

Зубов

На правах рукописи

Зубов Иван Николаевич

**ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ
ЛИГНОУГЛЕВОДНОЙ МАТРИЦЫ ХВОЙНЫХ
НА ПРИМЕРЕ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА**

Специальность 05.21.03 – Технология и оборудование химической переработки
биомассы дерева, химия древесины

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Архангельск
2013

Работа выполнена в лаборатории химии растительных биополимеров федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт экологических проблем Севера Уральского отделения Российской академии наук

Научные руководители:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор химических наук, профессор
Боголицын Константин Григорьевич

кандидат технических наук,
Гусакова Мария Аркадьевна

Официальные оппоненты:

Пономарев Дмитрий Андреевич,
доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры органической химии
СПбГЛТУ

Миловидова Любовь Анатольевна
кандидат технических наук, доцент,
доцент кафедры технологии целлюлозно-
бумажного производства института теорети-
ческой и прикладной химии
САФУ имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация

Институт биологии Коми НЦ УрО РАН

Защита состоится «15» ноября 2013 года в 10⁰⁰ часов в ауд. 1220 на заседании диссертационного совета Д 212.008.02 при ФГАОУ ВПО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова» (САФУ) по адресу: 163002, г. Архангельск, наб. Северной Двины, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке САФУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» октября 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент



Т.Э. Скребец

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Состав, строение и свойства лигноуглеводных композитов формируются на наноуровне при непосредственном участии мультиферментативных комплексов в процессе биосинтеза древесного вещества. В дальнейшем это предопределяет поведение растительных полимеров при химических и физических воздействиях. Активность ферментативных комплексов клетки зависит от внешних условий, к которым относятся абиотическое, биотическое и антропогенное воздействия. В связи с этим, изучение вопросов биосинтеза компонентов клеточных оболочек, их самоорганизации, а также влияние на эти процессы комплекса внешних и внутренних факторов приобретают все большую актуальность.

С современных позиций древесное вещество рассматривается как бионанокompозит. Основу древесины как хвойных, так и лиственных видов составляют полисахаридные компоненты (целлюлоза, гемицеллюлозы и пектиновые вещества), а также полифенол нерегулярного строения – лигнин. Функции лигнина в древесине заключаются в непосредственном его участии в процессах биосинтеза и формирования надмолекулярной структуры древесного вещества, придании жесткости углеводной композиции клеточной стенки и защите растения от патогенов. Во многом это определяется функциональной природой и физико-химическими свойствами лигнина. Основной трудностью при изучении лигнинов является невозможность их выделения в неизменном виде в силу высокой лабильности, что делает предпочтительным использование неразрушающих методов анализа древесного вещества.

Применение современных методов исследования и высокоточной приборной базы позволит получить новые данные и уточнить имеющиеся сведения о распределении лигнина в клеточной стенке, его связи с полисахаридами, а также особенностях строения и надмолекулярной структуры лигноуглеводной матрицы.

Целью данной работы является изучение особенностей формирования состава и структуры древесного вещества хвойных на примере можжевельника обыкновенного (*Juniperus Communis L.*).

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- обосновать выбор биообъекта и региона исследования;
- изучить компонентный состав древесины можжевельника различных природно-климатических зон и определить приоритетные факторы формирования компонентов древесного вещества;
- определить влияние ферментативного (пероксидазного) катализа на химические процессы формирования древесины можжевельника;
- исследовать функциональную природу и физико-химические свойства лигнина в процессе биосинтеза и формирования древесного вещества;
- изучить особенности ультрамикростроения и надмолекулярной структуры лигноуглеводной матрицы, а также влияние на процесс их формирования химической природы компонентов древесины.

Научная новизна

Получены новые сведения об особенностях компонентного состава древесины можжевельника обыкновенного различных природно-климатических зон Европейского Севера России. Определены приоритетные факторы формирования компонентов древесного вещества. Установлено, что интенсивность биохимических процессов образования углеводной составляющей древесного вещества можжевельника определяется температурным режимом региона.

Получены новые данные о функциональной природе, физико-химических свойствах и молекулярно-массовых характеристиках малоизмененных препаратов нативного лигнина можжевельника. Показана значительная роль растительных пероксидаз как регуляторов биохимических процессов в биосинтезе и функционализации лигнина.

Методами сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии получены новые экспериментальные данные об особенностях строения древесного вещества можжевельника. Доказана спиральная ориентация микрофибрилл в слоях вторичной клеточной стенки. Получено подтверждение глобулярной структуры макромолекулярных образований лигнина с нецеллюлозными полисахаридами.

Практическая значимость

Предложена усовершенствованная методика исследования строения лигно-углеводной матрицы древесины методом сканирующей электронной микроскопии, включающая стадию криомеханической пробоподготовки. Проведена доработка и адаптация методики определения параметра активности пероксидазы в растительном сырье.

На защиту выносятся

- Влияние абиотических факторов на компонентный состав древесины можжевельника обыкновенного.
- Роль пероксидазы в процессах биосинтеза и функционализации лигнина.
- Результаты исследования функциональной природы, молекулярно-массовых характеристик и реакционной способности диоксанлигнинов из разновозрастной древесины можжевельника.
- Данные по ультрамикростроению и надмолекулярной структуре древесной матрицы хвойных.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в формулировке целей и задач исследования, получении основного массива экспериментальных данных, их интерпретации, подготовке публикаций по теме диссертационной работы.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы докладывались на: IV Международной молодежной конференции «Экология-2011» (Архангельск); XIV Молодежной конференции по органической химии (Екатеринбург, 2011); IV Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров» (Архангельск, 2011); V Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения в химии и

химической технологии растительного сырья» (Барнаул, 2012); 12-th European Workshop on lignocellulosics and pulp «EWLP 2012» (Finland, 2012); Всероссийской конференции с международным участием «Экология и геологические изменения в окружающей среде северных регионов» (Архангельск, 2012); V Международной конференции «Физикохимия растительных полимеров» (Архангельск, 2013).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных трудов, из них 3 статьи в журналах, входящих в список ВАК.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей 3 раздела, выводов и списка литературы. Работа изложена на 121 странице машинописного текста, включая 37 рисунков, 3 схемы и 16 таблиц. Список литературы содержит 172 наименования.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В литературном обзоре дана краткая характеристика комплекса абиотических факторов и их влияния на особенности состава и структуры древесного вещества. Рассмотрены: морфологические особенности строения древесины хвойных пород; состав, строение и особенности биосинтеза основных компонентов клеточной стенки; характеристика ферментов класса оксидоредуктаз, их роль в растительных организмах и процессе лигнификации; методы анализа компонентов клеточной стенки и древесного вещества в целом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Можжевельник как биообъект исследования

Химический состав древесины не является строго постоянным и меняется под воздействием ряда факторов, в числе которых абиотические, биотические и антропогенные. Абиотические (факторы неживой природы) играют определяющую роль в процессах распределения растительности, а также формирования состава и структуры древесного вещества. Для оценки их влияния на процесс биосинтеза лигноуглеводной матрицы необходимо исключить (минимизировать) биотическое и антропогенное воздействия. Достичь этого возможно при использовании в качестве биообъекта исследования стрессоустойчивого вида, обладающего низкой заболеваемостью, длительным периодом жизни и обширным географическим ареалом. Одним из немногих биообъектов, отвечающих заданным условиям, является можжевельник обыкновенный (*Juniperus Communis* L).

Архангельская область (АО) и Ненецкий автономный округ (НАО) характеризуются разнообразием природных ландшафтов, с различным геологическим строением и климатическими особенностями, что совместно с широким распространением можжевельника обыкновенного позволяет использовать эти территории в качестве региона проведения исследований. На основе справочных данных произведен выбор районов отбора, расположенных в различных природно-климатических зонах АО и НАО (рис. 1).

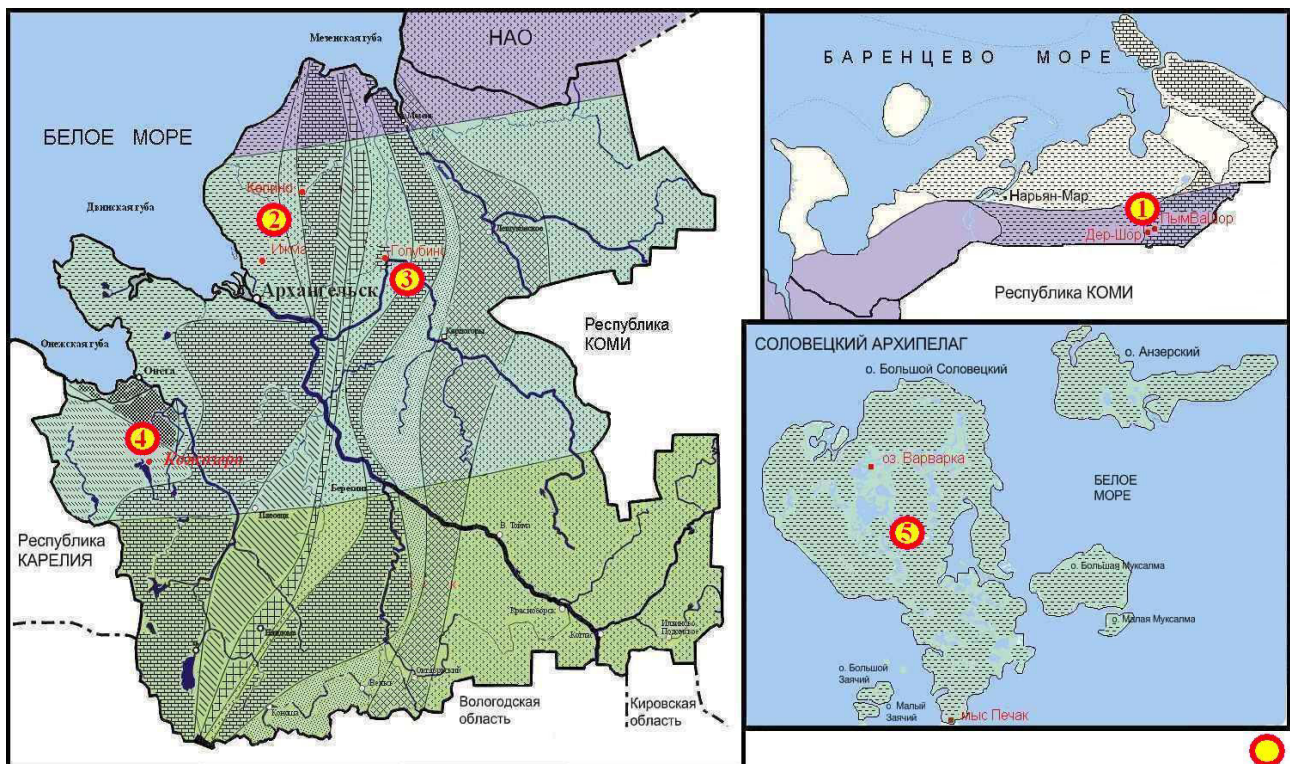


Рис. 1 – Участки отбора проб древесины можжевельника: 1 – НАО; 2 – Приморский район, АО; 3 – Пинежский район, АО; 4 – Онежский район, АО; 5 – Соловецкий район, АО.

Первый район отбора проб расположен в зоне тундры (субарктический пояс, $67^{\circ}10'$ с.ш.), а районы 2-5 в зоне северной тайги (умеренно климатический пояс, $65^{\circ}11'$ - $63^{\circ}16'$ с.ш.). Распределение точек отбора по широте позволяет оценить влияние климата на процесс формирования особенностей компонентного состава древесного вещества. На вышеуказанных участках был произведен отбор представительных образцов древесины и хвои можжевельника. Количество образцов древесины, их возраст и ключевые климатические характеристики районов отбора представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика образцов древесины и районов исследования

Район	1	2	3	4	5
Количество образцов, шт	3	16	4	4	4
Возраст образцов, лет	72-90	17-140	90-115	68-107	59-113
Средняя температура июля, $^{\circ}\text{C}$	12,6	15,6	15,6	12,0	15,9
Число дней в году с устойчивой температурой выше 5°C	100	120	120	140	130
Сумма температур выше 5°C	950	1500	1500	1200	1600

Примечание: Отбор представительных проб древесины произведен согласно ГОСТ 16128-70.

2. Компонентный состав древесины можжевельника

Компонентный состав древесины во многом определяет особенности ее строения и свойства. Однако в литературе имеются лишь незначительные сведения о содержании основных компонентов в древесине можжевельника.

Согласно представленным данным (таблица 2), древесина можжевельника обладает специфическим компонентным составом и по соотношению лигнин-целлюлоза занимает промежуточное положение между хвойными и лиственными породами. Пониженное содержание целлюлозы (в среднем 38-41%), не характерное для хвойных пород, совместно с высоким содержанием лигнина (в среднем 30-32%) может слу-

жить объяснением высокой плотности, гидрофобности и устойчивости древесного вещества можжевельника.

Таблица 2 – Компонентный состав некоторых видов хвойных и лиственных пород древесины

Вид древесины	Содержание, % к а.с.д.			
	лигнин Класона	целлюлоза по методу Кюршнера	вещества экстрагируемые:	
			горячей водой	диэтиловым эфиром / спирто-бензольной смесью
Литературные данные (Никитин Н.И., 1962; Гелес И.С., 2007)				
Ель	27,0 – 29,6	46,1 – 53,1	1,1 – 3,0	0,9 – 1,5 / 2,3 – 2,6
Сосна	27,1 – 36,5	46,6 – 51,9	2,6 – 4,6	4,1 – 4,6 / 5,0 – 7,9
Лиственница	23,1–25,5	39,5–45,8	5,1 – 22,6	0,8 – 1,8 / 2,5 – 3,3
Береза	19,5 – 23,8	31–48,8	1,4 – 3,5	0,9 – 2,4 / 3,3
Дуб	22,5	37,1	7,0	0,5 / –
Можжевельник	21,7; 35,18	48,3	0,22	6,3 / –
Экспериментальные данные				
Можжевельник	28,6 – 34,2	36,4 – 47,0	0,74 – 4,98	(2,20 – 7,70)*

Примечание: экспериментальные данные, определенные по стандартным методикам (Оболенская А.В., 1991); * в качестве органического растворителя использовался этанол.

Древесина можжевельника обыкновенного, произрастающего в Архангельской области, служит субстратом лишь для 2 видов дереворазрушающих грибов, в то время как для сосны и осины характерно 126 и 212 видов соответственно. Возможно, что повышенная биотическая устойчивость можжевельниковых деревьев также связана с высоким содержанием экстрактивных веществ, количество которых в исследуемых образцах достигает 7,7 %.

Стоит отметить, что компонентный состав исследованных образцов древесины варьируется в довольно широком диапазоне. Вероятно, это вызвано различными климатическими условиями произрастания можжевельника (рис. 2). Одним из наиболее значимых климатических параметров для растительных организмов является длительность безморозного периода (количество дней с температурой > 0⁰С). Данный параметр определяет продолжительность периода вегетации, однако для приарктических территорий предпочтительнее использовать другую величину – число дней в году с устойчивой температурой выше 5⁰С.

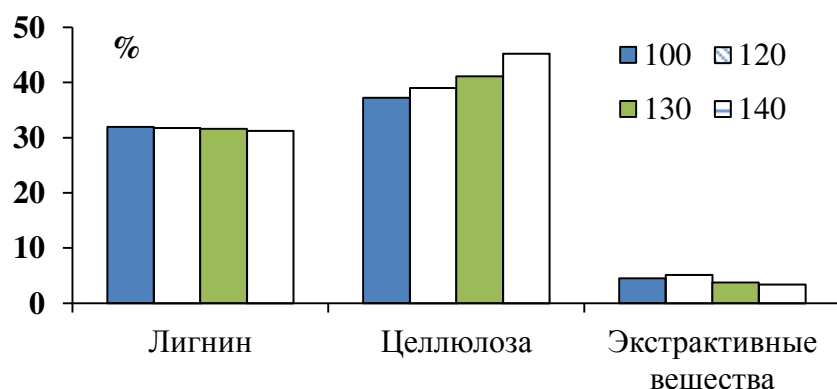


Рис.2 – Зависимость изменения содержания основных компонентов в древесине можжевельника, (% к а.с.д.) от числа дней в году с устойчивой температурой выше 5⁰С.

Примечание: данные получены на образцах древесины можжевельника в возрастном диапазоне 70-90 лет.

Из результатов, приведенных на графике, видно, что содержание целлюлозы в древесине можжевельника увеличивается с ростом количества безморозных дней в регионе и достигает максимума в более «мягких» климатических условиях зоны северной тай-

ги. Объяснением этому может служить большая продолжительность вегетационного периода и интенсификация процесса биосинтеза целлюлозы. Для лигнинной составляющей и экстрактивных веществ подобной зависимости не наблюдается. Вероятно, содержание этих компонентов, служащих защитным барьером растительного организма, определяется другими факторами. Анализ данных, представленных на рисунке 3 (а,б), позволяет сделать вывод о том, что содержание этих компонентов, выполняющих защитные функции в растительных организмах, определяется продолжительностью процессов биосинтеза.

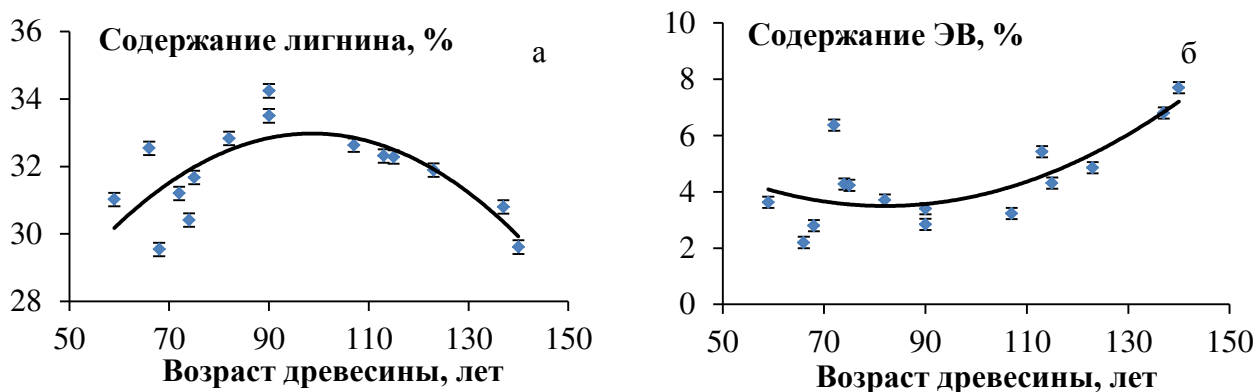


Рис. 3 – Возрастная изменчивость содержания лигнина (а) и экстрактивных веществ (б) в древесине можжевельника обыкновенного.

В процессе роста и развития можжевельниковых деревьев в условиях Европейского Севера идет активный процесс лигнификации древесного вещества, что подтверждается ростом содержания лигнинных компонентов, максимальное количество которых наблюдается в возрасте 90-110 лет (рис. 3а). Далее наблюдается снижение концентрации лигнина, одновременно с этим происходит рост количества экстрактивных веществ в древесине можжевельника. Вероятно, в возрасте 90-110 лет происходит нарушение окислительно-восстановительного баланса. Оксикоричные кислоты, образующиеся в этот период, вступают преимущественно в окислительные процессы, что вызывает снижение интенсивности образования трех оксикоричных спиртов, и, напротив, рост количества образующихся экстрактивных веществ, таких как флавоноиды и стильбены.

Таким образом, экспериментально показано, что древесина можжевельника обладает специфичным для хвойных пород химическим составом. Содержание основных компонентов древесины варьируется в широком диапазоне. Для углеводной составляющей древесного вещества определяющим фактором является температурный режим региона, в то время как содержание лигнинных веществ определяется возрастом древесины.

3. Механизм пероксидазного катализа биосинтеза лигнина

Формирование лигноуглеводной композиции древесного вещества можжевельника обусловлено особенностями биосинтеза индивидуальных компонентов клеточной стенки и ходом лигнификации. По современным представлениям процесс биосинтеза лигнина протекает по свободно радикальному механизму путем присоединения отдельных феноксильных радикалов к растущему полимеру. Важно отметить, что в биохимических реакциях участвуют монолигнолы, различающиеся редокс-состоянием. Значительная роль в процессе образования феноксильных радикалов и инициации лигнификации отводится растительным пероксидазам. Учитывая вышесказанное, процесс биосинтеза лигнина может быть представлен в виде следующей

общей схемы, составленной нами на основе литературных данных (Рогожин В.В., 2004):

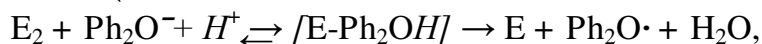
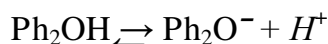
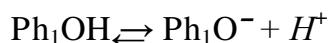
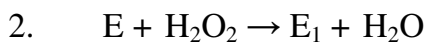
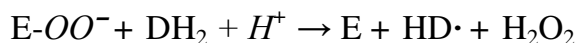
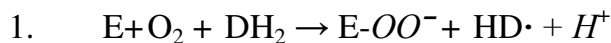
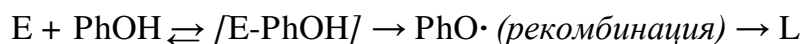


схема 1

где E – несвязанная форма фермента; O_2 , H_2O_2 – субстраты-окислители; DH_2 – субстрат-восстановитель; $E\text{-OO}^-$ – фермент-субстратный комплекс; $\text{HD}\cdot$ – радикал; E_1 , E_2 – промежуточные полу-окисленные формы фермента; Ph_1OH – быстро и Ph_2OH – медленно окисляемый субстрат-восстановитель (монолигнол); Ph_1O^- , Ph_2O^- – фенолят-анионы; $\text{Ph}_1\text{O}\cdot$, $\text{Ph}_2\text{O}\cdot$ – феноксильные радикалы; $[E\text{-PhOH}]$ – промежуточный фермент-субстратный комплекс; L – макромолекула лигнина.

На начальном этапе биосинтеза лигнина в ходе реакций оксидазного окисления субстратов происходит образование пероксида водорода. Данный процесс является пусковым механизмом для последующего протекания пероксидазного цикла реакций фермента. Очевидно, что лимитирующим фактором для лигнификации древесного вещества является интенсивность образования активных фермент-субстратных комплексов E_1 . Этот процесс напрямую зависит от концентрации образующегося пероксида. Скорость второй стадии зависит от химической природы окисляемых лигнинных соединений, их функционального состава и молекулярной массы.

Процесс образования феноксильных радикалов из неионизированных фенольных структур проходит через стадию образования фенолят-анионов. Количественной мерой данного процесса служит константа кислотной ионизации K_a . Чем выше значение K_a для субстрата-восстановителя (монолигнола), тем выше его реакционная способность в кислото-основных взаимодействиях. Как следствие, образуется большее количество фенолят-анионов данного типа, вступающих в дальнейшие окислительно-восстановительные взаимодействия. Критерием, характеризующим реакционную способность в процессе окисления фенолят анионов до феноксильных радикалов, является окислительно-восстановительный потенциал (ОВП). Именно величина ОВП окисляемых субстратов характеризует их редокс состояние и может определять функциональную природу конечных лигнинных структур.

Согласно предложенной схеме активность растительных пероксидаз служит регулятором процессов биосинтеза и функционализации лигнина. Как следствие, динамика пероксидазной активности должна коррелировать с полученными экспериментальными данными о компонентном составе древесины (рис. 3а), а также должна отразиться на функциональной природе и физико-химических свойствах малоизмененных препаратов лигнина.

4. Активность пероксидазы как маркер процесса биосинтеза лигнина

В растениях пероксидазы представлены генетически разнородными белками с одинаковой активностью (Рогожин В.В., 2004). Этот факт позволяет использовать ак-

тивность пероксидазы хвои можжевельника как общий параметр активности всех изоформ растительных пероксидаз и провести оценку влияния данного параметра на ход процесса лигнификации.

Активность пероксидазы (АПО) хвои определяли при 25 °С по скорости окисления гваякола пероксидом водорода в среде калий-фосфатного буфера (рН 7.0) при длине волны 417 нм на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu). Полученные данные представлены на рисунке 4.

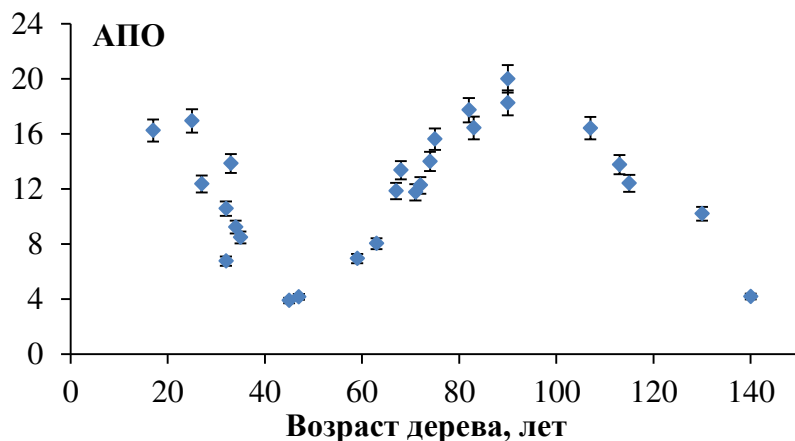


Рис. 4 – Возрастная изменчивость средних значений пероксидазной активности хвои можжевельника.

В растениях на ранних стадиях роста процессы биосинтеза наиболее интенсифицированы, а следовательно, для них характерен повышенный уровень активности ферментативных комплексов, вовлеченных в процесс формирования древесного биоконструкта. С увеличением возраста дерева процесс лигнификации в нем замедляется, что косвенно подтверждается снижением значений параметра активности пероксидазы, промежуточный минимум которых наблюдается в возрасте 45-50 лет. Этот возраст характеризуется как середина жизненного цикла большинства можжевельниковых деревьев, произрастающих в этом регионе (Приморский район (АО), рис. 1). Возможно, что в этот период содержание хинонных форм полифенолов, служащих катализаторами биологических процессов, достигает некоторого критического значения, вследствие чего происходит рост пероксидазной активности. Максимальные значения АПО наблюдаются в возрасте 90 лет и соответствуют наибольшему содержанию лигнина в древесине можжевельника (рис. 3а.), что подтверждает значимую роль растительных пероксидаз в процессе лигнификации древесного вещества (схема 1).

Итак, зависимости изменения параметра АПО и содержания лигнина от продолжительности биосинтеза имеют схожий характер, что позволяет использовать АПО в качестве маркера биохимических процессов лигнификации и функционализации лигнина. Для оценки возможности его использования в качестве диагностического признака качественных (структурных) изменений в лигнине необходимо провести анализ малоизмененных препаратов лигнина, выделенных из разновозрастной древесины можжевельника.

5. Изучение процесса функционализации лигнина можжевельника

Для изучения функциональной природы и физико-химических свойств лигнина можжевельника, а также динамики изменения этих характеристик в процессе роста и развития древесины было выделено и проанализировано 16 малоизмененных препаратов лигнина можжевельника из разновозрастных образцов древесины. Выделение представительных образцов лигнина проводили по методу Пеппера, выход препаратов диоксанлигнина (ДЛ) составил 25-35% от лигнина Класона.

Функциональный состав выделенных препаратов ДЛ можжевельника (ДЛМ) определен по стандартным методикам (Закис Г.Ф., 1975), молекулярно-массовые характеристики – методом ВЭЖХ, элементный состав – методом сжигания на элементном анализаторе Euro EA 3000 (конфигурация [CNHS]) (таблица 3, рис. 5). Полученные данные усреднены по 20-летним возрастным диапазонам, начиная с 50 до 150 лет. Выделение ДЛ из более ранней древесины не проводилось из-за малой биомассы образцов.

Таблица 3 – Характеристика препаратов ДЛМ

Возрастной диапазон, лет	OCH ₃ , %	C, %	H, %	O, %	Эмпирическая формула фенолпропановой единицы (ФПЕ)	P:G:S*	M _w , а.е.м	M _w /M _n
50-70	17,2	64,4	6,0	29,6	C ₉ H _{10,13} O _{2,43} (OCH ₃) _{1,04}	17:61:22	7600	2,5
70-90	16,4	62,3	6,4	31,3	C ₉ H _{11,31} O _{2,77} (OCH ₃) _{1,02}	20:59:21	7800	2,7
90-110	16,7	62,4	5,9	31,7	C ₉ H _{10,25} O _{2,80} (OCH ₃) _{1,04}	17:61:22	7750	2,7
110-130	16,9	62,6	6,0	31,4	C ₉ H _{10,46} O _{2,73} (OCH ₃) _{1,05}	17:61:22	7900	2,7
130-150	17,4	61,1	5,4	33,5	C ₉ H _{9,59} O _{3,04} (OCH ₃) _{1,11}	13:64:23	9100	2,4

Примечание: * соотношение *n*-кумаровых, гваяцильных и сирингильных единиц лигнина.

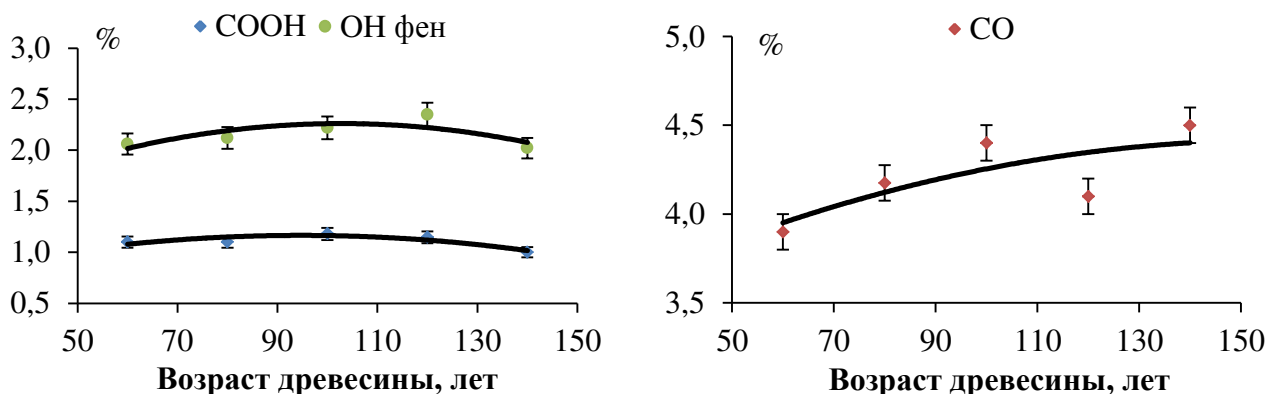


Рис. 5 – Изменение функциональной природы ДЛМ с возрастом.

Полученные значения молекулярных масс и полидисперсность препаратов лигнина можжевельника соответствуют ДЛ хвойных. Причем максимальные значения среднемассовых молекулярных масс M_w характерны для лигнинов, выделенных из возрастной древесины, что свидетельствует об усилении процессов конденсации лигнина с возрастом.

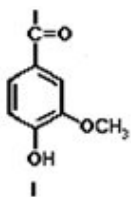
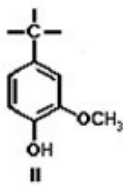
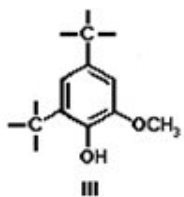
Анализ функциональной природы выделенных препаратов ДЛ выявил повышенное содержание метоксильных групп, вероятно, вызванное присутствием сирингильных структур. Наличие последних подтверждено методом ИК-спектроскопии, так установлено, что полоса поглощения 1510 см^{-1} является суперпозицией двух полос 1514 и 1502 см^{-1} , относящихся к колебаниям ароматических колец (G) и (S) типов. Соотношение интенсивностей полос поглощения G/S составляет примерно 2,8. Согласно данным элементного анализа препаратов ДЛМ и рассчитанным на его основе эмпирическим формулам ФПЕ, количество S-структур достигает максимума в возрасте 130-150 лет. Динамика изменения содержания гидроксильных и карбонильных функциональных групп в ДЛМ с возрастом имеет схожий характер и, также как содержание лигнина, характеризуется перегибом в области 90 – 110 лет (рис.5). В целом функциональный состав лигнинов не претерпевает значительных количественных изменений при увеличении возраста.

Методами ИК-спектроскопии, элементного и химического анализа установлено, что ДЛМ относится к композиционно неоднородным биополимерам, состоящим из мономерных единиц гваяцильного, сирингильного и *n*-кумарового типа в соотношении 61:22:17.

Фенольные гидроксильные группы являются активными реакционными центрами в макромолекулах лигнина. Их диссоциация в значительной мере определяет реакционную способность природного полимера в кислотно-основных и окислительно-восстановительных взаимодействиях. Мерой кислотно-основных свойств является константа диссоциации. Определение pK_a препаратов ДЛМ проводили методом спектрофотометрического титрования (Косяков Д.С., 2007).

Регрессионный анализ кривой спектрофотометрического титрования – зависимости оптической плотности от pH раствора, позволяет дифференцированно определить величины pK_a трех основных типов фенольных структур лигнина (таблица 4).

Таблица 4 – Значения pK_a основных типов фенольных структур ДЛМ из разновозрастной древесины

Возрастной диапазон, лет	pK_{a1}		pK_{a2}		pK_{a3}	
50-70	8,08	I	10,04	II	11,90	III
70-90	7,69		10,08		11,71	
90-110	9,13		10,69		11,91	
110-130	8,67		10,59		11,78	
130-150	7,32		9,72		11,66	

Согласно полученным данным, структуры I типа имеют минимальные значения pK_a в водной среде 7,32 – 9,13, что вызвано наличием сопряженной с бензольным кольцом карбонильной группы. Однако, согласно фотометрическим данным, полученным $\Delta\varepsilon$ -методом, их содержание в выделенных препаратах ДЛМ незначительно и не превышает 8% от общего числа структур со свободным фенольным гидроксильным. Основная часть фенольных гидроксильных групп ДЛМ содержится в структурах II типа (до 55%), pK_a которых изменяется в пределах 9,72 – 10,69. К структурам III типа, имеющим наибольшее значение pK_a 11,66 – 11,91, относятся структуры с несопряженной α -карбонильной группой и с С-С связью в пятом положении, характерной для конденсированных структур лигнина.

Полученные данные свидетельствуют о значимом изменении величин pK_a структур I и II типа в образцах ДЛМ, выделенных из разновозрастной древесины. Вероятно, это обусловлено изменением функциональной природы и молекулярно-массовых характеристик препаратов лигнина в процессе биосинтеза древесного вещества. При этом значения pK_a структур III типа практически не изменяются. Таким образом, основной вклад в изменение значений константы кислотной ионизации ДЛМ вносят структуры I и II типа. Однако, учитывая данные об их количественном содержании в выделенных препаратах лигнина, можно сказать, что именно структуры II типа будут играть определяющую роль в формировании особенностей строения и физико-химических свойств лигнина.

Максимальные значения pK_{a2} характерны для лигнинов, выделенных из древесины можжевельника в возрасте 90 – 110 лет, следовательно, в данный период времени лигнин можжевельника характеризуется наименьшим значением K_a (примерно в 10 раз ниже, чем в возрасте 130-150 лет) и минимальной способностью к образованию фенолят-анионов, что частично объясняет замедление процессов биосинтеза лигнина (рис. 3а).

Эффективный потенциал лигнина (φ_{02}^*), как основной физико-химический параметр редокс состояния полимера, является интегральным показателем реакционной способности в окислительно-восстановительных взаимодействиях и зависит от его функциональной природы и макромолекулярных свойств. Эффективный потенциал препаратов ДЛМ определяли методом косвенной оксидметрии (Боголицын К.Г., 2010), для расчета значений использовали уравнение:

$$\varphi_{02}^* = \varphi^{\text{нач}} - \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{03}^{\text{нач}}}{C_{\Sigma} - C_{03}^{\text{нач}}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{C_{03}^{\text{равн}}}{C_{\Sigma} - C_{03}^{\text{равн}}} + \frac{RT}{2F} \ln \frac{2C_{\text{ArO}^-}^{\text{нач}} - 4C_{03}^{\text{нач}} + 4C_{03}^{\text{равн}}}{C_{03}^{\text{нач}} - C_{03}^{\text{равн}}} + \frac{2,303RT}{2F} \text{pH},$$

где φ_{02}^* – эффективный потенциал органической окислительно-восстановительной системы (ОВС), В; $\varphi^{\text{нач}}$ – стандартный (начальный) потенциал органической ОВС, В; R – универсальная газовая постоянная $8,314 \cdot 10^3$ Дж/(К·моль); T – абсолютная температура, К; F – число Фарадея, 96487 Кл/моль; $C_{03}^{\text{нач}}$ – начальная аналитическая концентрация феррицианида, моль/л; $C_{03}^{\text{равн}}$ – равновесная аналитическая концентрация окисленной формы, моль/л; C_{Σ} – суммарная концентрация форм ОВС, $C_{\Sigma} = C_{03}^{\text{нач}} + C_{04}^{\text{нач}} = C_{03}^{\text{равн}} + C_{04}^{\text{равн}}$; $C_{\text{ArO}^-}^{\text{нач}}$ – начальная концентрация фенольных гидроксильных групп лигнина, моль/л.

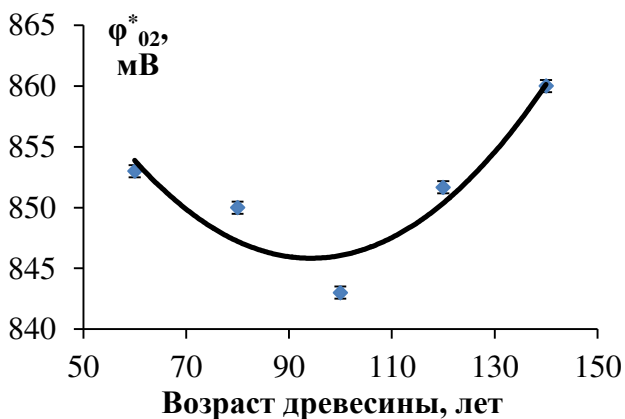


Рис. 6 – Изменение эффективного потенциала лигнина с возрастом дерева.

Все изученные препараты лигнина обладают весьма высоким окислительным потенциалом 842-860 мВ, что соответствует лигнинам хвойных пород. Кроме того, прослеживается некоторая зависимость ОВП от молекулярной массы образца, так для высокомолекулярных образцов, выделенных из древесины можжевельника в возрасте 130-150 лет, характерны максимальные значения потенциала (рис. 6).

Эффективный окислительный потенциал зависит от логарифма отношения

концентраций $\lg(C_{\text{ox}}/C_{\text{red}})$, что позволяет судить об изменении относительного содержания фенольных (C_{red}) и хинонных (C_{ox}) форм лигнина. Так, высокие значения ОВП лигнинов в 50-летней древесине свидетельствуют о промежуточном максимуме относительного содержания хинонных форм, что косвенно подтверждает их роль – активаторов пероксидазы. Рост активности пероксидазы (рис. 4) интенсифицирует биосинтез лигнина. Этот процесс сопровождается снижением относительного содержания хинонных структур и приводит к уменьшению значений эффективного потенциала, минимум значений которого наблюдается в возрасте 90-110 лет и соответствует максимальному содержанию лигнина.

Таким образом, изменение содержание лигнина в процессе роста можжевельных деревьев действительно связано с нарушением окислительно-восстановительного баланса, регулятором которого служит фермент пероксидаза. Снижение концентрации лигнина по достижении возраста 90-100 лет объясняется преобладанием окислительных и дегидрогенизационных процессов с образованием хинонных форм и повышением термодинамической неравновесности в древесной матрице можжевельника и также подтверждается динамикой ферментативной активности.

6. Ультрамикростроение и надмолекулярная структура древесной матрицы

Функциональная природа и физико-химические свойства лигнина определяют конформационные особенности макромолекул, их связь с углеводами и распределе-

ние полимера в клеточной стенке в процессах биосинтеза и формирования древесного вещества. Для изучения ультрамикростроения и надмолекулярной структуры можжевельника нами были проведены микроскопические исследования с применением современного высокоточного оборудования.

В данном разделе представлены новые экспериментальные данные об особенностях строения и структуры древесного вещества можжевельника. Снимки древесины получены на сканирующем электронном микроскопе SEM Sigma VP ZEISS и атомно-силовом микроскопе АСМ Multimod 8 Bruker. По результатам проведенных микроскопических исследований сделаны следующие основные выводы.

Наряду с первичной (P) и вторичной (S) оболочками, для клеточной стенки древесины можжевельника характерно наличие третичной оболочки – бородавчатого слоя (W), несвойственного для древесины хвойных пород (рис. 7). Наличие бородавчатого слоя может служить объяснением присутствия в лигнине можжевельника синрингильных структур в количестве до 23%.

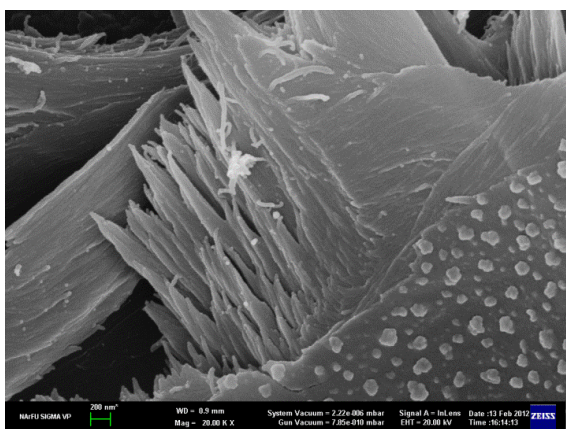


Рис. 7 – Расположение слоев клеточной стенки древесины можжевельника и ориентация в них целлюлозных микрофибрилл.

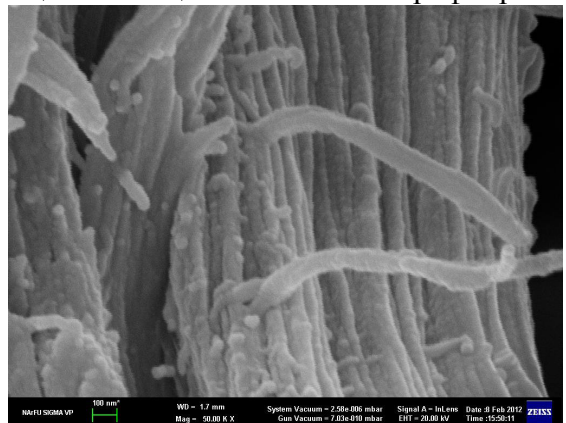


Рис. 9 – Микрофибриллы целлюлозы на сколе слоя S2 клеточной стенки древесины можжевельника.

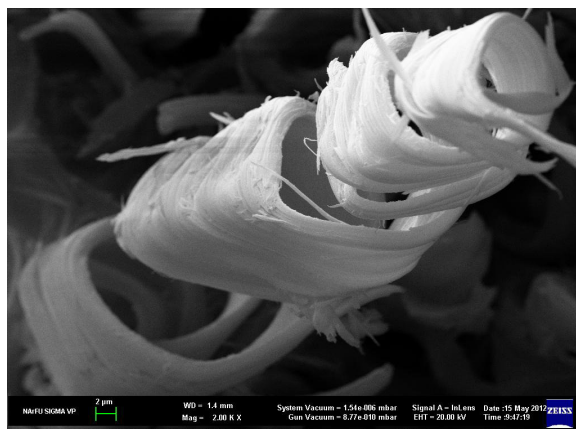


Рис. 8 – Спиральная структура клеточной стенки трахеиды.

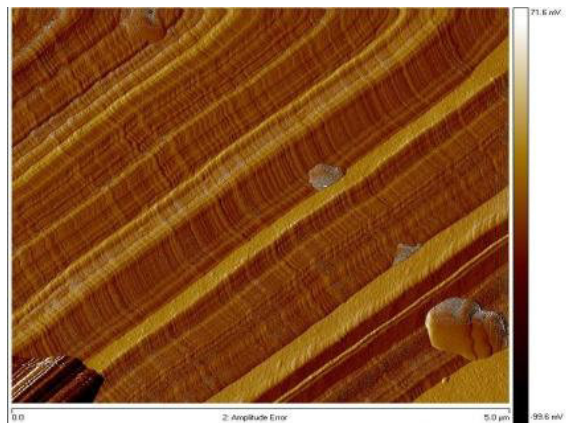
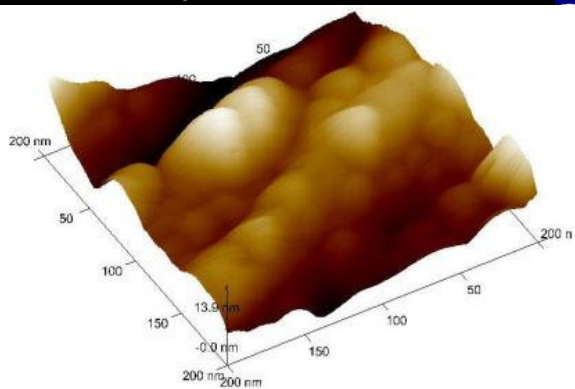
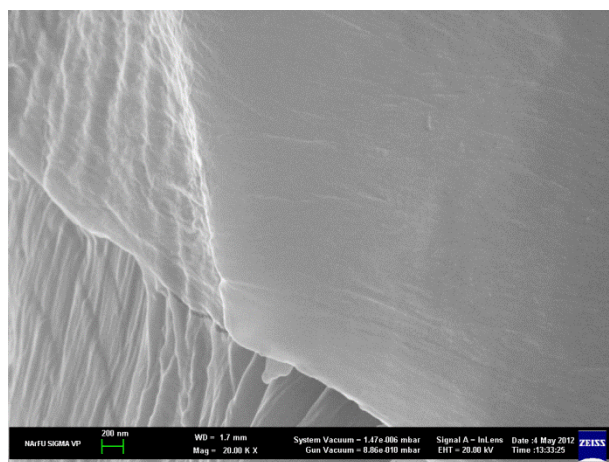
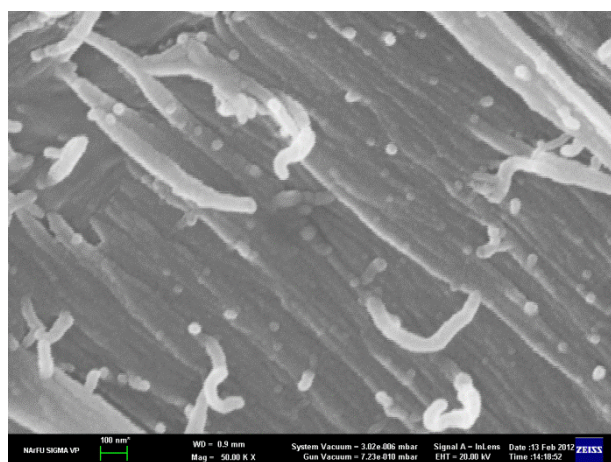


Рис. 10 – Поверхность слоя S1 клеточной стенки на радиальном сколе образца древесины можжевельника после обработки водой.

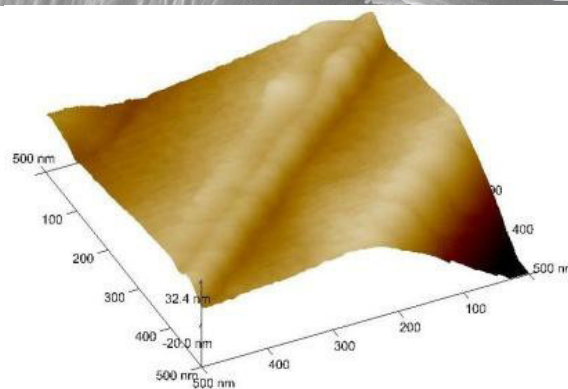
Методом SEM с применением предварительной криомеханической обработки получены снимки, подтверждающие разнонаправленную спиральную ориентацию микрофибрилл целлюлозы в различных слоях вторичной оболочки. Подобное расположение способствует большей механической устойчивости клеточной стенки (рис. 8). Для этого исследуемые образцы древесины (надсеченные по периметру) охлаждались в жидком азоте, после чего производился скол. Для повышения контрастности

снимков на поверхность исследуемых образцов наносилось золото-палладиевое покрытие.

Различное строение слоев связано с особенностями формирования микрофибрилл целлюлозы и их компоновкой. Анализ (рис. 10) позволяет сделать вывод о том, что формирование кристаллов слоя S1 возможно лишь при наслаивании отдельных молекул целлюлозы на одно основание, причем каждая последующая молекула должна повторять «дефекты» предыдущих. Рост микрофибрилл S2, напротив, осуществляется вдоль, а не поперек. Можно предположить, что одна молекула фермента, катализирующая синтез целлюлозы из глюкозы, обеспечивает удлинение сразу нескольких макромолекул целлюлозы, о чем свидетельствуют изгибы, переплетения и раздвоения микрофибрилл (рис. 9). Также для микрофибрилл целлюлозы характерен большой диапазон размеров, например, их диаметр в слое S2 может колебаться от 20 до 300 нм и более.



до обработки водой



после обработки водой

Рис. 11 – Поверхность слоя S1 на радиальном сколе образца древесины можжевельника.

Первичная оболочка клеточной стенки можжевельника (рис. 11) состоит из отдельных разнонаправленных целлюлозных волокон толщиной до 50 нм, помещенных в твердый раствор гемицеллюлоз в лигнине. Последний представляет собой частицы глобулярной формы (диаметр 5 – 60 нм), растворимые в водных растворах щелочей, диоксана и других растворителях. Лигнин в таком твердом растворе по своей функциональной природе и полимолекулярным свойствам отличается от лигнина, находящегося в жесткой композиции сеток.

Полученные экспериментальные данные согласуются с основными положениями физико-химической модели формирования лигноуглеводной матрицы (Боголицын К.Г., 2004, 2010).

В целом, результаты проведенных исследований подтверждают значимую роль растительных пероксидаз в процессах биосинтеза, функционализации и формирования физико-химических свойств лигнина, что определяет его распределение в клеточной стенке, связь с полисахаридами матрикса, а также особенности ультрамикростроения и надмолекулярной структуры древесного вещества

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. С использованием методов сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии получены новые экспериментальные данные по ультрамикростроению и надмолекулярной структуре древесной матрицы хвойных, подтверждающие возможность рассмотрения древесного вещества как нанокompозита, основой которого служат целлюлозные нанопибрилы (20 – 50 нм) и лигноуглеводные образования глобулярной формы (диаметр 5 – 60 нм).

2. Лигнификация древесины происходит как ферментативный радикальный окислительно-восстановительный процесс, характеризующийся изменением соотношения *n*-кумаровых: гваяцильных: сирингильных (17:61:22) структур лигнина, а также функциональной природы, реакционной способности ($pK_{a2} = 9.72 - 10.69$; $\varphi_{02}^* = 842 - 860$ мВ) и молекулярно-массовых характеристик лигнина можжевельника.

3. Показана значительная роль растительных пероксидаз в процессах биосинтеза и формирования структуры лигнина.

4. Получены новые данные по компонентному составу древесины можжевельника обыкновенного (*Juniperus Communis* L.) арктических и приарктических территорий Европейского Севера России. Установлено, что климатические факторы, в первую очередь, определяют ход биосинтеза углеводной составляющей древесного вещества можжевельника, что выражается в повышенном содержании целлюлозы. Для лигнинной составляющей древесины можжевельника определяющим фактором является продолжительность биосинтеза.

6. Предложена усовершенствованная методика исследования строения лигноуглеводной матрицы древесины методом сканирующей электронной микроскопии, включающая стадию криомеханической пробоподготовки. Проведена доработка и адаптация методики определения параметра активности пероксидазы в растительном сырье.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях

1. **Зубов И.Н.** Влияние абиотических факторов на формирование лигноуглеводной матрицы древесины можжевельника [Текст] / И.Н. Зубов, С.С. Хвиюзов, М.А. Лобанова, М.А. Гусакова, К.Г. Боголицын // Известия вузов. Лесной журнал. – 2012. – №1. – С. 113–120.

2. Боголицын К.Г. Ультрамикростроение и надмолекулярная структура древесной матрицы [Текст] / К.Г. Боголицын, Д.Г. Чухчин, **И.Н. Зубов**, М.А. Гусакова // Химия растительного сырья. – 2012. – №3. – С. 37–44.

3. Bogolitsyn K. Ultramicroscopic composition and supramolecular structure of wood matrix [Text] / K. Bogolitsyn, D. Chuhchin, **I. Zubov**, M. Gusakova // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2013. – Vol. – 39. – №7. – P. 671–676.

4. Боголицын К.Г. Можжевельник обыкновенный как объект для изучения биогеохимических аспектов формирования древесного вещества [Текст] / К.Г. Боголицын, М.А. Гусакова, С.С. Хвиюзов, **И.Н. Зубов** // Физикохимия расти-

тельных полимеров: материалы IV Междунар. конф. / под. ред. д-ра хим. наук, проф К.Г. Боголицына. – Архангельск. – 2011. – С. 28–31.

5. Хвиюзов С.С. Исследование лигнина можжевельника *Juniperus* [Текст] / С.С. Хвиюзов, К.Г. Боголицын, М.А. Гусакова, **И.Н. Zubov** // Физикохимия растительных полимеров: материалы IV Междунар. конф. / под. ред. д-ра хим. наук, проф К.Г. Боголицына. – Архангельск. – 2011. – С. 135–136.

6. **Zubov И.Н.** Активность пероксидазы хвои можжевельника различных природно-климатических зон [Текст] / И.Н. Zubov, К.Г. Боголицын, М.А. Гусакова, С.С. Хвиюзов, М.А. Лобанова // Физикохимия растительных полимеров: материалы IV Междунар. конф. / под. ред. д-ра хим. наук, проф К.Г. Боголицына. – Архангельск. – 2011. – С. 118–121.

7. Хвиюзов С.С. Физико-химические свойства лигнина можжевельника *Juniperus* [Текст] / С.С. Хвиюзов, **И.Н. Zubov**, М.А. Лобанова, М.А. Гусакова, К.Г. Боголицын // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы 5 Всероссийской конференции с международным участием. – Барнаул. – 2012. – С. 92-93.

8. Bogolitsyn K.G. Biochemical aspects of formation of the lignin-carbohydrate matrix of coniferous wood: case study of Juniper [Text] / K.G. Bogolitsyn, M.A. Gusakova, **I.N. Zubov**, M.A. Lobanova, S.S. Hviuzov // Proceedings 12th European workshop on lignocellulosics and pulp EWLP – Espoo, Finland. – 2012. – P. 362–365.

9. Боголицын К.Г. Морфология древесной матрицы можжевельника [Текст] / К.Г. Боголицын, **И.Н. Zubov**, М.А. Гусакова, Д.Г. Чухчин, С.С. Хвиюзов, А.А. Красикова // Физикохимия растительных полимеров: материалы V Междунар. конф. / под. ред. д-ра хим. наук, проф К.Г. Боголицына. – Архангельск. – 2013. – С. 74-77.

10. **Zubov И.Н.** Химический состав древесины хвойных экологически «чистых» территорий Европейского севера России [Текст] / И.Н. Zubov, С.С. Хвиюзов, М.А. Гусакова, К.Г. Боголицын // IV Международная молодежная конференция «Экология-2011», материалы докладов. – Архангельск. – 2011. – 312 с.

11. **Zubov И.Н.** Сравнительная характеристика химического состава древесины можжевельника гетеротермальных зон [Текст] / И.Н. Zubov, К.Г. Боголицын, М.А. Гусакова, С.С. Хвиюзов, М.А. Лобанова // Материалы всероссийской конференции с международным участием «Экология и геологические изменения в окружающей среде северных регионов» посвященная памяти чл.-корр. РАН Ф.Н. Юдахина. – Архангельск. – 2012. – С. 97–100.

Автор диссертации выражает глубокую благодарность: коллективу лаборатории **Химии растительных биополимеров ИЭПС УрО РАН** за поддержку и помощь в проводимых исследованиях; коллективу ЦКП НО «Арктика» и особенно **Чухчину Д.Г.** за проведение целого ряда исследований и помощь в интерпретации полученных результатов; коллективу лаборатории **Комплексного анализа наземной и космической информации для экологических целей ИЭПС УрО РАН**, а также **Сурсо М.В.** за помощь в проведении дендрологических исследований.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах с заверенными гербовой печатью подписями просим направлять по адресу: 163002. Россия, г. Архангельск, набережная Северной Двины, д. 17, САФУ, диссертационный совет Д 212.008.02.