeko koncentrato, 250 μl mikroelementų pradinio tirpalo, 7,5 g sacharozės bei 5 g agaras. Autoklavuojama 1 atm slėgyje, 121 °C temperatūroje.
- Čapeko koncentratas: 100 ml distiliuoto vandens, 30 g NaNO_3 , 5 g KCl , 5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Viskas gerai išmaišoma ir laikoma šaldytuve.
- Celiuliozės agaras terpė: 1 l distiliuoto vandens, 5 g CMC, 1 g NaNO_3 , 1,8 g K_2HPO_4 , 0,9 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g KCl ir 20 g agaras. Autoklavuojama 1 atm slėgyje, 121 °C temperatūroje.
- Krakmolo agarizuota terpė: 1 l distiliuoto vandens, 10 g krakmolo, 3 g mėsos ekstrakto, 12 g agaras. Autoklavuojama 1 atm slėgyje, 121 °C temperatūroje.

2.1.5. Hidrofobinei dangai formuoti naudoti aliejai

Kanapių: 0,924 g/l $\pm$ 0,002 g/l tankio, šalto spaudimo, pagamintas Lietuvos ūkininkų Rokiškio rajone.

Linų sėmenų: 0,929 g/l $\pm$ 0,002 g/l tankio, šalto spaudimo, pagamintas Lietuvos ūkininkų Utenos rajone.

Tungų medžio: 0,941 g/l $\pm$ 0,002 g/l tankio, įsigytas iš UAB *Pro colore*, Vilnius, Lietuva.

2.1.6. Molekulinės biologijos rinkiniai

DNR gryninti iš gelio – *GeneJet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro*, genams klonuoti – *CloneJET PCR Cloning Kit*, plazmidams gryninti – *GenJET Plasmid Miniprep Kit* – gamintojas *Thermo Fisher*, Vilnius, Lietuva.

2.1.7. Standartiniai molekulinės biologijos reagentai

Polimerazė – *DreamTaq Green DNA Polymerase*, molekulinės masės žymuo – *GeneRuler DNA Ladder Mix*, dažas – *6X DNA Loading Dye*, 50X TAE buferinis tirpalas elektroforezei, agarozės tabletės – *TopVision Agarose Tablet* – gamintojas *Thermo Fisher*, etidžio bromidas.

2.1.8. DNR pradmenys

Darbe naudoti universalūs pradmenys bakterijoms ir mikromicetams nustatyti (2.3 lentelė).

2.3 lentelė. Universalūs oligodeoksiribonukleotidiniai pradmenys, naudoti bakterijoms ir mikromicetams nustatyti

Table 2.3. Universal primer for bacteria and micromycetes identification

Pavadinimas	Seka	Kryptis
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	Tiesioginė
ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	Atvirkštinė
ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	Tiesioginė
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Atvirkštinė
ITS86F	5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAA-3'	Tiesioginė
ITS86R	5'-TTCAAAGATTCGATGATTCAG-3'	Atvirkštinė
27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC-3'	Tiesioginė
1492 R	5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3'	Atvirkštinė

2.2. Fizikiniai metodai

2.2.1. Gniuždymo įtempio nustatymas

Augalinės kilmės plokščių gniuždymo įtempis esant 10 % santykinei deformacijai nustatytas pagal LST EN 826 standarto metodiką (LST 13: 2013), naudojant laboratorinį presą HOUNSFIELD H10KS, kurio didžiausioji apkrovos jėga 10 kN, apkrovos tikslumas $\pm 0,5$ %, apkrovos greičio tikslumas $\pm 0,05$ %. Išmatuotas bandinys dedamas ant preso apatinės atramos, išcentruojamas ir apkraunamas pradine 250 ± 10 Pa apkrova. Su laboratoriniu presu suderinta kompiuterinė programa QMAT PROFESSIONAL užtikrina 0,1 t/min apkrovos greitį, kurio leidžiamasis nuokrypis ± 25 %, bandinys gniuždomas kol santykinė deformacija pasiekia 10 %. Pagal fiksuojamą apkrovą ir susidaranti deformacijos kreivė, rodanti bandinio deformacijų priklausomybę nuo jį veikiančios jėgos.

Gniuždymo įtempis esant 10 % santykinei deformacijai apskaičiuojamas pagal (2.1) formulę:

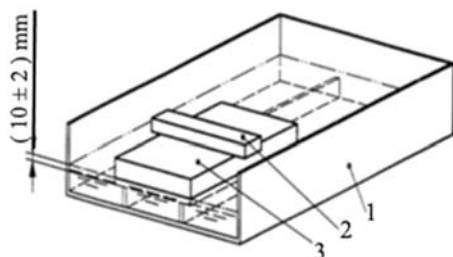
$$\delta_{10\%} = \frac{F_{10}}{A_0}, \quad (2.1)$$

čia $\sigma_{10\%}$ – gniuždymo įtempis esant 10 % santykinei deformacijai, MPa; F_{10} – bandinį veikianti jėga, esant 10 % santykinei deformacijai, N; A_0 – bandinio

skerspjūvio plotas, mm^2 . Bandymui iš kiekvienos serijos gaminių buvo paruošta po 3 bandinius, kurių matmenys $50 \times 50 \times t$ mm (t – bandinio storis).

2.2.2. Trumpalaikės vandens sugerties nustatymas

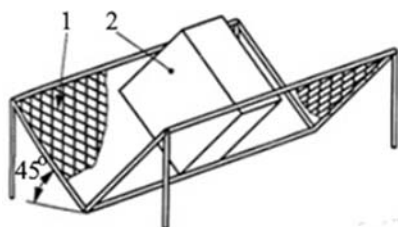
Augalinės kilmės kompozitinių plokščių trumpalaikė vandens sugertis nustatyta įmerkiant bandinius į vandenį 24 valandoms pagal LST EN ISO 29767:2019 standarto A metodą (LST 9: 2022). Praėjus nurodytam laikui bandiniai ištraukiami iš vandens, nutekinant perteklinį vandenį. Bandymas atliekamas imant iš kiekvienos serijos po 3 bandinius, kurių matmenys $50 \times 50 \times t$ mm. Prieš bandymo pradžią bandiniai kondicionuojami ne mažiau nei 6 valandas 23 ± 5 °C temperatūros aplinkoje. Po kondicionavimo jie sveriami ir pamatuojamas jų ilgis bei plotis. Augalinės kilmės kompozitinės plokštės dedamos į vonią be vandens, tuomet ant jų uždedama apkrova, neleidžianti joms pakilti pripylus vandens. Pripilama 23 ± 5 °C temperatūros vandens, kol jo lygis virš apatinės bandinio plokštumos pasiekia 10 ± 2 mm lygį (2.2 pav.). Įmerkti bandiniai paliekami vandenyje $24 \pm 0,5$ valandoms.



2.2 pav. Trumpalaikės vandens sugerties nustatymo įrangos schema: 1 – vandens vonia; 2 – apkrova, neleidžianti bandiniui pakilti pripildžius vonią vandens; 3 – bandinys

Fig. 2.2. Scheme of short-term water absorption determination equipment: 1 – tub with water; 2 – loading that does not allow lifting the specimen after filling the tub with water; 3 – specimen

Po 24 valandų bandiniai išimami iš vonios ir $10 \pm 0,5$ minutėms paliekami vertikaliame drenaziniame stove, kad nutektų neįsigėręs perteklinis vanduo (2.3 pav.).



2.3 pav. Vertikalus drenažinis stovas: 1 – horizontalios plokštumos atžvilgiu 45° kampu pasuktas tinklas, ant kurio dedamas bandinys; 2 – bandinys

Fig. 2.3. Vertical drainage stand: 1 – mesh rotated 45° in respect of the horizontal axis; 2 – specimen

Pertekliniam vandeniui nutekėjus bandiniai pasveriami. Trumpalaikė vandens sugertis po 24 valandų mirkymo vandenyje apskaičiuojama pagal (2.2) formulę:

$$W_p = \frac{m_{24} - m_0}{A_p}, \quad (2.2)$$

čia W_p – trumpalaikė vandens sugertis, kg/m²; m_{24} – bandinio masė po 24 valandų, kai jis iš dalies panardintas vandenyje, kg; m_0 – pradinė sauso bandinio masė, kg; A_p – apatinės plokštumos plotas, m².

2.2.3. Storio išbrinkio po mirkymo vandenyje nustatymas

Augalinės kilmės kompozitinių plokščių storio išbrinkis po mirkymo vandenyje nustatytas pagal standarte LST EN 317 nurodytas metodikas (LST 5: 1999), įvertinus bandinio storio pokytį įstrižainių susikirtimo taške po mirkymo vandenyje. Iki bandymo paruoštos augalinės kilmės kompozitinės plokštės kondicionuojamos 20±2 °C temperatūros ir 65±5 % santykinio oro drėgnio aplinkoje, iki kol masės pokyčiai ne didesni kaip 0,1 %. Storio išbrinkio tyrimams paruošta po 3 bandinius, kurių matmenys 50×50× t mm. Po matavimo bandiniai panardinami į 20±1 °C temperatūros vandenį plokštumomis vertikaliai 24 valandoms. Po 24 valandų bandiniai išimami iš vandens, nuo paviršių pašalinamas vandens perteklius ir matuojamas kiekvieno bandinio storis. Storio išbrinkis po mirkymo vandenyje nustatomas pagal (2.3) formulę:

$$G = \frac{t_2 - t_1}{t_1} \times 100, \quad (2.3)$$

čia G – storio išbrinkis po mirkymo vandenyje, %; t_1 – bandinio storis prieš mirkymą, mm; t_2 – bandinio storis po mirkymo, mm.

2.2.4. Matmenų stabilumo nurodytomis temperatūros ir drėgmės sąlygomis nustatymas

Augalinės kilmės kompozitinių plokščių matmenų stabilumo nustatymas vyko fiksuotomis aplinkos sąlygomis, t. y. temperatūros ir drėgmės sąlygomis pagal EN 1604 70 °C ir 90 % santykinio oro drėgnio aplinkoje (LST 10: 2013). Buvo naudojami trys mėginiai, kurių dydis (50×50×10) mm, kurie 24 valandas inkubuojami *Memmert HPP* termostate palaikant drėgmę. Prieš bandymą mėginiai buvo kondicionuojami (23±2) °C temperatūroje ir (50±5) % santykinėje drėgmėje 14 dienų, kol linijinių matmenų pokyčiai buvo < 0,1 %. Matmenų pokyčiai perskaičiuoti į procentinę išraišką pagal (2.4) formules:

$$\Delta\epsilon_l = 100 \times \frac{l_t - l_0}{l_0}; \Delta\epsilon_b = 100 \times \frac{b_t - b_0}{b_0}; \Delta\epsilon_d = 100 \times \frac{d_t - d_0}{d_0}, \quad (2.4)$$

čia l_0 , b_0 ir d_0 yra matmenys po kondicionavimo, mm; l_t , b_t ir d_t matmenys po inkubavimo termostate su drėgme.

2.2.5. Šilumos laidumo koeficiento matavimai

Augalinės kilmės kompozitinių plokščių su hidrofobine danga ir be jos šilumos laidumo koeficiento matavimai atlikti pagal LST EN 12667 standarto metodiką (LST 53: 2002), naudojant prietaisą FOX 304 (*LaserComp*, New Castle, Delaware, JAV), kurio matavimo ribos yra nuo 0,01 iki 0,50 W/(m K), o tikslumas yra ~1 %. Matuojamas šilumos srautas, praeinantis per bandinį. Tarp prietaiso plokščių sudaromas 20 °C temperatūrų skirtumas bei 10 °C vidutinė matavimo temperatūra ir matuojamas šilumos srauto tankis. Matavimas atliekamas tol, kol nusistovi šilumos srautas ir išlieka nusistovėjęs ne mažiau kaip 60 minučių. Tyrimams suformuoti trys kiekvienos kompozicijos mėginiai, kurie prieš matavimus išdžiovinti krosnelėje 70 °C temperatūroje iki pastovios masės, kol skirtumas tarp dviejų matavimų, atliktų per 24 valandas, reikšmių buvo < 0,1 %, tuomet kondicionuojami iki pastovios masės ne mažiau kaip 72 valandas iki pusiausvyros, esant (23±5) °C temperatūrai ir (50±5) % santykiniai oro drėgmei. Siekiant nustatyti matavimo metu įsigėrusį drėgmės kiekį, mėginiai pasverti prieš nustatant šilumos laidumą ir po jo.

2.2.6. Augalinės kilmės kompozito mikrostuktūros tyrimas

Augalinės kilmės kompozitų mikrostuktūros tyrimai buvo atlikti naudojant skenuojantį elektroninį mikroskopą JEOL JSM-7600, kai įtampa 4 kV ir 10 kV, 9–11 nm skiriamosios gebos, didinimas 700×, 1000×, 1500× kartų. Prieš bandymą tiriamoji medžiaga vakuumo aplinkoje buvo padengta plonu aukso sluoksniu, naudojant prietaisą *Quorum Q150R ES*.

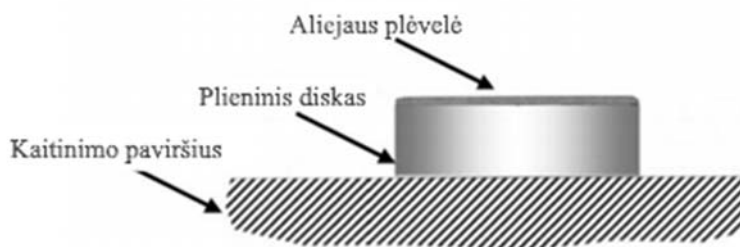
2.2.7. Mikrogravimetrinis metodas aliejaus plėvelės masės pokyčiui nustatyti

Aliejinės apsauginės dangos formavimui būtina žinoti, jos kietėjimo greitį ir temperatūrą, kurioje ji stingsta. Aliejaus degradacijai sukelti taikytas mikrooksidacinis metodas, sudarant plonasluoksnės plėvelės plieno paviršiuje.

Tiriamą aliejų 500 µm sluoksnis suformuojamas ant plieninio ritinėlio paviršiaus, kuris kaitinamas elektrinėje konvekciniame krosnelėje, kurioje palaikoma atitinkamai 90 °C, 120 °C temperatūra. Analizuojami mėginiai kaitinami iki pastovaus nekintančio svorio nuo 24 iki 240 val. Bandymas kartotas 3 kartus. Aliejaus masė apskaičiuojama pagal formulę (2.5):

$$m = S \times k \times \rho, \quad (2.5)$$

čia m – aliejaus masė (g), S – plieninio ritinėlio paviršiaus plotas (cm²), k – aliejaus plėvelės storis (500 µm), ρ – aliejaus tankis (g/l).



2.4 pav. Aliejinės dangos mikrogravimetrinio tyrimo schema (Asadauskas et al., 2001)

Fig. 2.4. Scheme of the oil film microgravimetric test method

Kaitinant aliejų pasikeičia jo plėvelės masė. Masės pokytis fiksuojamas naudojant analitines svarstyklas. Atvėsintas ritinėlis su tiriamuoju aliejumi sveriamas ir fiksuojama jo masė.

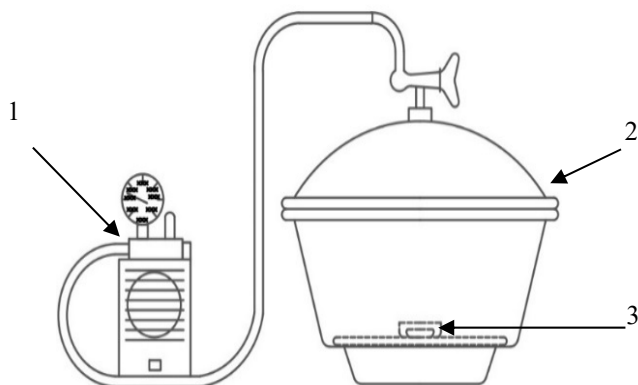
Masės pokytis apskaičiuojamas pagal (2.6) formulę:

$$\Delta m(\%) = 100 - \left(\left(\frac{m_g - m_0}{m_i - m_0} \right) \times 100 \right), \quad (2.6)$$

čia Δm – masės pokytis (%), m_0 – tuščio ritinėlio masė (be aliejaus, g), m_g – ritinėlio ir aliejaus masė prieš kaitinimą (g), m_i – ritinėlio ir aliejaus masė po kaitinimo.

2.2.8. Hidrofobinės dangos formavimas ant augalinės kilmės kompozitinių medžiagų

Formuojant hidrofobinę dangą ant augalinės kilmės kompozitinių plokščių, jos padengtos pasirinktais aliejais, kurių masės dalis sudarė apie 43–94 % lyginant su plokšte. Paskui 5 minutes jos laikomos eksikatoriuje (2.5 pav.), keliant slėgį iki 0,9–1 baro. Ši procedūra pakartota 5–10 kartų. Po šios procedūros augalinės kilmės kompozitinės plokštės su aliejumi laikomos 40 °C, 60 °C, 90 °C, 120 °C temperatūroje ir 1 % drėgmės termostate 24–240 val. arba iki kol pasieks stabilų svorį.



2.5 pav. Vakuuminio eksikatoriaus principinė schema, naudojama užpildant kompozito poras: 1 vakuuminis siurblys, 2 vakuuminis eksikatorius, 3 celiuliozinės kilmės kompozitinė plokštė

Fig. 2.5. Principle scheme of a vacuum desiccator used to fill the pores of a biocomposite

2.3. Mikrobiologiniai tyrimo metodai

2.3.1. Mikroorganizmų mikroskopavimas

Mikroskopuoti naudotas šviesinis mikroskopas CX41 *Olympus* su kamera U-TVIX-2. Ląstelių stebėjimas bei morfologinis nagrinėjimas atliktas *Olympus* CX41 mikroskopu, naudojant 10X, 40X ir 100X objektyvo padidinimus. Vaizdai buvo gaunami naudojant *Olympus* U-TVIX-2 mikroskopo kamerą ir toliau apdorojami naudojant *PixELINK uScope* programinę įrangą. Mikroskopavimas naudojamas norint nustatyti ląstelių morfologines ypatybes. Bakterijų ląstelės buvo dažomos Gramo būdu (Gedminienė, 2006). Gramneigiamos ląstelės nusidažo raudonai, o gramteigiamos nusidažo violetine spalva.

Pelėsiniam grybui mikroskopuoti skalpeliu buvo išpjauamas maždaug 1 cm^3 agarizuotos sočios PDA terpės kubelis, kuris perkeliamas ant mikroskopinio stikliuko, o ant jo viršaus uždedamas dengiamasis stikliukas. Vienkartine inokuliavimo kilpele paimamas nedidelis kiekis užaugusios pelėsinio grybo kultūros ir ji užsėjama ant PDA kubelio kraštų. Stikliukai su agaru kubeliu padedami ant Petri lėkštelės su drėgnu filtriniu popieriumi ir ji uždengiama. Inkubuojama termostate $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 10 parų.

Praėjus inkubacijos laikotarpiui, lašas laktofenolio mėlynojo dažo buvo užlašinamas ant švaraus mikroskopinio stikliuko. Dengiamasis stikliukas nuimamas nuo šviežiai užaugintos pelėsinio grybo kultūros ir perkeliamas ant mikroskopinio stikliuko su laktofenoliu ta puse, kurioje buvo sąlytis su pelėsinio grybo kultūra. Paruoštas stikliukas stebimas šviesiniu mikroskopu CX41 *Olympus* su kamera U-TV1X-2 didinant $4\times$, $20\times$ ir $100\times$ kartų.

2.3.2. Mikroorganizmų išskyrimas ir išsaugojimas

Mikroorganizmai išskirti nuo augalinės kilmės termoizoliacinės medžiagos, kuri pagaminta 2015 m. dr. Giedriaus Balčiūno ir laikyta $22 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje ir $55\% \pm 5$ drėgmėje kambario aplinkoje 24–36 mėnesius. Po šio laiko imituojant vandens apļiejimą (techninę vandentiekio avariją) augalinės kilmės plokštės buvo sudrėkintos 1–5 ml dejonizuoto vandens ir laikytos termostate $28\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje esant 65 % drėgmei 7–21 dieną. Susiformavusi mikroorganizmų bioplėvelė su mikrobiologine kilpele steriliomis sąlygomis buvo nuimta ir perkelta ant sočios PDA (*potato dextrose agar*) ir LB (*Lysogeny broth*) terpės. Mikroorganizmai buvo persėjami iki pavienės, grynos kultūros. Grynos mikroorganizmų kultūros paruoštos ilgalaikiam saugojimui su 25 % gliceroliu, laikomos šaldymo kameroje $-80\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

2.3.3. Pelėsinių grybų sporų paruošimas

Pelėsiniai grybai auginti ant sočios agarizuotos PDA terpės $25\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 7 paras, po sporuliacijos kultūra užpilta 0,9 % NaCl tirpalu, surinktos sporos skiestos iki 10^6 vnt./l, gauta suspensija naudota celiulazinio arba amilazinio fermento veiklai nustatyti.

2.3.4. Bakterijų kultūros suspensijos paruošimas

Naktinės bakterijų kultūros auginamos skystoje LB terpėje $30\text{ }^\circ\text{C}$ arba $37\text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje 24 valandas, purtant 150 rpm greičiu, nuplovus su NaCl 0,9 % tirpalu nuo sočios terpės, 5 μL skystos bakterijų kultūros naudojamos celiulazinio arba amilazinio fermento veiklai nustatyti.

2.3.5. Mikroorganizmų, pasižyminčių celiulaziniu ir amilaziniu aktyvumu, atranka

Celiulaziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų atrankai naudojama selektyvi terpė, kurioje vienintelis energijos ir anglies šaltinis – karboksimetilceliuliozė (CMC) (Kasana et al., 2008). Mikroorganizmai ant atrankios terpės inkubuojami 25 ± 2 °C arba 30 ± 2 °C temperatūroje 3–31 parą. Praėjus atitinkamam inkubavimo laikui, Petri lėkštelės su jų kultūra užpilamos Liugolio tirpalu (2 g KI ir 1 g I₂ 300 mL distiliuoto vandens) arba Kongo raudonuoju dažo (1 g/l) tirpalu, palaikoma iki 30 minučių kambario temperatūroje, nupilama ir nuplaunama su 1 M NaCl tirpalu, kai lėkštelės dažytos su Kongo raudonuoju dažu. Išryškėjusios halo zonos leidžia spręsti apie įvykusią CMC hidrolizę. Aplink bakterijų kolonijas yra susidariusios skaidresnės zonos, kurios parodo celiuliozės hidrolizę, celiulazės aktyvumą (Legodi et al., 2019). Matuojama zona siekiant apskaičiuoti fermentinį indeksą pagal (2.7) formulę (Coronado-Ruiz et al., 2018)

$$EI = \frac{\text{Hidrolizės zonos skersmuo}}{\text{Kolonijos skersmuo}}. \quad (2.7)$$

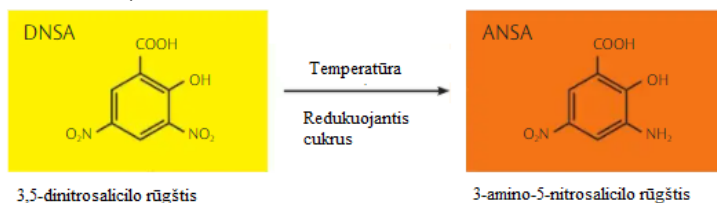
Amilaziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų atrankai naudojama selektyvi terpė, kurioje vienintelis energijos anglies šaltinis buvo krakmolai, kuris naudotas kaip rišiklis augalinės kilmės plokščių gamyboje. Mikroorganizmai užsėjami analogiškai kaip ir celiulaziniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų atrankai. Halo zonoms išryškinti šiuo atveju naudojamas tik Liugolio tirpalas, fermentinis indeksas taip pat apskaičiuojamas pagal 2.7 formulę.

2.3.6. Mikroorganizmų užsėjimas ant augalinės kilmės plokščių

Tolesni tyrimai buvo atliekami ant F ir G skirtingos sudėties kompozitinių plokščių, užsėjus tikslinius mikroorganizmus: pelėsinio grybo *Rh. oryzae* sporų suspensiją (10^6 vnt./ml) ir bakterijas *Pseudomonas putida* (10^9 vnt./ml naktinės kultūros) bei abiejų mikroorganizmų suspensiją, sumaišytą lygiomis dalimis (mišinys), po 1–3 ml, priklausomai, ar greitai susigeria į kompozitinę plokštę. Inkubuota 6 mėnesius 22 °C temperatūroje esant 65 % drėgmės; praėjus šiam laikui atliktas atsparumo gniuždymui testas pagal standartą LST EN 826.

2.4. Fermentinio aktyvumo matavimas naudojant DNS reagentą

Fermentiniam aktyvumui nustatyti taikomas DNS metodas, paremtas kolorimetrija. Veikiant fermentams įvyksta polisacharidų hidrolizė, kai susidaro redukuojantis cukrus. Fermentas celiulazė katalizuoja celiuliozės hidrolizę iki gliukozės, o fermentas amilazė – krakmolą iki maltozės. Fermentinė polisacharidų hidrolizės reakcija stabdoma dinitrosalicilo reagentu. Susidariusi gliukozė nustatoma redukuojant 3,5-dinitrosalicilo rūgštį. Vyksta spalvos pokyčio reakcija, redukuotas cukrus pakeičia geltoną DNS reagento spalvą į rausvai rudą. Spalvos intensyvumas proporcingas mėginyje esančio redukuoto cukraus koncentracijai. Spektrofotometriškai nustatomas spalvos pokyčio intensyvumas, kuris parodo dėl hidrolazių poveikio reakcijoje susidariusių redukuojančių cukrų kiekį (Zhang et al., 2004).



2.6 pav. 3,5-dinitrosalicilo rūgšties reakcijos schema su redukuojančiu cukrumi

Fig. 2.6. Reaction scheme of 3,5-dinitrosalicylic acid with a reducing sugar

Celiulazinių fermentų hidrolizės reakcija vykdoma citratiniame buferiniame tirpale, kurio pH 4,8, 30–60 minučių 50 °C temperatūroje. Reakcija sustabdoma mėgintuvėlius atvėsinus kambario temperatūroje ir įpylus po 1 mL DNS reagento. Turinys gerai sumaišomas ir mėgintuvėliai laikomi 10–15 minučių verdančio vandens vonioje, kol susidaro rausvai rudos spalvos tirpalas. Po kaitinimo mėginiai atvėsunami kambario temperatūroje, į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 10 mL distiliuoto vandens, sumaišoma ir spektrofotometru išmatuojama tiriamų mėginių sugertis, esant 540 nm bangos ilgiui. Amilazinis aktyvumas matuojamas analogiškai, tik kaip buferinis tirpalas naudojamas Na-fosfatinis su 20 mM NaCl, pH = 6,8, inkubuojama 37 °C temperatūroje.

2.5. Molekulinės biologijos tyrimo metodai

2.5.1. Genominės DNR išskyrimas

Genominei DNR gryninti naudotos mikroorganizmų kultūros iš skystosios arba agarizuotųjų terpių. Iš skystosios terpės paimta po 1,5 ml kultūros į *Eppendorf*

tipo mėgintuvėlius ir tada jos nucentrifuguojamos 6000 sūkių per minutę greičiu. Iš agarizuotosios terpės atsveriamą po 0,2 gramo kultūros ir sudedama į *BeadTube* tipo mėgintuvėlį, esantį rinkinyje. Bakterijų gDNR išskirta naudojant *Genomic DNA Purification Kit* (gamintojas – *Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo protokolą. Pelėsinių grybų genomine DNR išskirta *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit* rinkiniu (gamintojas – *Invitrogen*) arba *Thermo Scientific Genomic DNA Purification Kit* rinkiniu (gamintojas – *Thermo Fisher Scientific*) pagal pateiktus protokolus.

2.5.2. Genominės DNR amplifikacija polimerazine grandinine reakcija

Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metodas skirtas DNR fragmentams padauginti *in vitro*. Norint padauginti konkretų DNR regioną reikalingi specifiniai pradmenys; šiuo atveju naudoti universalūs ITS1 ir ITS4 pradmenys mikromicetams ir 27F 1492R bakterijoms nustatyti. Po reakcijos gaunama komplementari susintetinta DNR seka pasirinktam regionui. Specifiniams DNR fragmentams padauginti naudota *DreamTaq™* polimerazė, *T-personal* termocikleris.

PGR reakcijos komponentai supilstomi iki 50 µl lede. Reakcijos mišinį sudaro:

- 5 µl *10 X DreamTaq* buferinio tirpalo;
- 5 µl 2 mM dNTP mišinio;
- 1 µl tiesioginio pradmens (0,5 µM);
- 1 µl grįžtamojo pradmens (0,5 µM);
- 5 µl išgrynintos genominės DNR;
- 1 µl *DreamTaq* polimerazės;
- 32 µl vandens be nukleazių.

PGR reakcija vykdoma 25–35 ciklus, kuriuos sudaro:

Pradinė denatūracija	98 °C, 3 min;
Denatūracija	98 °C, 10 s;
Pradmenų prilydymas	54 °C, 30 s;
DNR sintezė	72 °C, 1 min 40 s;
Galutinė elongacija	72 °C, 10 min.

2.5.3. PGR fragmentų gryninimas

PGR produktui gryninti naudotas komercinis rinkinys *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit* (gamintojas – *Thermo Fisher Scientific*). Rinkinys

buvo naudojamas pagal gamintojo nurodytą protokolą. Išgryninto PGR produkto grynumas buvo tikrinamas elektroforezės metodu agarozės gelyje.

2.5.4. Elektroforezė agaroziniame gelyje

PGR produktai analizuoti horizontalios elektroforezės būdu. Elektroforezei naudotas 1 % agarozės gelis. Elektroforezė vykdyta 45 minutes esant pastoviam 120 mA srovės stipriui, 121 V įtampai, 300 W galiai. Pasibaigus elektroforezei, gelis 5–10 minutes laikytas etidžio bromido tirpale ir analizuotas bei vizualizuotas ultravioletinėje šviesoje *MiniBIS Pro* transiluminatoriumi, naudojant *GelCapture* programinę įrangą.

2.5.5. Naujos kartos sekoskaita

Bendrosios gDNR naujos kartos sekoskaita atlikta *Macrogen* kompanijoje (Pietų Korėjoje). Naudojama *Illumina MiSeq* platforma bakterijoms pagal V3-V4 regioną, mikromicetams pagal ITS2 konservatyvųjį regioną. 16S rRNA pagal V3-V4 regioną amplifikuota bakterijoms.

2.5.6. Bioinformatinė analizė

Bioinformatinė analizė ir duomenų apdorojimas atliktas naudojant bakterijoms *Mothur* programą pagal 16S rRNA genų fragmentus, grybams pagal ITS2 regioną naudojant DADA2 programą. *Mothur* bei DADA2 yra laisvosios prieigos bioinformatikos įrankiai, skirti atlikti neapdorotų sekų mikroorganizmų DNR analizę.

Padaugintų fragmentų DNR sekoskaita atlikta *Macrogen EU* kompanijoje, Olandijoje. Po sekoskaitos gauti rezultatai analizuoti ApE programa ir lyginti su NCBI duomenų baze, randant genų sekos atitikmenis.

2.6. Antrojo skyriaus išvados

1. Iš natūralių aliejų – kanapių sėklų, linų sėmenų ir tungų medžio – galima suformuoti apsauginę hidrofobinę dangą. Siekiant įvertinti pasirinkto aliejų kietėjimo ir džiūvimo laiką, atliktas mikrogravimetrinis tyrimas aliejaus plėvelės masės pokyčiui nustatyti, tokiu būdu nustatant apsauginės aliejinės dangos susiformavimo trukmę.
2. Norint kuo efektyviau padengti celiuliozinės kilmės kompozitinę plokštę, reikia taikyti impregnavimo vakuumu būdą.

3. Siekiant įvertinti suformuotos ant augalinės kilmės kompozitinės plokštės apsauginės hidrofobinės dangos efektyvumą, reikia atlikti šilumos laidumo koeficiento, gniuždymo įtempio esant 10 % santykinei deformacijai, trumpalaikės vandens sugerties, storio išbrinkio po mirkymo vandenyje tyrimus.
4. Naujos kartos sekoskaita galima įvertinti mikroorganizmų bendrijos pokyčius, kurie atsiranda ant skirtingų augalinės kilmės medžiagų, tokių kaip kanapių spalvai, celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės, biri celiuliozinė termoizoliacinė vata bei kompostuojami celiulioziniai mišiniai.
5. Bioskaidumui nustatyti pasirinkta tirti celiulazių ir amilazių aktyvumus. Mikroorganizmų produkuojamų celiulazių ir amilazių aktyvumas nustatomas pagal 3,5-dinitrosalicilo rūgšties spalvinės reakcijos pokytį, kai spalvos intensyvumas proporcingas mėginyje esančio redukuoto cukraus koncentracijai.

Sukurta ir ištirta hidrofobinė danga iš natūralios kilmės aliejų ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių bei jų sudėtinių medžiagų fizikiniai mechaniniai ir mikrobiologiniai tyrimai

Šių tyrimų tikslas yra išskirti mikroorganizmus, kurie būdingi augalinės kilmės kompozitams, juos identifikuoti. Nustatyti šių mikroorganizmų poveikį celiuliozinės kilmės medžiagoms ir kompozitinėms plokštėms, pagamintoms iš jų.

Siekta ištirti augalinės kilmės kompozitines statybines medžiagas, kurios impregnuotos natūralios kilmės aliejais: kanapių sėklų, linų sėmenų bei tungų medžio aliejais, tirtos jų fizikinės savybės (tankis, šilumos laidumo koeficientas, trumpalaikė vandens sugertis, išbrinkis).

Skyriaus tematika paskelbti penki autorės straipsniai (Vasiliauskienė et al., 2018, 2020a, 2020b, 2021, 2022).

3.1. Ant celiuliozinės kilmės medžiagų aptinkamų mikroorganizmų tyrimas

Siekiant ištirti mikroorganizmus, augančius ant natūralios kilmės termoizoliacinių medžiagų, jie išskirti iki grynų kultūrų nuo 2015 m. pagamintos augalinės kilmės kompozitinės plokštės, iš kanapių spalių ir rišiklių (natūralaus lignino arba sintetinės kilmės akrilinės dervos). Vyraujantys mikroorganizmai – bakterijos (1 nustatytas iki genties ir 5 iki rūšies taksonominių rangų) ir pelėsiniai grybai (3 nustatyti iki genties ir 11 iki rūšies taksonominio rango).

3.1.1. Ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių nustatytos bakterijos

Bakterijų 16S ribosominės RNR (rRNR) genuose yra devyni kintantys regionai (V1–V9), kurie rodo skirtingų bakterijų rūšių sekos įvairovę ir naudojami rūšiai identifikuoti. Padauginus polimerazinės grandininės reakcijos metu bakterijų DNR fragmentus, buvo atlikta jų sekoskaita ir, bioinformatiniais metodais išanalizavus gautus duomenis, nustatytos bakterijų gentys ir / arba rūšys (3.1 lentelė).

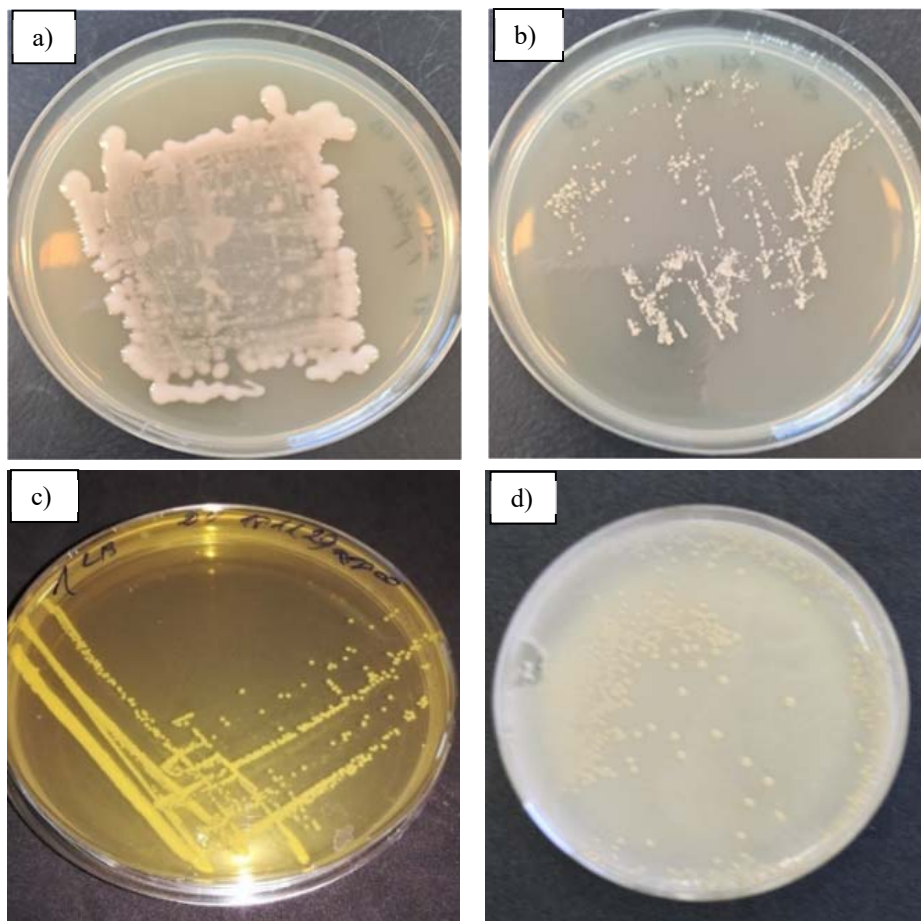
3.1 lentelė. Nustatytų bakterijų sekų sutapimas %, remiantis JAV nacionaliniu biotechnologijų informacijos centro duomenų baze (NCBI) pagal V1–V9 regioną
Table 3.1. Overlap of identified bacterial sequences in %, based on the US National Center for Biotechnology Information (NCBI) database by region V1-V9

Nustatytų bakterijų sekų sutapimas % su NCBI duombaze	<i>Paenibacillus rigui</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
%	99,46	99,8	99,2	100	98,11	95,87

Iš viso identifikuotos 6 bakterijų gentys, iš kurių 5 iki rūšies, o viena – iki genties taksonominio lygmens. Tolesniems tyrimams naudojamos tik tos bakterijos, kurias pavyko nustatyti iki rūšies.

P. putida – lazdelės formos, gramneigiamos, sporų neformuojančios, saprotrofinės bakterijos, randamos dirvožemyje ir vandenyje (Weimer et al., 2020). Petri lėkštelėje ant LB terpės formuoja mažas, permatomas, šviesiai geltonos arba baltos su rausvu atspalviu kolonijas (3.1 pav., a). Šios bakterijos yra judrios, turi žiuželius, todėl gali migruoti agaro lėkštelėje.

P. rigui yra lazdelės formos gramteigiamos, aerobinės arba fakultatyviai anaerobinės, endosporas formuojančios bakterijos (Sáez-Nieto et al., 2017). Petri lėkštelėje ant LB terpės formuoja mažas, baltos spalvos kolonijas (3.1 pav., b).



3.1 pav. Bakterijos ant LB terpės po 24 val. inkubavimo: a) *Pseudomonas putida*; b) *Paenibacillus rigui*; c) *Pantoea agglomerans*; d) *Bacillus subtilis*

Fig. 3.1. Bacteria on LB medium after 24 hrs incubation: a) *Pseudomonas putida*, b) *Paenibacillus rigui*, c) *Pantoea agglomerans*, d) *Bacillus subtilis*

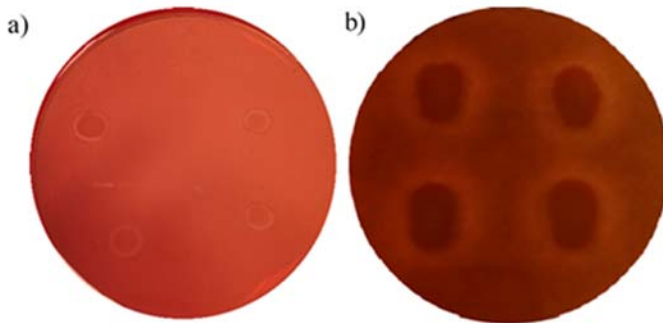
P. agglomerans yra gramneigiamos, tiesios lazdelės formos bakterijos (Wójcik-Fatla et al., 2022). Šių bakterijų kolonijos yra lygios, gelsvos spalvos (3.1 pav., c).

Bacillus subtilis yra gramteigiamos, aerobinės lazdelės formos bakterijos, formuojančios sporas (Su et al., 2020). Kolonijos ant LB terpės apvalios, nepermatomos, neryškiai baltos arba šiek tiek geltonos spalvos (3.1 pav., d).

3.1.2. Bakterinių celiulazių producentų nustatymas

Išanalizavus sekoskaitos rezultatus nustatyti 6 skirtingi bakterijų kamienai, iš literatūros duomenų žinoma, kad 4 iš jų, t. y. *P. rigui*, *P. putida*, *P. agglomerans*, *B. subtilis*, gali sintetinti celiulazinius fermentus (Hajiabadi et al., 2020). Tyrimo metu buvo pritaikytas lengvas, greitas kokybinis metodas, skirtas įvertinti specifinę sąveiką tarp Kongo raudonojo dažo arba KI+I₂ ir polisacharidų, gautų skylant karboksimetilceliuliozei (CMC). Ant CMC terpės atrinkti mikroorganizmai, produkuojantys celiulazinius fermentus (3.2 pav.). CMC skilimas buvo stebimas užpylus Petri lėkštelės Liugolio tirpalu (2 g KI, 1g I₂, 300 mL distiliuoto vandens) arba Kongo raudonojo dažo tirpalu. Susidaro aiškios ir gerai matomos skaidrios Halo zonos aplink mikroorganizmų kolonijas. Vizuali hidrolizės zona susidaro per 3–5 minutes, neskaitant mikroorganizmų augimo laiko.

Iš 4 identifikuotų bakterijų rūšių – *Paenibacillus rigui*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus subtilis* – celiulaziniu aktyvumu pasižymėjo tik *Pseudomonas putida* (3.2 pav.). Kitų tirtų bakterijų rūšių celiulazinis aktyvumas nenustatytas.

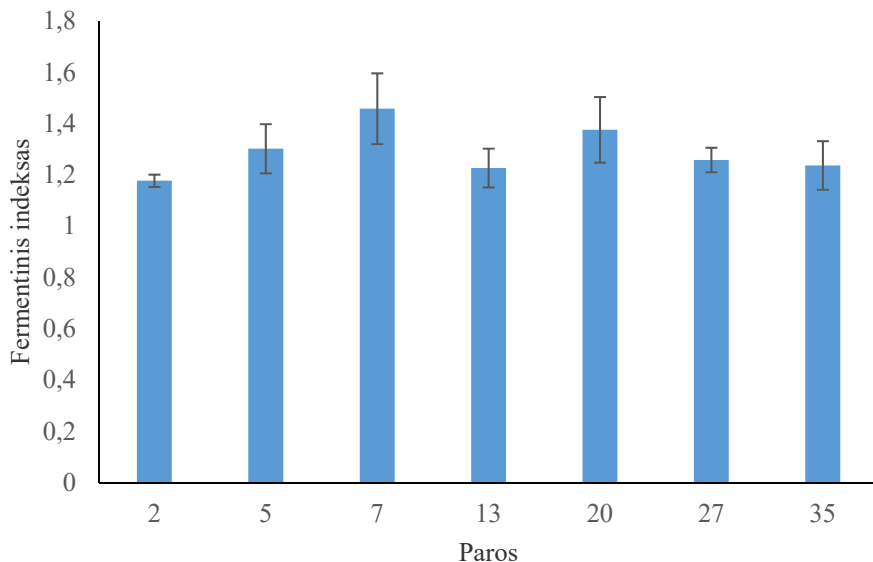


3.2 pav. *P.putida* celiulazinio aktyvumo nustatymas ant CMC terpės: a) Kongo raudonojo dažo tirpalu; b) Liugolio tirpalu. Rezultatai fiksuoti po 30 minučių

Fig. 3.2. Determination of cellulase activity on the CMC medium for *P. putida*: a) Congo red dye solution, b) Lugol's solution. Results recorded after 30 minutes

Apskaičiavus fermentinį indeksą (FI) (3.3 pav.), kuris yra mikroorganizmo kolonijos ir susidariusios Halo zonos skersmenų santykis ant atrankios terpės, pagal celiulazinio aktyvumo zonos dydį, jau po dviejų parų augimo ant mitybinės

atrankios terpės nustatyta, kad *P.putida* bakterijos geba skaidyti karboksimetilceliuliozę. Tarp antros ir penktos paros FI kito nuo 1,18 iki 1,30. Didžiausias FI skersmenų santykis buvo išmatuotas po 7 parų ir sudarė apie 1,46 tarp bakterijos *P.putida* ir Halo zonos. Praėjus daugiau negu 13 parų, Halo zonos dydis kito nuo 1,22 iki 1,37 fermentinio indekso.



3.3 pav. *P. putida* fermentinis indeksas ant CMC terpės
Fig. 3.3. Enzymatic index of *P. putida* on the CMC medium

Stebint *Pseudomonas putida* augimą ant lėkštelių su atrankia CMC terpe (3.2 lentelė), nustatytas tolygus bakterijų kolonijų didėjimas. Po 2 parų inkubavimo *P. putida* kolonijos dydžio vidurkis siekė 6,75 mm, t. y. padidėjo apie 2 kartus, palyginus su pradinio bakterijų užsėjimo tašku, po 35 parų kolonijų vidutinis skersmens dydis apie 13 mm. Nustatytas fermentinio aktyvumo indeksas didžiausias buvo po 7 parų. Praėjus 13 ir daugiau parų fermentinis indeksas mažai kito, nors bakterijų kolonijos ir plėtėsi, kadangi *Pseudomonas putida* kaip maistinių medžiagų šaltinį pradėjo vartoti nebegyvybingus mikroorganizmus. Pagal fermentinio aktyvumo indeksą nustatyta, kad bakterijos ant atrankios CMC terpės celiulazės produkuoja intensyviausiai apie 7-ą augimo parą.

Atlikus kokybinę testą ant atrankios CMC terpės *Paenibacillus rigui*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus subtilis* bakterijų kamienai nepasižymi celiulaziniu aktyvumu, nes pirminiu identifikacijos metu Halo zonos nesudarė (3.2 lentelė). Manoma, kad ištirti bakterijų kamienai kaip maistinių medžiagų šaltinį karboksimetilceliuliozės skaidyti negali.

3.2 lentelė. Bakterijų Halo skersmens kitimas 2–35 parų laikotarpiu (mm)

Table 3.2. Diameter of Halo zones of bacteria (mm)

Celiulazinio aktyvumo Halo zonos dydžių vidurkis, mm	2 parų	5 parų	7 parų	13 parų	20 parų	27 parų	35 parų
<i>Pseudomonas putida</i>	6,75	7,75	8,75	9,75	10,75	12	13,25
<i>Paenibacillus rigui</i>	Halo zonų nebuvo						
<i>Pantoea agglomerans</i>	Halo zonų nebuvo						
<i>Bacillus subtilis</i>	Halo zonų nebuvo						

Tolimesniems tyrimams ant celiuliozinės kompozitinės plokštės pasirinkta tik viena bakterija *P.putida*.

3.1.3. Ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių nustatyti pelėsiniai grybai

Mikromicetų ribosominės DNR (rDNR) vidinės transkribuojamos sritys (ITS) yra variabilios tarp rūšių ir konservatyvios rūšies viduje, dėl to tinkamos grybų rūšims identifikuoti molekuliniiais metodais. Analizuojant PGR metodu gautų fragmentų sekoskaitos rezultatus nustatytos 3 pelėsinių grybų gentys ir 11 rūšių (3.3 lentelė).

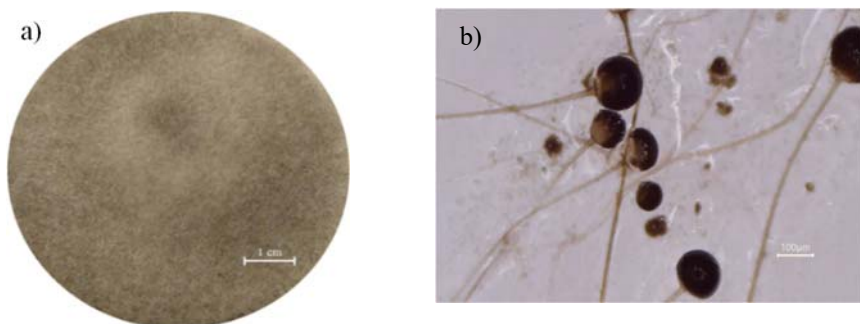
Remiantis literatūrine analize, pelėsiniai grybai, randami natūralioje aplinkoje, gali turėti įvairių celiuliozę skaidančių ir ardančių sekretuojamų fermentų. Tačiau tik kepurėtieji grybai, priklausantys papėdgrybiams (*basidiomycota*), gali visiškai, iki anglies cheminio elemneto, skaidyti natūralų gamtoje esantį celiuliozės polimerą. Visi kiti mikromicetai produkuoja tik tam tikrus fermentus, todėl dažniausiai skaidant gamtinius polimerus, tokius kaip celiuliozė, randamos mikroorganizmų bendrijos, galinčios veikti kartu.

Tolimesniems tyrimams ant celiuliozinių kompozitinių plokščių buvo pasirinkti pelėsiniai grybai iš skirtingų skyrių: zigomicetų ir aukšlagrybių (askomicetų). Iš papėdgrybių skyriaus nepasirinkta jokio mikromiceto, nes VILNIUS TECH Chemijos ir bioinžinerijos katedros laboratorijos nepritaikytos kepurėtėsiams grybams auginti.

3.3 lentelė. Pelėsiniai grybai, išskirti iki pavienių kultūrų ir nustatyti sekoskaitos būdu
Table 3.3. Fungi isolated to pure cultures and identified by sequencing

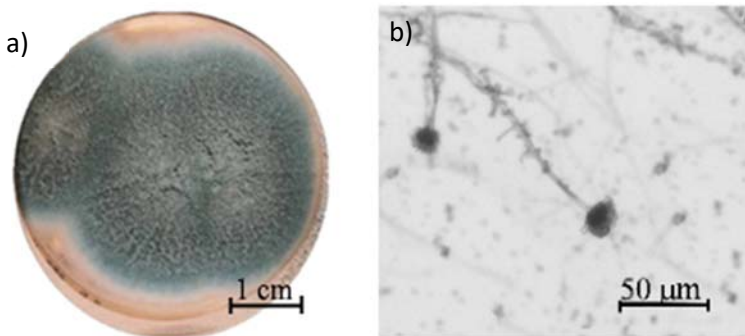
Skyrius	Pelėsiniai grybai	Sutapimo % lyginant su NCBI duomenų baze
Zigomicetai	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
Zigomicetai	<i>Basidiobolus microsporus</i>	89,38
Zigomicetai	<i>Mortierella globalpina</i>	89,74
Zigomicetai	<i>Mortierella rostafrankii</i>	87,5
Zigomicetai	<i>Mucor circinelloides</i>	84
Zigomicetai	<i>Rhizomucor variabilis</i>	88
Papėdgrybis (<i>basidiomycota</i>)	<i>Mycena aurantiomarginata</i>	99
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Hypocrea</i> sp.	99
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Trichoderma</i> sp.	99
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Sporothrix schenckii</i>	99,8
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Talaromyces pinophilus</i>	99
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Penicillium</i> sp.	99,55
Aukšliagrybiai (<i>ascomycota</i>)	<i>Sporothrix mexicana</i>	96,12

Iš literatūros yra žinoma, kad *A. fumigatus* ir *Rh. oryzae* geba skaidyti angliavandenius (Sidar et al., 2020). *Rhizopus oryzae* (3.2 pav.) tam turi 317 genų, kurie sintetina fermentus ardančius polisacharidus, o *Aspergillus fumigatus* – 474 (3.3 pav), todėl tolesniems tyrimams buvo pasirinkti šie pelėsiniai grybai.



3.4 pav. a) Pelėsinis gybas *Rhizopus oryzae* ant PDA agarizuotos terpės po 14 d. auginimo; b) tas pats organizmas, matomas mikroskopuojant, vaizdą padidinus 10 kartų
Fig. 3.4. a) Fungi *Rhizopus oryzae* growing on the PDA media with agar after 14 days of growth, b) the same organism magnified 10-fold

Pelėsiniai grybai *Rh.oryzae* ant sočios agarizuotos terpės auginti 3–28 paras 25 °C temperatūroje. Grybo micelis padengia visą Petri lėkštelę per 3–5 paras, intensyviai sporuliuoti pradeda po 10–14 parų. Kolonijos iš pradžių primena baltą 1–1,5 cm aukščio veltinį arba cukraus vatą, kuri pradėjus sporuliuoti patamsėja iki juodos spalvos. Sporangėkočio skersmuo yra 6–15 μm, ilgis 2500 μm, sporangės dydis 50–250 μm, ji užpildyta sporomis 4–8 μm, rizoidai gerai išsivystę, gali būti iki 350 μm ilgio.



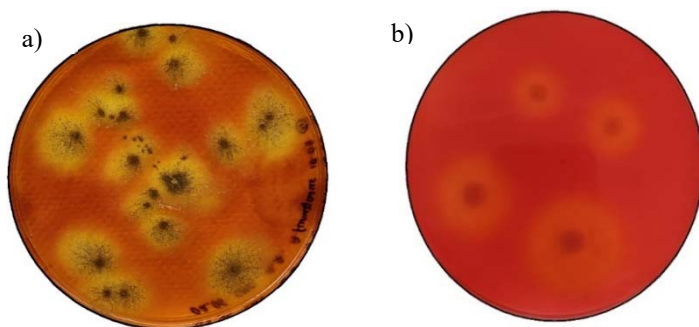
3.5 pav. a) Pelėsinis grybas *Aspergillus fumigatus* ant PDA terpės po 7 d. inkubavimo;
b) *A.fumigatus* po 21 dienos auginimo (40× padidinimas)

Fig. 3.5. a) Fungi *Aspergillus fumigatus* on PDA medium after 7 days of incubation,
b) *A. fumigatus* after 21 days of growth (40× magnification)

Pelėsiniai grybai *A. fumigatus* ant sočių agarizuotų terpių auginti 3–28 paras 25 °C temperatūroje. Jaunos kolonijos (3.2 pav.) melsvai žalsvos spalvos, kuri senstant organizmui tamsėja. Paviršius būna aksominis, su gerai išvystytu oriniu miceliu. Sporuliuoti pradeda po 3 parų. Sporangėkočio skersmuo 5–10 μm, ilgis mažiau negu 300 μm. Augimo temperatūra 12–48 °C, optimali 37 °C.

3.1.4. Pelėsinių grybų celiulazinių producentų nustatymas

Nustatyta, kad ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių vyraujantys mikroorganizmai yra pelėsiniai grybai; celiulazinių producentų paieškai paimti *Rhizopus oryzae* ir *Aspergillus fumigatus*, žinomi kaip gebantys skaidyti gamtinės kilmės polisacharidus.



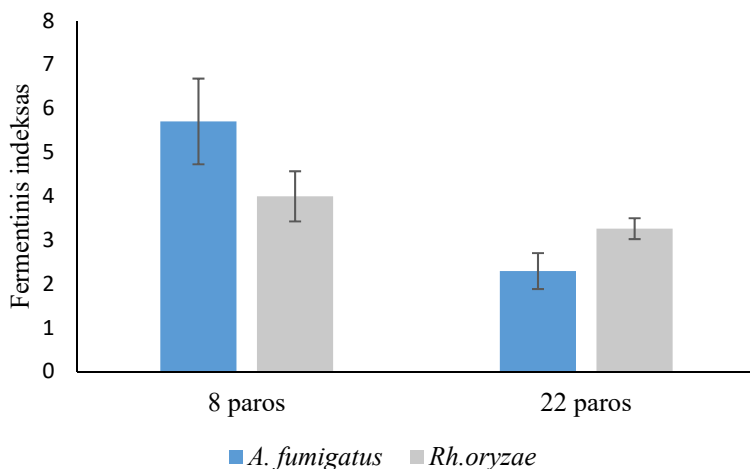
3.6 pav. Pirminis celiulazių identifikavimas: a) *A. fumigatus* patikrinimas ant CMC terpės su Liugolio tirpalu; b) *Rh. oryzae* patikrinimas ant CMC terpės po 12 dienų, dažyta su Kongo raudonuoju dažu

Fig. 3.6. Preliminary determination of cellulase activities: a) test of *A. fumigatus* on CMC medium with Lugol's solution, (b) test of *Rh. oryzae* on CMC medium after 12 days stained with Congo red dye

Inkubuojant 7 paras pelėsinius grybus *A. fumigatus* ir *Rh. oryzae* ant CMC terpės bei paveikus Liugolio tirpalu arba Kongo raudonuoju dažu, pastebėta, kad susidaro Halo zonos. Todėl pirminis celiulazių veiklos nustatymas galimas jau po 7 parų. Ilgas, daugiau kaip 21 paros pelėsinių grybų inkubavimo laikas ant atrankios terpės netikslingas, nes Halo zonos plečiasi, viena su kita persidengia. Fermentinis indeksas apskaičiuotas po 7 ir 21 paros, šis būdas tinkamas tik kokybiniam celiulazių aktyvumui įvertinti.

Nustatytas fermentinis indeksas po 8 ir 22 parų inkubacijos 25 °C temperatūroje ir 55 % aplinkos drėgmėje, jis buvo pelėsinio grybo *A. fumigatus* po 8 parų 2,5 karto, o *Rh. oryzae* 1,2 karto didesnis negu po 22 parų. Nustatyta, kad *A. fumigatus* FI indeksas didesnis augimo pradžioje, o *Rh. oryzae* lieka panašus viso augimo periodu. *A. fumigatus* geba įsisavinti įvairias medžiagas ir produkuoti fermentus, skaidančius celiuliozę, esančią CMC terpėje, iki pavienių gliukozės molekulių. *Rh. oryzae* auga labai greitai, grybo micelis uždengia visą CMC terpę Petri lėkštelėje. Daugelis *Rh. oryzae* kamienų aktyviai produkuoja celiulazę, pektinazę, lipazę (Lugauskas et al., 2002).

Palyginus bakterijos *P. putida* ir pelėsinio grybo *Rh. oryzae* fermentinius indeksus nustatyta, kad jie skiriasi 2,8 karto. Tarp *P. putida* ir *A. fumigatus* fermentinis indeksas skiriasi apie 3 kartus.

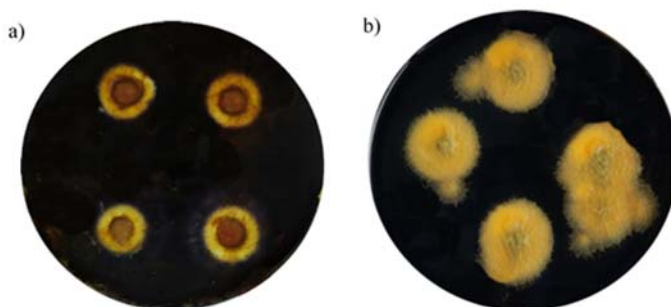


3.7 pav. *Rh. oryzae* ir *A. fumigatus* apskaičiuotas fermentinis indeksas ant CMC terpės
Fig. 3.7. Enzymatic index of fungi *Rh. oryzae* and *A. fumigatus* on the CMC medium

Galima daryti prielaidą, kad pelėsiniai grybai produkuoja daugiau celiulazių nei bakterijos, taip teigė ir kiti tyrėjai (Nykter et al., 2008; Behera et al., 2017).

3.1.5. Amilazinių producentų atranka

Patikrinus bakterijas *P. putida*, *P. rigui*, *P. agglomerans* ir *B. subtilis*, nė viena jų nepasižymėjo amilaziniu aktyvumu. Nei ant krakmolo agaro terpės, nei DNS metodu amilazinis aktyvumas nenustatytas. Tačiau pelėsiniai grybai *A. fumigatus* ir *R. oryzae* pasižymi amilaziniu aktyvumu (Cornejo-Ramírez et al., 2018).

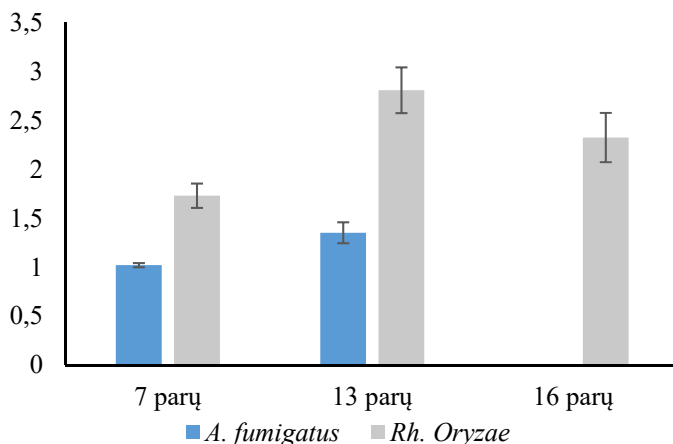


3.8 pav. Pirminis amilazių identifikavimas: a) *Rh. oryzae* ant krakmolo agaro terpės po 4 parų; b) *A. fumigatus* ant krakmolo agaro terpės po 7 parų

Fig. 3.8. Preliminary determination of cellulase activities: a) *A. fumigatus* on starch agar medium after 7 days, b) *Rh. oryzae* on starch agar medium after 4 days

Atlikus kokybinį amilazinio aktyvumo testą ant agarizuotos krakmolo terpės nustatytos pelėsinio grybo *Rh. oryzae* (3.8 pav.) suformuotos Halo zonos jau po 4 parų. Praėjus tiek pat laiko, *A. fumigatus* ryškiomis Halo zonomis nepasižymi, nors terpės, esančios po mikroorganizmu, nenusidažė Liugolio tirpalu, galima daryti prielaidą, kad vis dėlto hidrolizė įvyko.

Po 7 parų inkubacijos 25 °C temperatūroje ir esant 55 % RH fermentinis indeksas tarp pelėsinių grybų *A.fumigatus* ir *Rh.oryzae* skiriasi apie 70 % (3.9 pav.). Vėliau po 13 parų *Rh.oryzae* skaidė krakmolo terpę 60 % intensyviau negu *A.fumigatus*.



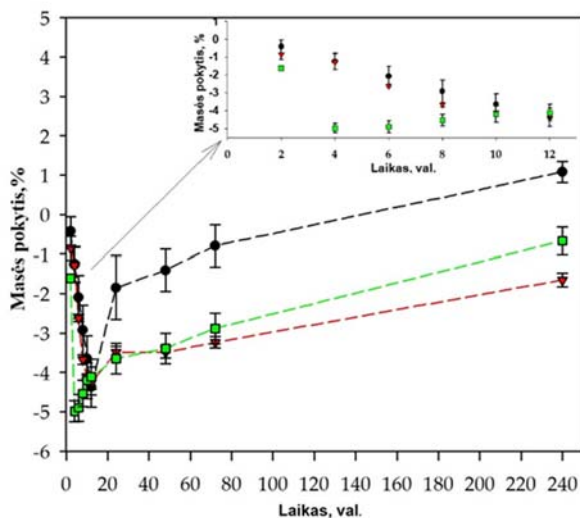
3.9 pav. Pelėsinių grybų fermentinis indeksas ant agarizuotos krakmolo terpės
Fig. 3.9. Enzymatic index of fungi on the starch agar medium

Po 16 parų nenustatyta, kad *A. fumigatus* skaido krakmolo terpę. *Rh. oryzae* amilazinis aktyvumas pagal FI sumažėjo iki 80 %, palyginus su gautais rezultatais po 13 parų. *Rh. oryzae* skaidė krakmolą greičiau ir intensyviau negu *A.fumigatus*, kurio fermentinis indeksas po 7 ir 13 parų kito nedaug nuo 1,02 iki 1,35. Galima manyti, kad šis *A.fumigatus* kamienas ne itin intensyviai skaido krakmolą. Inkubuojant ilgesnį laiką gauti duomenys gali būti netikslūs, nes pelėsinių grybų micelis padengia visą Petri lėkštelę, jis trukdo Liugolio tirpalui pasiekti krakmolo terpę. Identifikavus mikroorganizmų, produkuojančių celiulazinius ir amilazinius fermentus kokybiniais metodais ant atrankių terpių, rūšis, pasirinkti du mikroorganizmai: bakterija *P. putida* bei pelėsinis grybas *Rh. oryzae*. Šie mikroorganizmai buvo naudojami celiuliozinės kilmės kompozitinėms plokštėms iš kanapių spalų su kukurūzų krakmolo rišikliu mikrostuktūriniuose tyrimuose, taip pat buvo įvertintas tokių plokščių tankis bei atsparumas gniuždymui esant santykinai 10 % deformacijai.

3.2. Kompozitinių plokščių iš kanapių spalį užpildo su apsaugine danga fizikiniai tyrimai

3.2.1. Apsauginės hidrofofinės dangos susiformavimo greičio nustatymas

Siekiant nustatyti laiką, per kurį susiformuoja aliejinė hidrofofinė danga, buvo atliktas mikrooksidacijos tyrimas. Iš literatūros žinoma, kad esant 90 °C temperatūrai prasideda intensyvi aliejaus autooksidacija (Lazzari et al., 1999). Autooksidacijos metu pasikeičia aliejaus būseną, iš skysčio jis tampa kieta medžiaga.



3.10 pav. Aliejaus kietėjimas, kai susiformuoja kieta hidrofofinė danga: ● kanapių sėklų aliejus, ▼ linų sėmenų aliejus, ■ tungų medžių aliejus

Fig. 3.10. Oil hardening, when a hydrophobic coating is formed:

● hempseed oil, ▼ linseed oil, ■ tung tree oil

Pirmąsias 12 valandų vyksta intensyvus aliejų garavimas (3.10 pav.), t. y. masės mažėjimas. Nustatyta, kad greičiausiai garavo tungų medžio aliejus, jo masė per 4 valandas sumažėjo 4,98 %. Didžiausias linų sėmenų aliejaus masės sumažėjimas buvo po 12 val. 4,27 %. Kanapių sėklų taip pat po 12 val. – 4,37 %.

Pasibaigus intensyviai garavimo fazei, kai intensyviausiai garuoja vanduo, prasideda stingimas, pradeda formotis gelinė aliejaus struktūra (3.10 pav.). Tuomet garavimas lėtėja, nes pradeda skirtis susidarę lakieji organiniai junginiai.

Šis stingimo etapas kiekvienam aliejui prasidėjo skirtingai ir truko nevienodai ilgai (3.11 pav.). Kanapių sėklų aliejus po 24 val. buvo skystas, linų sėmenų aliejus buvo pasidengęs geline struktūra. Greičiausiai sustingo tungų medžio aliejus, suformuodamas kietos porėtos struktūros sluoksnį.



3.11 pav. Ritinėliai su aliejumi po inkubacijos 90 °C temperatūroje: kanapių aliejus – 24 val. (a); 240 val. (b); linų sėmenų aliejus – 24 val. (c); 240 val. (d); tungų medžio aliejus 2 val. (e); 24 val. (f); 240 val. (g)

Fig. 3.11. Specimens after incubation at 90 °C temperature: hempseed oil — 24 h (a), 240 h (b); linseed oil — 24 h (c), 240 h (d); tung tree oil — 2h (e), 24 h (f), 240 h (g)

Dėl molekulinį kryžminių jungčių (angl. *crosslinking*) atsiranda labai stabilūs tinklai, kurie yra hidrofobinės ir apsauginės dangos pagrindas.

Autooksidacijos proceso metu bendra aliejaus masė pakito (3.4 lentelė). Labiausiai sumažėjo tungų medžio aliejaus masė (3,49 %). Šis aliejus sustingo

greičiausiai (per 2 valandas), 47–56 kartais greičiau negu kanapių ir linų sėmenų aliejai, dėl didelio kiekio α -eleostearinės rūgšties.

3.4 lentelė. Aliejaus masės pokytis autooksidacijos proceso metu

Table 3.4. Change in the oil mass during the auto-oxidation process

Aliejus	Masės pokytis, %	Sustingimo laikas, val.
Kanapių sėklų	1,77±0,52	112
Linų sėmenų	2,87±0,18	94
Tungų medžio	3,49±0,34	2

Linų sėmenų aliejaus masė sumažėjo 2,87 %, jis sustingo per 94 val. Mažiausiai pakito kanapių sėklų aliejaus masė 1,77 %, jis stingo lėčiausiai – 112 val. Šis aliejus pasižymi antioksidacinėmis savybėmis dėl jame esančių tokoferolių, tokių kaip vitaminas E, ir tokotrienolių (Liang et al., 2015).

3.2.2. Aliejaus įsigėrimas į kompozitines plokštes

Aliejaus įsigėrimas į augalinės kilmės plokštes priklauso nuo jos sudėties. Iš literatūros žinoma, kad kanapių spalių porėtumas yra 76,67±2,03 % (Jiang et al., 2018), todėl galima daryti prielaidą, kad tuščios ertmės augalinės kilmės kompozitinėse plokštėse bus užpildytos natūralios kilmės aliejais.

3.5 lentelė. Aliejaus sugertis į augalinės kilmės kompozitines plokštes

Table 3.5. Oil penetration data for different oil-impregnated cellulosic composite boards with various compositions

Celiuliozinės kompozitinės plokštės tipas	Naturalūs aliejai	Aliejų sugertis į celiuliozinę kompozitinę plokštę, %
F tipo plokštė	Kanapių sėklų al.	55,05±9,66 %
	Linų sėmenų al.	63,41±18,86 %
	Tungų medžio al.	43,33±4,47 %
G tipo plokštė	Kanapių sėklų al.	81,80±10,92 %
	Linų sėmenų al.	93,42±15,88 %
	Tungų medžio al.	85,50±15,14 %
H tipo plokštė	Kanapių sėklų al.	61,64±12,99 %
	Linų sėmenų al.	68,22±11,23 %
	Tungų medžio al.	70,23±13,97 %

F tipo kompozitinė plokštė, kurios sudėtyje yra daugiafunkcio antipireno, sudaryto iš fosforo ir azoto organinių druskų, kanapių sėklų aliejaus absorbavo iki 55,05 %, linų sėmenų aliejaus – iki 63,41 %, o tungų medžio aliejaus – iki 43,33 %. Palyginus su kito tipo augalinės kilmės plokštėmis, šis antipireno priedas sumažino aliejaus prasiskverbimą. Visų trijų aliejų rūšių skverbimasis į G tipo plokštę buvo apie 20 % didesnis (apie 82–93 %) palyginus su kitomis. Manoma todėl, kad plėtrusis grafitas pasižymi oleofilinėmis savybėmis. Žinoma, kad žaliavinės naftos, dyzelino, tepalinės alyvos techninių avarių metu plėtrusis grafitas naudojamas kaip adsorbentas. Per pirmąsias 12 valandų plėtrusis grafitas 1 g adsorbuoja 4,5 g žaliavinės naftos (Yao et al., 2016). Tuo remiantis galima paaiškinti augalinės kilmės kompozitinės plokštės su plėtriuoju grafitu oleofilines savybes. Į H tipo plokštę, esančią be jokių priedų, aliejus prasiskverbė nuo 61,64 % iki 70,23 %, tai atitinka prielaidą, kad visos tuščios poros yra užpildomos aliejumi.

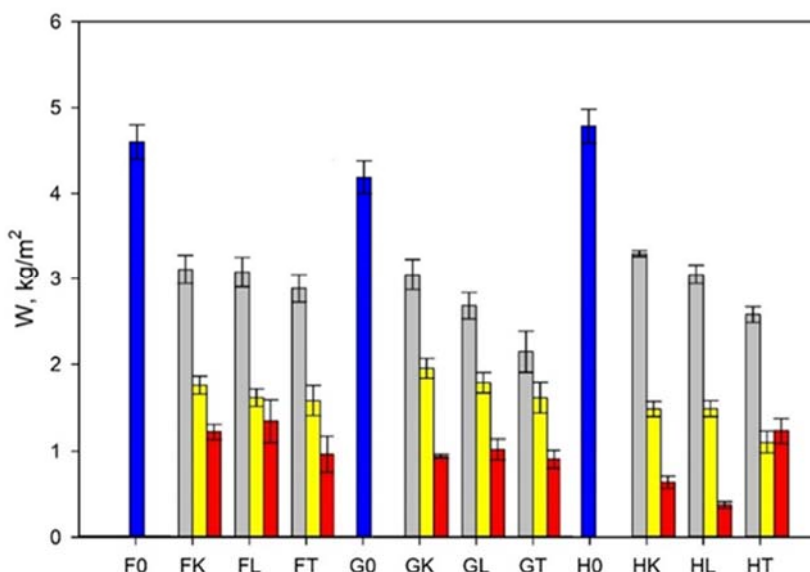
3.2.3. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga trumpalaikės vandens sugerties tyrimas

Pagrindinis natūralių pluoštų trūkumas yra jų hidrofiliškumas. Tai sumažina suderinamumą su hidrofobinėmis polimerinėmis matricomis. Jie taip pat pasižymi prastu matmenų stabilumu ir dideliu aplinkoje esančios drėgmės įsigeriamumu, dėl to negalima plačiai naudoti natūralių pluoštų kompozitų. Norint naudoti šias medžiagas lauke, būtina išanalizuoti jų savybes, veikiant natūralioms aplinkos sąlygoms (Beg et al., 2008), o tai šiuo metu nėra gerai ištirta sritis.

Kanapių spaliai pasižymi vandens sugertimi (net iki 4 kartų savo svorio), nes celiuliozės ir hemiceliuliozės polimerai turi amorfinės vietas, kurios atsakingos už vandens ir maistinių medžiagų apykaitos ciklą augale. Amorfinės vietos celiuliozės polimere turi lengvai prieinamų hidroksilo grupių, tai nulemia kanapių spalių hidrofiliinį pobūdį (He et al., 2019). Dėl galimybės naudoti celiuliozines kompozitines plokštes lauke būtina ištirti vandens poveikį šioms. 3.12–3.14 paveiksluose pateikti rezultatai, gauti matuojant atitinkamai trumpalaikę vandens absorbciją iš dalies panardinant, storio išbrinkimą ir matmenų stabilumą padidėjusios temperatūros ir drėgmės sąlygomis, kai CKP impregnuotos skirtingais aliejais.

Maksimali vandens sugertis buvo augalinės kilmės plokščių kompozituose, kurie impregnuoti aliejumi ir kietinti 40 °C temperatūroje (3.12 pav.). Tungų medžio aliejus pasižymėjo didžiausiu efektyvumu ir, palyginti su kontroliniais mėginiais, kurie nebuvo impregnuoti, sumažino vandens sugertį 36 % F tipo, 50 % G tipo ir 45 % H tipo plokštėms. Šie rezultatai rodo, kad aliejaus kietinimas 40 °C temperatūroje yra tik mažai efektyvus.

Priešingai, kai aliejinė danga suformuojama 90 °C arba 120 °C temperatūroje, pastebėta daug mažesnė vandens sugertis. Nepaisant augalinės kilmės kompozitinės plokštės tipo (F, G ar H), kanapių sėklų ir linų sėmenų aliejus turėjo beveik tą patį poveikį. Vandens sugertis sumažėjo daugiau kaip 2 kartus, kai hidrofobinė danga buvo suformuota 90 °C temperatūroje, palyginti su tomis, kurios buvo paruoštos 40 °C temperatūroje, ir daugiau nei 3 kartus, palyginti su kontrolinėmis, be impregnavimo aliejaus. Nustatyta, kad efektyviausia aliejinės apsauginės dangos kietinimo (polimerizacijos) temperatūra yra 120 °C. Įtakos vandens sugerčiai turi ir augalinės kilmės kompozitinės plokštės sudėtis, pavyzdžiui F ir G sudėties plokštėms vandens sugertis impregnavus tungų medžio aliejumi buvo mažiausia – 1,0 kg/m² ir 0,90 kg/m², o H sudėties impregnavus linų sėmenų aliejumi – 0,37 kg/m².



3.12 pav. Trumpalaikė vandens sugertis, kai celiuliozinės kompozitinės plokštės F, G, H impregnuotos K – kanapių sėklų aliejumi, L – linų sėmenų aliejumi, T – tungų medžio aliejumi, danga suformuota: 40 °C, 90 °C, 120 °C temperatūroje, kontrolė, *W* – trumpalaikė vandens sugertis

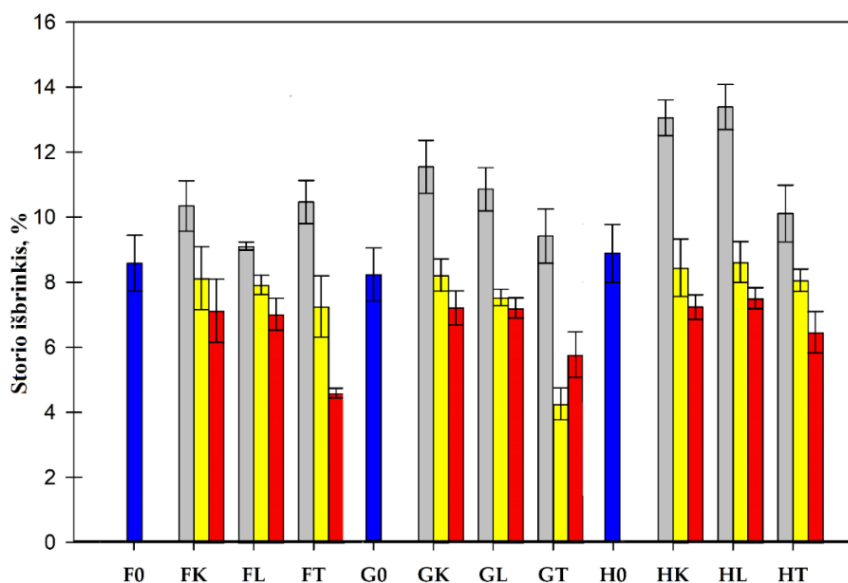
Fig. 3.12. Water absorption of different oils-impregnated cellulose-based composite boards at hardening temperatures: 40 °C, 90 °C, 120 °C, control without oil control, *W* — short-term water absorption by partial immersion

Nepaisant impregnavimo temperatūros, didžiausias vandens sugeriamumo sumažėjimas buvo pastebėtas, kai buvo naudojamas tungų medžio aliejus. Tai priklauso nuo šio aliejaus hidrofobiškumo bei struktūros. Literatūroje yra panašių

duomenų apie ryžių lukštų ir sojos baltymų pagrindu pagamintų plokščių impregnavimą tungų medžio aliejumi (Chalapud et al., 2020; He et al., 2019). Tačiau H tipo plokštės vandens sugertis yra mažiausia, palyginus su F ir G tipo gautais rezultatais. Tai rodo, kad F arba G priedai kartu su tungų medžio aliejumi sukuria tam tikrus ryšius, t. y. F priedas padengia kanapių spalių paviršių, susidarant plonam apsauginiam sluoksniui. G priedas trukdo kukurūzų krakmolo rišikliui, nes hidrofobinis priedas iš natūralių aliejų silpnina kukurūzų krakmolo gebėjimą absorbuoti vandenį.

3.2.4. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga storio išbrinkio tyrimas

Vertinant vandens poveikį, buvo atliktas augalinės kilmės kompozitinės plokštės storio išbrinkio tyrimas. Kalbant apie vandens sugertį pastebėti panašūs storio pokyčiai, apibendrinti 3.13 paveiksle.



3.13 pav. Storio išbrinkis, kai celiuliozinės kompozitinės plokštės F, G, H impregnuotos K – kanapių sėklų aliejumi, L – linų sėmenų aliejumi, T – tungų medžio aliejumi, danga suformuota: 40 °C, 90 °C, 120 °C temperatūroje, kontrolinis mėginys

Fig. 3.13. Swelling in the thickness of different oil-impregnated cellulose-based composite boards at hardening temperatures: 40 °C, 90 °C, 120 °C, control without oil

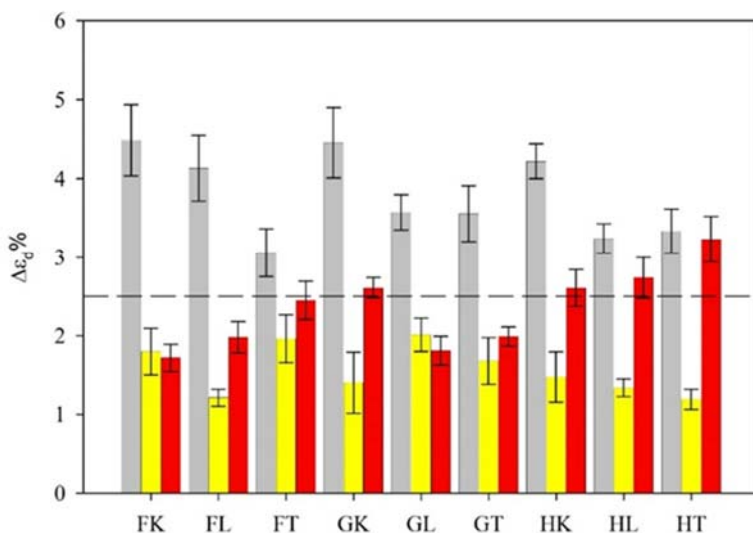
Nepriklausomai nuo naudojamos aliejaus rūšies ir apsauginės dangos formavimo temperatūros, storio išbrinkis sumažėjo, palyginus su neapsaugota augalinės kilmės kompozitive plokšte. Išskyrus tai, kad 40 °C temperatūra kietėjant dangai nebuvo efektyvi, t. y. lyginant su kontrolinėmis plokštėmis, visų rūšių aliejais padengtos plokštės išbrinko iki 1,5 karto. Nedidelį teigiamą poveikį galima pastebėti esant 90 °C kietėjimo temperatūrai. Kaip parodyta 3.13 pav., impregnavus kanapių sėklų ir linų sėmenų aliejais, gauti panašūs rezultatai. Tačiau tungų medžio aliejumi impregnuotų plokščių storio išbrinkis, kai dangos kietėjimo temperatūra buvo 90 °C, sumažėjo. Palyginus su kontroliniais bandiniais, tungų medžio aliejus sumažino storio išbrinkį ~15,7 % F tipo, ~48,0 % – G tipo ir 10,4 % – H tipo plokštėms. Didesnis impregnavimo tungų medžio aliejumi poveikis greičiausiai gautas dėl to, kad jis ant augalinės kilmės kompozitinės plokštės paviršiaus gali sudaryti labiau polimerizuotą, t. y. turinčią daugiau kryžminių jungčių, polimerinę dangą. Sustiprėję ryšiai tarp kompozito sudėtinių medžiagų neleidžia kukurūzų krakmolo dalelėms išbrinkti, todėl apriboja ne tik vandens sugertį ir storio išbrinkį, bet ir tūrinius pokyčius. Palyginus su literatūros šaltiniais, žinoma, kad kai kryžminės jungtys buvo formuotos citrinos rūgštimi paveikiant celiuliozę ir krakmolą, rūgštis blokavo kai kurias hidroksilo grupes ir padidino atsparumą vandeniui (Hassan et al., 2020). Tas pats išvadas galima padaryti esant 120 °C kietėjimo temperatūrai. Kanapių sėklų ir linų sėmenų aliejus paveikė panašiai visas kompozicijas, t. y., palyginus su kontroliniais bandiniais, storio išbrinkis sumažėjo 1,6 % F sudėties, 1,0 % – G sudėties ir 1,6 % – H sudėties plokštėms. Atsižvelgiant į viršutinę ir apatinę rezultatų ribas, kanapių sėklų ir linų sėmenų aliejumi impregnuotų kompozitinių plokščių išbrinkio storio sumažėjimas nereikšmingas. Tungų medžio aliejumi impregnuotų kompozitų storis sumažėjo nuo 8,6 % iki 4,6 % F tipo, nuo 8,2 % iki 5,8 % G tipo ir nuo 8,9 % iki 6,5 % H tipo plokštėms.

3.2.5. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga matmenų stabilumo tyrimas

Augalinės kilmės kompozitų susitraukimo ir / arba išbrinkimo laipsnis, pasikeitus aplinkos drėgmės kiekiui, yra svarbi savybė, lemianti jo pritaikomumą. Šis parametras žinomas kaip matmenų stabilumas. Matmenų stabilumo pokyčiai nustatomi statybiniais termoizoliaciniais gaminiais ir nėra įprastai matuojami celiuliozinės kilmės kompozitinėms plokštėms. Kadangi kanapių spalvai gali sugerti iki 4 kartų vandens buvo atliktas ir šis tyrimas. Remiantis EN 1604 standartu leidžiamas iki 2,5 % plokščių matmenų stabilumo pokytis tiriamiesiems bandiniams. Tyrimas atliktas pasirinkus standarte nurodytas ribines sąlygas, esant 70 °C temperatūrai ir 90 % drėgmei. Matmenų stabilumo rezultatai pateikti 3.14 paveiksle.

Matoma, kad apsauginės dangos kietėjimas 40 °C temperatūroje nepakankamas, matmenų stabilumo gerėjimą galima pastebėti tik esant 90 °C ir 120 °C temperatūrai. Augalinės kilmės kompozitinių plokščių matmenys pakankamai stabilūs buvo tik su ta aliejine danga, kuri suformuota 90 °C temperatūroje, t. y. neviršijo leistinos 2,5 % ribos bei pagerėjo iki 3 kartų, ir tai parodo, kad šiuo atveju impregnavimas yra efektyvus. Kaip jau minėta (He et al., 2019), impregnavimas aliejumi sumažina celiuliozinių kompozitų hidroksigrupių skaičių, todėl padidėja visų CKP matmenų stabilumas.

Didžiausias stabilumas buvo, kai aliejinės dangos kietėjimo temperatūra 90 °C H tipo kompozitams. Manoma, kad kai aliejai laisvai įsigeria į poras, tuštumas ir įtrūkimas, esančius tarp kukurūzų krakmolo rišiklio ir kanapių spalių, jie suformuoja hidrofinę plėvelę, taip trukdanti pakisti matmenims. Kadangi F priedas pasiskirstęs visame kanapių spalių paviršiuje, aliejus prasiskverbia tik per įtrūkumus ir tuštumas, esančius tarp kukurūzų krakmolo rišiklio. Antipireninio priedo F ir kukurūzų krakmolo sąsaja gali būti nepakankamai stipri, kad atlaikytų drėgmės poveikį.



3.14 pav. Matmenų stabilumo nustatymas, kai celiuliozinės kompozitinės plokštės F, G, H su apsaugine danga suformuotos iš: K – kanapių sėklų aliejaus, L – linų sėmenų aliejaus, T – tungų medžio aliejaus. Danga suformuota: 40 °C, 90 °C, 120 °C temperatūroje, po inkubacijos 70 °C ir 90 % RH

Fig. 3.14. Dimensional stability (70 °C temperature and 90 % relative air humidity) of different oil-impregnated cellulose-based composite boards at hardening temperatures: 40 °C, 90 °C, 120 °C. $\Delta\epsilon_d$ — the change in thickness

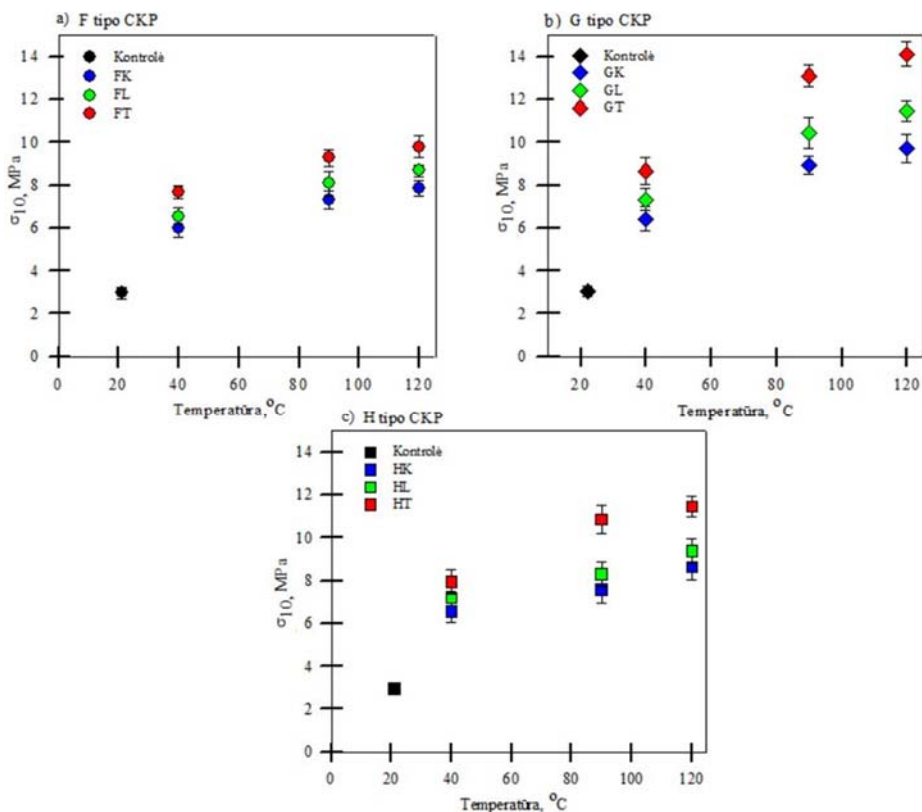
Be to, G priedas yra kaip tarpas, trukdantis kontaktinėms zonoms tarp kukurūzų krakmolo rišamosios medžiagos ir kanapių spalių, todėl matmenų stabilumas šiek tiek prastesnis, palyginti su H tipo kompozitu. Kai aliejinės dangos kietėjimo temperatūra 120 °C, galima pastebėti keletą įdomių pokyčių. Galima manyti, kad esant aukštesnei temperatūrai, kol aliejus tampa kietas, klampa yra sumažinta, vyksta pirmas autooksidacijos etapas, todėl geriau įsiskverbti į CKP struktūrą. Esant greitesnei skvarbai susiformuoja plonesnis galutinės plėvelės storis, kuris negali atlaikyti išbrinkimo jėgos. Matmenų stabilumo, esant aukštai temperatūrai ir drėgmei, taip pat vandens sugerties ir išbrinkio storio rezultatai rodo, kad su tirtais kanapių sėklų, linų sėmenų ir tungų medžio aliejais galima suteikti celiuliozinės kilmės kompozitinei plokštei hidrofobinių savybių.

3.2.6. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių atsparumas gniuždymui esant santykinai 10 % deformacijai

Celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės stiprumo pokytį lemia aliejaus tipas bei terminis apdorojimas. Nustatyta, kad didelis aliejaus įsigėrimas į kompozitinę plokštę padidina atsparumą gniuždymui, palyginti su kitais terminio apdorojimo metodais (Lee et al., 2018). Todėl norint efektyviai impregnuoti medienos ar panašius gaminius, turinčius daug celiuliozės, nebūtina naudoti aukštų temperatūrų. 3.15 paveiksle parodyti atsparumo gniuždymui duomenys esant 10 % deformacijai, kai aliejinė apsauginė danga formuota kietinant trijose skirtingose temperatūrose bei su trimis skirtingų aliejų rūšimis.

Nustatyta, kad dangos atsparumas gniuždymui padidėja, jau esant 40 °C aliejaus apsauginės dangos formavimo temperatūrai. Palyginti su kontroliniais bandiniais, atsparumas gniuždymui padidėjo 1,5–3 kartus, tai rodo, kad aliejus kaip apsauginė danga formuojasi 40 °C temperatūroje. Panašus pagerėjimas pastebėtas ir anksčiau (Bak et al., 2012), kai tuopos ir robinijos mediena 2–6 valandas impregnuota 160 °C temperatūroje saulėgrąžų, sėmenų ir rapsų aliejais. Aktyvinimo temperatūrų skirtumas gali būti siejamas su skirtinga impregnavimo trukme ir aliejaus rūšimis.

Esant 90 °C aliejaus kietinimo temperatūrai, nustatyta, kad atsparumas gniuždymui pasiekia 7,3 MPa, kai danga buvo iš kanapių sėklų aliejaus, linų sėmenų – 8,1 MPa, tungų medžio – 9,3 MPa F tipo kompozitinėse plokštėse. Kai naudota G tipo plokštė, 8,9 MPa – kanapių sėklų, 9,4 MPa – linų sėmenų, 14 MPa – tungų medžio – aliejams. Esant H tipo plokštei, 6,5 MPa – kanapių sėklų, 7,9 MPa – linų sėmenų ir 11 MPa – tungų medžio aliejams (3.15 pav.). Manoma, kad augaliniai aliejai užpildo kanapių spalių indus ir poras, padengia sienelės, suformuoja kryžminius molekulinis ryšius (angl. *crosslinking*), todėl susidaro apsauginė plėvelė ir atsiranda geresnis kanapių spalių šoninis stabilumas.



3.15 pav. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių atsparumas gniuždymui esant santykiniai 10 % deformacijai, kai suformuota danga ant a) F tipo su K – kanapių sėklų aliejumi, L – linų sėmenų aliejumi, T – tungų medžio aliejumi; b) G tipo su K – kanapių sėklų aliejumi, L – linų sėmenų aliejumi, T – tungų medžio aliejumi; c) H tipo tipo su K – kanapių sėklų aliejumi, L – linų sėmenų aliejumi, T – tungų medžio aliejumi

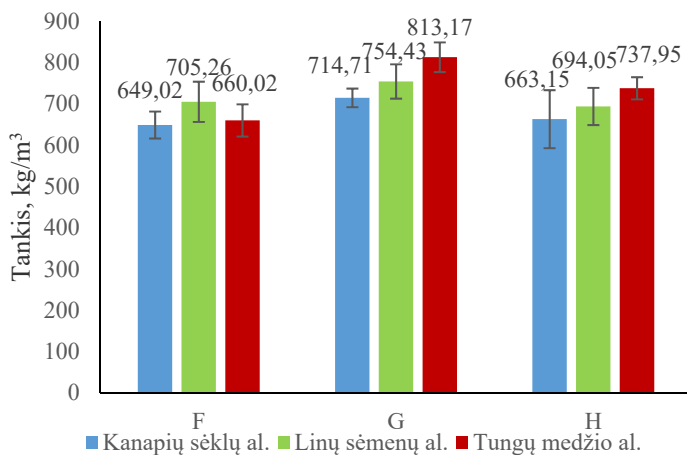
Fig. 3.15. Compressive stress at 10% deformation of cellulose-based composite boards with different oil-impregnation at different temperatures: a) F type of the CBB with hempseed oil (K), linseed oil (L), and tung tree oil (T); b) G type of the CBB with hempseed oil (K), linseed oil (L), and tung tree oil (T); c) H type of the CBB with hempseed oil (K), linseed (L), and tung tree oil (T)

Panašias išvadas padarė ir kiti tyrėjai, tyrę aliejumi impregnuotos medienos ir medžio drožlių plokščių matmenų stabilumą ir mechaninį atsparumą (Chalapud et al. 2020; Cheng et al. 2014). Kietėjimo temperatūros padidinimas iki 120 °C rodo nereikšmingą F tipo kompozitinės plokštės atsparumo gniuždymui pokytį. G ir H celiuliozinių kompozitinių plokščių atsparumo gniuždymui pokytis panašus į tą, kuris buvo tarp kontrolinių mėginių ir 40 °C aliejaus kietinimo temperatūros.

Gauti rezultatai rodo, kad atsparumo gniuždymui parametrai labiausiai padidėjo, kai apsauginė danga buvo kietinama 90 °C temperatūroje ir naudojamas tungų medžio aliejus. Reikšmingas pagerėjimas esant gniuždymo 10 % deformacijai rodo, kad tarp aliejaus, naudojamo impregnuoti, krakmolo, naudojamo kaip rišiklis, ir kanapių spalių veikia tarpusavio sinergija. Tai galima paaiškinti vandenilinių ryšių tarp kanapių spalių, linų sėmenų ir tungų medžio aliejaus molekulių laisvųjų karboksirūgščių grupių sąveika su kukurūzų krakmolo hidroksigrupėmis (Singh et al., 2022).

3.2.7. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su aliejine apsaugine danga tankis

Augalinės kilmės kompozitinių plokščių tankis daugeliu atvejų svarbus parametras. 3.16 paveiksle pavaizduota, kaip šios charakteristikos skiriasi naudojant skirtingas aliejaus rūšis ir kietinant 90 °C temperatūroje.



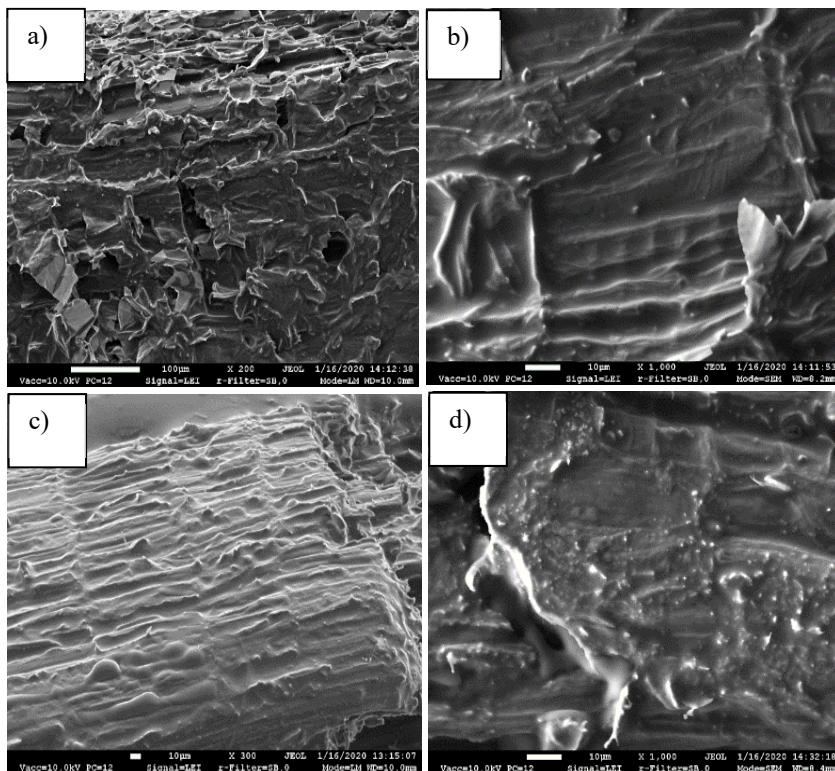
3.16 pav. Celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės su apsaugine danga tankis

Fig. 3.16. Density of the cellulose-based composite boards of natural origin when the coating was formed with K-hemp seed oil, L-flaxseed oil, T-tung tree oil

Nepaisant impregnuoti naudojamo aliejaus rūšies, tankis padidėjo visais atvejais. Didžiausias tankio padidėjimas nustatytas mėginiams, kurie impregnuoti tungų medžio aliejumi iki 48 %, o mažiausias su kanapių sėklų aliejumi – 37 %. Be to, tankio pokyčiai taip pat yra dėl to, kad skiriasi aliejų sudėtis, t. y. riebalų rūgštys, bei įvairių priedų, tokių kaip antioksidantai, buvimas.

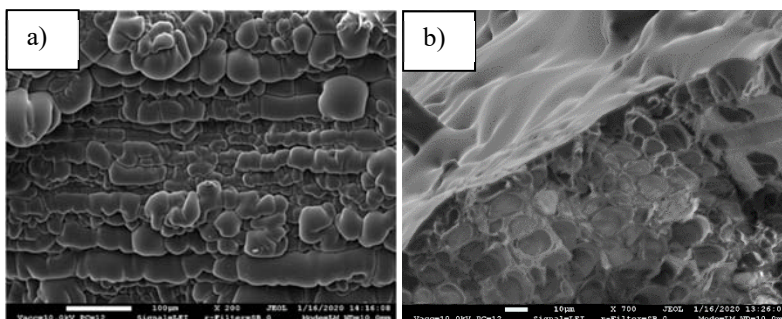
3.2.8. Kanapių spalį su aliejine apsaugine danga mikrostruktūros tyrimai

Celiuliozinės kilmės termoizoliacinės medžiagos pasižymi geromis termoizoliacinėmis savybėmis, nes porėta struktūra leidžia susidaryti didesniems oro tarpams. Žinoma, kad kanapių spaliai pasižymi porėta tvarkingai išsidėsčiusia struktūra. Tačiau, suformavus aliejinę apsauginę dangą, ši struktūra keičiasi. Ant kanapių spalį formuojant apsauginę dangą 90 °C temperatūroje su kanapių sėklų aliejumi pasidengia plėvelė (3.17 ir 3.18 pav.), kurios struktūra netvarkinga, atsikartoja paties spalio reljefas, matomas grublėtumas, susiformavę „krateriai“. Kai hidrofobinė danga suformuota iš linų sėmenų aliejaus, ji tolygesnė, nebesimato spalio reljefo, lyginant su kanapių sėklų aliejumi.



3.17 pav. Kanapių spalio mikrostruktūra: a) ir c) su kanapių sėklų aliejumi; b) ir d) su linų sėmenų aliejumi

Fig. 3.17. Hemp shives microstructure: a and c) with hemp seed oil, b and d) with flaxseed oil

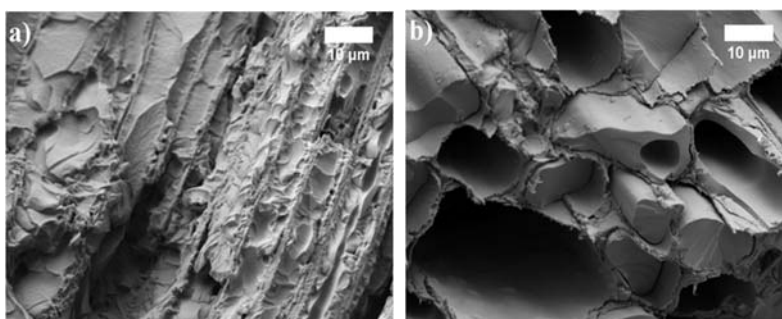


3.18 pav. Kanapių spalio mikrostrutūra: a ir b) su tungų medžio aliejumi
Fig. 3.18. Hemp shives microstructure: a and b) with tung tree oil

Kitoks vaizdas matomas, kai hidrofobinė danga ant kanapių spalio suformuota iš tungų medžio aliejaus. Kanapių spalio reljefinio paviršiaus nesimato, susiformuoja sferinė struktūra. Skersiniame pjūvyje matomas kanapių spalio, užpildytas tungų medžio aliejumi, su aiškia apsaugine plėvele paviršiuje.

3.2.9. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su aliejine apsaugine danga mikrostruktūra

Atlikus mikrostruktūrinę analizę ir palyginus su literatūros šaltiniais, nustatyta, kad į augalinės kilmės kompozitines plokštes iš kanapių spalių, turinčių tuščias poras ir vandens indus, prasiskverbia aliejus. Kaitinamas jis suformuoja biopolimerą, kuris užpildo tuščias ertmes (3.19 paveikslas).



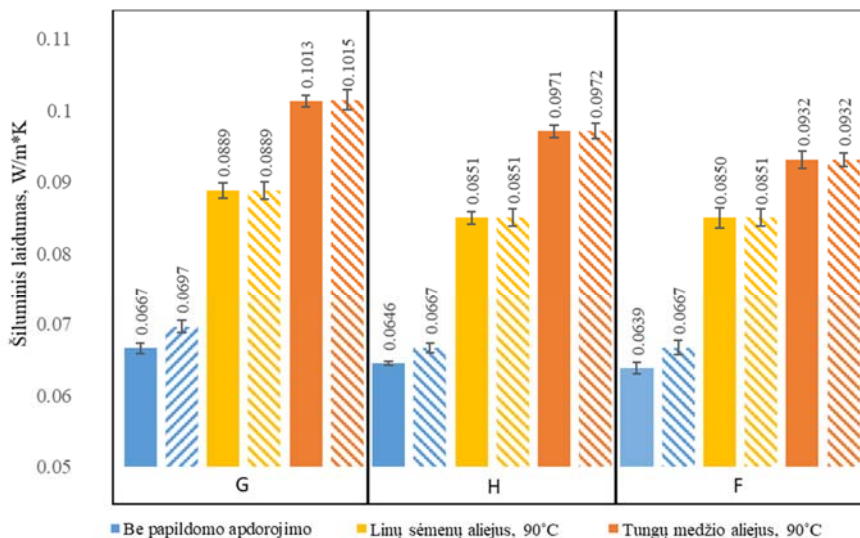
3.19 pav. Augalinės kilmės kompozitinės plokštės mikrostruktūra po hidrofobinės dangos formavimo 90 °C temperatūroje: a) su linų sėmenų aliejumi;
b) su tungų medžio aliejumi

Fig. 3.19. Microstructure of cellulose-based composite boards s with different oil-impregnation and hardening at 90 °C: (a) linseed oil; (b) tung tree oil

Tungų medžio aliejus vidutiniškai turi daugiau C=C jungčių, todėl jis greičiau džiūsta ir tankiau susidaro „kryžminiai ryšiai“, todėl ant augalinės kilmės kompozitinės plokštės paviršiaus sudaro storesnę dangą, kuri pagal mikrostruktūrinę analizę yra $\sim 1 \mu\text{m}$, o pvz., linų sėmenų aliejaus apsauginės dangos storis yra $\sim 0,6 \mu\text{m}$.

3.2.10. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga šiluminio laidumo tyrimas

Termoizoliacinėms medžiagoms būdinga akyta struktūra. Tačiau tokią struktūrą padengus apsaugine danga, šiluminės savybės gali pakisti. Dėl to buvo išmatuotas augalinės kilmės kompozitinės plokštės su apsaugine danga šiluminis laidumas. Danga suformuota iš linų sėmenų ir tungų medžio aliejų 90°C temperatūroje (3.20 paveikslas).



3.20 pav. Celiuliozinės kilmės plokščių su įvairiais aliejais suformuota danga 90°C temperatūroje šiluminis laidumas: G, H, F – plokščių tipas; ■ – linų sėmenų aliejus; ■ – tungų medžio aliejus; ■ – neapdorotos aliejumi: vientisos spalvos stulpeliai – bandiniai, išdžiovinti 70°C temperatūroje iki pastovaus svorio; dryžuoti stulpeliai – bandiniai, kurie kondicionuoti $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ temperatūroje ir $(50\pm 2)\%$ drėgmėje iki pastovaus svorio

Fig. 3.20. Thermal conductivity of different oil-impregnated cellulose-based composite boards. G, H, F — composition of boards, impregnated at 90°C hardening temperature.

■ — linseed oil, ■ — tung tree oil, ■ — without oil treatment: solid-type bars — specimens dried at 70°C to constant weight; pattern-type bars — specimens conditioned at $(23\pm 2)^\circ\text{C}$ and $(50\pm 2)\%$ to constant weight

Didžiausias šiluminio laidumo padidėjimas (34 %) gautas sausų mėginių, kurie padengti tungų medžio aliejumi, o mažiausias (22 %) – orasausių, kai danga buvo iš linų sėmenų aliejaus. Celiuliozinės kilmės kompozitines plokštes padengus aliejumi šiluminio laidumo reikšmės padidėja; tai tiesiogiai koreliuoja su šių plokščių tankio padidėjimu (3.20 pav.). Kaip minėta anksčiau, impregnavimo metu aliejus prasiskverbia į porėtą celiuliozinės kilmės kompozito struktūrą ir sudaro susietą ir tankią plėvelę visų komponentų sąsajose. Dėl šios priežasties padidėja kontaktinių zonų plotas, taip patiriant šilumos nuostolius.

Iš literatūros žinoma, kad augalinės kilmės medžiagos yra higroskopiškos, todėl be hidrofobinės dangos kompozitinių plokščių šiluminis laidumas padidėja iki 4,3 %, lyginant su orasausiu. Iš 3.20 pav. matyti, kad šiluminis laidumas tarp sausų ir orasausių mėginių, kurie impregnuoti aliejumi, nesikeičia arba kinta matavimo prietaiso paklaidų ribose, todėl galima daryti prielaidą, kad pasirinktos augalinės kilmės kompozitinių plokščių apsaugojimo technologija leidžia sumažinti jų higroskopiskumą.

3.2.11. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga atvirų porų nustatymas

Aliejų efektyvumui įvertinti užpildant ar izoliuojant poras, atliktas atvirojo poringumo nustatymas (3.6 lentelė). Nustatyta, kad impregnuojant aliejumi celiuliozinės kilmės kompozitines plokštes sumažėja atvirų porų kiekis, todėl vandens molekulės nebegali įsiskverbti į kanapių spalius.

3.6 lentelė. Atvirų porų nustatymas, kai impregnavimas atliktas su linų sėmenų ir tungų medžio aliejais 90 °C temperatūroje

Table 3.6. Open porosity of different oil-impregnated CKP at 90 °C temperature

Celiuliozinės kompozitinės plokštės tipas	Kontrolė	Linų sėmenų al.	Tungų medžio al.
F	18,1 ± 0,57	12,5 ± 0,62	11,0 ± 0,46
G	18,3 ± 0,77	12,2 ± 0,64	10,1 ± 0,64
H	20,2 ± 0,59	13,7 ± 0,80	11,3 ± 0,69

Efektyviausiai poringumą sumažino tungų medžio aliejus, kuris, nepaisant kompozitinės plokštės tipo, vidutiniškai sumažina atvirą akytumą ir tuštėtumą ~40 %, o linų sėmenų aliejus ~30 %, palyginti su kontroliniais bandiniais be apsauginės dangos.

3.3. Mikroorganizmų poveikis kompozitinėms plokštėms

3.3.1. *Rhizopus oryzae* ir *Pseudomonas putida* augimas ant kompozitinių plokščių

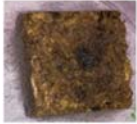
Išskirtos ir atrinktos grynos pelėsinio grybų ir bakterijų kultūros, produkujančios celiulazinius bei amilazinius fermentus. Norint atsakyti į darbo tikslą, kaip ir kiek paveikia tokie mikroorganizmai celiuliozinės kilmės kompozitus, buvo užsėtos pelėsinio grybo *Rhizopus oryzae* ir bakterijos *Pseudomonas putida* kultūros ant pačių kompozitinių plokščių. Pelėsinio grybo *Rh. oryzae* ir bakterijos *P. putida* suspensijos atskirai bei kartu, jas sumaišant lygiomis dalimis, buvo tolygiai paskleistos ant F, G, H tipo celiuliozinių kompozitinių plokščių be apsauginės dangos ir su ja, kuri suformuota iš tungų medžio ar linų sėmenų aliejaus. Tokios celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės su mikroorganizmų suspensijomis inkubuotos 6 mėnesius 22 °C temperatūroje 65 % drėgmėje (3.20 pav.) termostate, kuriame reguliuojama drėgmė.

Celiuliozinės kompozitinės plokštės su mikroorganizmais fotografuotos po dviejų, penkių, devynių ir aštuoniolikos savaitių, po to kas mėnesį iki 6 mėnesių, šio laikotarpio nuotraukos nepateiktos, nes po 18 savaitės jokių vizualinių pokyčių nesimatė.

Iš gautų tyrimo rezultatų (3.21 pav.) nustatyta, kad kai ant celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių buvo užsėtos bakterijos *P.putida* kultūros suspensija, vizualinio augimo nesimato tiek ant F, tiek ant G tipo. Kai buvo užsėta pelėsinio grybo kultūros suspensija *Rh.oryzae*, matome, kad jis augo ant kompozito šonų, t. y. per pjūvio vietas. Esant abiejų mikroorganizmų mišinio suspensijai ant celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės po 2 ir 5 savaitių užaugo šviesiai žalios spalvos kolonijos, kurios nebūdingos *Rh. oryzae*, tačiau ši spalva būdinga kitam identifikuotam pelėsiniui grybui *Aspergillus fumigatus*, kuris taip pat yra aktyvus celiuliozės skaidytojas. Manoma, kad likusios *A. fumigatus* sporos kompozito užpildo – kanapių spalių – vidinėje dalyje augo greičiau negu užsėtos pelėsinio grybo *Rh. oryzae* ir bakterijos *P. putida*, nors prieš sėjant tikslinius mikroorganizmus ant celiuliozinės kompozitinės plokštės jos buvo dezinfekuotos UV šviesoje 1 valandą. Todėl manoma, kad į kanapių spalių poras ar į tuščias celiuliozinės kilmės kompozito erdves pateko arba liko mikroorganizmų sporų, kurios atsirado augalo augimo laiku, perdirbimo arba kompozitinės plokštės formavimo metu.

Analizuojant celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės G (3.21 pav.) tyrimų rezultatus, matyti, kad bakterija *P.putida* neaugo. Galima teigti, kad *P. putida* bakterijoms nesusidarė palankios sąlygos augti, trūko drėgmės, nors ir

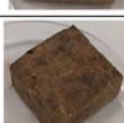
teigiama, kad dėl savo nepaprastai universalaus metabolizmo ji gali lengvai prisitaikyti ir atlaikyti fizinį bei cheminį stresą (Weimer et al., 2020).

	Auginio trukmė				
	Mikroorganizmas	2 savaitės	5 savaitės	9 savaitės	18 savaitę
F tipo augalinės kilmės kompozitinė plokštė	<i>P.putida</i>				
	<i>Rh.oryzae</i>				
	<i>P.putida</i> ir <i>Rh.oryzae</i>				
G tipo augalinės kilmės kompozitinė plokštė	<i>P.putida</i>				
	<i>Rh.oryzae</i>				
	<i>P.putida</i> ir <i>Rh.oryzae</i>				

3.21 pav. Augalinės kilmės kompozitinės plokštės su *P.putida*, *Rh.oryzae* ir jų abiejų suspensija

Fig. 3.21. Cellulose-based composite boards of the natural origin with *P. putida*, *Rh. oryzae*, and a suspension of both

Kai buvo kartu užsėtas *Rh. oryzae* ir *P.putida* suspensijų mišinys, užaugo pelėsinis grybas, tačiau bakterijų augimo nesimatė, nebuvo biofilmo ant celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės. *Rh.oryzae* išsiskverbė į kompozitinių plokščių vidines ertmes, ant paviršiaus augo oriniai hifai, formavosi micelis termostato aplinkoje esant 65 % drėgmei ir 22 °C temperatūrai.

	Auginimo trukmė Mikroorganizmas	2 savaitės	5 savaitės	9 savaitės	18 savaitės
F tipo augalinės kilmės kompozitinė plokštė su linų sėmenų aliejaus apsaugine danga	<i>P.putida</i>				
	<i>Rh.oryzae</i>				
	<i>P.putida</i> ir <i>Rh.oryzae</i>				
G tipo augalinės kilmės kompozitinė plokštė su tungų medžio aliejaus apsaugine danga	<i>P.putida</i>				
	<i>Rh.oryzae</i>				
	<i>P.putida</i> ir <i>Rh.oryzae</i>				

3.22 pav. Celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės F su suformuota apsaugine danga iš linų sėmenų aliejaus ir G su danga iš tungų medžio aliejaus su *P. putida*, *Rh.oryzae* ir jų abiejų mišiniu

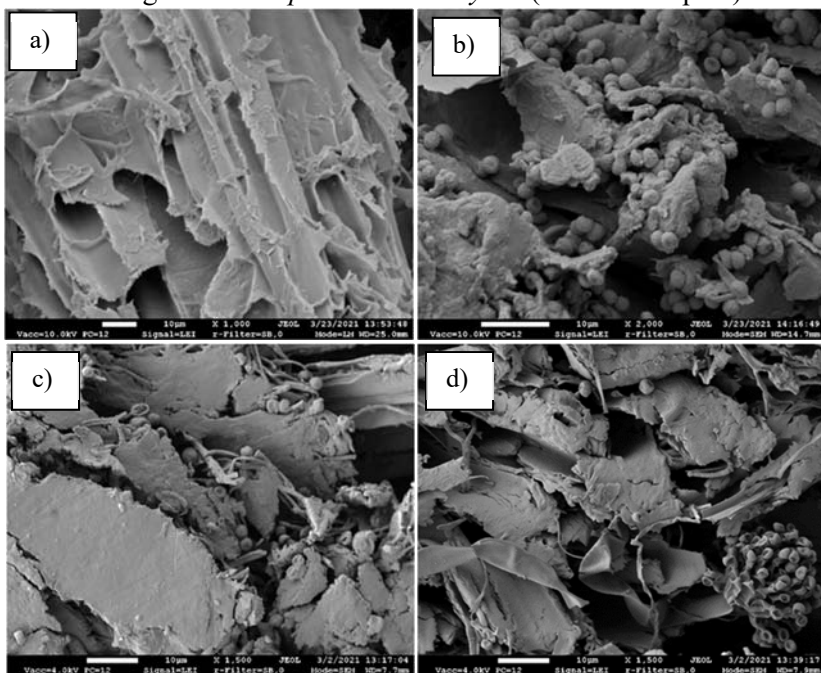
Fig. 3.22. Cellulose-based composite boards F type with formed a protective coating from linseed oil, and G with a coating from tung tree oil with *P. putida*, *Rh.oryzae*, and a mixture of both

Vizualiai nustatyta, kad tiek bakterijų *P. putida*, tiek pelėsinio grybo *Rh.oryzae* augimo ant F plokščių su apsaugine danga, suformuota iš linų sėmenų aliejaus, nėra (3.22 pav.). Tačiau ant G kompozitinės plokštės su apsaugine danga iš tungų medžio aliejaus vizualiai nustatytas mikroorganizmų augimas tik 18 savaitę. Kadangi matomi oriniai hifai ir micelis, galima teigti, kad tai ne

bakterijos, o pelėsiniai grybai. Kai ant G tipo kompozitinių plokščių užsėtas pelėsinis grybas *Rh. oryzae* bei jo ir bakterijos *P.putida* suspensijų mišinys, vizualiai matomas pelėsinių grybų orinių hifų bei micelio augimas.

3.3.2 Mikrostruktūrinė celiuliozinių kompozitinių plokščių analizė

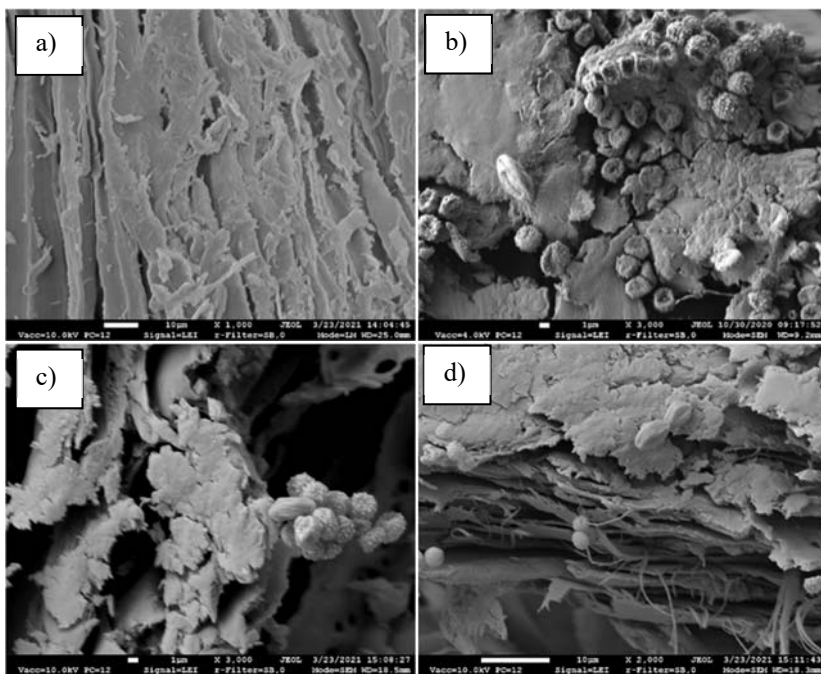
Celiuliozinės kilmės kompozito užpildas – kanapių spalvai – turi daug celiuliozės (57–77 %), o kukurūzų krakmolo rišiklis sudarytas iš amilozės ir amilopektino. Skaidant mikroorganizmams šiuos polisacharidus iki gliukozės, pagrindinio maistinių medžiagų šaltinio, vyksta celiuliozinės kilmės kompozito destrukcija, kuri lemia kompozitinių plokščių mechaninių ir šiluminių savybių pokyčius. Literatūroje aprašyta, kad esant aplinkoje drėgmei, mikroorganizmai, radę celiuliozės grandinėje amorfinę vietą, pradės produkuoti fermentus, skaidančius celiuliozės ir krakmolo polisacharidus, todėl skverbsis gilyn ir ardys polisacharidą. Buvo iškelta prielaida, kad paviršiuje ir 2–3 mm gylyje augs tiksliniai mikroorganizmai *P. putida* ir *Rh. oryzae* (3.23 ir 3.24 pav.).



3.23 pav. F plokštės tipo mikrostruktūrinė analizė: a) kontrolinis mėginys; b) 1 mm gylyje nuo plokštės paviršiaus; c) 2–2,5 mm gylyje; d) 4,5–5 mm bandinio viduryje
Fig. 3.23. Microstructure of the F-type board: a) the control sample, b) at a 1 mm depth from the surface, c) at a 2–2.5 mm depth from the surface; d) in the middle of the sample

Atlikta celiuliozinių kompozitinių plokščių, ant kurių užsėti mikroorganizmai ir inkubuoti šešis mėnesius 22 oC temperatūroje, 65 % drėgmėje, mikrostruktūrinė analizė. Celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės su *Rh. oryzae* ir *P. putida* bandinių sluoksniai paimti taip: viršutinis sluoksnis 1 mm, 2–2,5 mm ir tiriamo bandinio viduje 4,5–5 mm (3.23 pav., b, c, d). Pats paviršius netirtas, nes vizualiai matėsi mikroorganizmų augimas.

Mikroorganizmai rasti visuose tirtuose F tipo bandinio sluoksniuose. Gilesniuose sluoksniuose remiantis morfologine analize identifikuoti *Rh. oryzae* ir *P. putida*. Iš paveikslo matome, kad kontroliniame mėginyje, t. y. celiuliozinės kilmės kompozite, ant kurio nebuvo užsėti mikroorganizmai, jokių sporų ar orinių hifų nesimato. Kompozito F bandinio viduryje morfologiškai nustatytas ne tik užsėtas tikslinis pelėsinis grybas, bet manoma ir *Aspergillus* genties grybas (3.23 pav., d), nors ir prieš sėjant mikroorganizmus kompozitinės plokštės buvo sterilinamos 1 val. po dezinfekcinę UV lempa. *Aspergillus* spp. atsigavo gavęs pakankamą kiekį drėgmės ir šilumos.



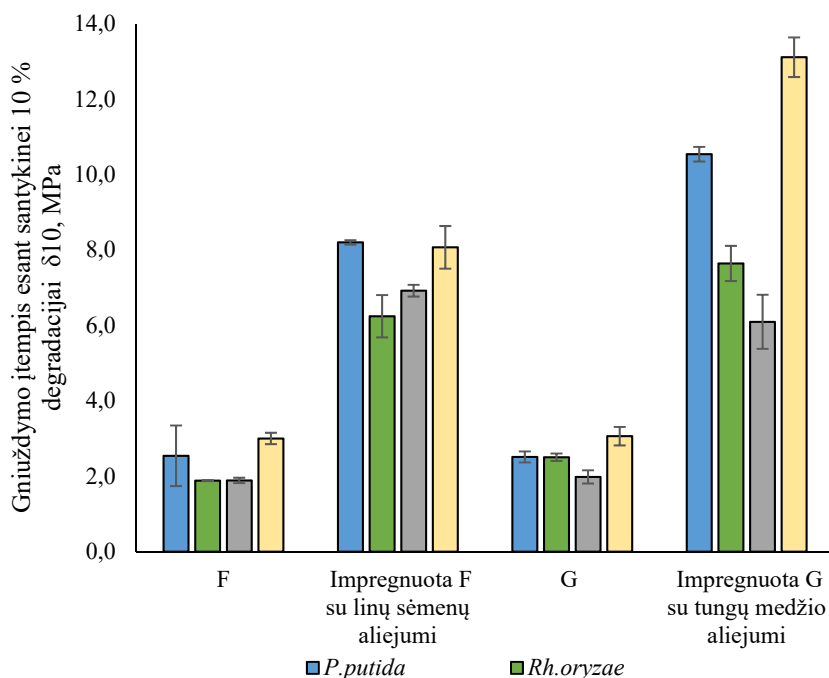
3.24 pav. G plokštės mikrostruktūrinė analizė: a) kontrolinis mėginy; b) 1 mm gylyje; c) 2–2,5 mm gylyje; d) 4,5–5 mm gylyje, bandinio vidury

Fig. 3.24. Microstructure of the G-type board: a) the control sample, b) at a 1 mm depth from the surface, c) at a 2–2.5 mm depth from the surface; d) in the middle of the sample

Celiuliozinės kilmės kompozito G bandinyje su tiksliniais mikroorganizmais po inkubavimo, gilesniuose sluoksniuose, morfologinės analizės metodu nustatyti pelėsiniai grybai gali būti *Rh. oryzae* bei *Aspergillus* spp, nes rastos sporos (3.24 pav.) būdingos šių genčių grybams.

3.3.3. Celiuliozinės kompozitinės plokštės fizikinės savybės po poveikio mikroorganizmais

Siekiant įvertinti ekologiškų plokščių ilgalaikiškumą vienas iš fizikinių metodų yra atsparumas gniuždymui bei tankis, kuris lemia šiluminį laidumą, nes labai svarbu, kad eksploatavimo metu tankis nekistų. Todėl atsparumas gniuždymui atliktas po 6 mėnesių, laikant mėginius 22 °C temperatūroje, 65 % drėgmėje. Iš 3.25 paveikslo matome, kad F tipo plokščių be apsauginės dangos, ant kurių užsėta grynos kultūros pelėsinio grybo suspensija *Rh. oryzae*, atsparumas gniuždymui sumažėjo 42,6 %, o kai buvo mikroorganizmų mišinys iš *Rh. oryzae* ir *P. putida* – 42,8 %.



3.25 pav. Mikroorganizmų poveikis celiuliozinės kilmės kompozitinėms plokštėms
Fig. 3.25. Effects of microorganisms on cellulose-based composite boards

Kadangi bandiniai inkubuoti 6 mėnesius, laikantis minimalių sterilumo sąlygų, 65 % drėgmėje ir 22 °C temperatūroje, siekiant kuo labiau imituoti gyvenamąsias patalpas, susidarė palanki terpė mikroorganizmams augti. Todėl augo ne tik tiksliniai mikroorganizmai, bet ir esantys kompozito užpilde kanapių spaliuose arba atsiradę iš aplinkos kompozito formavimo ir / ar inkubavimo metu. Pelėsinis grybas pradėjo skaidyti kompozito sudedamąsias dalis: užpildą – kanapių spalius ir rišiklį – kukurūzų krakmolą. Nustatyta, kad atsparumas gniuždymui, kai buvo užsėta bakterijos *P. putida* kultūros suspensija ant augalinės kilmės kompozitinės plokštės, sumažėjo 22,7 %, lyginant su kontroline plokšte be mikroorganizmų. Lyginat G tipo (3.7 lentelė) kompozitines plokštes, nustatyta, kad esant bakterijoms atsparumas gniuždymui sumažėjo apie 20,3 %, kai buvo pelėsinio grybo *Rh.oryzae* suspensija, – apie 20,5 %. Kai ant G tipo plokštės užsėtos abiejų mikroorganizmų mišinio suspensija, atsparumas gniuždymui sumažėjo 37,1 %.

3.7 lentelė. Celiuliozinių kompozitinių plokščių atsparumas gniuždymui esant santykiniai 10 % deformacijai

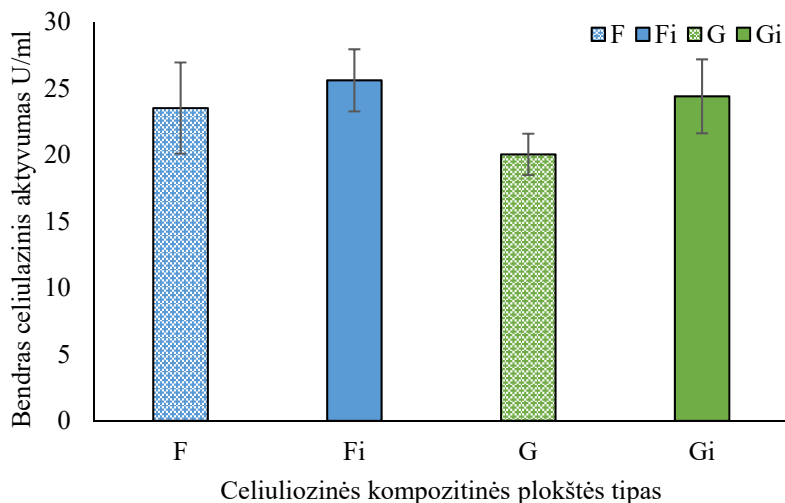
Table 3.7. Compressive stress at 10% deformation of cellulose-based composite boards

	Atsparumas gniuždymui esant santykiniai 10 % deformacijai, MPa			
Kompozitinės plokštės tipas	<i>P. putida</i>	<i>Rh. oryzae</i>	<i>P. putida ir Rh. oryzae</i>	Kontroliniai bandiniai
F	2,54 ± 0,80	1,88 ± 0,01	1,89 ± 0,07	3 ± 0,15
F su linų sėmenų aliejaus apsaugine danga	8,20 ± 0,06	6,24 ± 0,56	6,92 ± 0,16	8,06 ± 0,56
G	2,51 ± 0,15	2,50 ± 0,10	1,98 ± 0,18	3,06 ± 0,24
G su tungų medžio aliejaus apsaugine danga	10,54 ± 0,19	7,64 ± 0,47	6,09 ± 0,72	13,11 ± 0,52

Bakterijos *P. putida* nepaveikė F tipo augalinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga, kadangi, esant dangai, bakterijos neįsiskverbia į plokštės vidų. Pelėsinio grybo *Rh.oryzae* augimo vizualiai nesimatė (3.22 ir 3.25 pav.), bet atsparumas gniuždymui sumažėjo 22,6 %. Kai buvo užsėtas *Rh. oryzae* ir *P.putida* suspensijų mišinys, atsparumas gniuždymui sumažėjo 14,3 %. Lyginant su kontroliniu mėginiu, G tipo kompozitinę plokštę be hidrofobinės dangos veikiant bakterijoms *P.putida*, atsparumas gniuždymui sumažėjo 20,3 %, o su tungų medžio aliejine danga – 19,6 %. G plokštės su apsaugine danga ir *Rh.oryzae* sporų suspensija atsparumas gniuždymui sumažėjo 41,7 %, o su abiem mikroorganizmais – 53,5 %.

3.3.4. Celiulazinių ir amilazinių fermentų aktyvumo nustatymas

Pagrindiniai polisacharidai, esantys augalinės kilmės kompozitinėje plokštėje, yra celiuliozė – kanapių spaliuose ir amilozė – kukūruų krakmole. Kokybinio testo metu nustatyti mikroorganizmai, kurie pasižymi celiulazinių ir amilazinių fermentų aktyvumu. Siekiant įvertinti, ar *P. putida* ir *Rh. oryzae* gali skaidyti suformuotas augalinės kilmės kompozitines plokštes, t. y. celiuliozines grandines ir amilozę, buvo atlikti fermentiniai tyrimai, kai nustatomas galutinis produktas – redukuotas cukrus, t. y. gliukozės molekulės. Šių mikroorganizmų suspensijos buvo užsėtos ant celiuliozinės kilmės kanapių spalių kompozitų, nustatyta (3.21, 3.22 pav.), kad ant tokių plokščių susidarius palankioms sąlygoms auga ne tik tiksliniai mikroorganizmai, bet ir spaliuose esantys.



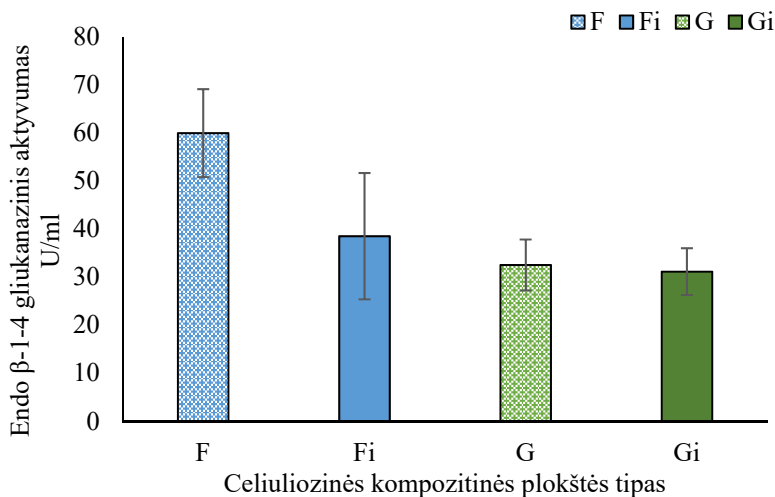
3.26 pav. Bendras mikroorganizmų celiulazinis poveikis ant F ir G tipo celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės. F ir G be apsauginės aliejinės dangos, Fi – su linų sėmenų aliejine danga, Gi – su tungų medžio apsaugine aliejine danga

Fig. 3.26. Total cellulase activity of microorganisms on cellulose-based composite boards of types F and G. F and G without protective oil coating, Fi – with a linseed oil coating, Gi – with a tung oil protective oil coating

Po inkubacijos iš F ir G tipo plokščių su apsaugine danga ir be jos buvo padarytos nuoplovos, kurios buvo centrifuguojamos, gautas supernatantas, naudojamas tolesniuose tyrimuose. Bendras celiulazinis aktyvumas nuoplovose, kurios padarytos nuo F tipo (3.26 pav.) celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės, nustatytas $23,5 \pm 3,4$ U/ml. Kai F tipo plokštė buvo impregnuota linų sėmenų aliejumi bei suformuota apsauginė danga, bendras celiulazinis aktyvumas

25,6±2,3 U/ml, nors vizualiai mikroorganizmų augimas nenustatytas. Nuo G tipo augalinės kilmės kompozitinės plokštės padarytose nuoplovose su mikroorganizmų produkuojamais fermentais nustatytas bendras celiulazinis aktyvumas 20±1,55 U/ml, o su apsaugine tungų medžio aliejine danga – 24,4±2,78 U/ml. Ne ant visų augalinės kilmės plokščių matėsi augimas, tačiau nustatytas bendras celiulazinis aktyvumas rodo, kad mikroorganizmų suspensija, užsėta ant celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės, augo, todėl sintetino fermentus ir dėl to vyko celiuliozės polimero skaidymas. Tačiau, kuris fermentinės dekonstrukcijos etapas tuo metu vyko, pagal bendrą celiulazinį aktyvumą nustatyti negalima.

Fermentai endo-β-1,4-gliukanazės (EC 3.2.1.4) hidrolizuoja celiuliozėje esančius vidinius glikozidinius ryšius. Iš literatūros šaltinių žinoma, kad kai kurie mikroorganizmų produkuojami endoglikanaziniai fermentai (Asha et al., 2015) veikia kristalinę celiuliozę, o tai neigiamai veikia celiuliozinės kilmės kompozitines plokštes. Siekiant nustatyti, koks yra šių endoglikanazių aktyvumas, nuo kompozitinių plokščių buvo padarytos nuoplovos, centrifuguotos ir supernatantas naudotas aktyvumo tyrimams.

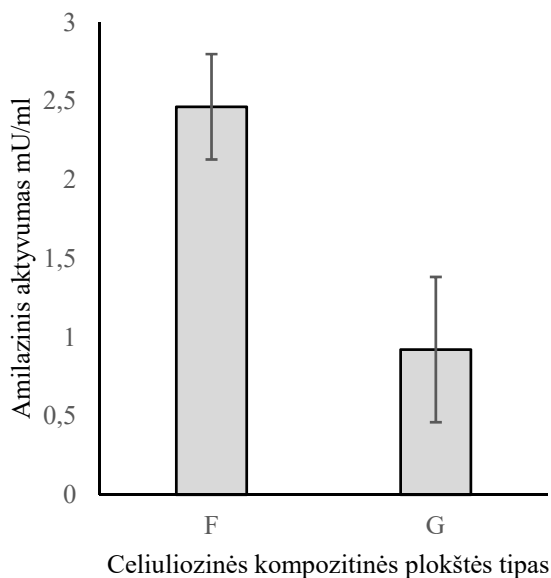


3.27 pav. Mikroorganizmų produkuojamų endo-β-1,4-gliukanazių aktyvumas nuo F ir G tipo augalinės kilmės kompozitinių plokščių. F ir G be apsaugines aliejinės dangos, Fi su linų sėmenų aliejine danga, Gi su tungų medžio apsaugine aliejine danga

Fig. 3.27. Activity of endo- β-1,4-glucanase produced by microorganisms from cellulose-based composite boards type F and G. F and G without protective oil coating, Fi – with a linseed oil coating, Gi – with a tung oil protective oil coating

Nustatytas mikroorganizmų produkujamos endo- β -1,4-gliukanazės (3.27 pav.) aktyvumas nuo F ir G tipo kompozitinių plokščių be apsauginės dangos ir su ja rodo, kad vyksta celiuliozės glikozidinis β -1,4 ryšio skaidymas. F tipo kompozito endogliukanazinis aktyvumas yra 60 ± 9 U/ml, o su apsaugine linų sėmenų aliejine danga – $38,5 \pm 13$ U/ml. G tipo kompozitinės plokštės endo- β -1,4-gliukanazinis aktyvumas $32,5 \pm 5$ U/ml, o su apsaugine tungų medžio aliejine danga – 31 ± 5 U/ml. Endo- β -1,4-gliukanazinis aktyvumas nuo F tipo kompozitinės plokštės be apsauginės dangos buvo didesnis, palyginus su kitais tirtais mėginiais, nuo 1,55 iki 1,9 karto. Hidrofobinė danga vis dėlto sumažino kanapių spalių hidrofilumą, todėl mikroorganizmai arba jų produkujami fermentai neprisijungė prie celiuliozės amorfinių vietų. Taip pat G tipo kompozitas, kurio sudėtyje yra plėtrusis grafitas, pasižymi antimikrobinėmis savybėmis (Whitehead et al., 2017), kurios iš dalies slopino mikroorganizmų augimą.

Augalinės kilmės kompozitinių plokščių rišiklis yra kukurūzų krakmolas. Nustatyta, kad bakterija *Pseudomonas putida* ir pelėsinis grybas *Rhizopus oryzae* pasižymi amilaziniu aktyvumu ant agarizuotos krakmolo terpės.



3.28 pav. Mikroorganizmų amilazinis aktyvumas nuo F ir G tipo augalinės kilmės kompozitinių plokščių.

Fig. 3.28. Amylase activities by microorganisms on the F- and G-type biocomposites boards

Atlikus amilazinio aktyvumo tyrimus nustatyta (3.28 pav.), kad nuo F ir G tipo augalinės kilmės kompozitinės plokštės gautame nuoplovų supernatante amilazinis aktyvumas nustatytas nuo F tipo $2,46 \pm 0,3$ mU/ml, o nuo G tipo $0,92 \pm 0,46$ mU/ml. Šios celiuliozinės kompozitinės plokštės buvo be apsauginės aliejinės dangos. Esant hidrofobinei dangai amilazinis aktyvumas CKP nuoplovose nenustatytas.

Amilazinių fermentų aktyvumas mažesnis 1000 kartų, lyginant su celiulazinių fermentų aktyvumu. Kadangi augalinės kilmės kompozitinės plokštės rišiklis yra kukurūzų krakmolą, kuris formavimo proceso metu yra termiškai apdorojamas, todėl pasikeičia polisacharido struktūra, susiformuoja nauji ryšiai. Taip pat augalinės kilmės kompozitinės plokštės dengiant hidrofobine danga iš linų sėmenų bei tungų medžio aliejų, kurie gali jungtis prie krakmolo molekulių, susidaro nauji polimeriniai dariniai, kaip žinoma iš literatūros, tokie krakmolo ir aliejų mišiniai naudojami bioplėvelių gamyboje (Gao et al., 2020).

3.4. Naujos kartos DNR sekoskaitos tyrimai

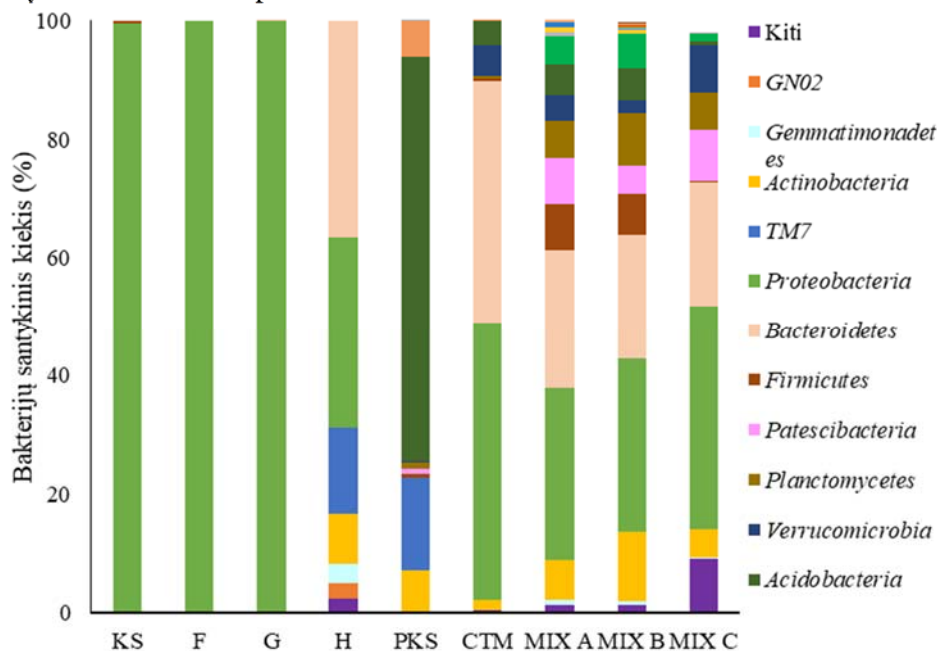
Ankstesniuose šio darbo tyrimuose pastebėta, kad mikroorganizmų bendrijos būna įsitvirtinusios celiuliozinėse medžiagose, iš jų formuojamose kompozitinėse plokštėse. Todėl nuspręsta naujos kartos sekoskaitos metodu nustatyti vyraujančių mikroorganizmų bendrijų sudėtį. Pirmiausia siekta nustatyti, kas sudaro mikrobiotą žaliaviniuose kanapių spaliuose, iš jų suformuotuose kompozituose, birioje termoizoliacinėje vatoje eksploatacijos metu ir kaip ji keičiasi vykstant biotransformacijai, t. y. kompostuojamuose celiulioziniuose mišiniuose. Biotransformacijos procesas – reiškiny, kai veikiamos mikroorganizmais atliekos suvirsta iki mažesnių molekulių, todėl jos vėl grįžta į biologinio virsmo ratą kaip maistinių medžiagų šaltinis augalams arba kitiems organizmams.

3.4.1. Sekoskaitos būdu nustatytų bakterinių bendrijų sudėtis

Išskyrus bendrąją bakterijų genominę DNR iš celiuliozinės kilmės medžiagų, tokių kaip kanapių spalių, kompozitinių plokščių, termoizoliacinės vatos bei kompostuojamų celiuliozinių mišinių, bei atlikus naujos kartos sekoskaitą, gauti duomenys išanalizuoti bioinformatiniais metodais ir nustatytos bakterijų gentys (3.29 pav.).

Nustatyta, kad kanapių spaliuose, žaliaviniame kompozito užpilde, vyraujančios bakterijos yra proteobakterijos (99,67 %). Jos išlieka vyraujančios ir kompozituose su antipireno priedais, plėtriuoju grafitu (G tipo plokštė 99,7 %) arba su fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalu (F tipo plokštė, 100 %). Nesant antipireninių priedų celiuliozinėse kompozitinėse plokštėse, kai užpildas

yra kanapių spaliai ir kukurūzų kramolo rišiklis, mikroorganizmų įvairovė padidėja – proteobakterijų, kurios vyrauja kanapių spaluose, sumažėja iki 32,1 %, atsiranda bakterioidečių (36,6 %), aktinobakterijų (8,4 %), sacharobakterijų (14,51 %). Tai parodo, kad antipireno priedai slopina kai kurių bakterijų rūšių augimą termoizoliacinėse plokštėse.



3.29 pav. Bakterijų gentinė sudėtis. KS kanapių spaluose, žaliavos, iš kurių formuojami kompozitai; F, G, H kompozitai, palyginimui CTM – biri celiuliozinė termoizoliacinė vata eksploatavimo metu, PKS – pluoštinių kanapių spalų plokštė, suformuota 2015 m., laikyta 4 metus kambario sąlygomis, bei kompostuojami celiulioziniai mišiniai MIX A, MIX B, MIX C

Fig. 3.29. Bacterial counts determined up to the taxonomic section. KS in hemp shives as raw materials for composites; F, G, H cellulose-based composites, where F – with Flovan additives; G – with expandable graphite, H – without additives. For comparison, CTM – bulk cellulose thermal insulation wool, after flooding, PKS – fiber hemp shives board with acrylic binder formed in 2015 and stored for 4 years under room conditions, and cellulose composted mixtures MIX A, MIX B, MIX C

Taip pat pastebėta, kad *Pseudomonas* genties bakterijos randamos plokštėse, pagamintose be antipireninių priedų (H tipo). Kadangi išskirtos ir tirtos *P. putida*, buvo padaryta prielaida, kad jos gali būti jautrios G ir F tipo kompozitinių plokščių antipireniniams priedams. Nustatyta, kad LB agarizuotoje terpėje su 1 % plėtriojo grafito tirtos bakterijos neaugo (duomenys nepateikiami). Nors literatūroje

tiesioginio plėtriojo grafito veikimas nenagrinėtas, tačiau yra duomenų apie grafito antimikrobines savybes, kuris – grafito pagrindinis struktūros elementas. Antimikrobinių savybių atsiranda tuomet, kai aštrūs grafito nanosluoksnių kraštai supjausto bakterijų ląstelių sienelių membranas, sudarydami poras, dėl kurių atsiradimo sutrinka osmosinis balansas ir galiausiai įvyksta ląstelės žūtis (Liu et al., 2011). Panašiai teigiama ir apie ląstelių žūtį, kai naudojamos fosforo ir azoto neorganinės druskos arba jų tirpalai (Nasrallah et al., 2022). Tolesniais tyrimais bus siekiama ištirti, ar antipirenai veikia kitų rūšių bakterijų gyvybingumą, tokių kaip *Bacteroidetes* ar / ir *Actinobacteria*, randamų H ir PKS tipo kompozituose.

Eksplotavimo metu celiuliozinėje termoizoliacinėje medžiagoje rastų mikroorganizmų sudėtis buvo panaši į randamą H tipo termoizoliacinėse plokštėse, rasta proteobakterijų (46,82 %), bakterioidečių (40,72 %), verukomikrobijų (5,32 %), aktinobakterijų (1,8 %) ir firmikučių (0,55 %).

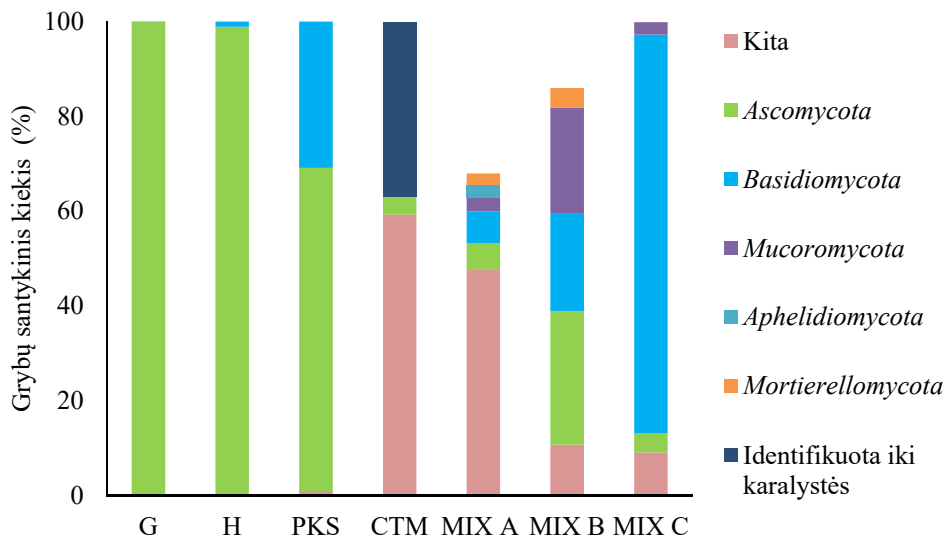
Kompostuojant celiuliozines medžiagas didelę įtaką turi žaliųjų atliekų panaudojimas. Siekiant gauti subrendusį kompostą naudojant tekstilės atliekas, žaliųjų atliekų kiekis turi sudaryti bent 20 %. Nustatyta, kad esant 80 % tekstilės atliekų kompostavimo mišiniuose, juose randamas padidėjęs sunkiųjų metalų ir ypač cinko kiekis. Šie metalai slopina kai kurių mikroorganizmų augimą. Didėjant žaliųjų atliekų koncentracijai, atitinkamai mažėja sunkiųjų metalų koncentracija, todėl didėja ir taksonominių lygių įvairovė, kuri yra nuo 4 iki 27 kartų sąlygiškai didesnė nei rasta kanapių spalioose ar ant kompozitinių plokščių su antipireniniais priedais.

3.4.2. Sekoskaitos būdu nustatytų grybų bendrijų sudėtis

Atliekant eukariotinių (pelėsinių grybų) bendrijų sudėties nustatymą (Gleason et al., 2012; Ko et al., 2018) ne visi išskirtos genominės DNR mėginiai atitiko kokybinius reikalavimus naujos kartos sekoskaitai, todėl gauti duomenys analizuojami tik G ir H tipo celiuliozinių kompozitinių plokščių, PKS plokštės bei celiuliozinių kompostavimo mišinių bendrijų (3.30 pav.). Pagal taksonominį skyrių celiuliozinėse kompozitinėse G ir H tipo plokštėse vyrauja *Ascomycota* (aukšlagrybiai, atitinkamai 99,88 % ir 98,85 %) bei rasta šiek tiek *Basidiomycota* (papėdgrybių – 0,12 % ir 1,15 %). PKS plokštės gDNR mėginiuose kartu su aukšlagrybiais taip pat rasta apie 30 % papėdgrybių. Birioje termoizoliacinėje vatoje nustatyta 36,9 % gautų sekoskaitos rezultatų tik iki grybų karalystės, todėl tiksliai identifikuoti galima tik *Ascomycota* (aukšlagrybius) 3,6 %.

Tiriant kompostuojamus celiuliozinius mišinius, nustatyta, kad esant 80 % tekstilės, 10 % popieriaus ir kartono bei 10 % žaliųjų atliekų, vyrauja papėdgrybiai, o, didėjant žaliųjų atliekų kiekiui kompostuojamame mišinyje,

atsiranda arba santykinai padidėja ir kitų mikromicetų, pvz., *Mucoromycota*, *Mortierellomycota* bei kitų nenustatytų grybų.



3.30 pav. Grybų gentinė sudėtis. G, H tipo kompozitinės plokštės, PKS – pluoštinių kanapių spalų plokštė (2015 m.), CTM – biri celiuliozinė termoizoliacinė vata eksploataavimo metu, kompostuojami celiulioziniai mišiniai MIX A, MIX B, MIX C

Fig. 3.30. Fungi counts were determined up to the taxonomic section. KS in hemp shives as raw materials for composites; F, G, H cellulose-based composites, where F – with Flovon additives; G – with expandable graphite, H — without additives. For comparison, CTM – bulk cellulose thermal insulation wool, after flooding, PKS – fiber hemp shives board with acrylic binder formed in 2015 and stored under room conditions, and cellulose composted mixtures MIX A, MIX B, MIX C

Nustatyta, kad celiuliozinės medžiagos (3.29 ir 3.30 pav.) su įvairiais priedais, tokiais kaip anitpirenai arba tekstilės atliekose esantys sunkieji metalai, inhibuoja kai kurių mikroorganizmų rūšių augimą. Kuo mažiau dedama nenatūralių priedų arba kuo ilgiau laikomos celiuliozinės medžiagos didesnėje nei 75 % drėgmėje (Møller et al., 2017), tuo įvairesnė mikrobiota.

3.5. Trečiojo skyriaus išvados

1. Atlikus mikrobiologijos tyrimus, išskirti ir nustatyti mikroorganizmai nuo kanapių spalų su natūraliu rišikliu ligninu. Nustatyta 16 pelėsinų grybų, iš kurių 12 iki rūšies, 4 iki genties taksonominio vieneto, bei bakterijos,

kurių 4 identifikuotos iki rūšies ir 1 iki genties taksonominio vieneto. 100 % sutapimas su duomenų bazėmis buvo pelėsinių grybų *Rhizopus oryzae* ir *Aspergillus fumigatus*. Bakterijų sutapimas: *Bacillus subtilis* – 100 %, *Paenibacillus rigui* – 99,46 %, *Pseudomonas putida* – 99,8 %. Tyrimams tinkami mikroorganizmai pasižymi celiulaziniu ir amilaziniu aktyvumu.

2. Autoksidacijos proceso metu tungų medžio kaulavaisių aliejus kietėjo greičiausiai – 2 val., linų sėmenų aliejus – 94 val., o kanapių sėklų aliejus – 112 val. Tungų medžio aliejus neteko 3,49 % masės, linų sėmenų aliejus – 2,87 %, kanapių sėklų aliejus – 1,77 %. Aliejaus kietėjimo greitis lemia hidrofinės apsauginės dangos ant celiuliozinių kompozitinių plokščių susiformavimo trukmę. Naudojant tungų medžio aliejų danga susiformuoja greičiausiai.
3. Kanapių sėklų, linų sėmenų, tungų medžio aliejus į celiuliozinę kompozitinę plokštę, kurioje naudotas antipirenas – plėtrusis grafitas, įsiskverbia 20 % daugiau, negu į celiuliozinę kompozitinę plokštę, kurios sudėtyje buvo fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalas arba nebuvo jokių priedų. Toks plokštės tipas lemia didesnę celiuliozinės kompozitinės plokštės su plėtriuoju grafitu ir apsaugine aliejine danga tankį, palyginus su celiuliozinėmis kompozitinėmis plokštėmis be plėtriojo grafito.
4. Aliejinės dangos suformavimas 120 °C temperatūroje lemia mažesnę kompozitinės plokštės trumpalaikę vandens sugertį nuo 0,37 iki 1,22 kg/m² ir išbrinkį nuo 4,59 iki 7,5 %, palyginus su plokštėmis be apsauginės hidrofinės dangos. Celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių su apsaugine danga matmenų stabilumas neviršijo 2,5 % leidžiamosios ribos, kai danga suformuota 90 °C ir 120 °C temperatūroje. Tokios apsauginės dangos apsaugo celiuliozines kompozitines plokštes nuo drėgmės.
5. Celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės stiprumo pokytį lemia plokštėje esantys priedai, aliejaus tipas bei apsauginės dangos formavimo temperatūra. Didžiausiu atsparumu gniuždymui pasižymi celiuliozinė kompozitinė plokštė su plėtriuoju grafitu ir tungų medžio aliejumi, kai gniuždymo stipris 14,13 MPa. Kai danga kietinama ne žemesnėje nei 90 °C temperatūroje, suformuojama apsauginė danga, kuri pagerina celiuliozinės plokštės ilgalaikiškumą.
6. Aliejinės dangos storis ant kanapių spalio, siekiantis ~1 μm su tungų medžio aliejumi ir 0,6 μm – su linų sėmenų aliejumi, apsaugo celiuliozines kompozitines plokštes nuo drėgmės įgėrio.
7. Efektyviausiai atviras poras sumažina tungų medžio aliejus. Tokių porų sumažėjimas lemia padidėjusį 48 % celiuliozinės kompozitinės plokštės, padengtos tungų medžio aliejumi, tankį, kuris tiesiogiai koreliuoja su

- padidėjusiu šilumos laidumu iki 34 %. Sukurta apsauginė danga sumažina vandens molekulių prasiskverbimą link celiuliozės grandinės amorfinių vietų bei celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių higroskopiskumą.
8. Mikroorganizmai *Rh. oryzae* ir *A. fumigatus* skverbiasi ir ardo aliejine danga neapsaugotą celiuliozinę kompozitinę plokštę per visą kompozito gylį.
 9. Esant ant celiuliozinių kompozitinių plokščių užsėtai grynai bakterijų kultūrai *P. putida* kompozito atsparumas gniuždymui sumažėja 20 %, nepaisant plokštės ir hidrofobinės dangos tipo. Pelėsinio grybo *Rh. oryzae* kultūra, gryna arba kartu su bakterija *P. putida*, užsėta ant celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės, mažina apie 40 % kompozito atsparumą gniuždymui, nepaisant plokštės ir hidrofobinės dangos tipo. Kai ant plokštės su fosforo ir azoto neorganinės druskos priedu bei iš linų sėmenų aliejaus suformuota apsaugine danga užsėtas pelėsinis grybas *Rh. oryzae*, atsparumas gniuždymui sumažėjo iki 22 %. Labiausiai atsparumas gniuždymui sumažėja tų plokščių, ant kurių buvo užsėti abu *P. putida* ir *Rh. oryzae* mikroorganizmai.
 10. Veikiant mikroorganizmams, didžiausias $25,6 \pm 2,3$ U/ml celiulazinis aktyvumas buvo kompozitinėse plokštėse su fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalu ir apsaugine danga iš linų sėmenų aliejaus; lyginant su kitais gautais rezultatais, jis buvo didesnis vidutiniškai apie 13,6 %. 60 ± 9 U/ml endo- β -1,4-gliukanazinis aktyvumas kompozitinėse plokštėse su fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalu, be apsauginės dangos, buvo didesnis už kitus tirtus nuo 1,55 iki 1,9 karto. Todėl galima teigti, kad bioskaidymas prasideda ne nuo celiuliozės polimero grandinės galo, o nuo vidinių jungčių, kurios neapsaugotos hidrofobine danga.
 11. Atlikus fermentinio aktyvumo tyrimus, nustatytas amilazinis aktyvumas tik ant tų kompozitinių plokščių, kurios buvo be apsauginės dangos su abiejų tipų antipirenais: fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalu – $2,46 \pm 0,3$ mU/ml ir plėtriuoju grafitu – $0,92 \pm 0,46$ mU/ml. Hidrofobinės dangos apsaugo kukurūzų krakmolo rišiklį nuo mikroorganizmų, išskiriamų dėl amilazinių fermentų poveikio, todėl celiuliozinė kompozitinė plokštės struktūra išlieka.
 12. Antipireniniai priedai ar sunkieji metalai slopina kai kurių bakterijų, tokių kaip *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Patescibacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Tenericutes*, bei pelėsinių grybų *Mucoromycota* *Aphelidiomycota* *Mortierellomycota* augimą, todėl šie mikroorganizmai neardo celiuliozės polimero struktūros.

Bendrosios išvados

1. Sukurtos aliejinės dangos 90 °C ir 120 °C temperatūroje apsaugo celiuliozinės kilmės kompozitinės plokštės su apsaugine danga iš kanapių sėklų, linų sėmenų ar tungų medžio aliejų nuo drėgmės įgėrio.
2. Celiuliozinės kompozitinės plokštės su apsaugine hidrofobine danga iš linų sėmenų ar tungų medžio aliejaus bei su užsėtomis mikroorganizmų kultūromis atsparesnės gniuždymui, palyginus su plokštėmis be apsauginės dangos, nuo 3 iki 4 kartų.
3. Bioskaidymas nustatytas pagal bendrąjį celiulazinį, endo- β -1,4-gliukanazinį ir amilazinį aktyvumus. Didžiausias endo- β -1,4-gliukanazinis aktyvumas buvo 60 ± 9 U/ml, nustatytas tiriant kompozitines plokštės su fosforo ir azoto neorganinės druskos tirpalu be apsauginės dangos. Amilazinis aktyvumas nustatytas tik ant kompozitinių plokščių be apsauginės dangos. Galima teigti, kad bioskaidymas prasideda nuo celiuliozės vidinių jungčių per neapsaugotas hidrofobine danga amorfinės vietas.
4. Celiuliozinėse medžiagose esantys antipireniniai priedai ar sunkieji metalai slopina kai kurių rūšių mikroorganizmų augimą. Todėl antipireniniai priedai ir / ar sunkieji metalai lemia celiuliozinės kompozitinės plokštės ilgaamžiškumą, bet sumažina celiuliozinių mišinių kompostavimo efektyvumą.

Rekomendacijos

1. Rekomenduojama celiuliozines kompozitines plokštes apsaugoti nuo vandens, jas impregnuojant natūralios kilmės linų sėmenų arba tungų medžio aliejais, kurie priklauso džiūstančiųjų grupei. Po impregnavimo būtina celiuliozines kompozitines plokštes su aliejais kaitinti ne žemesnėje nei 90 °C temperatūroje suformuojant apsauginę hidrofobinę dangą. Esant šioms dangoms celiuliozinės kilmės kompozitinių plokščių savybės pagerėja, t. y. sumažėja trumpalaikė vandens sugertis iki 3 kartų, išbrinkis 48 %, matmenų stabilumas neviršija leidžiamųjų ribų, plokštės tampa higroskopiškos. Todėl, nors ir esant perteklinei drėgmei, aplinkoje esantys mikroorganizmai lėčiau skaido celiuliozinės kilmės kompozitines plokštes.
2. Norint padidinti celiuliozinių kompozitinių plokščių ilgalaikiškumą, prieš formuojant plokštes, rekomenduojama panaikinti mikroorganizmų sporas, kurios augalo augimo metu įsisiskverbia į kanapių spalius. Efektyviausias būdas autoklavuoti 121 °C temperatūroje, 1 atm slėgyje 15 min. pačius kanapių spalius. Tokius išsterilintus kanapių spalius siūloma naudoti formuojant celiuliozinės kilmės kompozitines plokštes.
3. Rekomenduojama naudoti antipireninius priedus, nes jie iš dalies slopina mikroorganizmų augimą, o tai sumažina gamtinių polimerų, tokių kaip celiuliozė ir krakmolai, bioskaidymą.

Literatūros sąrašas

- Acuña P., Li, Z., Santiago-Calvo, M., Villafañe, F., Rodríguez-Perez, M., & Wang, D. Y. (2019). Influence of the characteristics of expandable graphite on the morphology, thermal properties, fire behaviour and compression performance of a rigid polyurethane foam, *Polymers* 11(1). [https://doi: 10.3390/polym11010168](https://doi.org/10.3390/polym11010168)
- Arantes, V., & Saddler J. N. (2010). Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis, *Biotechnology for Biofuels* 3(1): 4. [https://doi: 10.1186/1754-6834-3-4](https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4)
- Asadauskas, S., & Erhan, S. Z. (2001). Thin-film test to investigate liquid oxypolymerization of nonvolatile analytes: Assessment of vegetable oils and biodegradable lubricants. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* 78(10): 1029–1035. [https://doi: 10.1007/s11746-001-0383-z](https://doi.org/10.1007/s11746-001-0383-z)
- Asha, P., Divya, J., & Bright Singh, I. S. (2015). Purification and characterisation of processive-type endoglucanase and β -glucosidase from *Aspergillus ochraceus* MTCC 1810 through saccharification of delignified coir pith to glucose. *Bioresource Technology* 213. [https://doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.013](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.013)
- Bak, M., & Németh, R. (2012). Changes in swelling properties and moisture uptake rate of oil-heat-treated poplar (*Populus × euramericana* cv. pannónia) wood. *BioResources* 7(4): 5128–5137. [https://doi: 10.15376/biores.7.4.5128-5137](https://doi.org/10.15376/biores.7.4.5128-5137)
- Barcelos, C. A., Rocha, V. A., Groposo, C., de Castro, A. M., Pereira, & Jr N. (2016). Enzymes and Accessory Proteins involved in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. *Mycology: Current and Future Developments* 1(2): 23–56.

[https://doi: 10.13140/RG.2.1.3557.3527](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3557.3527)

Battaglia, E., Benoit, I., van den Brink, J., Wiebenga, A., Coutinho, P. M., Henrissat, B., & de Vries, R. P. (2011). Carbohydrate-active enzymes from the zygomycete fungus *Rhizopus oryzae*: A highly specialized approach to carbohydrate degradation depicted at genome level. *BMC Genomics* 12. [https://doi: 10.1186/1471-2164-12-38](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-38)

Bayrak, A., Kiralan, M., Ipek, A., Arslan, N., Cosge, B., & Khawar, K. M. (2010). Fatty acid compositions of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) genotypes of different origin cultivated in Turkey. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 24(2): 1836–1842. [https://doi: 10.2478/V10133-010-0034-2](https://doi.org/10.2478/V10133-010-0034-2)

Beg, M. D. H., & Pickering, K. L. (2008). Reprocessing of wood fibre reinforced polypropylene composites. Part II: Hygrothermal ageing and its effects. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 39(9): 1565–1571. [https://doi DOI: 10.1016/j.compositesa.2008.06.002](https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2008.06.002)

Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K., & Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15(1): 197–210. [https://doi: 10.1016/j.jgeb.2016.12.001](https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001)

Brethauer, S., Shahab, R. L., & Studer, M. H. (2020). Impacts of biofilms on the conversion of cellulose, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(12): 5201–5212. [https://doi: 10.1007/s00253-020-10595-y](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10595-y)

Briga-sá, A., Nascimento, D., Teixeira, N., Pinto, J., Caldeira, F., Varum, H., & Paiva, A. (2013a). Textile waste as an alternative thermal insulation building material solution, *Construction and Building Materials* 38: 155–160. [https://doi: 10.1016/j.conbuildmat.2012.08.037](https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.08.037)

Callaway, J. C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140(1–2): 65–72. [https://doi: 10.1007/s10681-004-4811-6](https://doi.org/10.1007/s10681-004-4811-6)

Carrasco, M., Villarreal, P., Barahona, S., Alcaíno, J., Cifuentes, V., & Baeza, M. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. *BMC Microbiology* 16(1): 1–9. [https://doi: 10.1186/s12866-016-0640-8](https://doi.org/10.1186/s12866-016-0640-8)

Chaiyasit, W., Elias, R.J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(3): 299–317. [https://doi: 10.1080/10408390600754248](https://doi.org/10.1080/10408390600754248)

Chalapud, M. C., Herdt, M., Nicolao, E. S., Ruseckaite, R. A., Ciannamea, E. M., & Stefani, P. M. (2020). Biobased particleboards based on rice husk and soy proteins: Effect of the impregnation with tung oil on the physical and mechanical behavior, *Construction and Building Materials* 230: 116996. [https://doi DOI: 10.1016/j.conbuildmat.2019.116996](https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.116996)

Chang, C. W., Lee, H. L., & Lu, K. T. (2019). Manufacture and characteristics of oil-modified refined lacquer for wood coatings, *Coatings* 9(1). [https://doi: 10.3390/coatings9010011](https://doi.org/10.3390/coatings9010011)

Chen, B., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51(10): 901–916. <https://doi:10.1080/10408398.2011.606379>

Chen H. (2014). *Chemical Composition and Structure of Natural Lignocellulose 2.1 Main Components of Natural Lignocellulosic Materials*. Springer, ed. https://doi:10.1007/978-94-007-6898-7__2

Cheng, D., Chen, L., Jiang, S., & Zhang Q. (2014). Oil uptake percentage in oil-heat-treated wood, its determination by Soxhlet extraction, and its effects on wood compression strength parallel to the grain. *BioResources* 9(1): 120–131. <https://doi:10.15376/biores.9.1.120-131>

Cornejo-Ramírez, Y. I., Martínez-Cruz, O., Del Toro-Sánchez, C. L., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., & Cinco-Moroyoqui, F. J. (2018). The structural characteristics of starches and their functional properties. *CYTA - Journal of Food* 16(1): 1003–1017. <https://doi:10.1080/19476337.2018.1518343>

Coronado-Ruiz, C., Avendaño, R., Escudero-Leyva, E., Conejo-Barboza, G., Chaverri, P., & Chavarria, M. (2018). Two new cellulolytic fungal species isolated from a 19th-century art collection, *Scientific Reports* 8(1). <https://doi:10.1038/s41598-018-24934-7>

Dome, K., Podgorbunskikh, E., Bychkov, A., & Lomovsky, O. (2020). Changes in the crystallinity degree of starch having different types of crystal structure after mechanical pretreatment. *Polymers* 12(3): 1–12. <https://doi:10.3390/polym12030641>

Dotan, A. (2014). *Biobased Thermosets* Elsevier Inc. <https://doi:10.1016/B978-1-4557-3107-7.00015-4>

Ek, M., & Gellerstedt, G. H. G. (2009a). *Wood Chemistry and Wood Biotechnology: Pulp and Paper Chemistry and Technology, Volume 3*. De Gruyter.

Ek, M., & Gellerstedt, G. H. G. (2009b). *Wood Chemistry and Wood Biotechnology: Cellulose and Carbohydrate chemistry, Volume 4*. De Gruyter.

Enongene, E., Ingo, M., Adrian, T., Reginald, S., & Justin, P. (2013). Non-hydrolytic cellulose active proteins Research progress and potential application in biorefineries. *Industrial Biotechnology* 9(3): 123–131. <https://doi:10.1089/ind.2013.0010>

Escalante, A., & Rojas, O. J. (2018). Agave tequilana Bagasse as Source of Cellulose Nanocrystals via Organosolv Treatment. *BioResources* 13 (2): 3603–3614

Fadhil, M. I., Oetari, A., & Sjamsuridzal, W. (2020). Starch-degrading ability of *Rhizopus azygosporus* UICC 539 at various temperatures. *AIP Conference Proceedings* 2242 (June). <https://doi:10.1063/5.0007874>

Folkesson, A., Jelsbak, L., Yang, L., Johansen, H. K., Ciofu, O., Hoiby N., & Molin, S. (2012). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: An evolutionary perspective, *Nature Reviews Microbiology* 10(12): 841–851. <https://doi:10.1038/nrmicro2907>

GANEWATTA, M. S., LOKUPITIYA, H. N., & TANG, C. (2019). Lignin Biopolymers in the Age of Controlled Polymerization, *Polymers*: 44. <https://doi:10.3390/polym11071176>

Gao, W., Wu, W., Liu, P., Hou, H., Li, X., & Cui, B. (2020). Preparation and evaluation of hydrophobic biodegradable films made from corn/octenylsuccinated starch incorporated with different concentrations of soybean oil. *International Journal of*

- Biological Macromolecules* 142: 376–383. [https://doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.108](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.108)
- Ghosh, B., & Rani R. R. (2011). Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*. *Journal of Applied Sciences* 11(14): 2470–2486
- Gleason, F. H., Carney, L. T., Lilje, O., & Glockling, S. L. (2012). Ecological potentials of species of *Rozella* (Cryptomycota). *Fungal Ecology* 5(6): 651–656. [https://doi: 10.1016/j.funeco.2012.05.003](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2012.05.003)
- Gourlay, K., Hu, J., Arantes, V., Andberg, M., Saloheimo, M., Penttilä, M., & Saddler, J. (2013). Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology* 142: 498–503. [https://doi: 10.1016/j.biortech.2013.05.053](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.053)
- Gourlay, K., Arantes, V., & Saddler, J. N. (2012). Use of substructure-specific carbohydrate binding modules to track changes in cellulose accessibility and surface morphology during the amorphogenesis step of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for Biofuels* 5: 1–14. [https://doi: 10.1186/1754-6834-5-51](https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-51)
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Gill, S., & Sihag, M. (2014). Flax and flaxseed oil: an ancient medicine & modern functional food, *Food Scientists & Technologists*. [https://doi DOI: 10.1007/s13197-013-1247-9](https://doi.org/10.1007/s13197-013-1247-9)
- Gupta, V. K., Kubicek, C. P., Berrin, J. G., Wilson, D. W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E. X. F., Ezeji T. (2016). Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass, *Trends in Biochemical Sciences* 41(7): 633–645. [https://doi: 10.1016/j.tibs.2016.04.006](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006)
- Hajiabadi, S., Mashreghi, M., Bahrami, A. R., Ghazvini, K., & Matin, M. M. (2020). Isolation and molecular identification of cellulolytic bacteria from Dig Rostam hot spring and study of their cellulase activity, *Biocell* 44(1): 63–71. [https://doi: 10.32604/BIOCELL.2020.08171](https://doi.org/10.32604/BIOCELL.2020.08171)
- Hassan, M. M., Tucker, N., & Le Guen, M. J. (2020). Thermal, mechanical and viscoelastic properties of citric acid-crosslinked starch/cellulose composite foams. *Carbohydrate Polymers* 230: 115675. [https://doiDOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115675](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115675)
- He, Z., Qian, J., Qu, L., Yan, N., & Yi, S. (2019). Effects of Tung oil treatment on wood hygroscopicity, dimensional stability and thermostability. *Industrial Crops and Products* 140 (January): 111647. [https://doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111647](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111647)
- Hong, S.-B., Go, S.-J., Shin, H.-D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97(6): 1316–1329. [https://doi: 10.1080/15572536.2006.11832738](https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832738)
- Horwitz B.A. 2013. *Genomics of Soil- and Plant- Associated Fungi*.
- Hu, K., Kulkarni, D. D., Choi, I., & Tsukruk, V. V. (2014). Graphene-polymer nanocomposites for structural and functional applications, *Progress in Polymer Science* 39(11): 1934–1972. [https://doi: 10.1016/j.progpolymsci.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.03.001)
- Hu, L., Du, M., & Zhang, J. (2018). Hemicellulose-Based Hydrogels Present Status and Application Prospects: A Brief Review. *Open Journal of Forestry* 08(01): 15–28. [https://doi 10.4236/ojf.2018.81002](https://doi.org/10.4236/ojf.2018.81002)
- Huang, L. Z., Ma, M. G., Ji, X. X., Choi, S. E., & Si, C. (2021). Recent Developments and

- Applications of Hemicellulose From Wheat Straw: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 9. [https://doi: 10.3389/fbioe.2021.690773](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.690773)
- Hung, W. C., Wu, K. H., Lyu, D. Y., Cheng, K. F., & Huang, W. C. (2017). Preparation and characterization of expanded graphite/metal oxides for antimicrobial application, *Materials Science and Engineering C* 75: 1019–1025. [https://doi: 10.1016/j.msec.2017.03.043](https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.043)
- Hussain, A., Calabria-Holley, J., Schorr, D., Jiang, Y., Lawrence, M., & Blanchet, P. (2018). Applied Surface Science Hydrophobicity of hemp shiv treated with sol-gel coatings. *Applied Surface Science* 434: 850–860. [https://doi: 10.1016/j.apsusc.2017.10.210](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.10.210)
- Hýsková, P., Hýsek, Š., Schönfelder, O., Šedivka, P., Lexa, M., & Jarský, V. (2020). Utilization of agricultural rests: Straw-based composite panels made from enzymatic modified wheat and rapeseed straw. *Industrial Crops and Products* 144 (December 2019). [https://doi: 10.1016/j.indcrop.2019.112067](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.112067)
- Hearle, J. W. S. (1958). A fringed fibril theory of structure in crystalline polymers. *Journal of Polymer Science* 28, 432–435
- Janesch, J., Arminger, B., Gindl-Altmutter, W., & Hansmann, C. (2020). Superhydrophobic coatings on wood made of plant oil and natural wax, *Progress in Organic Coatings* 148(May): 105891. [https://doi: 10.1016/j.porgcoat.2020.105891](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105891)
- Jankauskiene, Z., Butkute, B., Gruzdeviene, E., Cesevičiene, J., Fernando, A. L. (2015). Chemical composition and physical properties of dew- and water-retted hemp fibers. *Industrial Crops and Products* 75: 206–211. [https://doi: 10.1016/j.indcrop.2015.06.044](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.044)
- Jiang, T., Duan, Q., Zhu, J., Liu, H., & Yu, L. (2020). Starch-based biodegradable materials: Challenges and opportunities. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research* 3(1): 8–18. [https://doi: 10.1016/j.aiepr.2019.11.003](https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.003)
- Jiang, Y., Lawrence, M., Ansell, M. P., & Hussain, A. (2018). Cell wall microstructure, pore size distribution and absolute density of hemp shiv, *Royal Society Open Science* 5(4). [https://doi: 10.1098/rsos.171945](https://doi.org/10.1098/rsos.171945)
- Johns, A., Edwards, K., Inglesby, S., Quirino, R. (2016). Emulsion Polymerization of Tung Oil-Based Latexes with Asolectin as a Biorenewable Surfactant, *Coatings* 6(4): 56. [https://doi: 10.3390/coatings6040056](https://doi.org/10.3390/coatings6040056)
- Jönsson, L. J., & Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199: 103–112. [https://doi: 10.1016/j.biortech.2015.10.009](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009)
- Jordeva, S., Tomovska, E., Trajković, D., & Zafirova, K. (2014). Textile waste as a thermal insulation material. *Tekstil: Journal of Textile & Clothing Technology* 63(5–6): 174–178.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33: 188–203. [https://doi: 10.1016/j.rser.2014.01.077](https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077)
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., & Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine.

Current Microbiology 57(5): 503–507. [https://doi: 10.1007/s00284-008-9276-8](https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8)

Ko, U., Bahram, M., Tedersoo, L., Sa, S., Do, M., May, T., Ryberg, M., & Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses, 0: 135–159. [https://doi: 10.1007/s13225-018-0401-0](https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0)

Lazzari, M., & Chiantore, O. (1999). Drying and oxidative degradation of linseed oil. *Polymer Degradation and Stability* 65(2): 303–313. [https://doi: 10.1016/S0141-3910\(99\)00020-8](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(99)00020-8)

Lee, S. H., Ashaari, Z., Lum, W. C., Abdul Halip, J., Ang, A. F., Tan, L. P., Chin, K. L., & Md Tahir, P. (2018). Thermal treatment of wood using vegetable oils: A review. *Construction and Building Materials* 181: 408–419. [https://doi: 10.1016/j.conbuildmat.2018.06.058](https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.06.058)

Legodi, L. M., La Grange, D., Van Rensburg, E.L.J., & Ncube, I. (2019). Isolation of cellulose degrading fungi from decaying banana pseudostem and *Strelitzia alba*. *Enzyme Research* 2019. [https://doi: 10.1155/2019/1390890](https://doi.org/10.1155/2019/1390890)

Li, X., Tabil, L.G., & Panigrahi, S. (2007). Chemical treatments of natural fiber for use in natural fiber-reinforced composites: A review. *Journal of Polymers and the Environment*. [https://doi: 10.1007/s10924-006-0042-3](https://doi.org/10.1007/s10924-006-0042-3)

Liang, J., Appukuttan Aachary, A., & Hollader, U. T. (2015). Hemp seed oil: Minor components and oil quality. *Lipid Technology* 27(10): 231–233. [https://doi: 10.1002/lite.201500050](https://doi.org/10.1002/lite.201500050)

Lienemann, M. (2010). *Characterisation and engineering of protein-carbohydrate interactions*. Julkaisija – Utgivare.

Liu, M., Meyer, A. S., Fernando, D., Silva, D. A. S., Daniel, G., & Thygesen, A. (2016). Effect of pectin and hemicellulose removal from hemp fibres on the mechanical properties of unidirectional hemp/epoxy composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 90: 724–735. [https://doi: 10.1016/j.compositesa.2016.08.037](https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2016.08.037)

Liu, S., Zeng, T. H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., Kong, J., Chen, Y. (2011). Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ASC NANO* 5 (9): 6971–6980. [https://doi: 10.1021/nn202451x](https://doi.org/10.1021/nn202451x)

LST 2002. EN 12667 Thermal performance of building materials and products - Determination of thermal resistance by means of guarded hot plate and heat flow meter methods 53.

LST 2013. EN 1604 Thermal insulating products for building applications - Determination of dimensional stability under specified temperature and humidity conditions 10.

LST 1999. EN 317 Particleboards and fibreboards - Determinations of swelling in thickness after immersion in water 5.

LST 2013. EN 826 Thermal Insulating Products for Building Applications - Determination of Compression Behavior 13.

LST 2022. Statybiniai termoizoliaciniai gaminiai. Trumpalaikio vandens įmirkio nustatymas iš dalies panardinant (ISO 29767:2019) 9.

- Lugauskas, A., Paškevičius, A., ir Repečkienė, J. (2002). *Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje*. Aldorija.
- Martens-Uzunova, E. S., & Schaap, P. J. (2008). An evolutionary conserved d-galacturonic acid metabolic pathway operates across filamentous fungi capable of pectin degradation, *Fungal Genetics and Biology* 45(11): 1449–1457. [https://doi: 10.1016/j.fgb.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.08.002)
- Meng, X., & Ragauskas, A. J. (2014). Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 150–158. [https://doi: 10.1016/j.copbio.2014.01.014](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.014)
- Mishra, R. K., Banthia, A. K., & Majeed, A. B. A. (2012). Pectin based formulations for biomedical applications: A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(4): 1–7
- Mojsov, K., Andronikov, D., Janevski, A., Jordeva, S., Kertakova, M., Golomeova, S., Gaber, S., & Ignjatov, I. (2018). Production and application of α -amylase enzyme in textile industry. *Tekstilna industrija* 66: 23–28
- Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2020). The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment, *Advances in Applied Microbiology* 110: 149–180. [https://doi: 10.1016/BS.AAMBS.2019.12.002](https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2019.12.002)
- Møller, E.B., Andersen, B., Rode, C., & Peuhkuri, R. (2017). Conditions for mould growth on typical interior surfaces, *Energy Procedia* 132: 171–176. [https://doi: 10.1016/j.egypro.2017.09.680](https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.09.680)
- Montero De Espinosa, L., Meier, M. A. R. (2011). Plant oils: The perfect renewable resource for polymer science? *European Polymer Journal* 47(5): 837–852. [https://doi: 10.1016/j.eurpolymj.2010.11.020](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.11.020)
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*. [https://doi: 10.1039/c0cs00108b](https://doi.org/10.1039/c0cs00108b)
- Musio, B., Mohamed, E., Mourad, F., Ahmed, H., Antonicelli, M., Chiapperini, D., Dursi, O., Grieco, F., Latronico, M., Mastrorilli, P., Ragone, R., Settanni, R., Triggiani, M., Gallo, V. (2022). A spectroscopic study to assess heavy metals absorption by a combined hemp / spirulina system from contaminated soil. *Environmental Advances* 7: 100144. [https://doi: 10.1016/j.envadv.2021.100144](https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100144)
- Mussing, J. (2010). *Industrial Applications of Natural Fibres Structure: Properties and Technical Applications*. John Wiley & Sons.
- Nasrallah, D. A., & Ibrahim, M. A. (2022). Enhancement of physico-chemical, optical, dielectric and antimicrobial properties of polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose blend films by addition of silver doped hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of Polymer Research* 29(3). [https://doi: 10.1007/s10965-022-02943-5](https://doi.org/10.1007/s10965-022-02943-5)
- Nykter, M., Kymäläinen, H. R., Thomsen, A. B., Lilholt, H., Koponen H., Sjöberg A. M., & Thygesen, A. (2008). Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Biomass and Bioenergy* 32(5): 392–399. [https://doi: 10.1016/j.biombioe.2007.10.015](https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.10.015)

- Oregui-Bengoechea, M., Agirre, I., Iriondo, A., Lopez-Uriónabarrenechea, A., Requies J. M., Agirrezabal-Telleria, I., Bizkarra, K., Barrio, V. L., & Cambra, J. F. (2019). *Heterogeneous Catalyzed Thermochemical Conversion of Lignin Model Compounds: An Overview*. Springer International Publishing. [https://doi: 10.1007/s41061-019-0260-5](https://doi.org/10.1007/s41061-019-0260-5)
- Oyman, Z. O., Ming, W., & Van Der Linde, R. (2005). Oxidation of drying oils containing non-conjugated and conjugated double bonds catalyzed by a cobalt catalyst. *Progress in Organic Coatings* 54(3): 198–204. [https://doi: 10.1016/j.porgcoat.2005.06.004](https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2005.06.004)
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., Beckham, G. T. (2015). Fungal cellulases. *Chemical Reviews* 115(3): 1308–1448. [https://doi: 10.1021/cr500351c](https://doi.org/10.1021/cr500351c)
- Poblete-Castro, I., Becker, J., Dohnt, K., Martins dos Santos, V., & Wittmann, C. (2012). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol*. [https://doi: 10.1007/s00253-012-3928-0](https://doi.org/10.1007/s00253-012-3928-0)
- Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal* 282(7): 1190–1213. [https://doi: 10.1111/febs.13224](https://doi.org/10.1111/febs.13224)
- Przybylak, M., Maciejewski, H., Dutkiewicz, A., Wesolek, D., & Władyka-Przybylak, M. (2016). Multifunctional, strongly hydrophobic and flame-retarded cotton fabrics modified with flame retardant agents and silicon compounds. *Polymer Degradation and Stability* 128: 55–64. [https://doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.003](https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.003)
- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Chistensen J. H., & Boerjan W. (2004). Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews* 3(2): 29–60. [https://doi: 10.1023/B](https://doi.org/10.1023/B)
- Robledo-Mahón, T., Calvo, C., & Aranda, E. (2020). Enzymatic potential of bacteria and fungi isolates from the sewage sludge composting process. *Applied Sciences (Switzerland)* 10(21): 1–13. [https://doi: 10.3390/app10217763](https://doi.org/10.3390/app10217763)
- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R. P., & Mäkelä M. R. (2014). Plant-Polysaccharide-Degrading Enzymes from Basidiomycetes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78(4): 614–649. [https://doi: 10.1128/mmbr.00035-14](https://doi.org/10.1128/mmbr.00035-14)
- Sáez-Nieto, J. A., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernandez-Torres, M. A., Villalón, P., & Valdezate, S. (2017). *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes and New Infections* 19: 19–27. [https://doi: 10.1016/j.nmni.2017.05.006](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.05.006)
- Schwarzova, I., Stevulova, N., & Melichar, T. (2017). Lightweight composites based on technical hemp hurds in construction industry. *Chemical Engineering Transactions* 57: 1369–1374. [https://doi: 10.3303/CET1757229](https://doi.org/10.3303/CET1757229)
- Segers, F. J. J., van Laarhoven, K. A., Huinink, H. P., Adan, O. C. G., Wösten, H. A. B., Dijksterhuis, J. (2016). The indoor fungus *Cladosporium halotolerans* survives humidity dynamics markedly better than *Aspergillus niger* and *Penicillium rubens* despite less growth at lowered steady-state water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 82(17): 5089–5098. [https://doi: 10.1128/AEM.00510-16](https://doi.org/10.1128/AEM.00510-16)
- Shoa, N. (2019). Isolation and Characterization of Amylase Enzyme from Selected Fungal

Strains of Wof Washa Forest of. *Scientific Journal of Biology & Life Sciences*: 1–10. <https://doi.org/10.33552/SJBLS.2019.01.000506>

Siano, F., Moccia, S., Picariello, G., Russo, G. L., Sorrentino, G., Di Stasio, M., La Cara, F., & Volpe, M. G. (2019). Comparative study of chemical, biochemical characteristic and ATR-FTIR analysis of seeds, oil and flour of the edible Fedora cultivar hemp (*Cannabis sativa* L.). *Molecules* 24(1): 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24010083>

Sidar, A., Albuquerque, E. D., Voshol, G. P., Ram, A. F. J., Vijgenboom, E., Punt, P. J. (2020). Carbohydrate Binding Modules: Diversity of Domain Architecture in Amylases and Cellulases From Filamentous Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8(July): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00871>

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>

Singh, G. P., Bangar, S. P., Yang, T., Trif, M., Kumar, V., & Kumar, D. (2022). Effect on the Properties of Edible Starch-Based Films by the Incorporation of Additives: A Review. *Polymers* 14(10). <https://doi.org/10.3390/polym14101987>

de Souza, T. S. P., & Kawaguti, H. Y. (2021). Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food and Bioprocess Technology* 14(8): 1446–1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>

Strain, Z. W., & Coral, G. (2002). Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. *Turkish Journal of Biology* 26(4): 209–213

Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories* 19(1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>

Suri, K., Singh, B., Kaur, A., Yadav, M. P., & Singh N. (2020). Influence of microwave roasting on chemical composition, oxidative stability and fatty acid composition of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil. *Food Chemistry* 326 126974. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126974>

Taghinasab, M., & Jabaji, S. (2020). Cannabis microbiome and the role of endophytes in modulating the production of secondary metabolites: An overview. *Microorganisms* 8(3): 1–22. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030355>

Teacă, C. A., Roșu, D., Mustață F., Rusu, T., Roșu, L., Roșca, I., & Varganici, C. D. (2019). Natural bio-based products for wood coating and protection against degradation: A review. *BioResources* 14(2): 4873–4901. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.Teaca>

Teh, S. S., & Birch, J. (2013). Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* 30(1): 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.01.004>

Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science* 39(2): 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.12.001>

Thomsen, A. B., Rasmussen, S., Bohn, V., Nielsen, K. V., & Thygesen, A. (2005). Hemp raw materials : The effect of cultivar, growth conditions and pretreatment on the chemical

composition of the fibres. Denmark Forskningscenter Risoe.

Thygesen, A., Daniel, G., Lilholt, H., Thomsen, A. B., & Daniel, G. (2005). Hemp Fiber Microstructure and Use of Fungal Defibrillation to Obtain Fibers for Composite Materials. *Journal of Natural Fibers* 2(4). [https://doi: 10.1300/J395v02n04_02](https://doi.org/10.1300/J395v02n04_02)

Plustoš, P., Száková, J., Hrubý, J., Hartman, I., Najmanová, J., Nedělník, J., Pavlíková, D., Batysta, M. (2006). Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soil by high biomass producing plants. *Plant, Soil and Environment* 52(9): 413–423. [https://doi: 10.17221/3460-pse](https://doi.org/10.17221/3460-pse)

Tosh, B., & Routray, C. R. (2014). Grafting of cellulose based materials : a review. *Chemical Science Review and Letters* 3(10): 74–92. [https://doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.06.013](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.06.013)

Viel, M., Collet, F., & Lanos, C. (2018). Chemical and multi-physical characterization of agro-resources' by-product as a possible raw building material. *Industrial Crops and Products* 120(September): 214–237. [https://doi: 10.1016/j.indcrop.2018.04.025](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.025)

Viretto, A., Gontard, N., & Angellier-Coussy, H. (2018). Exploring Lignocellulosic Biomass. *Valorization of lignocellulosic fibers derived from Park and Garden wastes for Biocomposites applications* (June): 58

Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B.C., Liyanage, R., & Sivakanesan, R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(7): 2836–2847. [https://doi: 10.1002/jsfa.10315](https://doi.org/10.1002/jsfa.10315)

Wang, Z., Han, E., & Ke, W. (2007). Influence of expandable graphite on fire resistance and water resistance of flame-retardant coatings, *Corrosion Science* 49(5): 2237–2253. [https://doi: 10.1016/j.corsci.2006.10.024](https://doi.org/10.1016/j.corsci.2006.10.024)

Ward, P.G., De Roo, G., & O'Connor, K. E. (2005). Accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene and phenylacetic acid by *Pseudomonas putida* CA-3. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 2046–2052. [https://doi: 10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005)

Weimer, A., Kohlstedt, M., Volke, D. C., Nikel, P. I., & Wittmann, C. (2020). Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(18): 7745–7766. [https://doi: 10.1007/s00253-020-10811-9](https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9)

Whitehead, K. A., Vaidya, M., Liauw, C. M., Brownson, D. A.C., Ramalingam, P., Kamieniak, J., Rowley-Neale, S. J., Tetlow, L. A., Wilson-Nieuwenhuis, J. S.T., Brown, D., McBain, A. J., Kulandaivel, J., Banks, C. E. (2017). Antimicrobial activity of graphene oxide-metal hybrids. *International Biodeterioration and Biodegradation* 123: 182–190. [https://doi: 10.1016/j.ibiod.2017.06.020](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.06.020)

Wójcik-Fatla, A., Mackiewicz, B., Sawczyn-Domańska, A., Sroka, J., Siwiec, J., Paściak, M., Szponar, B., Pawlik, K., & Dutkiewicz, J. (2022). Timber-colonizing gram-negative bacteria as potential causative agents of respiratory diseases in woodworkers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 95(6): 1179–1193. [https://doi: 10.1007/s00420-021-01829-1](https://doi.org/10.1007/s00420-021-01829-1)

Xu, X., Chen, L., Guo, J., Cao, X., & Wang S. (2017). Synthesis and characteristics of

tung oil-based acrylated-alkyd resin modified by isobornyl acrylate. *RSC Advances* 7(48): 30439–30445. [https://doi: 10.1039/c7ra02189e](https://doi.org/10.1039/c7ra02189e)

Yao, T., Zhang, Y., Xiao, Y., Zhao, P., Guo, L., Yang, H., & Li, F. (2016). The effect of environmental factors on the adsorption of lubricating oil onto expanded graphite. *Journal of Molecular Liquids* 218: 611–614. [https://doi: 10.1016/j.molliq.2016.02.050](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.050)

Yu X., Chen L., Jin Z., & Jiao A. (2021). Research progress of starch-based biodegradable materials: a review. *Journal of materials science* 56(19): 11187–11208. [https://doi: 10.1007/s10853-021-06063-1](https://doi.org/10.1007/s10853-021-06063-1)

Zhang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88(7): 797–824. [https://doi: 10.1002/bit.20282](https://doi.org/10.1002/bit.20282)

Zheng, G., Wu, J., Wang, W., & Pan, C. (2004). Characterizations of expanded graphite/polymer composites prepared by in situ polymerization, *Carbon* 42(14): 2839–2847. [https://doi: 10.1016/j.carbon.2004.06.029](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.06.029)

Autorės mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašas

Straipsniai recenzuojamuose mokslo žurnaluose

Vasiliauskienė, D., Balčiūnas, G., Boris, R., Kairytė, A., Kremensas, A., Urbonavičius, J. (2020) The effect of different plant oil impregnation and hardening temperatures on physical-mechanical properties of modified biocomposite boards made of hemp shives and corn starch. *Materials*, 13 (22), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ma13225275>

Biyada, S., Merzouki, M., Dëmčenko, T., Vasiliauskienė, D., Urbonavičius, J., Marčiulaitienė, E., Vasarevičius, S., Benlemlih, M. (2020). Evolution of microbial composition and enzymatic activities during the composting of textile waste. *Applied sciences*, 10 (11), 1–26. <https://doi.org/10.3390/app10113758>

Biyada, S., Merzouki, M., Dëmčenko, T., Vasiliauskienė, D., Ivanec-Gorani-na, R., Urbonavičius, J., Marčiulaitienė, E., Vasarevičius, S., Benlemlih, M. (2021). Microbial community dynamics in the mesophilic and thermophilic phases of textile waste composting identified through next-generation sequencing. *Scientific reports*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03191-1>

Biyada, S., Merzouki, M., Dëmčenko, T., Vasiliauskienė, D., Urbonavičius, J., Marčiulaitienė, E., Vasarevičius, S., Benlemlih, M. (2022). The Effect of Feedstock Concentration on the Microbial Community Dynamics During Textile Waste Composting. *Frontiers in ecology and evolution*, 10, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.813488>

Straipsniai kituose leidiniuose

Vasiliauskienė, D., Balčiūnas, G., & Urbonavičius, J. (2018). Isolation and identification of fungi growing on fibre hemp shive based thermal insulation materials. In *21-osios Lietuvos jaunųjų mokslininkų konferencijos „Mokslas – Lietuvos ateitis“ teminė konferencija „Aplinkos apsaugos inžinerija“, 2018 m. kovo 20 d. Vilnius = Proceedings of the 21th Conference for Junior Researchers “Science – Future of Lithuania” “Environmental protection engineering”, 20 March 2018, Vilnius, Lithuania* (47–51). <https://doi.org/10.38>

Summary in English

Introduction

Formulation of the problem

Global politics are increasingly promoting a responsible approach to consumption that harms the environment as little as possible, uses environmentally-friendly materials to the greatest possible extent, and produces minimum waste to be economically and environmentally friendly. Environmentally-friendly materials could be reused or degraded naturally after decommissioning. Nowadays, energy production from renewable sources is increasingly expanding, i.e., windmills, solar energy, thermal energy from willows, and other low-value trees. These tendencies also prevail in the production of thermal insulation materials for buildings. In our climate zone, various composites are formed as building or insulation materials from flax, hemp, and wood processing waste. Fiber hemp, wood, flax, and reeds have been long used in the traditional construction of houses in Lithuania. All these materials of plant origin are connected by the similar chemical composition of cellulose, lignin, hemicellulose, pectin, and ash (inorganic substances) (Li et al., 2007). The main function of cellulose in nature is mechanical, i.e., to maintain shape and stability. Therefore, the interwoven cellulose fibers form paper (filter paper — practically pure cellulose). In flax, hemp, and cotton, the cellulose molecules are arranged in parallel and comprise a fiber formed by linear molecules joined in parallel via 1.4-glycosidic bonds. The characteristic structure of the fibers is the presence of crystalline and amorphous regions. Amorphous sites, where the gaps between the molecules are larger, are weaker in their interaction, causing water molecules to enter, thereby forming hydrogen bonds with

cellulose macromolecules. Through these amorphous sites, the cellulose macromolecule becomes increasingly hydrophilic, and a favorable environment is formed for the development of microorganisms. Therefore, it is particularly important to convert these hydrophilic sites into hydrophobic ones that do not accumulate water and prevent the development of a community of microorganisms.

Developing new building thermal insulation materials from renewable sources requires considering their hydrophilicity, making them hydrophobic without compromising their physical-mechanical properties.

The relevance of the dissertation

The production of ecological thermal insulation materials for construction uses primary raw materials of plant origin, such as fibrous hemp, flax, bamboo, or recycled ones, such as textile waste (cotton) and paper waste (wood). The type of used raw materials (primary or recycled) is determined by national environmental policies. In countries with climatic conditions unfavorable for growing cotton, bamboo, flax, hemp, and other such plants, there is a tendency to use textile and paper waste. Countries with favorable conditions for growing certain plants use their parts. In the Lithuanian climate zone, willow is the most often grown renewable energy source for the production of biofuels; fiber hemp is grown for ecological textile and as thermal insulation material. Fiber hemp is used in plant-based composites, which consist of filler and starch as an organic binder. The composites that contain plant-derived organic matter must meet technological requirements, such as thermal conductivity, mechanical resistance, fire resistance, and, most importantly, durability. Organic substances of plant origin, such as cellulose, lignin, hemicellulose, and binders, are inevitably exposed to microorganisms existing in the environment during operation. The destructive effects of microorganisms affect the micro- and macrostructures of composite materials and lead to defects, which can significantly change their physical properties and reduce their durability.

A protective coating from natural oils on composite boards of plant origin produced using hemp fibers, and corn starch would allow the creation of a completely natural product, which would become more resistant to destructive effects.

The object of the research

The bio-based composite boards are made of cellulose components of natural origin, characterized by hydrophilic properties and the effects made by environmental microorganisms.

The aim of the dissertation

To create ecological protective coatings from natural oils for the cellulose-based thermal insulation materials, investigate their physical and mechanical properties, and identify the microorganism communities that influence the micro- and macrostructures of such materials.

The objectives of the dissertation

1. To create thermal insulation boards made of cellulosic materials that have been impregnated with oils of natural origin and to determine their physical and mechanical properties.
2. To determine the microorganisms that grow on the cellulose-based composite boards, their effect on the mechanical properties of boards, and their biodegradation activity.
3. To investigate the composition of microorganism communities on hemp shives, cellulose-based composite boards, cellulose thermal insulation wool, and compostable cellulose mixes with green waste.

Research methodology

The effect of protective coatings made from natural oils (hemp seed, linseed, and tung tree) on cellulose-based thermal insulating boards was determined by the following methods: determination of the density, thermal conductivity, compressive stress at 10% relative deformation, short-term water absorption, swelling in thickness after immersion in water, dimensional stability under specified temperature and humidity conditions, microstructures (optical and scanning electron microscopies).

The following microbiology and molecular biology methods were used: isolation and preservation of microorganisms, isolation of genomic DNA, polymerase chain reaction (PCR), next-generation sequencing, and the determination of enzymatic activity.

The scientific novelty of the dissertation

The following new results in the field of Materials Engineering were obtained during the preparation of the dissertation:

1. The effect of microorganisms on cellulose-based composite boards was determined, manifesting as a decrease in the compressive strength of approx. 22% after the incubation with the bacterium *Pseudomonas putida* and of approx. 42% — with the mold fungus *Rhizopus oryzae*.
2. The protective coating on cellulose-based composite boards made of hemp seeds, linseed, and tung wood oils is effective only when it is produced at 90 °C and 120 °C. The composite boards protected by this method became resistant to moisture in the environment.
3. The developed method increases the compressive strength of cellulose-based composite boards with a protective coating by 2 to 4.5 fold, improves the dimensional stability, which does not exceed 2.5%, reduces short-term water absorption by up to 3-fold, and thickness swelling by 10.4–48%.

The practical value of the research findings

The composite boards produced with protective coatings were characterized by better resistance to compression, reduced swelling, and short-term water absorption. They were more resistant to the action of microorganisms. Cellulose-based composite boards with improved properties could be used in ecological products and structures. Since they have

become more resistant to the effects of water, they can be adapted for rooms with increased humidity.

Defended statements

A protective coating of natural oils could increase the compressive strength of cellulosic composite boards and reduce the effects of microorganisms and water.

The cellulose-based composite boards made of hemp shives and the binder corn starch are degraded by enzymes synthesized by communities of microorganisms, such as cellulases and amylases.

The composition of cellulose-based materials determines the diversity of microbiota; the contained additives and/or impurities inhibit the growth of some types of microorganisms.

The approval of the research findings

Five research articles were published on the topic of the dissertation: four were included in the Clarivate Analytics (Web of Science) database, and one —was in other peer-reviewed scientific journals.

The research results were presented at five scientific conferences in Lithuania and abroad:

1. 1. International Conference for Young Scientists on Biorefinery Technologies and Products “BTechPro2022”, 27–29 April 2022, Riga, Latvia.
2. World Microbe Forum: American Society for Microbiology and Federation of European Microbiological Societies collaboration, 20–24 June 2021, online, worldwide.
3. 1st Corrosion and Materials Degradation Web Conference session on Composite and Bonded Structures, 2021, online.
4. 1st International Electronic Conference on Microbiology, 2020, online.
5. Federation of European Microbiological Societies Online Conference on Microbiology, 2020, online.
6. 21st Young Scientists conference “Science — Future of Lithuania,” 2018, Vilnius.

The structure of the dissertation

The dissertation thesis includes the introduction, three chapters, general conclusions, a list of references, and the list of publications by the dissertation author.

The dissertation consists of 125 pages; the text of the dissertation contains seven formulae, 48 figures, 17 tables, and 131 references.

1. Literature review of the components of thermal insulation materials made from renewable sources

The ecological raw material of bio-based such as hemp, flax, bamboo or waste rich in cellulose as paper or textile allows the production of environmentally approachable thermal insulating materials. But these bio-based materials could accumulate moisture, and this is the factor emerging for the growth of microorganisms. The effect of

biodestructivity is not needed during the exploitation of building materials. It is known that hemp (*Cannabis sativa*) could produce oil, fiber for the textile industry, and waste of this, shives. The hemp cells wall are composed of cellulose, hemicellulose, lignin, aromatic compounds such as waxes and other lipids, and inorganic substances (ash). The chemical composition and structure of the plant cell wall determine their properties and function. The main functions of cellulose are mechanical, i.e. maintaining the shape and stability of the structure. Cellulose fiber is a hydrophobic polymer with high tensile strength. In plant cell walls, cellulose forms microfibrils (e.g., 2–20 nm in diameter and 100–40 000 nm in length), providing a strong linear and structural system. X-ray diffraction analysis revealed a crystalline structure of cellulose consisting of crystallites and amorphous sites with larger inter-molecular gaps and weaker interactions. The amount and volume of crystallites determine the properties of cellulose.

The conditions for the accumulation of moisture are developed which causes the growth of microorganisms. The biobased polymers that exist in the natural environment are affected by microorganisms. The main decomposers are fungi (filamentous fungi, basidiomycetes, actinomycetes) aerobic and anaerobic or thermophilic bacteria, which grow in the water and soil. The biodeconstruction of biopolymers by microorganisms is an important stage in the exchange cycle of carbon, as a chemical element. The biodegradation of cellulose requires a complex of enzymes with synergistic effects. Fungi, which are mainly able to decompose crystal cellulose, produce complexes of cellulase enzymes. Most fungi by species that produce the complex of cellulases are *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, *Humicola*, *Schizophillum*, and *Aspergillus*. These species are characterized by the fact that the enzymes they produce have high thermal stability. Only the fungi of mycelium can fully degrade the cellulose substrates and are the main organisms with the full range of enzymes required to transform the bio-based material into molecules.

Worldwide, a lot of investigations are devoted to the acceleration of the biobased decomposition of lignocellulose and hemicellulose complexes to obtain bioethanol. However, there is not much research on how to protect the structure of hemp shives from the destructive effects of microorganisms. In nature, the cellulose polymer is protected by natural inhibitors, e.g., aromatic, phenolic, and organic acids. To protect cellulose-based thermal insulation materials, it is necessary to prevent the accumulation of moisture in their constituents. To reduce water sorption into cellulose-based materials, hydrophilicity must be converted to hydrophobicity (Teacă et al., 2019). This can be done by coating the materials with hydrophobic compounds, such as lipids.

Impregnation with vegetable oils is a classical method of preserving cellulose-based materials. Semi-drying and drying oils are a perfect way of forming hydrophobic coatings. Hydrophobic coatings with vegetable oils protect materials from water, microorganisms, termites, nematodes, and even UV radiation.

2. Materials and methods used for investigation of cellulose-based composite boards

Cellulose-based composite boards were made of hemp shives, which are rich in cellulose. Hemp shives are usually considered waste, obtained after the separation of the fibers from the hemp stem. Boards were made from 2.5–5 mm hemp shive fractions and corn starch

binder with a bulk density of 550 kg/m³. As flame retardants, expandable graphite 9950250 nitric acid (EG) flakes (ProGraphite GmbH Untergriesbach, Germany) with an average particle size of min 70% of 300µm or the Flovan CGN-01 (FL) (Huntsman, Basel, Switzerland) were incorporated (Table S2. 1) (composite boards made by Dr Kremensas).

Table S2.1. Structure of the cellulose-based composites boards

F type board	G type board	H type boards
Hemp shives	Hemp shives	Hemp shives
Corn starch	Corn starch	Corn starch
Phosphorus and nitrogen organic compounds as flame-retardants	Expandable graphite as flame-retardant	—

For the impregnation, composite boards were covered with selected oils: semi-drying hempseed or drying linseed and tung tree oils took approx. 43–94% of the total weight of the cellulose-based composite boards (CBBs) were exposed in the vacuum desiccator of about 0.9–1 bar pressure for 5 min. This procedure was repeated 5 to 10 times. After this, the oil-free CBBs were maintained at a temperature of either 40, 90, or 120 °C and 1% humidity conditions in the thermostat (22 °C was used as control) for 24–240 h or for the time required to reach the stable weight (Vasiliauskienė et al., 2020).

Bacterium *Pseudomonas putida* was incubated in liquid LB media at 30 °C temperature for 24 hours; then, suspension of 10⁹ colony-forming units (cfu)/ml in 0.9% NaCl was prepared. Fungus *Rhizopus oryzae* was incubated on the PDA media for 10–21 days; spores were collected in 20 ml of 0.9% NaCl and diluted to 10⁶ units/ml. The *P. putida* and *Rh. oryzae* suspensions were mixed in equal parts, poured 1 ml on three CBB samples, and incubated for six months. Images were made every week for the first three weeks and every month afterwards.

The microstructure of the CBB samples before and after the six-month growth of microorganisms was investigated with a JSM-7600F Field Emission Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL, Tokyo, Japan). The following were the parameters of the SEM tests: voltage — 4 kV or 10 kV; the distance to a specimen's surface varied from 15 mm to 25 mm; the used magnification was either 500x or 1000x, 2000x, and 3000x. The samples were completely dried in the oven at 60±5 °C temperature for 72 hours. Before microstructural analysis, the samples were covered with a thin Au layer using a Quorum Q150R ES instrument (Quorum, Laughton, UK).

Next-Generation Sequencing (NGS) was performed by Macrogen (Republic of Korea). The 16S rRNA gene V3-V4 region was amplified using specific 16S rRNA primers specific to bacteria. The target amplicon of fungi was the conserved regions of 18S, 5.8S, and 28S rDNAs. The internal transcribed spacer ITS2 region was amplified by using universal primers. Data were analyzed using either Mothur for the 16S rRNA gene fragments of bacteria or DADA2 for the ITS region of fungi. Mothur is an open-source bioinformatics tool for performing the analysis of microbial DNA from raw sequencing data generated on Illumina or other sequencing platforms. DADA2 is an open-source pipeline that uses different algorithms for sequence clustering and is considered more accurate and faster than Operational Taxonomic Unit (OTU) clustering.

3. Investigation of cellulose-based thermal insulation materials

3.1. Identification of microorganisms on cellulose-based materials and detection of cellulase and amylase production

The predominant microorganisms were isolated and identified: five bacteria at the species level and one — at the genus level. At the same time, 11 fungal species were identified, and another three fungi were identified at the genus level.

For further studies, fungi that were identified with a 100% of confidence level were used, namely *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus* (Fig. S3.1). The tested bacteria were identified with at least a 99% confidence level, namely *Paenibacillus rigui*, *Pseudomonas putida*, *Pantoea agglomerans*, and *Bacillus subtilis*. A selective carboxymethylcellulose medium (CMC) with the Congo Red dye was used for the initial identification of cellulase activities. The Halo zones formed around colonies of microorganisms reflect the cellulase activities. Such zones were formed around fungi *Rh. oryzae* and *A. fumigatus*, also *P. putida*, but not other bacteria.

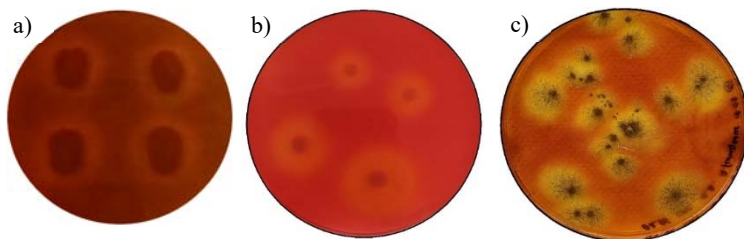


Fig. S3.1. The initial determination of cellulase activities on CMC medium:
a) *Pseudomonas putida* after 35 days of growth, b) *Rh. oryzae* after 12 days of growth,
c) *A. fumigatus* after 12 days of growth

3.2. Investigation of physical and mechanical properties of cellulose-based composite boards with protective coatings

Hemicellulose and amorphous cellulose are responsible for high water absorption of cellulose-based materials and composites because they contain numerous easily accessible hydroxyl groups, which give a hydrophilic character to such aggregates. The cellulose-based composite boards were formed and coated with different natural oils, such as hempseed, linseed, or tung tree. It was demonstrated that the protective coatings increase the compressive strength and decrease the water absorption and swelling.

The possibility of using cellulose-based composite boards at elevated humidity compared to normal environmental conditions makes it necessary to analyze their water uptake behavior. Figs. S3.2 represent the results obtained while measuring, respectively, the short-term absorption of water by partial immersion, the swelling in thickness, and the dimensional stability under increased temperature and humidity conditions.

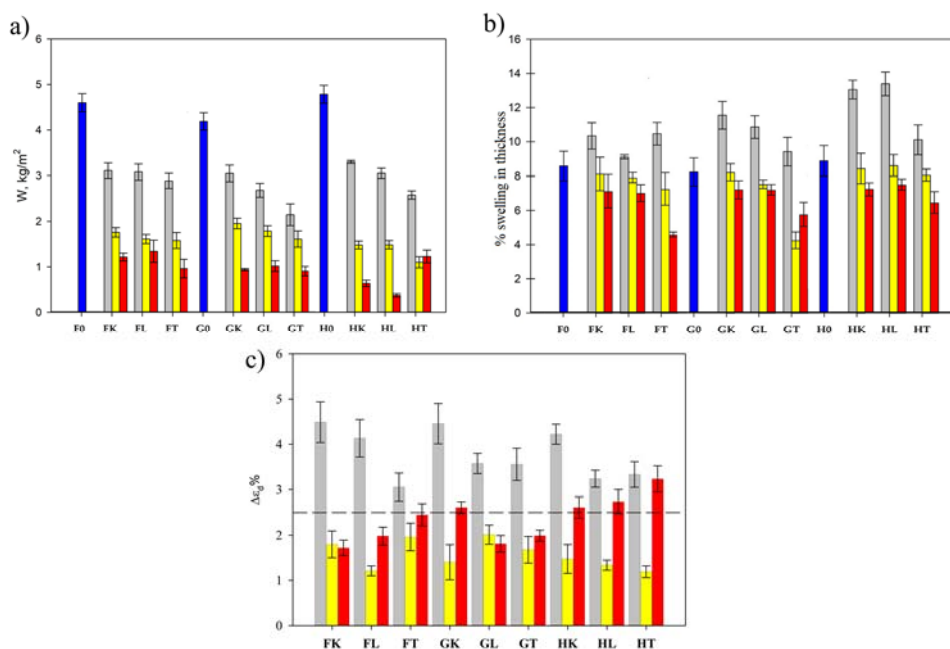


Fig. S3.2. Water absorption a), swelling in thickness b) and Dimensional stability (at 70 °C temperature and 90% relative air humidity) c) of tge CBB of different oil-impregnated CBBs at hardening temperatures: 40 °C, 90 °C, 120 °C, control CBBs without oil

Maximum water absorption was obtained for CBBs that were impregnated with hemp seed oil and hardened at 40 °C temperature (Fig. S3.2). It is worth mentioning that non-impregnated control CBBs have an average value of water absorption equal to 4.5 kg/m² for F-composition, 4.2 kg/m² for G-composition and 4.7 kg/m² for H-composition. Tung tree oil showed the highest efficiency and, compared to the control CBBs, reduced water absorption by 36% for F-type boards, 50% for G-type boards, and 45% for H-type boards. These results showed that the hardening of the oil at 40 °C was only slightly effective. On the contrary, when the oils were hardened at either 90 °C or 120 °C, much less water absorption was observed. Irrespective of the CBB board type (F, G, or H), hempseed and linseed oils had almost the same impact; water absorption values were reduced more than 2-fold for the boards prepared at 90 °C compared to the ones prepared at 40 °C temperature, and more than 3-fold compared to control CBB without the oil-impregnation. In addition, it was shown that the most effective hardening temperature was 120 °C, at which the action of different oil types depended on the composition of CBBs. Independently of impregnation temperature, the biggest reduction in water absorptivity was observed when tung tree oil was used. This behavior can be the result of the hydrophobicity and structure of tung tree oil, which forms a thick layer on the external surface as well as a porous aggregate structure.

As was previously observed (Lee et al., 2018), due to their hydrophobic nature, additives, such as G, weaken the ability of corn starch to bind water when performing the

water absorption test, thus creating effective paths for water to enter. However, tung tree oil effectively penetrates those cracks or voids formed during the incorporation of additives, thereby reducing the water absorption of CBBs.

To further evaluate the penetration of water into the CBBs, swelling in thickness experiments were conducted. Regarding the water absorption, similar changes in swelling in thickness results are observed and are summarized in Fig. S3.2. It can be observed that contrary to water absorption, the results of swelling in thickness change in a polynomial manner.

Regardless of the used type of oil and hardening temperature, swelling in thickness was reduced compared to the untreated CBBs. It was observed that 40 °C hardening temperature was not effective, i.e., compared to control CBBs, all oil types increased swelling in thickness values up to 1.5-fold for all compositions. A slight positive impact could be observed at 90 °C hardening temperature when either hempseed or linseed oil was used. As demonstrated previously for water absorption, the use of such oils provides similar effects for CBBs. Improved results were obtained for tung tree oil-impregnated CBBs at a hardening temperature of 90 °C. Compared to control CBBs, it reduced swelling in thickness by ~15.7% for F-composition, by ~48.0% for G-composition, and by 10.4% for H-composition. A higher impact of the impregnation with tung tree oil was observed, likely due to its capability to form a more cross-linked and dense film on the surface of CBB constituents. Stronger bonds between the raw materials do not allow corn starch particles to swell, thus restricting not only water absorption and swelling in thickness but also the volumetric changes. The same conclusions could be drawn for 120 °C hardening temperature. Hempseed and linseed oil influenced all compositions similarly, i.e., it slightly reduced swelling in thickness, but due to variation of measurement data, no significant impact was observed.

The degree to which cellulose-based composites shrink and/or swell when moisture content changes is an important property determining their suitability for different applications. This parameter is known as dimensional stability. The targeted dimensional changes are not standardized for CBBs, but acceptable ones according to EN 1604 are 2.5% for products tested under increased temperature and humidity conditions (Fig. S3.2).

It is clearly seen that hardening at 40 °C is inefficient; the improvement of the dimensional stability can be observed only at temperatures of 90 °C and 120 °C. The dimensional stability of CBBs prepared with oils at a hardening temperature of 90 °C in all cases improved by up to 3- fold and did not exceed the limit of 2.5%, indicating an effective impregnation. As previously shown (He et al., 2019), oil impregnation reduces the number of hydroxy groups of cellulose-based composites, thus increasing the dimensional stability of all CBBs. The greatest improvement at a 90 °C hardening temperature was observed for H-type compositions leading to the conclusion that the oils freely penetrate into the pores, voids, and cracks formed between the corn starch binder and hemp shives, thus hindering the changes in thickness.

The strength characteristics of the CBBs are affected by the oil type and heat treatment due to heat-induced alteration of the chemical structure of valve and vessel wall components. It is demonstrated that a high oil uptake also contributes to the higher mechanical performance of CBBs compared to other heat treatment methods (Tang et al., 2019).

Therefore, it is not necessary to use high temperatures to efficiently impregnate wood-based or similar products. Fig. S3.3 demonstrates the compressive stress at 10% deformation results versus the hardening temperature of three types of oil-impregnated CBBs with or without the additives.

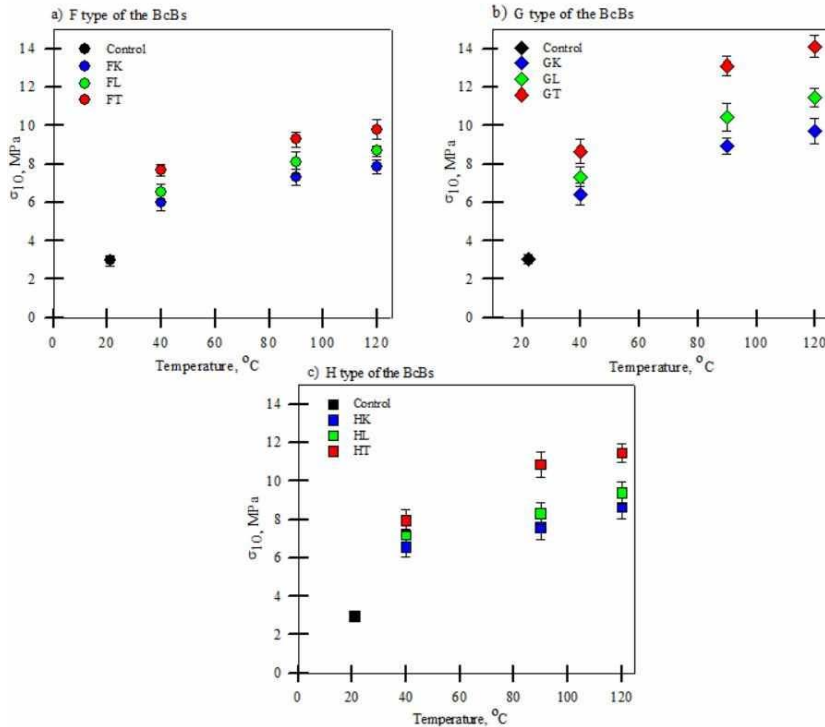


Fig. S3.3. Compressive stress at 10% deformation of CBBs with different oil-impregnation at different temperatures: a) F-type CBB with hempseed oil (K), linseed oil (L), and tung tree oil (T); b) G-type CBB with hempseed oil (K), linseed oil (L), and tung tree oil (T); c) H-type CBB with hempseed oil (K), linseed (L), and tung tree oil (T)

Additionally, the obvious improvement of the compression strength is seen at 40 °C oil-hardening temperature, where it increased by 1.5–3 fold compared to control CBBs, suggesting that oil as a wood impregnator activates itself at 40 °C. A similar improvement was observed previously (Zhang et al., 2020).

The first rise of strength can be noticed at a 90 °C oil hardening temperature, where it reaches its highest values: 7.3 MPa for hempseed oil, 8.1 MPa for linseed oil, and 9.3 MPa for tung tree oil in F-compositions; 8.9 MPa for hempseed oil, 9.4 MPa for linseed oil and 14 MPa for tung tree oil in G-compositions, and 6.5 MPa for hempseed oil, 7.9 MPa for linseed oil and 11 MPa for tung tree oil in H-compositions (Fig. S3.3). It is assumed that vegetable oils fill vessels and valves and thicken the walls, and cross-links, forming a denser film and owing to better lateral stability to hemp shives, which normally fail in compression due to buckling of thin valves and vessel walls. Similar findings were

reported by researchers who investigated the dimensional stability and mechanical behavior of oil-impregnated wood and particleboards [28, 36]. Increasing the hardening temperature up to 120 °C shows a negligible change in strength value for the F-composition while it becomes similar to those at 40 °C oil-hardening temperature for G- and H-compositions. The obtained results demonstrated that strength parameters increased most when tung tree oil was used for hardening at 90 °C. A significant improvement of the compressive stress at 10% deformation suggested a synergistic effect of oil used for the impregnation and starch used as a binding material for the production of CBBs. The synergy may be explained by the hydrogen bonding between the free carboxylic groups from the hemp, linseed, and tung tree oil molecules with the hydroxy groups in the corn starch.

To use the prepared CBBs for thermal insulation, the conductivity measurements were made (Fig. S3.4). The highest increment of thermal conductivity (34%) was obtained for dry CBB samples that were impregnated with tung tree oil, whereas the lowest one (22%) was for air-dried linseed oil-impregnated CBBs. After the oil impregnation, the increase in thermal conductivity values directly correlates with the increase in density of the CBBs.

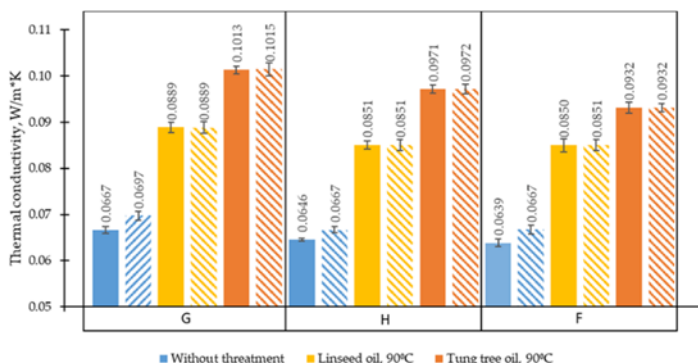


Fig. S3.4. Thermal conductivity of different oil-impregnated CBBs. G, H, F— composition of boards, impregnated at 90 °C hardening temperature. ■ — linseed oil, ■ — tung tree oil, ■ — without oil treatment: solid-type bars — specimens dried at 70 °C to constant weight; pattern-type bars — specimens conditioned at (23 ± 2) °C and (50 ± 2)% to constant weight

As stated before, during the impregnation, the oil penetrates the porous structure of CBBs and forms a highly cross-linked and dense film on the interface of CBBs constituents. For this reason, the area of contact zones increases, thus determining the heat loss through conduction.

To evaluate the efficacy of oils to fill in or isolate the pores, open porosity determination was performed. Oil impregnation minimizes open porosity, locking the pathways for the penetration of water molecules and assuring better interaction between raw materials. The most efficient type of oil that reduces the porosity is tung tree oil which, irrespective of the composition used, reduces open porosity and voids by ~40%, whereas linseed oil — by ~30% compared to control CBBs.

3.3. Effects of microorganisms growing on cellulose-based composite boards

To analyze how and to what extent such microorganisms affect cellulose-based composite boards, *P. putida* and *Rh. oryzae* suspensions were mixed using equal parts, and 1 ml was poured onto CBBs. The samples were incubated for six months at 22 °C temperature and 65% humidity, monitoring their growth (Fig. S3.5).

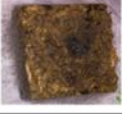
	Incubation time Microorganisms	2 weeks	5 weeks	9 weeks	18 weeks
Cellulose based composite board F type	<i>P.putida</i>				
	<i>Rh.oryzae</i>				
	<i>P.putida</i> and <i>Rh.oryzae</i>				
Cellulose based composite board G type	<i>P.putida</i>				
	<i>Rh.oryzae</i>				
	<i>P.putida</i> and <i>Rh.oryzae</i>				

Fig. S3.5. F- and G-type CBBs inoculated with either bacteria *P. putida*, fungi *Rh. oryzae*, or a mix of both

The analysis of the obtained results (Fig.S3. 5) established that when the culture of *P. putida* was inoculated, growth was not detected visually for F- and G-types of boards. The analysis of the growth of *Rh. oryzae* demonstrated that the growth occurred via the incision sites. In the presence of the mix of both microorganisms, after two and five weeks, light green colonies were observed that are uncharacteristic for *Rh. oryzae*. This color is

characteristic of another identified fungus, *Aspergillus fumigatus*, which is also an active degrader of cellulose. It is hypothesized that the remaining spores of *A. fumigatus* in the inner part of the composite filler (hemp shives) grew faster than the inoculated fungus *Rh. oryzae* and the bacteria *P. putida*, although the boards were disinfected under UV light for one hour before inoculating the microorganisms. Therefore, it is possible that microorganism spores that appeared either during the plant growth, processing, or the formation of CBBs entered or remained in hemp shives.

The results shown in Fig. S3.6 demonstrate that no growth was detected for F-type boards protected with a linseed oil coating. However, when analyzing the G-type board with a protective tung tree oil coating, the airborne hyphae were detected after two weeks when either *Rh. oryzae* or the mixture with *P. putida* was inoculated. When the pure culture of *P. putida* was inoculated onto a G-type board with a tung tree coating, the growth of microorganisms was observed just after 18 weeks. Possibly, the contamination with fungi *Rh. oryzae* was environmental.

	Incubation time Microorganisms	2 weeks	5 weeks	9 weeks	18 weeks
Cellulose based composite board F type with a protective coatings of linseed oil	<i>P. putida</i>				
	<i>Rh. oryzae</i>				
	<i>P. putida</i> and <i>Rh. oryzae</i>				
Cellulose based composite board G type with a protective coatings of tung tree oil	<i>P. putida</i>				
	<i>Rh. oryzae</i>				
	<i>P. putida</i> and <i>Rh. oryzae</i>				

Fig. S3.6. F-type cellulose-based composite boards with the linseed oil and G-type CBBs with tung tree oil protective coatings, inoculated with *P. putida*, *Rh. oryzae*, or a mix of both

It is crucial for environmentally-friendly cellulose-based building materials to have long-term performance. Therefore, a change in mechanical performance after inoculation with microorganisms after six months of incubation was evaluated. Fig. S3.7 presents the results of the compressive strength of CBBs with different flame retardants and protective coatings obtained from either linseed oil or tung tree oil before and after incubation with microorganisms.

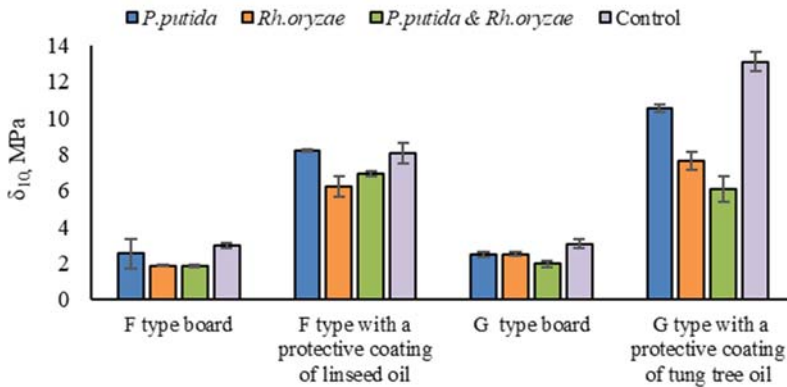


Fig. S3.7. Compressive strength of cellulose-based composite before and after incubation with the microorganisms for six months

In this study, it was previously determined that *Rh. oryzae* and *P. putida* can degrade corn starch, which is the binder, and cellulose in the hemp shives, which is the CBB filler (Fig. S3.7). The obtained results (Fig. S3.7) demonstrate that the lowest effect was observed for the boards affected by *P. putida*, that is, a decrease of compressive strength by 14–22.7% compared with the control without the microorganisms. The compressive strength after incubation with a mix of *Rh. oryzae* and *P. putida*, or the fungi *Rh. oryzae* was approx. 1.9 MPa for F-type and 1.98 to 2.54 MPa for G-type boards without protective coatings. When a protective coating was used for F-type boards, the compressive strength went up to 6.24 MPa after incubation with the *Rh. oryzae* and *P. putida* mix, or the fungi *Rh. oryzae*, whereas for G-type boards, it went up to 6.09 MPa with the *Rh. oryzae*.

3.4. Next-generation sequencing of microorganisms growing on cellulose-based composite boards

Cellulose molecules undergo deconstruction due to exposure to microorganisms. As a result, they return to the biological transformation cycle as a source of nutrients for plants or other organisms. Previous experiments have shown that microbial communities are formed inside cellulosic materials and/or composite boards. Therefore, it was decided to determine the composition of the microorganism communities using new-generation sequencing. This was done for raw hemp shives, cellulose-based composite boards, loose thermal insulation wool, and composted cellulosic mixtures.

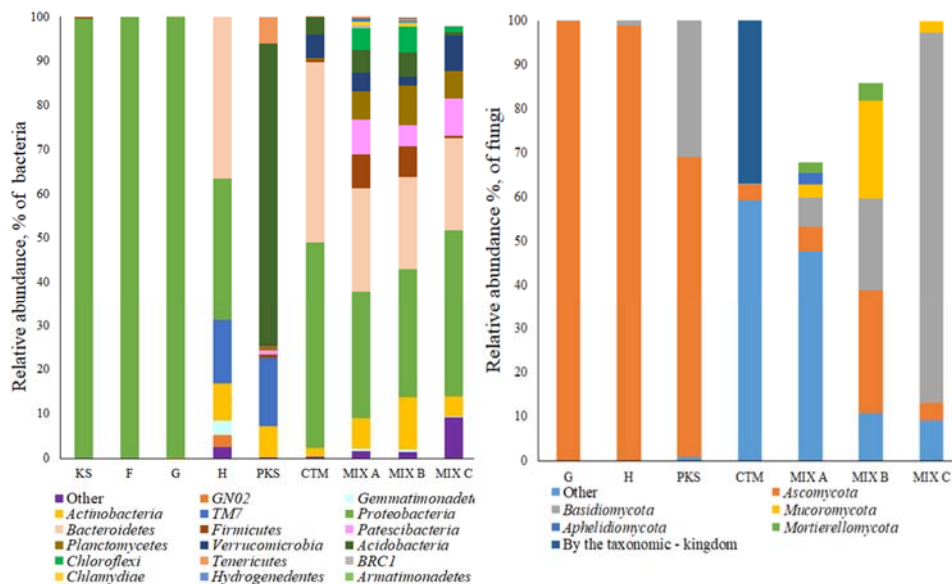


Fig. S3.8. Composition of bacterial and fungi communities in different materials. KS — hemp shives as a raw material for composites; F, G, H — cellulose-based composites, where F — with Flovan additives; G — with expandable graphite, H — without the additives. For comparison, CTM — loose cellulose thermal insulation wool after flooding; PKS — CBB made of hemp shives with acrylic binder formed in 2015 and stored under room conditions for four years; and cellulose composting mixtures termed MIX A, MIX B, and MIX C

The predominant bacteria in hemp shives, the raw composite filler, were determined to be Proteobacteria (99.67%). They remain dominant in composites with flame retardant additives, expanding graphite (G-type board, 99.7%), or with phosphorus-nitrogen inorganic salt solution (F-type board, 100%). In the absence of flame retardants, the diversity of microorganisms increases: the abundance of Proteobacteria that prevail in hemp shives decreases to 32.1%, whereas Bacteroidetes (36.6%), Actinobacteria (8.4%), and Saccharobacteria (TM7) (14.51%) appear. This shows that flame retardant additives inhibit the growth of some types of bacteria in thermal insulation boards. It was also observed that bacteria of the *Pseudomonas* genus are found in boards made without flame retardants (H-type). Since *P. putida* were isolated and studied, it was assumed that they might be sensitive to the flame retardants of G- and F-types. It was found that these bacteria did not grow on LB agarized medium with 1% expandable graphite (data not shown). Although the antimicrobial performance of graphite has not been investigated in the literature, there is data on the antimicrobial properties of graphene, which is the main structural element of graphite. Antimicrobial properties occur when the sharp edges of graphene nanosheets cut bacterial cell wall membranes, creating pores that lead to osmotic imbalance and, ultimately, cell death (Liu et al., 2011). Similarly, cell death is reported when inorganic salts of phosphorus-nitrogen or their solutions are used (Nasrallah et al., 2022). It is interesting to investigate the effects of flame retardants on the viability of

bacteria (such as Bacteroidetes and/or Actinobacteria) found in H- and PKS-type composites.

Composition of microorganisms found loose cellulose thermal insulation wool that was affected by flooding and similar to that found in H-type boards, represented by Proteobacteria (46.82%), Bacteroidetes (40.72%), Verrucobacteria (5.32%), Actinobacteria (1.8%), Firmicutes (0.55%).

The composting of cellulosic materials is influenced by using green waste. To obtain mature compost using textile waste, the amount of green waste must be at least 20%. It was found that 80% of textile waste composting mixes were found to contain elevated and extremely high levels of heavy metals. These metals inhibit the growth of some microorganisms. As the concentration of green waste increases, the concentration of heavy metals decreases accordingly. Therefore, the diversity of bacteria is 4–27-fold higher than that found in analyzing hemp shives or composite boards with flame retardants.

The investigated composition of the fungi communities revealed that not all genomic DNA samples met the qualitative requirements for next-generation sequencing, so only G- and H-type composites boards, PKS boards, and cellulosic composting mix communities were analyzed (Fig. S3.8). According to the taxonomic phyla, G- and H-type composites boards were dominated by Ascomycota (99.88% and 98.85%, respectively) and contained some Basidiomycota (0.12 and 1.15%). About 31% of these fungi were also found in PKS samples along with Ascomycota. In CTM samples, only 3.6% of Ascomycota could be reliably identified.

The increase of green waste in composting mixtures resulted in the abundance of Basidiomycota increasing from around 6% to 21% and to 84%.

Cellulose-based materials (Fig. S3.8) with various additives, such as antipyrenes or heavy metals in textile waste, have been found to inhibit the growth of some types of microorganisms. The diversity of the microbiota directly correlates with the absence of unnatural additives, longer storage times, or >75% humidity (Møller et al., 2017).

General conclusions

1. Hempseed, linseed, and tung tree oil coatings created at 90 °C and 120 °C protect cellulose-based composite boards from moisture absorption.
2. Cellulose-based composite boards with protective hydrophobic coatings made from linseed or tung tree oil are 3–4-fold more resistant to compressive stress at 10% of deformation when affected by the microorganisms compared to the boards without the protective coatings.
3. Biodegradation of the boards was determined by measuring the total cellulase, endo- β -1,4-glucanase, and amylase activities. The highest endo- β -1,4-glucanase activity was 60 ± 9 U/ml, determined when testing the composites with a phosphorus-nitrogen inorganic salt solution without a protective coating. Amylase activity was determined only on the composite boards without the protective coatings. It can be argued that biodegradation starts from the internal bonds of cellulose through the amorphous sites unprotected by the hydrophobic coating.
4. Flame retardant additives or heavy metals present in cellulosic materials inhibit the growth of some types of microorganisms. Therefore, flame retardant

additives and/or heavy metals determine the durability of the cellulose-base composite boards but reduce the composting efficiency of the cellulosic mixture.

Dovilė VASILIAUSKIENĖ

MIKROORGANIZMŲ POVEIKIS IŠ CELIULIOZĖS PAGAMINTŲ MEDŽIAGŲ
FIZIKINĖMS IR MECHANINĖMS SAVYBĖMS IR BIOSKAIDYMU

Daktaro disertacija

Technologijos mokslai,
medžiagų inžinerija (T 008)

EFFECT OF MICROORGANISMS ON THE PHYSICAL AND MECHANICAL
PROPERTIES AND BIODECAY OF CELLULOSE-BASED MATERIALS

Doctoral dissertation

Technological Sciences,
Materials Engineering (T 008)

Lietuvių kalbos redaktorė Dalia Markevičiūtė,
Anglų kalbos redaktorė Jūratė Griškėnaitė

2022 09 06. 12,0 sp. I. Tiražas 20 egz.
Leidinio el. versija <https://doi.org/10.20334/2022-043-M>
Vilniaus Gedimino technikos universitetas,
Saulėtekio al. 11, 10223 Vilnius
Spausdino UAB „Ciklonas“
Žirmūnų g. 68, 09124 Vilnius