

УДК 54.056/661.123

ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕКТИНОВ ИЗ КОРЫ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (*ABIES SIBIRICA*), ПОВРЕЖДЕННОЙ ПОЛИГРАФОМ УССУРИЙСКИМ (*POLYGRAPHUS PROXIMUS*)*

© В.А. Ионин^{1,2**}, Ю.Н. Маляр^{1,2}, Д.В. Зимонин^{1,2}, В.С. Боровкова^{1,2}, А.В. Захарченко¹, Ю.А. Литовка³, О.П. Таран^{1,2}, И.Н. Павлов³

¹ Институт химии и химической технологии СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/24, Красноярск, 660036 (Россия),
e-mail: ionin.va@icct.krasn.ru

² Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск, 660041 (Россия)

³ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН, Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 (Россия)

Деревья рода *Abies* считаются чувствительными к воздействию болезней и вредителей. Потенциальная площадь усыхания древостоев пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb) в результате комплексного биотического воздействия полиграфа уссурийского (*Polygraphus proximus* Blandford) составляет до 10 млн га. Деревья, пораженные корневыми патогенами, являются центрами усыхания, от которых распространяется патологический отпад, также возникает актуальный вопрос утилизации зараженных кородревесных отходов. Перспективным направлением является их экстрактивная переработка с получением широкого спектра востребованных веществ. Методом ступенчатой экстракции из поврежденной коры *A. sibirica* выделены фракции смолистых веществ, таннинов и пектинов. Проведена экспериментальная оптимизация процессов выделения одних из наиболее ценных вторичных экстрактивных компонентов – пектинов. Установлены оптимальные условия эксперимента с наибольшим выходом пектинов до 8.4 мас.%, который достигается при обработке коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*, раствором HCl при pH=1.71 в течение 48 мин. Выделенные экстрактивные вещества (таннины, пектины) коры *A. sibirica* охарактеризованы методом ИК-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии. Антиоксидантную активность таннинов и пектинов исследовали с использованием соединений, имитирующих свободные радикалы (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил), которая составила 97 и 89% соответственно.

Ключевые слова: кора, *Abies sibirica* Ledeb, *Polygraphus proximus* Blandford, экстрактивные вещества, оптимизация, антиоксидантная активность.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, Правительства Красноярского края и Красноярского краевого фонда науки, проект №20-43-242906 в рамках государственного задания Института химии и химической технологии СО РАН проект 0287-2021-0012.

Введение

Большую площадь лесов регионов Сибири, в частности Красноярского края, который является доминирующим в лесной отрасли России по объему лесных угодий, занимают хвойные леса. Общий запас древесины составляет 11.5 млрд кубометров, в том числе 9.5 млрд кубометров по хвойным насаждениям [1, 2]. Одним из

Ионин Владислав Александрович – младший научный сотрудник лаборатории каталитических превращений возобновляемых ресурсов, e-mail: ionin.va@icct.krasn.ru
Маляр Юрий Николаевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории каталитических превращений возобновляемых ресурсов, e-mail: yumalyar@gmail.com

наиболее распространенных видов является *Abies sibirica* Ledeb (*пихта Сибирская*) – крупное вечнозеленое дерево семейства Сосновых (*Pinaceae*), экстракты которой широко используются в традиционной и народной медицине для профилактики и лечения различных заболеваний [3].

Окончание на С. 68.

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcrpm.20220412027s

** Автор, с которым следует вести переписку.

В настоящее время на территории Сибири происходит массовое усыхание *A. sibirica*, причиной которой часто называют инвазийного стволового вредителя *Polygraphus proximus* Blandford (*полиграф уссурийский*), семейства *Curculionidae* [4, 5]. При этом сами авторы отмечают, что размножение стволовых вредителей, как правило, является следствием ослабления лесов и финальным биотическим фактором, приводящим к гибели деревьев и деградации насаждений. В результате инвазии *P. proximus* сибирские пихтовые леса оказались под воздействием дополнительного мощного вторичного стрессового фактора [6]. При массовом размножении в Сибири жуки атакуют не только деревья, утратившие устойчивость против стволовых дендрофагов, но также внешне здоровые и незначительно ослабленные деревья пихты [5]. Широкое распространение *P. proximus* свидетельствует о скрыто протекающей инвазии в новые местообитания в течение последних десятилетий.

Катастрофические масштабы усыхания создают реальную опасность потери уникальных пихтовых насаждений, выполняющих важную биосферную функцию. Кроме того, кородревесные отходы являются основными твердыми углеродсодержащими отходами современных деревообрабатывающих, целлюлозно-бумажных производств. Отходы составляют 13–21 мас.% от древесной биомассы. Объем отходов, образующихся в России, составляет от 65 до 105 млн м³ [7]. В настоящее время более половины отходов коры сжигается или складывается, оставшаяся часть используется как дешевый источник энергии на предприятиях ЦБП или компостируется для применения в сельском хозяйстве. Кора характеризуется высокими содержаниями золы, низкой точкой спекания и низкой теплотворной способностью по сравнению с древесиной. С другой стороны, кора пихты содержит высокие концентрации экстрактивных веществ (пектины, танины, ситостерины, полифенолы и др. [8, 9]). При этом подвергшийся гиперинвазии *P. proximus* вырубленный лес не перерабатывается должным образом, что ведет к убыткам производств лесоперерабатывающей промышленности.

В литературе на данный момент отсутствует информация о влиянии деятельности *P. proximus* В. на химический состав и свойства коры *A. sibirica*. Вместе с этим существует глобальная тенденция к применению методик «зеленой химии», заключающихся в максимально полном, безотходном получении востребованных веществ с применением экологически безопасных процессов без причинения вреда существующей экосистеме [10]. Совокупность этих факторов обуславливает актуальность поиска альтернативных видов растительного сырья с целью извлечения из растительной биомассы экстрактивных веществ с высокой добавленной стоимостью [11–13].

Одними из наиболее ценных экстрактивных веществ растительной биомассы являются дубильные вещества (танины), обладающие большим потенциалом в синтезе новых функциональных материалов за счет своей способности образовывать высокомолекулярные соединения [14–17]; а также пектиновые вещества, применяющиеся как в пищевой, так и в фармацевтической промышленности [18, 19] благодаря своей биологической активности, в том числе антиоксидантной [20], которая, несомненно, связана с их структурой [20, 21].

Таким образом, целью настоящей работы являлось исследование и оптимизация экстрактивных процессов выделения пектинов из коры *A. sibirica*, пораженной стволовыми патогенами, исследование состава наиболее ценных продуктов – пектинов и танинов и их антиоксидантной активности.

Зимонин Дмитрий Валерьевич – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной спектроскопии и анализа, e-mail: zimonind89@mail.ru

Боровкова Валентина Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории каталитических превращений возобновляемых ресурсов, e-mail: bing0015@mail.ru
Захарченко Анна Васильевна – ученица класса РАН, e-mail: anulechka062@gmail.com

Литовка Юлия Александровна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии, e-mail: ionin.va@icct.krasn.ru

Таран Оксана Павловна – доктор химических наук, профессор, директор, e-mail: ionin.va@icct.krasn.ru

Павлов Игорь Николаевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией лесных культур, микологии и фитопатологии, e-mail: ionin.va@icct.krasn.ru

Экспериментальная часть

Подготовка исходной коры и коры A. sibirica, поврежденной P. proximus. В качестве сырья для проведения экстракции использовали воздушно-сухую кору и кору *A. sibirica*, поврежденную *P. proximus*, измельченные на роторной ножевой мельнице марки РМ-120 до фракции 3 мм. Содержание влаги в образцах определяли сушкой навесок коры в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С до постоянной массы.

Выделение экстрактивных веществ. Навески исходной коры *A. sibirica* и коры, поврежденной *P. proximus*, экстрагировали петролевым эфиром в аппарате Сокслета объемом 1000 мл

при 65–70 °С в течение 16 ч до полного удаления смолистых веществ. В дальнейшем из полученных экстрактов отгоняли растворитель на ротационном испарителе, а твердый остаток коры сушили в сушильном шкафу при температуре 60–65 °С до постоянной массы и определяли выход смолистых веществ с учетом изначальной влажности образцов.

Из обессмоленных твердых остатков коры выделяли дубильные вещества (танины) по методике, аналогично оптимизированной в работе [22].

Затем твердый остаток коры обрабатывали раствором HCl в термостате при pH от 1.5 до 2.1, гидро-модуле 1 : 20, температуре 80 °С, постоянном перемешивании в течение от 30 до 60 мин. Затем раствор отфильтровывали и концентрировали под вакуумом на ротационном испарителе. Пектины осаждали из раствора 4-кратным объемом охлажденного изопропилового спирта. Осадок пектиновых веществ отстаивали при -12 °С в течение 12 ч, затем сушили в лиофильной сушилке «Иней-6». Выход пектиновых веществ определяли по изменению массы воздушно-сухого твердого остатка коры с учетом равновесной влажности.

Физико-химические исследования коры и экстрактивных веществ. Регистрацию ИК-спектров проводили помощью ИК-Фурье-спектрометра IR Tracer-100 (Shimadzu, Япония) в области 4000–400 см⁻¹. Образцы готовили в виде таблеток в матрице бромистого калия (2 мг на 1000 мг бромида калия).

Молекулярно-массовые характеристики дубильных и пектиновых веществ определяли с помощью гель-проникающей хроматографии с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity II Multi-Detector GPC/SEC System с рефрактометрическим детектором (RI). Разделение проводили на двух колонках Agilent PL aquagel-ОН с использованием в качестве подвижной фазы 0.1 М NaNO₃ с добавлением 0.25 г/л NaN₃. Калибровка колонки осуществлялась с использованием полидисперсных стандартов полиэтиленгликоля (Agilent, США). Скорость подачи элюента – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 100 мкл. Перед анализом образцы растворяли в подвижной фазе (5 мг/мл) и фильтровали через 0.22 мкм мембранный ПТФЭ-фильтр (Agilent). Сбор и обработку данных выполняли с использованием программного обеспечения Agilent GPC/SEC MDS.

Антиоксидантную активность дубильных и пектиновых веществ устанавливали по поглощающей способности ДФПГ с использованием ранее описанного метода [23] с небольшими корректировками. Раствор ДФПГ в этаноле (0.2 ммоль/л) готовили перед УФ-измерениями. Образцы УВ растворяли в этиловом спирте с концентрацией 0.5; 2 и 5 мг/мл. Растворы исследуемых образцов (1 мл) тщательно смешивали с 2 мл свежеприготовленного раствора ДФПГ и 2 мл этанола. Смеси хорошо перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. После этого измеряли оптическую плотность при 517 нм против холостого опыта. Более низкое поглощение реакционной смеси указывает на более высокую активность по нейтрализации свободных радикалов, что видно на графике зависимости процента ингибирования от концентрации соединения. В качестве положительного контроля использовали витамин С. Опыты повторяли трижды и полученные значения усредняли.

Способность поглощать ДФПГ рассчитывали по уравнению (1):

$$\text{Активность по удалению ДФПГ радикалов (\%)} = \left(1 - \frac{A_s - A_b}{A_c}\right) \cdot 100\%, \quad (1)$$

где A_c – поглощение раствора ДФПГ без образца, A_s – поглощение исследуемого образца, смешанного с раствором ДФПГ, A_b – поглощение образца без раствора ДФПГ.

Рентгенофазовый анализ коры до и после экстракции проводили на дифрактометре ДРОН-3 с использованием CuK α -монохроматизированного излучения ($\lambda=0.154$ нм), напряжение 30 кВ, ток 25 мА. Шаг сканирования 0.02 град; интервалы по 1 с на точку данных. Измерение проводили в интервале углов Брэгга 2 Θ от 5.00 до 70.00 град. Индекс кристалличности (ИК) целлюлозы, входящей в состав коры, рассчитывали приближенным способом по формуле:

$$\text{ИК} = (I_{002} - I_{AM}) / I_{002}, \quad (2)$$

где I_{002} – интенсивность пика при 2 $\Theta=22.3$ –22.5°; I_{AM} – интенсивность в точке перегиба при 2 $\Theta=17.9$ –18.5°.

Математическая оптимизация. Выделение экстрактивных веществ коры *A. sibirica* проводили с использованием программного обеспечения Statgraphics Centurion XVI, DOE block (Design of Experiment), согласно методике [24].

Обсуждение результатов

*Подготовка исходной коры и коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*.* В ходе работы использовалась исходная кора *A. sibirica* и отобранная со стволов деревьев, поврежденных *P. proximus*, в окрестностях города Дивногорска Красноярского края зимой 2021 года. Известно, что механическое измельчение сырья интенсифицирует процессы экстракции, облегчая проникновение органических растворителей вглубь волокон коры и последующее извлечение веществ из нее. С целью последующего максимально полного извлечения из коры пихты экстрактивных веществ производили измельчение образцов коры *A. sibirica* до фракции, не превышающей 1–3 мм.

Влажность исходной коры и коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus* составляла 12.3 и 8.9% соответственно.

Выделение экстрактивных веществ. Для наиболее полного извлечения экстрактивных веществ из коры пихты проводили ступенчатую экстракцию по принципу возрастающей полярности растворителей, что позволяет достичь наиболее полного извлечения полифлавоноидных соединений [25], в том числе танинов и пектинов. Применение традиционных методов экстракции органическими растворителями веществ из коры требует предварительного обессмоливания коры гексаном, петролейным эфиром, смесью растворителей (например, петролейный эфир/ацетон), что пресекает попадание фракций смолистых веществ в экстракты, выделяемые в дальнейшем [26].

После проведенной экстракции петролейным эфиром средний выход смолистых веществ для исходной коры *A. sibirica* составил 13.4 мас.% в пересчете по твердому остатку с учетом определенной ранее влажности, а для коры, поврежденной *P. proximus*, составил 8.8 мас.%,

Известно, что в ходе жизненного цикла *P. proximus* многократно повреждает кору, проникая под нее и выгрызая маточные ходы, что провоцирует выделение смолы у деревьев. В течение 2–4 лет деревья постепенно истощаются и усыхают, что приводит к снижению содержанию смолистых веществ в коре, поврежденной *P. proximus*.

В результате проведенной экстракции 70% этиловым спиртом выход дубильных веществ в среднем составил для исходной коры *A. sibirica* – 10.3 мас.%, а для коры, поврежденной *P. proximus* – 15.1 мас.%,

Математическая оптимизация выделения пектиновых веществ. Для математической обработки и оптимизации процесса выделения пектиновых веществ из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*, использовали результаты опытов, приведенные в таблице 1. В исследование в качестве независимых переменных включили два фактора: pH раствора и продолжительность реакции, а также интервалы их варьирования. Результат процесса характеризовали выходным параметром: массовой долей пектинов в продукте (табл. 1).

Согласно таблице 1, наибольшее количество пектинов выделяется в более кислых растворах, однако максимальное количество пектиновых веществ выделяется при pH=1.8, продолжительности реакции 45 мин. Такое явление может быть связано с термостабильностью пектиновых веществ в сильнокислых растворах и их постепенному гидролизу.

Зависимость выхода пектиновых веществ от переменных факторов – концентрации водных растворов этилового спирта и времени экстракции аппроксимированы уравнением регрессии второго порядка:

$$Y_1 = -52.961 + 51.550X_1 + 0.702X_2 - 14.592X_1^2 - 0.036X_1X_2 - 0.0065X_2^2 \quad (3)$$

Дисперсионный анализ показал, что в границах принятых условий эксперимента существенный вклад в суммарную дисперсию выходного параметра вносят оба фактора – pH раствора и продолжительность реакции. Полученные статистические характеристики представлены в таблице 2.

Адекватность уравнения (3) подтверждается высоким значением коэффициента детерминации $R^2_{adj} = 94.1\%$. На рисунке 1 приведены результаты сравнения значений выходного параметра, полученных в эксперименте, со значениями, прогнозируемыми по уравнению (3). Близость большинства «экспериментальных точек» к прямой указывает на хорошие прогностические свойства уравнения регрессии.

Математическая модель использована для графического отображения зависимости выходного параметра Y_1 от переменных факторов в виде поверхности отклика (рис. 2).

Максимальное прогнозируемое значение 8.37% в изученной области факторного пространства достигается, согласно вычислениям по математической модели (3), в точке, соответствующей следующим значениям переменных факторов: pH 1.71, продолжительность 48.5 мин.

Таблица 1. Выход пектиновых веществ в результате обработки растворами HCl

№ образца	pH (X_1)	Продолжительность процесса, мин (X_2)	Выход, масс. % (Y_1)
1	1.5	30	5.09
2	1.5	45	7.05
3	1.5	60	6.81
4	1.8	30	5.50
5	1.8	45	8.44
6	1.8	60	6.58
7	2.1	30	3.89
8	2.1	45	5.37
9	2.1	60	4.95

Таблица 2. Дисперсионный анализ для Y_1 (выход пектинов, %), зависящего от переменных факторов – X_1 (pH) и X_2 (продолжительность, мин)

Источники дисперсии	Выходные параметры	
	выход, масс. %, Y_1	
	Статистические характеристики	
	Дисперсионные отношения F	Уровни значимости P
X_1 : pH	12.77	0.0375
X_2 : Продолжительность	8.47	0.0620
X_1^2	11.76	0.0415
X_1X_2	0.37	0.0855
X_2^2	15.01	0.0305
Число степеней свободы	2	
R^2_{adj}	94.1	

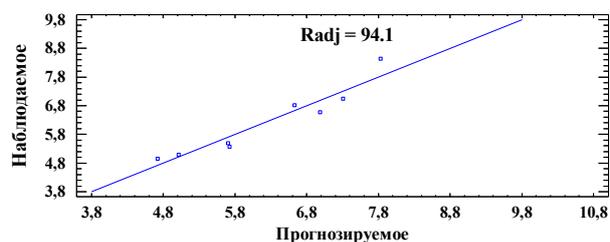


Рис. 1. График прогнозируемых по модели и наблюдавшихся в эксперименте значений выходного параметра (выход пектиновых веществ, %)

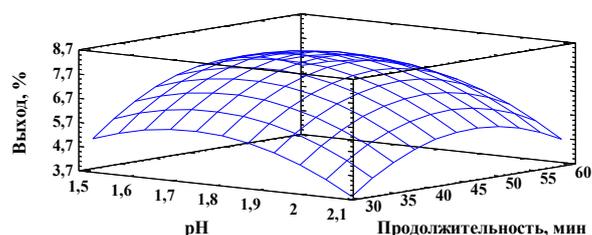


Рис. 2. Поверхность отклика выходных параметров при различном влиянии условий эксперимента на выход пектиновых веществ

Физико-химические исследования коры и экстрактивных веществ коры *A. Sibirica*. Зарегистрированные ИК-спектры дубильных веществ, выделенных из коры *A. sibirica*, приведены на рисунке 1 в электронном приложении к статье. Все ИК-спектры полученных экстрактов обладают схожим профилем, в котором наблюдается около 13 основных пиков

Первый пик в области п.п. $3415\text{--}3430\text{ см}^{-1}$ свидетельствуют о высокой степени вовлеченности OH групп в образовании водородных связей, в то время как второй, раздвоенный пик в области $2940\text{--}2920$ и $2850\text{--}2840\text{ см}^{-1}$ соотносится с колебаниями C-H связей в CH_3 и CH_2 группах [27, 28].

Пики в областях п.п. 1700 см^{-1} связывается с колебаниями C=O групп карбоновых кислот, альдегидов и др. [29]. Существующие пики в области п.п. $1620\text{--}1615$ и $1450\text{--}1445\text{ см}^{-1}$ связаны с колебаниями, характерными для ароматического кольца, связей C=C в алкенах и циклических олефинах, а также для ассиметричных C-O-O- группировок. В зарегистрированных ИК-спектрах наблюдаются более низкие значения интенсивности в области п.п. 1530 см^{-1} для образца коры пихты, поврежденной *P. proximus*, которое свидетельствует о меньшем количестве валентных C-C связей неконденсированных ароматических соединений.

В зарегистрированных ИК-спектрах смещения п.п. в области 1280 см^{-1} говорит о колебаниях симметричных C-O-C связей [30], а также колебаний C-O связей кольцевой структуры флавоноидоосновных дубильных веществ, а также C-CHR-C преобразованиями [28]. Сигнал в области п.п. 1150 см^{-1} обусловлен вкладом

гликозидной связи [31], а смещение в области п.п. 1000–1060 см^{-1} ассоциируется как с С-С колебанием характерным для полисахаридов [31], так и с колебанием С-О связей, в то время как интенсивность пика в области п.п. 960 см^{-1} свидетельствует о внеплоскостных колебаниях С-Н ароматических колец [28] и гликозидных связях полисахаридов [31]. Поглощение в области 870–865 см^{-1} относится к β -гликозидному типу связи [31], а сигнал для 825 см^{-1} связан с С1-Н, α -гликозидной связью и колебаниям С-Н в ароматическом кольце.

Приведенный выше анализ ИК-спектров продемонстрировал, что при проведении экстракции из коры пихты растворами этилового спирта произошло выделение нескольких классов веществ. При этом на приведенном спектре не существует пика, который исключительно ассоциировался только с полифенольными соединениями. Однако данный факт позволяет предположить возможность дальнейшего разделения полученных в ходе экстракции растворами этилового спирта веществ на ценные компоненты с помощью дополнительных операций. Для коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*, возможный ряд полученных соединений будет отличаться незначительно.

Зарегистрированные ИК-спектры пектиновых веществ, выделенных растворами соляной кислоты из исходной коры *A. sibirica* и из коры, поврежденной *P. proximus*, приведены на рисунке 2 в электронном приложении к статье.

Сравнение зарегистрированных ИК-спектров пектиновых веществ показывает незначительные отличия полученных соединений. Как могло ожидать, высокие и вместе с тем близкие для образцов значения в области п.п. 3600 см^{-1} и значительно низкая интенсивность по сравнению с областью п.п. 3000 см^{-1} говорят о степени вовлеченности О-Н групп в образовании водородных связей, отражая этерификацию части ОН-групп галактуронидной цепи [32], характерной для пектиновых веществ.

Следует отметить, что как для пектинов, полученных из исходной коры, так и для полученных из коры, поврежденной *P. proximus* характерны асимметричные пики сложноэфирных фрагментов в области п.п. 1745–1755 см^{-1} . В литературе имеются данные, свидетельствующие, что применение КВг в регистрации ИК-спектров может привести к снижению интенсивности, а также произойти к расщеплению полос сложных эфиров из-за влияния КВг на сложноэфирные группировки [32].

Также на приведенном зарегистрированном ИК-спектре имеется характерная расширенная полоса валентного колебания двойной связи СО пектиновых неэтерифицированных карбоксильных групп с максимумом в 1630 см^{-1} , свидетельствующая об их участии в межмолекулярных водородных связях.

Следует также отметить схожую для образцов тенденцию и для валентного колебания С-О связей гликозидного фрагмента в области 1150 см^{-1} [31].

Методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) установлено, что образцы пектиновых веществ, полученных до оптимизации процесса экстракции, имеют очень широкое молекулярно-массовое распределение (ММР) (рис. 3) со значением полидисперсности $\text{PDI}=18.81$ (табл. 3), представляя собой высокогетерогенные полисахариды.

В свою очередь в образцах, выделенных оптимизированным методом, наблюдается изменение профиля кривой ММР, который приобретает мономодальный вид с уменьшением PDI до 5.44. Отчетливо видно, что оптимизированный образец менее подвержен деструкции с незначительным образованием фракции низкомолекулярных соединений.

На кривых ММР дубильных веществ (рис. 4) наблюдается аналогичный характер распределения. Образцы, полученные при оптимальных условиях, имеют более узкое ММР с преобладающим количеством низкомолекулярных соединений, что в свою очередь делает их более растворимыми в воде и спиртах.

Проведенное исследование антиоксидантной активности показало, что все исследуемые образцы пектиновых и дубильных веществ, полученных из коры, поврежденной *P. proximus*, обладают сильной восстанавливающей способностью относительно ДФПГ радикалов и при этом имеют дозозависимый характер (рис. 5).

Известно, что содержание гидроксильных групп положительно влияет на антиоксидантную активность [23], следовательно, таннины, являясь полифенолами с большим количеством ОН-групп, могут использоваться в качестве природных антиоксидантов. Содержание карбоксильных и метоксильных групп в полисахаридах, в том числе в пектиновых веществах, также оказывает положительное влияние на АОА [23], что видно на рисунке 5, графиках 2 и 3, где наблюдаются довольно высокие значения АОА пектиновых веществ с максимумом поглощающей способности 89% при концентрации 5 мг/мл.

Рис. 3. Кривые молекулярно-массового распределения: 1 – пектинов, полученных из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*; 2 – пектинов, полученных при оптимальных условиях экстракции из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*

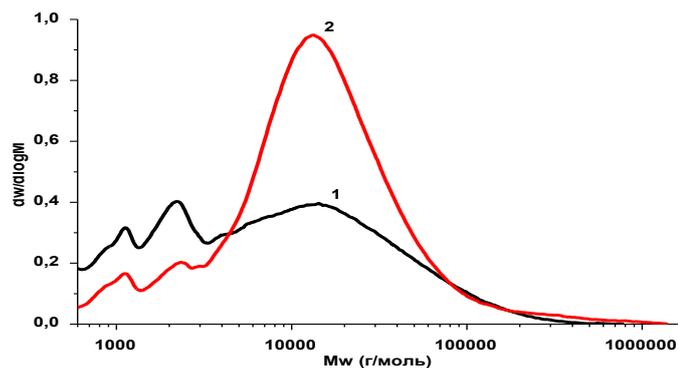


Таблица 3. Молекулярно-массовые характеристики дубильных и пектиновых веществ, полученных из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus* в оптимальных условиях экстракции

Образцы	M _w (г/моль)	PDI
Таннины	1.132	1.92
Таннины после оптимизации	825	1.49
Пектины	14.186	18.81
Пектины после оптимизации	24.611	5.44

Рис. 4. Кривые молекулярно-массового распределения: 1 – таннинов, выделенных из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*; 2 – таннинов, выделенных при оптимальных условиях экстракции из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*

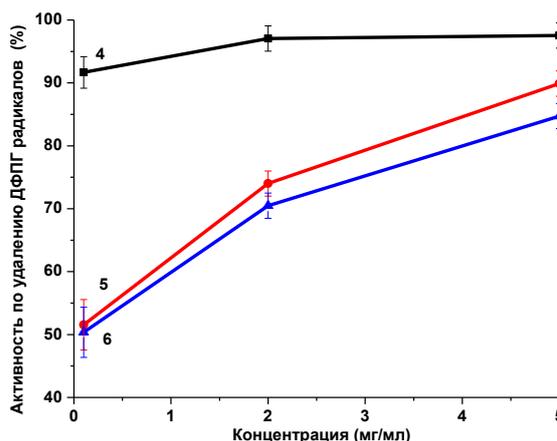
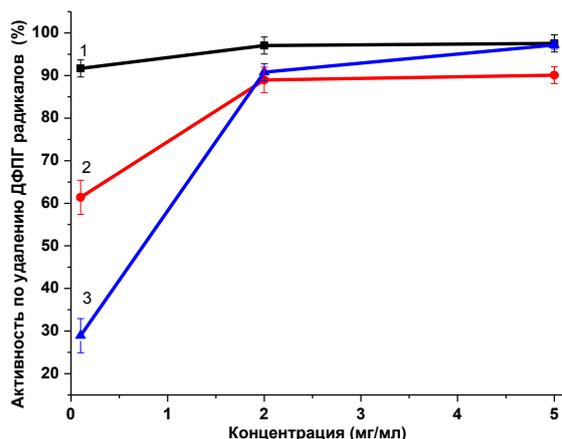
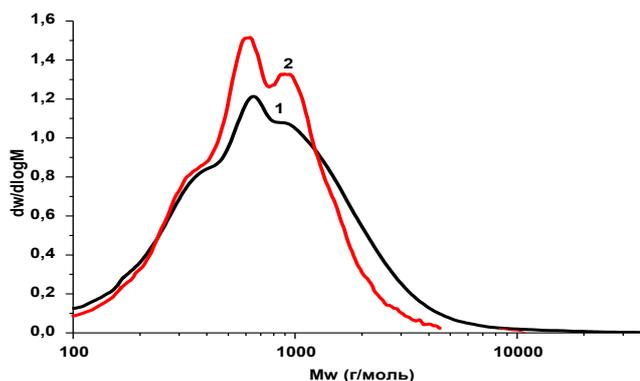


Рис. 5. Поглощающая способность ДФПГ радикалов при различной концентрации: 1 – Витамин С (контрольный опыт); 2 – таннинов, выделенных из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*; 3 – таннинов, выделенных при оптимальных условиях экстракции из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*; 4 – Витамин С (контрольный опыт); 5 – пектинов, выделенных из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*; 6 – пектинов, выделенных при оптимальных условиях экстракции из коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*

Молекулярная масса также является важным параметром, влияющим на биологическую активность дубильных и пектиновых веществ [20]. Согласно исследованиям [33], полимеры с относительно низкой молекулярной массой демонстрируют более сильную поглощающую способность ДФПГ радикалов. Действительно, среди всех исследуемых образцов наивысшую поглощающую способность ДФПГ радикалов проявляют танины (рис. 5, график 3), полученные в оптимизированных условиях процесса, соответственно, обладающие наиболее низкой молекулярной массой (табл. 3), что согласуется с данными ГПХ. Также важно отметить, что данный образец показал антиоксидантные свойства, близкие к витамину С при концентрации 5 мг/мл (~97%), что несомненно делает его перспективным и мощным антиоксидантом для использования в фармацевтической промышленности.

Для оценки влияния экстракционных процессов на кору пихты провели рентгенофазовый анализ. Результаты рентгенофазового анализа для образца исходной коры до и после проведения экстракции представлены на рисунке 3 в электронном приложении к статье (графики 1 и 2). Результаты рентгенофазового анализа для коры *A. sibirica*, поврежденной *P. proximus*, до и после проведения экстракции представлены на рисунке 3 в электронном приложении к статье (графики 3 и 4)

Рассчитанные по формуле (2) индексы кристалличности в используемых условиях эксперимента составили:

$$\begin{aligned} \text{ИК}_1 &= 0.247 (24.7\%) & \text{ИК}_2 &= 0.490 (49.0\%) \\ \text{ИК}_3 &= 0.420 (42.0\%) & \text{ИК}_4 &= 0.486 (48.6\%) \end{aligned}$$

Исходя из результатов РФА и рассчитанных индексов кристалличности, следует, что в результате экстракции наибольшее изменение индекса кристалличности наблюдается для коры, не поврежденной *P. proximus* ($\text{ИК}_2 - \text{ИК}_1 = 24.3\%$), что говорит о выраженных переходах аморфной части лигноцеллюлозной биомассы в кристаллическую.

Следует отметить разницу между исходными значениями рассчитанных по результатам РФА индексов кристалличности, зарегистрированных для исходной коры и для коры, поврежденной *P. proximus* (ИК_1 и ИК_3), составляющую 17.3%. Это говорит о том, что в ходе жизненного цикла *P. proximus* питается аморфной частью лигноцеллюлозной биомассы *A. sibirica*, что сказывается на увеличении доступности целлюлозы в дальнейших процессах и адсорбции реагентов на лигнине.

Заключение

Предложен способ ступенчатой экстрактивной переработки коры *A. sibirica*, пораженной стволовыми патогенами, позволяющий получать востребованные продукты: смолистые вещества, танины и пектины. Впервые методом экспериментальной и математической оптимизации установлены оптимальные условия экстракции из коры, поврежденной *P. proximus*, пектиновых веществ с наибольшим выходом, достигающим 8.4 мас.%, с применением HCl при pH=1.71 в течение 48 мин.

Выделенные экстрактивные вещества коры *A. sibirica* охарактеризованы методом ИК-спектроскопии и гель-проникающей хроматографии, определена их антиоксидантная активность. Антиоксидантная активность танинов и пектинов составила 97 и 89% соответственно при концентрации образцов 5 мг/мл.

Твердый остаток коры *A. sibirica* после экстракции охарактеризован методом РФА, на основе которого установлено, что в ходе жизненного цикла *P. proximus* питается аморфной частью лигноцеллюлозной биомассы, что сказывается на увеличении доступности целлюлозы в дальнейших процессах.

Работа выполнена с использованием оборудования Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН.

Список литературы

1. Melman I.V. Krasnoyarsk region timber industry complex and the problem of increasing its competitiveness // Regional economy: theory and practice. 2008. Vol. 26. P. 6.
2. Sobolev S.V. Krasnoyarsk Territory raw materials use complexity problems at wood-processing enterprises // Success of modern natural science. 2004. Vol. 4. Pp. 168–171.
3. Костеша Н.Я., Лукьяненко П.И., Стрелис А.К. Экстракт пихты сибирской «Абисиб» и его применение в медицине. Томск, 1997. 160 с.
4. Керчев И.А. Экология полиграфа уссурийского *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera; Curculionidae, Scolytinae) в Западно-Сибирском регионе инвазии // Российский журнал биологических инвазий. 2014. Т. 7. №2. С. 80–95.
5. Кривец С.А., Бисирова Э.М., Керчев И.А., Пац Е.Н., Чернова Н.А. Трансформация таежных экосистем в очаге инвазии полиграфа уссурийского *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) в Западной Сибири // Российский журнал биологических инвазий. 2015. Т. 8(1). С. 41–63.

6. Керчев И.А. Экология уссурийского полиграфа *Polygraphus proximus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) в западносибирском регионе инвазии: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Томск, 2013. 24 с.
7. Фетисова О.Ю., Микова Н.М., Таран О.П. Оценка применимости модельных и безмодельных методов кинетического анализа неізотермического пиролиза коры пихты // *Кинетика и катализ*. 2020. Т. 61. №6. С. 804–811.
8. Handa M. et al. Lipase inhibitory and LDL anti-oxidative triterpenes from *Abies sibirica* // *Phytochemistry*. 2013. Vol. 86. Pp. 168–175.
9. Shakhmatov E.G. et al. Extraction and structural characteristics of pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L. // *Carbohydrate Polymers*. 2015. Vol. 123. Pp. 228–236.
10. Anastas P., Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice // *Chemical Society Reviews*. 2010. Vol. 39(1). Pp. 301–312.
11. Abilleira F. et al. Tannins extraction from *Pinus pinaster* and *Acacia dealbata* bark with applications in the industry // *Industrial Crops and Products*. 2021. Vol. 164. 113394.
12. Gao Y. et al. Optimized ultrasound-assisted extraction of total polyphenols from *Empetrum nigrum* and its bioactivities // *Journal of Chromatography B*. 2021. Vol. 1173. 122699.
13. Wu K. et al. Mechanochemical assisted extraction: A novel, efficient, eco-friendly technology // *Trends in Food Science & Technology*. 2017. Vol. 66. Pp. 166–175.
14. Girard A.L., Awika J.M. Impact of condensed tannin interactions with grain proteins and non-starch polysaccharides on batter system properties // *Food Chemistry*. 2021. Vol. 359. 129969.
15. Harbertson J.F. et al. Impact of condensed tannin size as individual and mixed polymers on bovine serum albumin precipitation // *Food Chemistry*. 2014. Vol. 160. Pp. 16–21.
16. Harbertson J.F. et al. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character // *Food Chemistry*. 2012. Vol. 131(3). Pp. 999–1008.
17. Frazier R.A. Chapter 123 – Interactions of Tea Tannins with Proteins and Their Impact on Food Quality and Health, in *Tea in Health and Disease Prevention*. Academic Press, 2013. Pp. 1479–1490.
18. Li D.-q. et al. Pectin in biomedical and drug delivery applications: A review // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021. Vol. 185. Pp. 49–65.
19. Du Q. et al. The interfacial covalent bonding of whey protein hydrolysate and pectin under high temperature sterilization: Effect on emulsion stability // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021. Vol. 206. 111936.
20. Zhu Y. et al. Purification, in-depth structure analysis and antioxidant stress activity of a novel pectin-type polysaccharide from *Ziziphus Jujuba* cv. Muzaoresidue // *Journal of Functional Foods*. 2021. Vol. 80. 104439.
21. Liu N. et al. Comparison of characterization and antioxidant activity of different citrus peel pectins // *Food Chemistry*. 2022. Vol. 386. P. 19.
22. Ионин В.А., Казаченко А.С., Елсуфьев Е.В. Переработка коры кедрa сибирского (*Pinus Sibirica*) с экспериментальной и математической оптимизацией выделения танинов и этаноллигнинов // *Вестник Томского государственного университета. Химия*. 2021. №23. С. 54–66.
23. Borovkova V.S. et al. Molecular Characteristics and Antioxidant Activity of Spruce (*Picea abies*) Hemicelluloses Isolated by Catalytic Oxidative Delignification // *Molecules*. 2022. Vol. 27(1).
24. Пен Р.З. Планирование эксперимента в Statgraphics Centurion. Красноярск, 2014. 291 с.
25. Xu M. et al. Polarity-dependent extraction of flavonoids from citrus peel waste using a tailor-made deep eutectic solvent // *Food Chemistry*. 2019. Vol. 297. 124970.
26. Lobato-Peralta D.R. et al. A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications // *Journal of Cleaner Production*. 2021. Vol. 293. 126123.
27. Kyraleou M. et al. Diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy for simultaneous quantification of total phenolics and condensed tannins contained in grape seeds // *Industrial Crops and Products*. 2015. Vol. 74. Pp. 784–791.
28. Ping L. et al. Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive // *Industrial Crops and Products*. 2012. Vol. 40(1). Pp. 13–20.
29. Socrates G. The carbonyl group // *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 2001. Pp. 120–131.
30. Socrates G. Ethers: G1-O-G2 group // *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. 2001. Pp. 100–104.
31. Kacuráková M. et al. FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses // *Carbohydrate Polymers*. 2000. Vol. 43(2). Pp. 195–203.
32. Kamnev A.A. et al. Pectin functionalised by fatty acids: Diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopic characterisation // *Journal of Molecular Structure*. 2015. Vol. 1079. Pp. 74–77.
33. Liu X.-X. et al. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from Chinese yam by a cellulase-assisted method // *Process Biochemistry*. 2022. Vol. 121. Pp. 178–187.

Поступила в редакцию 2 октября 2022 г.

После переработки 10 ноября 2022 г.

Принята к публикации 11 ноября 2022 г.

Для цитирования: Ионин В.А., Маляр Ю.Н., Зимонин Д.В., Боровкова В.С., Захарченко А.В., Литовка Ю.А., Таран О.П., Павлов И.Н. Оптимизация выделения пектинов из коры пихты сибирской (*Abies sibirica*), поврежденной полиграфом уссурийским (*Polygraphus proximus*) // *Химия растительного сырья*. 2022. №4. С. 67–76. DOI: 10.14258/jcrpm.20220412027.

Ionin V.A.^{1,2*}, Malyar Yu.N.^{1,2}, Zimonin D.V.^{1,2}, Borovkova V.S.^{1,2}, Zaharchenko A.V.¹, Litovka Yu.A.³, Taran O.P.^{1,2}, Pavlov I.N.³ OPTIMIZATION OF PECTIN EXTRACTION FROM THE BARK OF SIBERIAN FIR (*ABIES SIBIRICA*), CORRUPTED BY USSURI POLYGRAPH (*POLYGRAPHUS PROXIMUS*)

¹ Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS, FRC KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/24, Krasnoyarsk, 660036 (Russia), e-mail: ionin.va@icct.krasn.ru

² Siberian Federal University, pr. Svobodny, 79, Krasnoyarsk, 660041 (Russia)

³ Sukachev Institute of Forest SB RAS, FRC KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 (Russia)

Species of *Abies* trees are considered susceptible to the effects of diseases and pests. As a result of the complex biotic impact of the Ussuri Polygraph (*Polygraphus proximus* Blandford) the area of potential drying of Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb) stands up to 10 million hectares. Trees corrupted by root pathogens are a center of desiccation, from where pathological decay spreads, so also there arise an urgent issue of disposal of corrupted bark and wood waste. A promising solution to this problem is the extractive processing of wood-bark wastes aimed to obtain a wide range of high-valued substances. Fractions of resinous substances, tannins and pectins were isolated from the corrupted *A. sibirica* bark using the sequential extraction method. The optimization of the process of pectin extraction - one of the most valuable secondary extractive components was carried out. The optimal experimental conditions were established with the highest yield of pectins up to 8.4 wt.%, which is achieved by treating the *A. sibirica* bark, corrupted by *P. proximus*, with a HCl solution at pH = 1.71 and the process duration 48 min. The isolated extractive substances (tannins, pectins) from the *A. sibirica* bark characterized by IR spectroscopy and gel permeation chromatography. The antioxidant activity of tannins and pectins studied using compounds imitated free radicals (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), which amounted to 97% and 89%, respectively.

Keywords: bark, *Abies sibirica* Ledeb, *Polygraphus proximus* Blandford, extractive substances, optimization, antioxidative activity.

References

- Melman I.V. *Regional economy: theory and practice*, 2008, vol. 26, p. 6.
- Sobolev S.V. *Success of modern natural science*, 2004, vol. 4, pp. 168–171.
- Kostesha N.Ya., Luk'yanenok P.I., Strelis A.K. *Ekstrakt pikhty sibirskoy "Abisib" i yego primeneniye v meditsine*. [Siberian fir extract "Abisib" and its use in medicine]. Tomsk, 1997, 160 p. (in Russ.).
- Kerchev I.A. *Rossiyskiy zhurnal biologicheskikh invaziy*, 2014, vol. 7, no. 2, pp. 80–95. (in Russ.).
- Krivets S.A., Bisirova E.M., Kerchev I.A., Pats Ye.N., Chernova N.A. *Rossiyskiy zhurnal biologicheskikh invaziy*, 2015, vol. 8(1), pp. 41–63. (in Russ.).
- Kerchev I.A. *Ekologiya ussuriyskogo poligrafa Poligraphus proximus Blandford (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) v zapadnosibirskom regione invazii: avtoref. diss. ... kand. biol. nauk.* [Ecology of the Ussuri polygraph *Poligraphus proximus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) in the Western Siberian region of invasion: Ph.D. diss. ... cand. biol. Sciences]. Tomsk, 2013, 24 p. (in Russ.).
- Fetisova O.Yu., Mikova N.M., Taran O.P. *Kinetika i kataliz*, 2020, vol. 61, no. 6, pp. 804–811. (in Russ.).
- Handa M. et al. *Phytochemistry*, 2013, vol. 86, pp. 168–175.
- Shakhmatov E.G. et al. *Carbohydrate Polymers*, 2015, vol. 123, pp. 228–236.
- Anastas P., Eghbali N. *Chemical Society Reviews*, 2010, vol. 39(1), pp. 301–312.
- Abilleira F. et al. *Industrial Crops and Products*, 2021, vol. 164, 113394.
- Gao Y. et al. *Journal of Chromatography B*, 2021, vol. 1173, 122699.
- Wu K. et al. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, vol. 66, pp. 166–175.
- Girard A.L., Awika J.M. *Food Chemistry*, 2021, vol. 359, 129969.
- Harbertson J.F. et al. *Food Chemistry*, 2014, vol. 160, pp. 16–21.
- Harbertson J.F. et al. *Food Chemistry*, 2012, vol. 131(3), pp. 999–1008.
- Frazier R.A. *Chapter 123 - Interactions of Tea Tannins with Proteins and Their Impact on Food Quality and Health, in Tea in Health and Disease Prevention*. Academic Press, 2013, pp. 1479–1490.
- Li D.-q. et al. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, vol. 185, pp. 49–65.
- Du Q. et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, vol. 206, 111936.
- Zhu Y. et al. *Journal of Functional Foods*, 2021, vol. 80, 104439.
- Liu N. et al. *Food Chemistry*, 2022, vol. 386, p. 19.
- Ionin V.A., Kazachenko A.S., Yelsuf'yev Ye.V. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Khimiya*, 2021, no. 23, pp. 54–66. (in Russ.).
- Borovkova V.S. et al. *Molecules*, 2022, vol. 27(1).
- Pen R.Z. *Planirovaniye eksperimenta v Statgraphics Centurion*. [Planning an experiment in Statgraphics Centurion]. Krasnoyarsk, 2014, 291 p. (in Russ.).
- Xu M. et al. *Food Chemistry*, 2019, vol. 297, 124970.
- Lobato-Peralta D.R. et al. *Journal of Cleaner Production*, 2021, vol. 293, 126123.
- Kyrleou M. et al. *Industrial Crops and Products*, 2015, vol. 74, pp. 784–791.
- Ping L. et al. *Industrial Crops and Products*, 2012, vol. 40(1), pp. 13–20.
- Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, 2001, pp. 120–131.
- Socrates G. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*, 2001, pp. 100–104.
- Kacuráková M. et al. *Carbohydrate Polymers*, 2000, vol. 43(2), pp. 195–203.
- Kamnev A.A. et al. *Journal of Molecular Structure*, 2015, vol. 1079, pp. 74–77.
- Liu X.-X. et al. *Process Biochemistry*. 2022, vol. 121, pp. 178–187.

Received October 2, 2022

Revised November 10, 2022

Accepted November 11, 2022

For citing: Ionin V.A., Malyar Yu.N., Zimonin D.V., Borovkova V.S., Zaharchenko A.V., Litovka Yu.A., Taran O.P., Pavlov I.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 4, pp. 67–76. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpr.20220412027.

* Corresponding author.