

RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte
Polimēru materiālu tehnoloģijas katedra

Sarmīte Janceva

Doktora studiju programmas “Ķīmijas tehnoloģija” doktorante

**NO LATVIJAS LAPKOKU MIZAS
IEGŪTU DABAS POLIFENOLU
UN PROANTOCIANIDĪNU IZPĒTE
UN MODIFIKĀCIJA VIDEI DRAUDZĪGU
FUNKCIONĀLU PRODUKTU
UN MATERIĀLU IEGŪŠANAI**

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji:

Dr. habil. chem.

TATJANA DIŽBITE

Dr. sc. ing.

MĀRCIS DZENIS

RTU Izdevniecība

Rīga 2017

Janceva S. No Latvijas lapkoku mizas iegūtu dabas polifenolu un proantociānīdīnu izpēte un modifikācija videi draudzīgu funkcionālu produktu un materiālu iegūšanai.

Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU Izdevniecība, 2017. – 40 lpp.

Iespiests saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-02” 2017. gada 29. jūnija lēmumu, protokols Nr. 169.22.



Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūtā laikā no 2010. līdz 2017. gadam saistībā ar šādām valsts pētījumu programmām (VPP) un Eiropas Reģionālās attīstības fonda (ERAF) projektiem:

- valsts pētījumu programma Nr. 2010.10-4/VPP-5: “Vietējo resursu (zemes dziļū, meža, pārtikas un transporta) ilgtspējīga izmantošana – jauni produkti un tehnoloģijas (NatRes)” (2010.–2013. g.);
- VPP-5 projekta Nr. 2 „Jaunu produktu un inovatīvas meža apsaimniekošanas, meža koksnes un nekoksnes produktu ražošanas tehnoloģijas, racionāli izmantojot meža resursus un būtiski palielinot produkcijas pievienoto vērtību” 2.4. apakšprojekts „Maztonnāžas produkti ar augstu pievienoto vērtību no koksnes ar biorafinērijas tehnoloģijām, materiāli ar uzlabotām ilgizturības īpašībām” (2010.–2013. g.);
- ERAF projekts: „Dažādas izcelsmes atjaunojamo kurināmo maisījumu jauna veida granulētu produktu izveidošana ekoloģiski tīru un efektīvu degšanas un siltuma ražošanas procesu nodrošināšanai ar būtiski uzlabotu šo procesu tehnoloģiju” (2010.–2013. g.);
- *Wood WisdomNet-2 research program* „Pinobio, Pinosylvins as novel Bioactive Agents for Food Applications” (2011.–2014. g.);
- valsts pētījumu programma „Meža un zemes dziļū resursu izpēte, ilgtspējīga izmantošana – jauni produkti un tehnoloģijas” (*ResProd*). Projekts Nr. 3 „Biomateriāli un bioprodukti no meža resursiem ar daudzpusīgu pielietojumu” (2014.–2017. g.).

**PROMOCIJAS DARBS
IZVIRZĪTS INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ**

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2017. gada 13. septembrī plkst. 15 Rīgas Tehniskajā universitātē, Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3/7, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI:

Dr. sc. ing. Juris MĀLERS, RTU;

Dr. sc. ing. Edgars BUKŠĀNS, LLU, Latvija;

Dr. chem. Bruno ANDERSONS, LV KĶI, Latvija.

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājusi šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Sarmīte Janceva

Datums:

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, tajā ir ievads, literatūras apskats, eksperimentālā daļa, rezultātu izvērtējums, secinājumi, seši pielikumi, literatūras saraksts, kas ietver 298 literatūras avotus, 104 attēli, 26 tabulas, kopā 171 lappuses.

PATEICĪBA

Izsaku visdziļāko pateicību saviem zinātniskā darba vadītājiem *Dr. habil. chem.* Tatjanai Dižbitei un *Dr. sc. ing.* Mārcim Dzenim par darba vadīšanu, neaizstājamo atbalstu darba izstrādes laikā, savlaicīgu palīdzību visos darba etapos un zinātnisko publikāciju sagatavošanā.

Īpašs paldies manam darba devējam – lignīna laboratorijas vadītājai *Dr. habil. chem.* Gaļinai Teliševai par atbalstu, vērtīgiem padomiem un efektīvu darba koordinēšanu.

Lielu pateicību izsaku visiem institūta un laboratorijas kolēģiem, kas mani praktiski atbalstīja promocijas darba izstrādāšanas laikā, par noderīgajiem padomiem eksperimentālajā darbā, par konsultācijām, palīdzot izprast rezultātus, morālo atbalstu un sapratni, kas ļāva strādāt ļoti labvēlīgā, draudzīgā un radošā gaisotnē.

Esmu pateicīga KĶI kolēģiem Mārtiņam Andžam un Ramunam Taupčauskim, kā arī LLU MEKA institūta direktora vietniekam zinātniskajā darbā *Dr. sc. ing.* Uldim Spullem un Laimonim Kūliņam par sadarbību un palīdzību saistvielās testēšanā kokskaidu plātnes un saplākšņu ražošanā.

Sevišķi liels paldies profesorei Elektrai Popandouplas (Grieķija, *Chimar Hellas*) par sadarbību un palīdzību adhezīvu izmantošanas efektivitātes novērtēšanā.

Esmu pateicīga arī profesoriem Dmitrijam Jeftjuģenam (Portugāle, Aveiro) un Andrejam Pronovičam (Somija, Turku, Abo Akadēmija) par atbalstu un palīdzību iegūto savienojumu struktūru identificēšanā un to raksturošanā, kā arī par morālo atbalstu stažēšanās laikā.

Sirsniņgs paldies manai ģimenei un draugiem par neizsmeļamo pacietību, rūpēm, saprotošo attieksmi un lielo atbalstu.

SATURS

Darba vispārīgs raksturojums.....	7
1. Literatūras apskata kopsavilkums	10
2. Eksperimentālā daļa	12
3. Darba rezultāti un to izvērtējums	14
3.1. Lapkoku mizas potenciāla novērtējums PACE un PAC iegūšanai	14
3.2. Lapkoku mizas novērtējums bioloģiski aktīvo savienojumu iegūšanai, izmantojot secīgu ekstrakciju	15
3.3. Optimālo PACE un PAC izdalīšanas režīmu noteikšana	18
3.4. PACE un PAC iegūšanas tehnoloģiskā shēma.....	21
3.5. PACE rūpnieciskās ražošanas iespējas novērtējums.....	24
3.6. No alkšņu mizas izdalīto proantocianidīnu raksturojums	25
3.7. PACE un PAC antioksidatīvā aktivitāte.....	28
3.8. PAC un PACE ietekme uz produktu oksidēšanās procesu.....	29
3.9. PACE un PAC bioloģiskā aktivitāte bioloģiskajās sistēmā	30
3.10. PACE izmantošanas perspektīvas poliēteru poliolu sintēzē.....	30
3.11. PACE izmantošana adhezīvu iegūšanai	31
3.12. Lapkoku mizas atlikuma izmantošana	33
3.13. Koku mizas biorafinērijas klasteris	34
Secinājumi.....	36
Publikāciju saraksts	37
Izmantotā literatūra	39

SAĪSINĀJUMI

ABTS ⁺	2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes katjona radikālis
AF	aizsardzības faktors
a. s.	absolūti sauss
ASS	augstākais sadedzes siltums
BA	baltalksnis
BL	blīgzna
CHIMAR	inovatīvs pētniecības un attīstības uzņēmums Grieķijā
DFPH [·]	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikālis
EtOH	etanols
FTIS	Furjē transformācijas infrasarkanā spektroskopija
GC	gāzes hromatogrāfija (angļu val. <i>gas chromatography</i>)
GSE	gallusskābes ekvivalents
IP	indukcijas periods
KĶI	Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūts
KMR	kodolmagnētiskā rezonanse
MA	melnalksnis
MEKA	meža un koksnes produktu pētniecības un attīstības institūts
MS	masspektrometrija
MV	mikroviļņi
ORAC	skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes metode (angļu val. <i>oxygen radical absorbance capacity</i>)
OS	osis
PAC	proantociānīdīns
PACE	proantociānīdīnus saturoša ekstraktviela
RTU	Rīgas Tehniskā universitāte
TBHQ	terc-butilhidrohinons
TE	troloksa ekvivalents
ZSS	zemākais sadedzes siltums

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

Saistībā ar pieaugošo pieprasījumu pēc atjaunojamiem resursiem, ierobežojot fosilo izejvielu izmantošanu, pasaulē pieaug pētījumu skaits par atjaunojamo resursu izmantošanu inovatīvo un vērtīgo produktu iegūšanā. Pilnvērtīga izejmateriālu izmantošana – “biorafinērija” – ir viens no meža resursu ilgtspējīgās izmantošanas nosacījumiem, tāpēc nepieciešams izvērtēt koksnes pārstrādes blakusproduktu – mizas racionālās un efektīvās izmantošanas iespējas. Tieši lapkoku mizas biorafinērijas produktu tirgus pašlaik ir vāji attīstīts, sniedzot mums dažādas pētniecības iespējas bioproduktu ražošanā no kokaugu mehāniskās pārstrādes atkritumiem, tostarp mizas, kuras apjoms ir apmēram 15 % no kokzāģēšanas blakusproduktiem. Pašlaik miza no Latvijā augošiem lapu kokiem tiek izmantota kā atjaunojamais enerģijas avots, neizmantojot tās potenciālu kā augstvērtīgu produktu ieguves avotu. Pateicoties mizas unikālajam ķīmiskajam sastāvam, no mizas var iegūt dažādus produktus ar pievienoto vērtību, t. sk. individuālus savienojumus vai savienojumu grupas ar sinerģisku bioloģisko aktivitāti, kā arī izejvielas dažādu materiālu ražošanai. Koku mizā ir koncentrēti dažādi bioloģiski aktīvi polifenola savienojumi, tostarp proantociānīdīni. Dabas oligomērie proantociānīdīni (PAC) pēdējos gados ir intensīvu fundamentālo un lietišķo pētījumu objekts, kas saistīts ar makromolekulu unikālo uzbūvi un to funkcionalitāti, kas nodrošina proantociānīdīnu plašu izmantošanu dažādās nozarēs – farmācijā, pārtikas rūpniecībā, kompozītmateriālu ražošanā u. c.

Neskatoties uz lielo pētījumu skaitu, kas veltīti zem molekulāro augu polifenolu antioksidatīvo īpašību izpētei, interese par drošiem un dabīgiem antioksidantiem turpina augt, izskaidrojot to ar pieaugošām prasībām pēc dažādu ekoloģiski drošu produktu piedevām, kas ļautu uzlabot lipīdus saturošo produktu patērētājam vēlamās īpašības un kompozītmateriālu termooksidēšanās stabilitāti.

Proantociānīdīnus saturošas ekstraktvielas (PACE) ir vienas no potenciālākajām izejvielām videi draudzīgu saistvielu iegūšanā kā alternatīva fenolformaldehīda (FF) sveķiem, kas ļautu ne tikai aizvietot fenolu vai rezorcīnolu, bet arī samazināt formaldehīda emisiju no gatava kompozītmateriāla. Neskatoties uz lielo pētījumu skaitu, kas veltīti videi draudzīgu saistvielu iegūšanai, to rezultāti nav pilnīgi izvērtēti. Pētījumi par PACE izmantošanu, kas iegūti no Latvijā augošu lapkoku mizām draudzīgo saistvielu iegūšanai, nav veikti. Saistvielas uz PACE bāzes varētu aizstāt toksiskos FF sveķus, pateicoties PACE zemei cenai un ekoloģiskajiem apsvērumiem.

Darbā veiktie pētījumi ir vērsti uz tālāku zinātniskās bāzes paplašināšanu mizas biorafinērijai, lai izstrādātu elastīgu tehnoloģisko shēmu, kas ļautu kombinēt tās klasterus atkarībā no reģionālajiem apstākļiem (vajadzība pēc noteikta produkta, izejvielu bāzes klātbūtne, izejvielu un produktu piegādes loģistika utt.) vietējos tirgos.

Darba mērķis

Promocijas darba mērķis ir novērtēt plaši izplatīto Latvijā augošu lapkoku mizas potenciālu kā proantocianidīnu avotu, noteikt optimālos proantocianidīnu saturošo ekstraktvielu (PACE) un to sastāvā esošo proantocianidīnu (PAC) izdalīšanas režīmus, raksturot PACE ķīmisko sastāvu, PAC struktūru un īpašības, kā arī izpētīt PACE un PAC izmantošanas iespējas ekoloģiski pilnvērtīgu dabas produktu iegūšanai biorafinērijas kontekstā.

Darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi

- novērtēt Latvijā augošu lapkoku – baltalkšņa, melnalkšņa, oša un blīgznas – mizas potenciālu kā augstvērtīgu izejvielu avotu mizas biorafinērijas kontekstā;
- noteikt optimālos proantocianidīnu ekstraktvielu (PACE) un to sastāvā esošo proantocianidīnu (PAC) izdalīšanas režīmus, veicot vienpakāpes ekstrakciju, piedāvāt šo procesu tehnoloģiskos risinājumus;
- noteikt no lapkoku mizas izdalīto PACE un PAC ķīmisko sastāvu un struktūru;
- izpētīt PACE un PAC antioksidatīvo aktivitāti, novērtēt to efektivitāti dažādās ķīmiskās un bioloģiskās sistēmās un izvērtēt to praktiskās izmantošanas iespējas ekoloģiski drošu produktu ražošanā;
- pētīt izdalīto PACE izmantošanas iespējas videi draudzīgu adhezīvu iegūšanā, novērtēt iegūto adhezīvu izmantošanas efektivitāti kokskaidu plātņu un saplākšņu ražošanā;
- izvērtēt tālākās lignocelulozes atlikuma izmantošanas iespējas.

Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

- Latvijā augošu lapkoku miza ir bagāta ar polifenoliem un ir piemērota izejviela proantocianidīnu saturošu ekstraktvielu (PACE) un proantocianidīnu (PAC) iegūšanai.
- Noteiktie optimālie ekstrakcijas režīmi nodrošina 87 % PAC pāreju no mizas ekstraktvielā.
- PACE viena cikla ekstrakcija, ņemot vērā produktu iznākumu un elektroenerģijas patēriņu, ir ekonomiski izdevīgāka, salīdzinot ar trīs ciklu ekstrakciju.
- PAC un PACE ar to funkcionālo sastāvu un augsto antioksidatīvo aktivitāti ir alternatīvi ekoloģiski pilnvērtīgi dabas produkti sintētiskiem antioksidantiem.
- PACE ir piemērota izejviela zemas viskozitātes poliēteru – poliolu un videi draudzīgu adhezīvu iegūšanai.
- Lapkoku mizu pēc ekstrakcijas iespējams izmantot kā izejvielu nanopildvielas iegūšanai, skujkoksnes celulozes papīra mehānisko stiprību palielināšanai vai kā cieto biokurināmo tās palielinātās siltumspējas dēļ.

Darba zinātniskā novitāte

- Pirmoreiz pētīta Latvijā augošo baltalkšņu, melnalkšņu, ošu un blīgzņas miza kā potenciāla izejviela augstvērtīgu produktu – proantocianidīnu saturošo ekstraktvielu (PACE) un proantocianidīnu (PAC) – iegūšanai.
- Noteikts no baltalkšņa un melnalkšņa mizas izdalīto proantocianidīnu ķīmiskais sastāvs un struktūra.
- Pierādīta PACE un PAC antioksidatīvā aktivitāte, to potenciālā izmantošana pārtikas rūpniecībā, kosmētikā, medicīnā, polimēru kompozītmateriālu ražošanā, aizstājot sintētiskos savienojumus ar dabasvielām.
- Parādīta iespēja daļēji aizvietot naftas izcelsmes fenolus fenola-formaldehīda sveķu sintēzē ar baltalkšņa mizas PAC saturošo ekstraktvielu saplākšņu izgatavošanai, palielinot saplākšņu mehānisko stiprību un samazinot formaldehīda emisiju.
- Pamatota izstrādātā PAC ekstraktvielas iegūšanas un konversijas, kā arī lignocelulozes atlikuma izmantošanas jauna klastera iekļaušanas lietderība lapkoku mizas biorafinērijas shēmā.

Darba praktiskā nozīmība

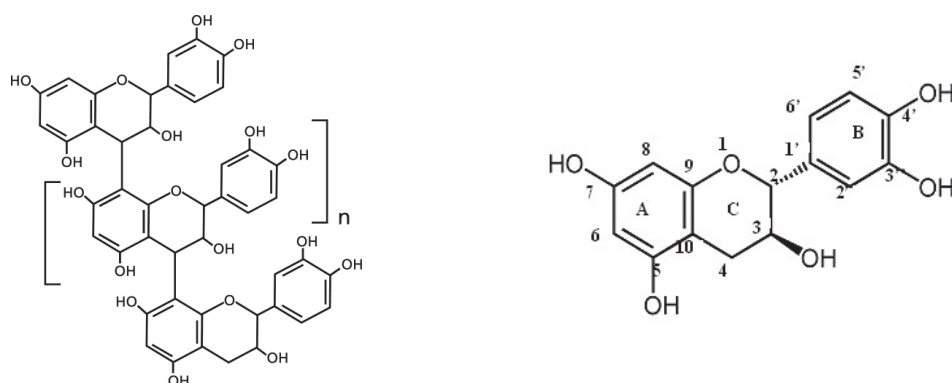
- Parādīta iespēja no Latvijā izplatītāko lapu koku mizas iegūt PAC saturošus produktus, kas dos būtisku ieguldījumu bioekonomikas attīstīšanā, kas aktuāla Latvijas tautsaimniecībai un atbilst Eiropas Savienības stratēģiskajiem uzdevumiem.
- Noteikti vienpakāpes ekstrakcijas optimālie parametri un dotas tehnoloģiskās rekomendācijas PAC saturošas ekstraktvielas izdalīšanai no lapkoku mizas un tās tālākai konversijai proantocianidīnos.
- Izmantotie secīgas ekstrakcijas režīmi paplašina izdalīto dabasvielu spektru un nodrošina maksimālo proantocianidīnu izdalīšanas efektivitāti, tomēr tās izmantošana no ekonomiskā viedokļa ir neizdevīga, salīdzinot ar vienas stadijas ekstrakciju.
- Pierādīts, ka PAC saturošas ekstraktvielas un PAC ir potenciāli antioksidanti pārtikas produktiem, kosmētiskajiem līdzekļiem, kompozītmateriāliem, radot alternatīvu sintētiskiem, ekoloģiski nedrošiem antioksidantiem.
- PAC ietekme uz piruvāta līmeņa pazemināšanos asins plazmā parāda šo bioloģiski aktīvo savienojumu perspektivitāti veselības aprūpē.
- Piedāvāti jauni, videi draudzīgi PACE adhezīvi koksnes kompozītmateriālu ražošanai ar samazinātu formaldehīda emisiju.
- Parādīta iespēja izmantot lapkoku mizu pēc PAC ekstrakcijas kā cieto biokurināmo ar augstāku siltumspēju, salīdzinot ar izejas mizu, un kā izejvielu nanocelulozes iegūšanai, uzlabojot skuju koksnes celulozes papīra mehāniskās īpašības.

Darba aprobācija

Promocijas darba rezultāti ir apspriesti un atspoguļoti 13 zinātniskajās publikācijās un 16 recenzētās zinātnisko konferenču tēzēs. Ir iegūts viens Latvijas Republikas patents. Autora publikāciju saraksts publicēts darba beigās.

1. LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS

Proantocianidīni ir lielmolekulāri savienojumi ar polifenolu struktūru, kurus var uzskatīt par flavan-3-ola monomēra (+) – katehīna un/vai (–) epikatehīna kondensācijas produktiem. Proantocianidīni ir bieži sastopami dažādos augu izcelsmes produktos ar hidroksilgrupu izkārtojumu 3', 4' B gredzenā, kā arī maisījumā kopā ar prodelfinīdiem un citiem proantocianidīnu pārstāvjiem. Atkarībā no proantocianidīnu izcelsmes avota, lielāko daļu proantocianidīnu veido 4–10 flavanolu vienības. Proantocianidīna un tā monomēra – katehīna – ķīmiskā struktūrformula dota 1. attēlā.



1. attēls. Proantocianidīna un tā monomēra – katehīna – ķīmiskā struktūrformula.

Proantocianidīnu un citu polifenolu uzkrāšanās mizā ir augu evolūcijas rezultāts. Proantocianidīni ir aktīvi metabolīti šūnu metabolismā, un tiem ir liela loma augu dzīves dažādos fizioloģiskos procesos. Šie savienojumi ir nepieciešami augiem, nodrošinot to aizsardzību pret mikrobu uzbrukumu, patogēniem, mehāniskiem bojājumiem un infekcijas slimībām, paaugstinot koku izturību pret pūšanu un sadrupšanu [1, 2]. Proantocianidīnu un citu polifenolu klātbūtne nodrošina augiem krāsu, aromātu un garšu, aizsargājot tos no zālēdājiem, padarot augus tiem nepatīkamus pēc garšas. Proantocianidīnu uzkrājums un to lokalizācijas vieta ir atkarīga no ģenētiskajiem faktoriem, klimatiskajiem un ekoloģiskajiem apstākļiem.

No medicīniskā viedokļa proantocianidīni u. c. līdzīgi polifenoli ir spēcīgi antioksidanti, kas aizsargā cilvēka organismu no brīvo radikāļu ietekmes, kas izraisa visdažādākās patoloģijas un slimības (piemēram, išēmiju, astmu, artrītu, iekaisumu vai pat epilepsiju). Proantocianidīniem tāpat piemīt bioloģiskā aktivitāte, piemēram, pretiekaisuma, pretvēža, pretsēnīšu un antibakteriālās, kā arī imunomodulējošā aktivitāte [3]. Proantocianidīniem, pateicoties lielam OH grupu skaitam, piemīt izteikta spēja veidot kompleksus – helātus jeb sāļus ar proteīniem, alkaloīdiem, smagiem metāliem un izvadīt tos no organisma vai veicināt to bioloģisko aktivitāti [4, 5]. Galvenā proantocianidīnu atšķirība no citiem polifenoliem ir tā, ka tie sastāda galveno daļu no cilvēka patērētajiem bioflavanoīdiem. Ne mazāk svarīga proantocianidīnu bioloģiskās aktivitātes un antioksidanto īpašību izmantošanas joma ir profilaktisko, higiēnisko, veterināro medikamentu iegūšana [6, 7].

Viena no komerciālajām proantocianidīnus saturošām ekstraktvielām, ko izmanto medicīnā, ir *Pycnogenol*®. Preparāts ir ekstraktviela, ko iegūst no piejūras priedes mizas, kas satur 70–75 % proantocianidīnu [8]. Vairāk nekā 40 gadu tika veikti pētījumi, lai pārliecinātos par *Pycnogenol*® drošību, efektivitāti un kvalitāti. Šo gadu laikā ir publicēts vairāk nekā 370 zinātnisko rakstu, kas apstiprināja *Pycnogenol*® toksicitātes neesamību. Šodien *Pycnogenol*® ekstraktviela ir pieejama vairāk nekā 700 uztura bagātinātājos, vitamīnos, kosmētikā un citos veselības produktos visā pasaulē [9]. Preparāts ir spēcīgs dabīgais antioksidants. Klīniskie pētījumi liecina, ka *Pycnogenol*® paplašina arteriālos asinsvadus, samazina glikozes līmeni asinīs, uzlabo asinsriti, stiprina imūno sistēmu un neitralizē brīvo radikāļu postošo iedarbību uz organisma šūnām. *Pycnogenol*® var uzlabot nieru funkciju pacientiem ar metabolītisko sindromu [10, 11].

Šodien pasaulē komerciāli tiek ražoti proantocianidīnu produkti ar augstu proantocianidīna saturu no ozola, eikalipta un Austrālijas akācijas mizām. Piemēram, no tonnas sausas akācijas mizas var iegūt apmēram 180 kg ekstrakta ar augstu PAC saturu (70–80 % uz a. s. ekstraktvielu). Proantocianidīni tāpat ir koku un krūmu koksne, saknēs un lapās, bet, salīdzinot ar mizu, mazākās koncentrācijās.

Uz proantocianidīnu spēju veidot kompleksus ar proteīniem, tai skaitā ar asins olbaltumvielām, ir pamatota proantocianidīnu medicīniskā lietošana, piemēram, kā savelkošie un baktericīdie līdzekļi mutes dobuma, smaganu, elpošanas ceļu un citu iekaisumu, kā arī apdegumu ārstēšanai un vietējās asiņošanas apturēšanai. Ārstējot apdegumus, proantocianidīnu šķīdums nogulsne proteīnus, veidojot aizsargplēvīti uz apdeguma vietas (brūces) un aizsargājot to no infekcijas [12, 13]. Pateicoties proantocianidīnu antioksidantīvām īpašībām, rūgtai garšai un mijiedarbībai ar proteīniem, proantocianidīnus saturošas ekstraktvielas izmanto vīna garšas uzlabošanai, dzidrināšanai un stabilizācijai [14, 15]. Proantocianidīnu spēja veidot nešķīstošus savienojumus ar alkaloīdu sāļiem un smagiem metāliem nomāc perorālo saindēšanos ar morfīnu, kokaīnu, atropīnu, nikotīnu, svina sāļiem, varu, kobaltu, radionuklīdiem un citām kaitīgām vielām. Proantocianidīni ar reducēšanas īpašībām ir piemēroti kā adsorbenti ūdens attīrīšanai no smagiem metāliem (svins, kadmijs un varš), kā arī vērtīgo metālu iegūšanai. Proantocianidīni hidrogēlu veidā ir patentēti kā metālisko elementu adsorbenti, kas spēj adsorbēt aktinīdus, piemēram, urānu, toriju vai tādus metālus kā kobalts, svins, hroms, dzīvsudrabs utt. [16, 17].

Pateicoties polifenola antioksidantām īpašībām, proantocianidīni piedevu veidā tiek izmantoti kā metāla korozijas inhibitori (piemēram, *Docker Nitron*). Kompozīcija uz proantocianidīnu bāzes nodrošina pretkorozijas aizsardzību, mijiedarbojoties ar rūsu un pārveidojot dzelzs oksīdus par korozijas neaktīviem savienojumiem, praktiski samazinot korozijas ātrumu līdz nullei [18, 19]. Par vienu no daudzsološākajām jomām proantocianidīnu saturošo ekstraktvielu rūpnieciskajai lietošanai tiek uzskatīta videi draudzīgu adhezīvu izgatavošana galvenokārt koksnes kompozītmateriālu iegūšanai.

Pamatojoties uz proantocianidīnu makromolekulu unikālo uzbūvi un to funkcionalitāti, kas nodrošina proantocianidīnu plašas izmantošanas iespējas dažādās nozarēs, lapkoku mizu kā kokapstrādes atlikumu racionāli būtu izmantot proantocianidīnu vai to saturošo ekstraktvielu iegūšanai.

2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Promocijas darba pētījumu objekts ir Latvijā augošo lapkoku – baltalkšņa (*Alnus incana*), oša (*Fraxinus excelsior*), blīgznas (*Salix caprea*) un melnalkšņa (*Alnus glutinosa*) – miza, lai iegūtu augstvērtīgus dabas produktus – proantocianidīnus saturošas ekstraktvielas (PACE) – un no tiem izdalītus proantocianidīnus (PAC) kā alternatīvu sintētiskiem produktiem. Sadarbībā ar institūtu “Silava” mizas paraugi ievākti Ogres novadā, Ogresgala mežos 197. un 198. kvartālā.

Promocijas darba struktūra ir pakārtota iepriekš minētajiem darba uzdevumiem. Darbs ir strukturēts četrās nodaļās. Pirmajā nodaļā ir novērtēts Latvijā augošo lapkoku mizas potenciāls kā augstvērtīgu produktu (PACE un individuālo savienojumu – PAC) ieguves avots. Otrajā nodaļā ir noteikti optimālie PACE un PAC izdalīšanas režīmi. Trešajā nodaļā veikts izdalīto no lapkoku mizas PACE un PAC ķīmiskais raksturojums un izvērtētas šo produktu praktiskās izmantošanas iespējas. Ceturtajā nodaļā atbilstoši mizas biorafinērijas koncepcijai ir izvērtētas lapkoku mizas atlikuma jeb tā dēvētā lignocelulozes atlikuma praktiskās izmantošanas iespējas un izstrādāta mizas pilnvērtīgas izmantošanas elastīga tehnoloģiskā shēma.

PACE izdalīšanai tika izmantota lapkoku miza ar mitruma saturu 7 % un daļiņu izmēru no 0,5–2 mm. Miza ar smalkāku daļiņu frakciju (< 0,05 mm) apgrūtināja PACE difūziju no mizas tilpumā, līdz ar to šī frakcija, kas sastāda 18 % no kopējā mizas daudzuma, tika atdalīta un atbilstoši biorafinērijas koncepcijai izmantota citu produktu iegūšanai.

Lai noteiktu optimālos PACE izdalīšanas režīmus, kā mainīgie parametri tika ņemti: ekstrahents, hidromodulis, ekstrakcijas temperatūra un laiks, ekstrahēšanas ciklu skaits.

Lapkoku mizas secīgas ekstrakcijas nepieciešamība ir atkarīga no koku sugas, reģionālajām vajadzībām pēc bioloģiski aktīviem savienojumiem, piemēram, triterpenoīdiem un zemmolekulāriem polifenoliem, kā arī no produkta mērķuzdevuma. Lapkoku mizas secīga ekstrakcija tika veikta ar šķīdinātājiem pēc to polaritātes pieaugošā secībā, sākot ar heksānu, etilacetātu un beidzot ar 40 % EtOH.

Lai novērtētu lapkoku mizas potenciālu PACE un individuālo savienojumu – proantocianidīnu – iegūšanai, iegūtām ekstraktvielām tika noteikti galvenie komponenti, ķīmiskais sastāvs un struktūra, izmantojot Folin-Čikolto, Portera, Vanilīna, GC un UHPLC-ESI-MS/MS analīzes un iekārtas.

Proantocianidīnu izdalīšana tika veikta no ekstraktvielām ar paaugstinātu šo savienojumu saturu. Proantocianidīnu raksturošanai tika izmantotas šādas analīzes: FTIS, GC, ¹³C-KMR un TOF-MS.

PAC un PACE antioksidatīvās aktivitātes raksturošana tika veikta, izmantojot DFPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazilradikālis), ABTS⁺ (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonskābes katjona radikālis) un skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitātes (*oxygen radical absorbance capacity* – ORAC) testus. PACE un PAC radikāļu dezaktivēšanas aktivitāte ABTS⁺ un DFPH[•] testos izteikta kā IK₅₀ vērtība, kas parāda, kāda ir nepieciešamā antioksidanta koncentrācija, lai sasniegtu 50 % brīvo radikāļu inhibēšanu. Savukārt ORAC

testā proantocianidīnu antioksidatīvā aktivitāte ir izteikta $\text{mmol TE}^{\bullet} \text{g}^{-1}$, kas parāda superoksīda anjonradikāļa $\text{O}_2^{\bullet-}$ koncentrācijas samazināšanos.

Lai novērtētu PAC un PACE ietekmi uz lipīdus saturošo produktu oksidēšanās stabilitāti, izmantota *Oksipress* metode. PAC un PACE antioksidantā aktivitāte lipīdu oksidēšanas testā izteikta kā indukcijas periods (*IP – induction period*), kādā antioksidants spēj aizkavēt substrāta oksidēšanos. Kā references antioksidanti pētījumos izmantots sintētiskais fenols – terc-butilhidrohinons (TBHQ) – un E vitamīna analogs – Troloks.

Lai novērtētu dabisko antioksidantu potenciālu polimēru termooksidēšanas inhibēšanai, tika veikti poliuretānu (PU) plēvju temooksidatīvās destruktijas testi, pievienojot antioksidantu PU priekšpolimerizēšanas stadijā.

Pamatojoties uz PACE komponentu funkcionālo sastāvu, no baltalkšņa mizas iegūtais PACE tika izmantota poliēteru poliolu sintēzei un videi draudzīgo adhezīvu iegūšanai, koksnes materiālu ražošanai. Kokskaidu plātņu un saplākšņu testēšana tika veikta sadarbībā ar *CHIMAR HELLAS*, MEKA un KĶI atbilstošām struktūrvienībām. Līmējuma kvalitāte saplākšņiem tika noteikta saskaņā ar standarta LVS EN 314 (6) punktu 5.1.3. un 5.1.1. prasībām, bet kokskaidu plātnēm – atbilstoši standarta EN312 P2 prasībām.

Formaldehīda emisija saplākšņa paraugiem noteikta, pamatojoties uz standarta JIS A 1460 un EN 717-2:1994 prasībām.

Sekojošā mizas biorafinērijas koncepcijai, uz baltalkšņa mizas piemēra parādīta lignocelulozes atlikuma izmantošanas perspektivitāte. Lignocelulozes atlikuma kā cietā biokurināmā izmantošanas perspektivitātes novērtēšana veikta pēc sadedzes siltuma aprēķiniem, izmantojot elementanalīzes datus. Sadarbībā ar KĶI Celulozes laboratoriju lignocelulozes atlikums testēts kā pildviela papīra mehānisko īpašību uzlabošanai.

3. DARBA REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

Izstrādājot promocijas darbu, galvenā uzmanība ir veltīta bioloģiski aktīvo savienojumu – proantocianidīnus saturošo ekstraktvielu (PACE) – un to sastāvā esošo proantocianidīnu (PAC) iegūšanai, kā izejvielu izmantojot Latvijā augošu lapkoku mizu. Šie pētījumi veikti, pamatojoties uz lapkoku mizas nepietiekamo izpēti vērtīgu produktu iegūšanā.

3.1. Lapkoku mizas potenciāla novērtējums PACE un PAC iegūšanai

Latvijā augošo lapkoku mizas pētījumiem PACE un PAC iegūšanai, kā ekstrahenti tika ņemti etanols un ūdens, pamatojoties uz to selektivitāti attiecībā pret PAC, ķīmisko inertumu, mazo toksiskumu un zemo izmaksu. Lai noteiktu efektīvāko ekstrahentu un to koncentrāciju PACE un PAC iegūšanai, laboratorijas apstākļos tika veikta vienpakāpes ekstrakcija pie rekomendētajiem ekstrakcijas parametriem, izmantojot par pamatu literatūras datus [20–23] un iepriekšējos eksperimentos iegūtos rezultātus [23] kas ietvēra: mizas un ekstrahenta masas attiecību – 1:8 (hidromodulis – 8), ekstrakcijas temperatūru – 80 °C un laiku – 30 min. (1. tabula).

1. tabula

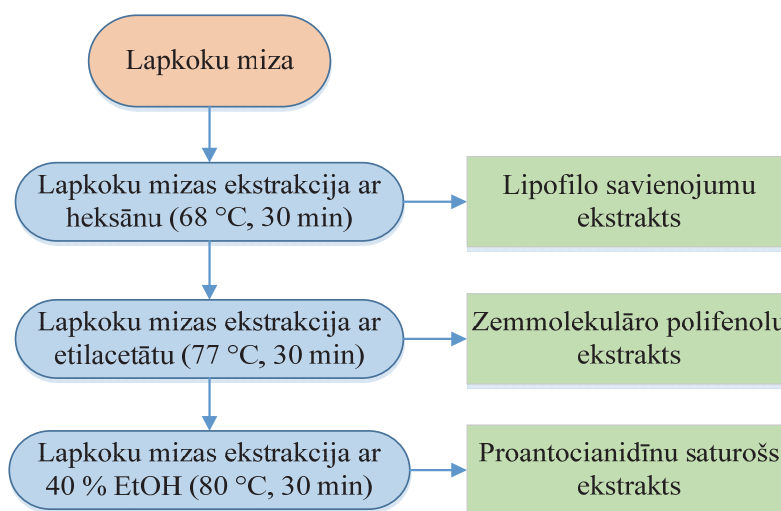
Ekstrahenta koncentrācijas ietekme uz PACE un PAC izdalīšanas efektivitāti
(vienpakāpes ekstrakcija, 30 min., 80 °C, hidromodulis – 8)

Ekstrahents	Baltalkšņa miza	Melnalkšņa miza	Blīgzņas miza	Oša miza
Ekstraktvielas iznākums no mizas, %				
96 % EtOH	10,3	10,2	11,3	8,9
80 % EtOH	11,1	10,7	14,1	11,4
60 % EtOH	12,9	13,6	15,4	15,4
40 % EtOH	15,3	14,7	15,8	16,2
20 % EtOH	13,5	13,8	13,6	16,4
H ₂ O	12,6	11,7	11,2	14,8
PAC saturs ekstraktvielā/PAC iznākums no mizas, %				
96 % EtOH	15,9/1,6	15,4/1,6	9,2/1,0	< 0,01/< 0,01
80 % EtOH	17,4/1,9	17,1/1,8	11,4/1,6	< 0,01/< 0,01
60 % EtOH	18,5/2,4	18,2/2,5	13,7/2,1	< 0,01/< 0,01
40 % EtOH	21,9/3,4	21,6/3,2	14,1/2,2	< 0,01/< 0,01
20 % EtOH	20,7/2,8	21,2/2,9	12,6/1,7	< 0,01/< 0,01
H ₂ O	17,4/2,2	16,8/2,0	9,8/1,1	< 0,01/< 0,01

Iegūtie rezultāti parāda, ka 40 % EtOH (w/w) nodrošina augstāko ekstraktvielas un PAC iznākumu no lapkoku mizas. Neskatoties uz oša mizas augsto ekstraktvielas iznākumu, veicot kvantitatīvo proantocianidīnu analīzi, tika konstatēts, ka šī ekstraktviela nesatur proantocianidīnus kā mērķa produktus.

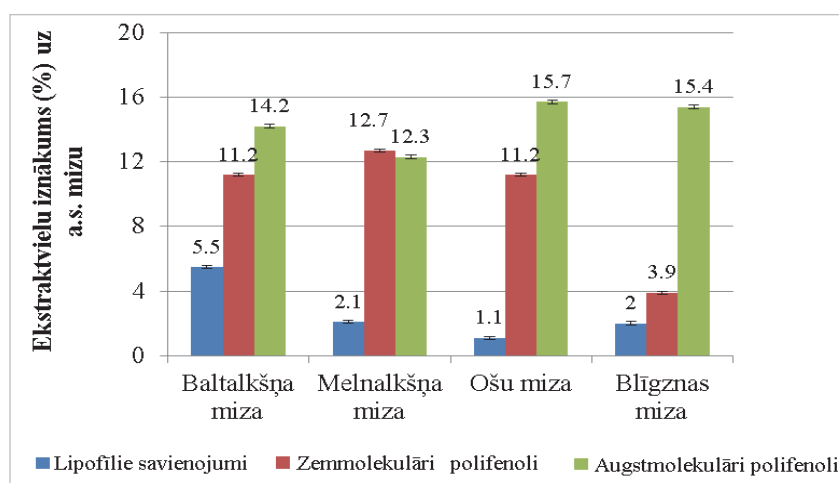
3.2. Lapkoku mizas novērtējums bioloģiski aktīvo savienojumu iegūšanai, izmantojot secīgu ekstrakciju

Atkarībā no koku sugas, reģionālajām vajadzībām pēc citiem bioloģiski aktīviem dabas savienojumiem, piemēram, triterpenoīdiem un zemmolekulāriem polifenoliem, kā arī produktu mērķuzdevuma, lapkoku mizas vienpakāpes ekstrakcijas vietā var izmantot secīgo ekstrakciju, iekļaujot heksānu un etilacetātu (pārtikas rūpniecībā atļautie šķīdinātāji) līdz ar 40 % etilspirtu ekstrakcijas sistēmā. Pie šādiem nosacījumiem metodika kļūst perspektīvāka vairāku augstvērtīgu savienojumu iegūšanai, kas apstiprina lapkoku mizu kā augstvērtīgu izejvielu dabas produktu ieguvei. Lapkoku mizas secīgas ekstrakcijas rezultātā tika iegūti trīs ekstrakti: 1 – lipofilo savienojumu ekstrakts, 2 – zemmolekulāro polifenolu ekstrakts un 3 – proantocianidīnu ekstrakts (2. attēls).



2. attēls. Lapkoku mizas secīgas ekstrakcijas blokshēma.

Ekstraktvielu iznākums atsevišķās ekstrakcijas stadijās atkarībā no koku sugas ir dots 3. attēlā.



3. attēls. Ekstraktvielu iznākums no lapkoku mizas atsevišķās ekstrakcijas stadijās.

Lapkoku mizas ekstrakcija ar nepolāro šķīdinātāju parāda, ka oša, melnalkšņa un blīgzņas miza satur tikai 1–2 % lipofilo savienojumu, kas ir ievērojami mazāk, salīdzinot ar baltalkšņa mizu (5,5 %). Hidrofilo ekstraktvielas iznākums veido lielāko daļu no kopējā ekstraktvielu daudzuma, piemēram, baltalkšņa mizā apmēram 82 %, tādēļ lapkoku mizu nevar uzskatīt par potenciālu izejvielu lipofilo savienojumu iegūšanai. Apmēram pusi (42–50 %, izņemot blīgzņas mizu) no hidrofilajām ekstraktvielām veido ar etilacetātu ekstrahējamās vielas, kas norāda, ka lapkoku miza ir vērtīga izejviela vidēji polāru savienojumu, piemēram, diarilheptanoīdu, t. sk. oregonīnu iegūšanai.

Apkopojot iegūtos rezultātus, ir skaidrs, ka alkšņu miza ir piemērotākā izejviela gan zemmolekulāro (oregonīnu), gan lielmolekulāro polifenolu (proantocianidīnu) iegūšanai, savukārt Latvijā augošās blīgzņas miza ir potenciāls zemmolekulāro polifenolu ieguves avots.

Izdalīto ar 40 % EtOH ekstraktvielu iznākums no lapkoku mizām svārstās robežās no 12 līdz 15 % uz a. s. mizu. Lai novērtētu lapkoku mizas potenciālu proantocianidīnu un to saturošo ekstraktvielu iegūšanai, izdalītajām ar 40 % EtOH ekstraktvielām tika veikta ķīmiskā sastāva analīze. 2. tabulā apkopotais hidrofilo ekstraktvielu ķīmiskais sastāvs liecina, ka kopējais polifenolu saturs ekstraktvielās svārstās robežās 16–51 % (0,16–0,51 GSE•g⁻¹). Daļa no polifenoliem ekstraktvielās ir O-glikozīdu veidā, kas sastāv no aglikona un ogļhidrātu atlikuma, kuru galvenokārt veido ksiloze un glikoze. Starp lapkoku mizas ekstraktvielu identificētajiem savienojumiem tika konstatēti tādi polifenoli kā katehīns (proantocianidīna monomērs), epigallokatehīns, katehīna dimērs, trimērs un pat tetramērs, kā arī hirsatunolols, oregonīns, hidroksioregonīns u. c. polifenoli, kā arī to glikozīdi.

2. tabula

Hidrofilo ekstraktvielu ķīmiskā sastāva raksturojums

Lapkoku miza	Oregonīnu saturs etilacetāta ekstraktvielā [29]	Polifenolu saturs 40 % EtOH ekstraktvielā,	Katehīna saturs 40 % EtOH ekstraktvielā	PAC saturs 40 % EtOH ekstraktvielā	Ogļhidrātu saturs 40 % EtOH ekstraktvielā
% , uz a. s. ekstraktvielu					
BL	< 0,01	51,1	35,2	16,6	5,5
BA	72,2	39,2	22,6	24,6	37,1
MA	75,0	46,1	23,6	24,4	25,8
OS	< 0,01	16,1	4,3	< 0,01	52,8

Iegūtie rezultāti parāda, ka, iekļaujot etilacetātu ekstrahēšanas shēmā, papildus no alkšņu mizas var iegūt bioloģiski aktīvu savienojumu – oregonīnu. Neskatoties uz blīgzņas mizas ekstraktvielas augsto polifenolu saturu (51 % uz a. s. ekstraktvielu vai 0,51 GSE•g⁻¹), proantocianidīnu saturs tajā ir neliels – 16,6 % uz a. s. ekstraktvielu. Dominējošais savienojums blīgzņas mizas ekstraktvielas sastāvā ir katehīns. Oša mizas ekstraktvielā neliels polifenolu saturs – 16 % – norāda šīs mizas zemo potenciālu bioloģiski aktīvo savienojumu iegūšanai. Oša mizas hidrofilo ekstraktvielu sastāvā netika konstatēta arī oregonīna un proantocianidīnu klātbūtne. Apkopojot iegūtos rezultātus, no četrām pētītajām lapkoku mizām vispiemērotākās izejvielas PACE un individuālo savienojumu – PAC – iegūšanai ir alkšņu

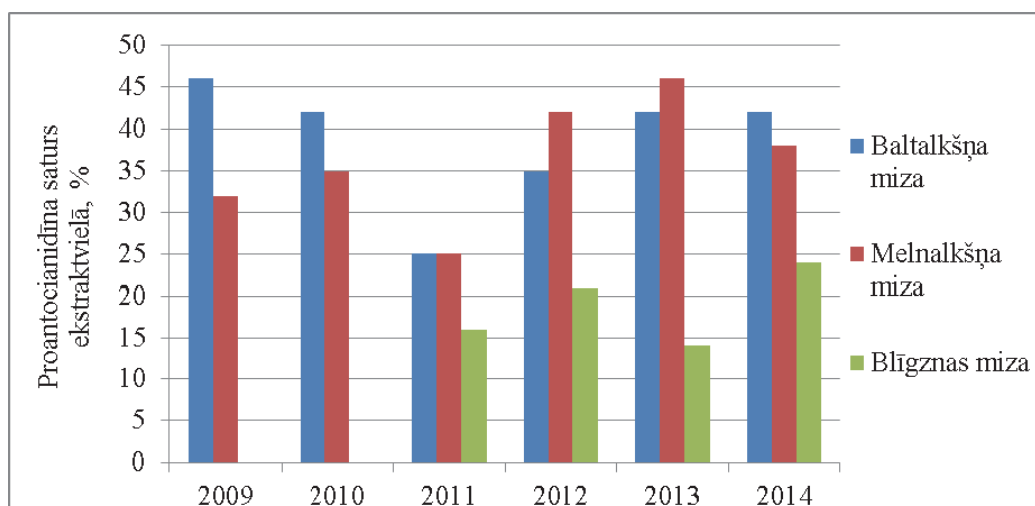
mizas, kas ļauj no 1 kg mizas iegūt 120–140 g ekstraktvielas ar proantocianidīnu saturu 24,4–24,6 %. Veicot secīgo ekstrakciju (heksāns, etilacetāts, 40 % EtOH) ar divu pirmo minēto ekstraktu atdalīšanu, proantocianidīnu saturs ekstraktvielā nedaudz palielinās, salīdzinot ar vienkāpes ekstrakcijā iegūto (3. tabula).

3. tabula

Ekstrakcijas paņēmiena ietekme uz proantocianidīnu saturu ekstraktvielā

Lapkoku miza	Vienkāpes ekstrakcija		Secīga ekstrakcija	
	PACE iznākums no mizas, %	PAC saturs ekstraktvielā, %	PACE iznākums no mizas, %	PAC saturs ekstraktvielā, %
BA	15,3	21,9	14,2	24,6
MA	14,7	21,6	12,3	24,4
BL	15,8	14,1	15,4	16,6
OS	16,2	< 0,01	15,7	< 0,01

Proantocianidīnu saturs mizā ir atkarīgs ne tikai no koku sugas, bet arī no koku augšanas vietas un mizas ievākšanas gada. Ņemot to vērā, visā promocijas darba izstrādes laikā, katru gadu rudenī, tika ievākta lapkoku miza un, veicot secīgu ekstrakciju, noteikts to ekstraktvielu iznākums un proantocianidīnu saturs izdalītajā ekstraktvielā, kas visu sešu gadu laikā svārstījās robežās no 16 līdz 46 %, rēķinot uz a. s. ekstraktvielu. PAC saturs skrīnings lapkoku mizas ekstraktvielās parādīja, ka, sākot no 2012. gada, alkšņu mizas ekstraktvielā PAC saturs bija augstāks, salīdzinot ar 2011. gadu, kas liecina par alkšņu augsto potenciālu kā izejvielai PACE un proantocianidīnu iegūšanai (4. attēls).



4. attēls. Proantocianidīnu saturs lapkoku mizas ekstraktvielās.

Augsts proantocianidīnu saturs ekstraktvielā bija novērojams arī 2009. un 2010. gadā, veicot pētījumus valsts pētījumu saistībā ar programmu "Jauni produkti un inovatīvas meža apsaimniekošanas, meža koksnes un nekoksnes produktu ražošanas tehnoloģijas, racionāli izmantojot meža resursus un būtiski palielinot produkcijas pievienoto vērtību". Ņemot vērā, ka lauksaimniecības zemju teritorijas ir dabiski apmežojušās ar blīgzņu un šī koku suga Ziemeļamerikā ir pazīstama kā augstvērtīga izejviela salicīna iegūšanai, sākot no 2011. gada,

Latvijā liela uzmanība tika pievērsta blīgzņas mizas izpētei. Izmantojot augstas izšķirtspējas UHPLC-ESI-MS/MS masspektrometriju, tika noskaidrots, ka Latvijā augošā blīgzņas miza nav bagāta ar salicīnu, bet gan ar tādiem polifenoliem kā katehīns un katehīna dimērs (procianidīns B2). Katehīna saturs blīgzņas mizas ekstraktvielā svārstās no 35 līdz 40 %, kas pamato augsto kopējo polifenolu saturu (50–60 %) ekstraktvielā.

3.3. Optimālo PACE un PAC izdalīšanas režīmu noteikšana

Efektīvākai PACE un PAC izdalīšanai no mizas atkārtoti tika noteikti optimālie PACE izdalīšanas režīmi, pārbaudīti iepriekšminētie un izmantotie no literatūras avotiem [20–21] iegūtie optimālie PACE ekstrakcijas parametri. PACE un PAC iegūšanas tehnoloģijas izstrādei tika pētīta šādu ekstrakcijas parametru maiņas ietekme uz PACE un PAC izdalīšanas efektivitāti:

1. ekstrahenta koncentrācija;
2. mizas un ekstrahenta masas attiecība – hidromodulis;
3. ekstrakcijas temperatūra;
4. ekstrakcijas laiks.

PACE izdalīšanas efektivitāte tika kontrolēta pēc ekstraktvielas iznākuma un proantocianidīna satura ekstraktvielā. Pamatojoties uz iepriekš veikto proantocianidīnu skrīningu dažādās lapkoku sugu mizās (5. attēls), kā mērķobjekts šim pētījumam tika ņemta baltalkšņa miza kā potenciāli pilnvērtīgākā un pieejamākā izejviela. Savstarpēji salīdzinot vienpakāpes un secīgas ekstrakcijas ceļā iegūto ekstraktvielu ķīmisko sastāvu, galvenokārt PAC saturu ekstraktvielā (3. tabula), būtiskas izmaiņas netika novērotas. Pie tam secīga ekstrakcija (3. attēls) sadārdzina PACE kā produktu, tāpēc ekonomisku apsvērumu dēļ PACE izdalīšanai no baltalkšņa mizas tika izmantota vienpakāpes ekstrakcija.

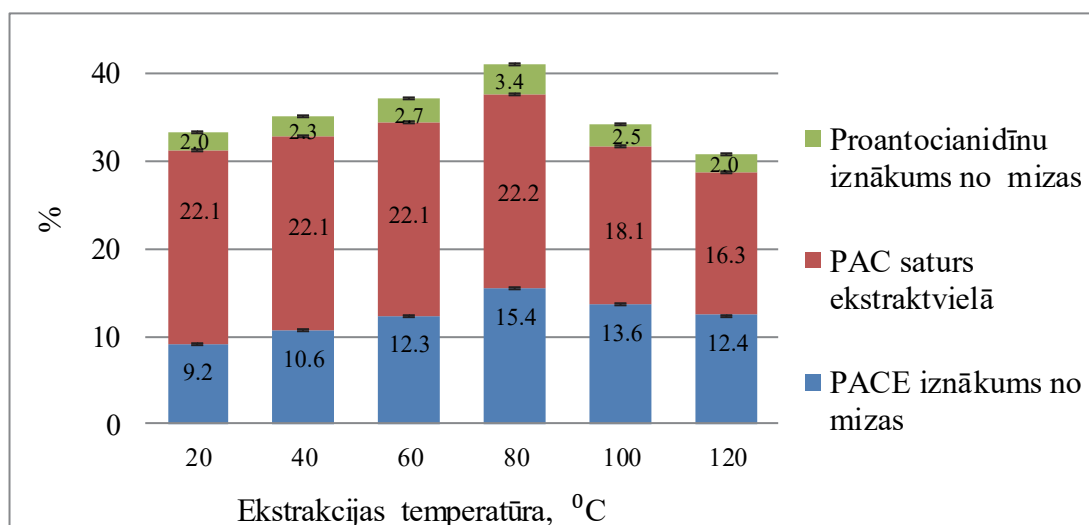
Lai pārlicinātos, ka tieši 40 % etanola ūdens šķīdums ir viespiemērotākais ekstrahents efektīvai PACE izdalīšanai no mizas, atkārtoti tika veikta 30 minūšu baltalkšņa mizas ekstrakcija 80 °C temperatūrā, mainot ekstrahenta procentuālo sastāvu. Iegūtie rezultāti apliecināja, ka 40 % EtOH nodrošina augstāko ekstraktvielas iznākumu no mizas, kas sasniedz 15,3 % ar proantocianidīna saturu 22 %, pārrēķinot uz a. s. ekstraktvielu.

Iepriekš veiktie eksperimenti, nosakot hidromoduļa izvēli, parādīja, ka mizas un ekstrahenta masas attiecība 1:4 (hidromodulis – 4) nav pietiekama, jo ekstrahenta nepietiek, lai pilnīgi saslapinātu mizas daļiņas, līdz ar to samazinās PACE ekstrakcija no biomasas šķīdumā. Mainot hidromoduli no 6 līdz 8, netika novērotas īpašas izmaiņas iegūtā PACE iznākumā, savukārt, palielinot hidromoduli no 8 līdz 14, PACE iznākums nedaudz samazinājās, bet elektroenerģijas patēriņš pieauga no 0,38 līdz 0,49 kWh, kas saistīts ar šķidrās fāzes tilpuma palielināšanos ekstrakcijas sistēmā). Hidromoduļa ietekme uz PACE izdalīšanas efektivitāti parādīta 4. tabulā. Optimāla PACE izdalīšana tiek sasniegta pie mizas un ekstrahenta masu attiecības 1:8.

Hidromoduļa ietekme uz PACE izdalīšanas efektivitāti

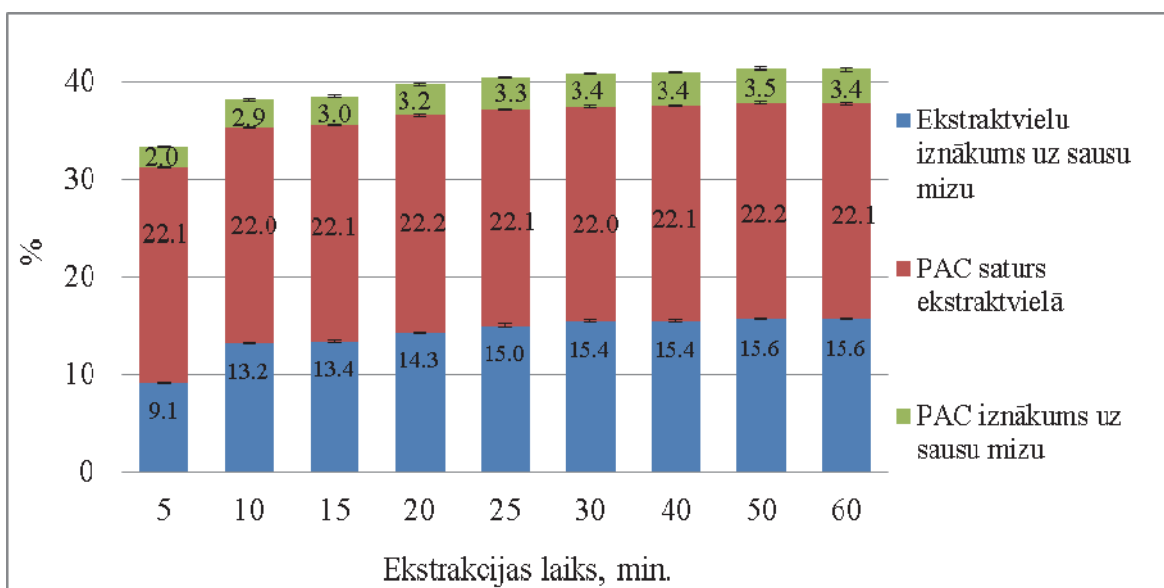
Mizas svars, g	Ekstrahenta (40% EtOH) svars, g	PACE iznākums, % uz a. s. mizu	Proantocianidīnu saturs ekstraktvielā, %	Elektroenerģijas patēriņš, kWh
10,1	60	15,1	21,7	0,32
10,1	80	15,3	21,9	0,38
10,3	100	14,2	21,8	0,42
10,2	120	13,7	21,8	0,46
10,1	140	12,6	21,9	0,49

Vispārzināms ir fakts, ka augsta ekstrakcijas temperatūra palielina ekstrakcijas efektivitāti. Lai noteiktu optimālo ekstrakcijas temperatūru, baltalkšņa mizas ekstrakcija tika veikta 20 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C, 100 °C un 120 °C temperatūrā ar 40 % EtOH pie noteiktā optimālā hidromoduļa (1:8), ekstrakciju veicot 30 minūtes. Iegūtie rezultāti parādīja, ka visaugstākais PACE iznākums tiek sasniegts, ja ekstrakcijas temperatūra ir 80 °C. Paaugstinot ekstrakcijas temperatūru līdz 120 °C un veicot ekstrakciju paātrinātā šķīdinātāja ekstrakcijas iekārtā (ASE 300), proantocianidīnu saturs ekstraktvielā samazinājās, kas liecina par proantocianidīnu termisko destrukciju paaugstinātā temperatūrā (5. attēls).



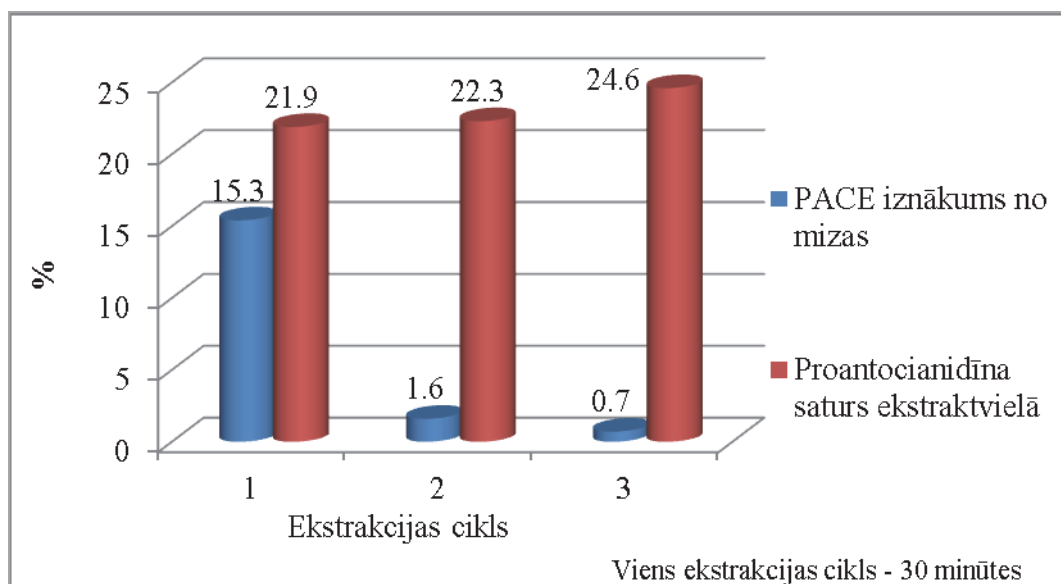
5. attēls. Ekstrakcijas temperatūras ietekme uz PACE un PAC izdalīšanas efektivitāti.

PACE izdalīšanas efektivitāte atkarībā no ekstrakcijas laika dota 6. attēlā. Ekstrakcijas laika optimizēšanai baltalkšņa mizas ekstrakcija tika veikta pie noteiktās optimālās ekstrakcijas temperatūras – 80 °C, optimālā hidromoduļa – 8, kā ekstrahentu izmantojot 40 % EtOH. Ekstrakcijas laiks tika mainīts no 5 līdz 60 min., nosakot maksimālo ekstraktvielas iznākumu nevis proantocianidīna saturu ekstraktvielā. Iegūtie rezultāti parāda, ka optimālais ekstrakcijas laiks PACE izdalīšanai ir 30 minūtes, iegūstot 153 ± 1 mg ekstraktvielas ar proantocianidīna saturu ekstraktvielā $22 \pm 0,1$ %.



6. attēls. Ekstrakcijas laika ietekme uz PACE un PAC izdalīšanas efektivitāti.

Atkārtojot vienpakāpes baltalkšņa mizas ekstrakciju trīs reizes (trīs ciklu ekstrakciju) ar katra cikla ilgumu 30 minūtes (40 % EtOH, 80 °C, hidromoduli – 8, 3 x 30 min.), tika noskaidrots, ka visaugstākais PACE iznākums tiek sasniegts ekstrakcijas pirmā cikla laikā, un tas ir 87 % no kopējā izdalītā PACE daudzuma. Otrā un trešā cikla laikā PACE iznākums bija attiecīgi 9 % un 4 %, pārrēķinot uz a. s. mizu. Savstarpēji salīdzinot proantocianidīnu saturu ekstraktvielā, redzams, ka ar katru nākamo ekstrakcijas ciklu proantocianidīnu saturs ekstraktvielā nedaudz pieaug, paaugstinās PAC tīrības pakāpei 1,1 reizes (7. attēls).



7. attēls. Iegūto PACE sadalījums pa frakcijām, veicot baltalkšņa mizas trīs ciklu ekstrakciju.

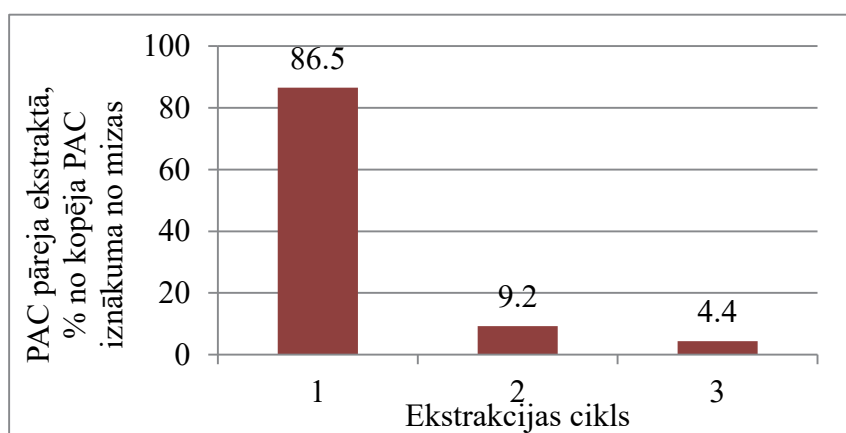
Pārrēķinot uz a. s. mizu, otrā un trešā ekstrakcijas ciklā PAC iznākums no mizas ir attiecīgi 0,4 un 0,2 %. Ņemot vērā, ka, veicot trīs ciklu mizas ekstrakciju, elektroenerģijas

patēriņš pieaug trīskārtīgi, kas ir ekonomiski neizdevīgi no PACE iegūšanas viedokļa, bet izdalītā PACE un PAC pieaugums ir mazs, PACE un PAC izdalīšanai no lapkoku mizas racionāli ir izmantot vienu ekstrakcijas ciklu ar ekstrakcijas laiku 30 minūtes.

Ņemot vērā iepriekšējo eksperimentu rezultātus (1.– 4. tabula un 3.–9. attēls), PACE un PAC efektīvai izdalīšanai no baltalkšņa mizas ir noteikti šādi optimālie ekstrakcijas parametri:

1. ekstrahents – 40 % EtOH;
2. hidromodulis – 8;
3. temperatūra – 80 °C;
4. ekstrakcijas laiks – 30 min.

Minētie parametri nodrošina visaugstāko hidrofilo ekstraktvielu iznākumu (15,3 % uz a. s. mizu) ar proantocianidīnu saturu 22 %. Šādos apstākļos no proantocianidīnu saturošas baltalkšņa mizas 86,5 % proantocianidīnu pāriet pirmajā hidrofilo ekstraktu frakcijā (8. attēls).



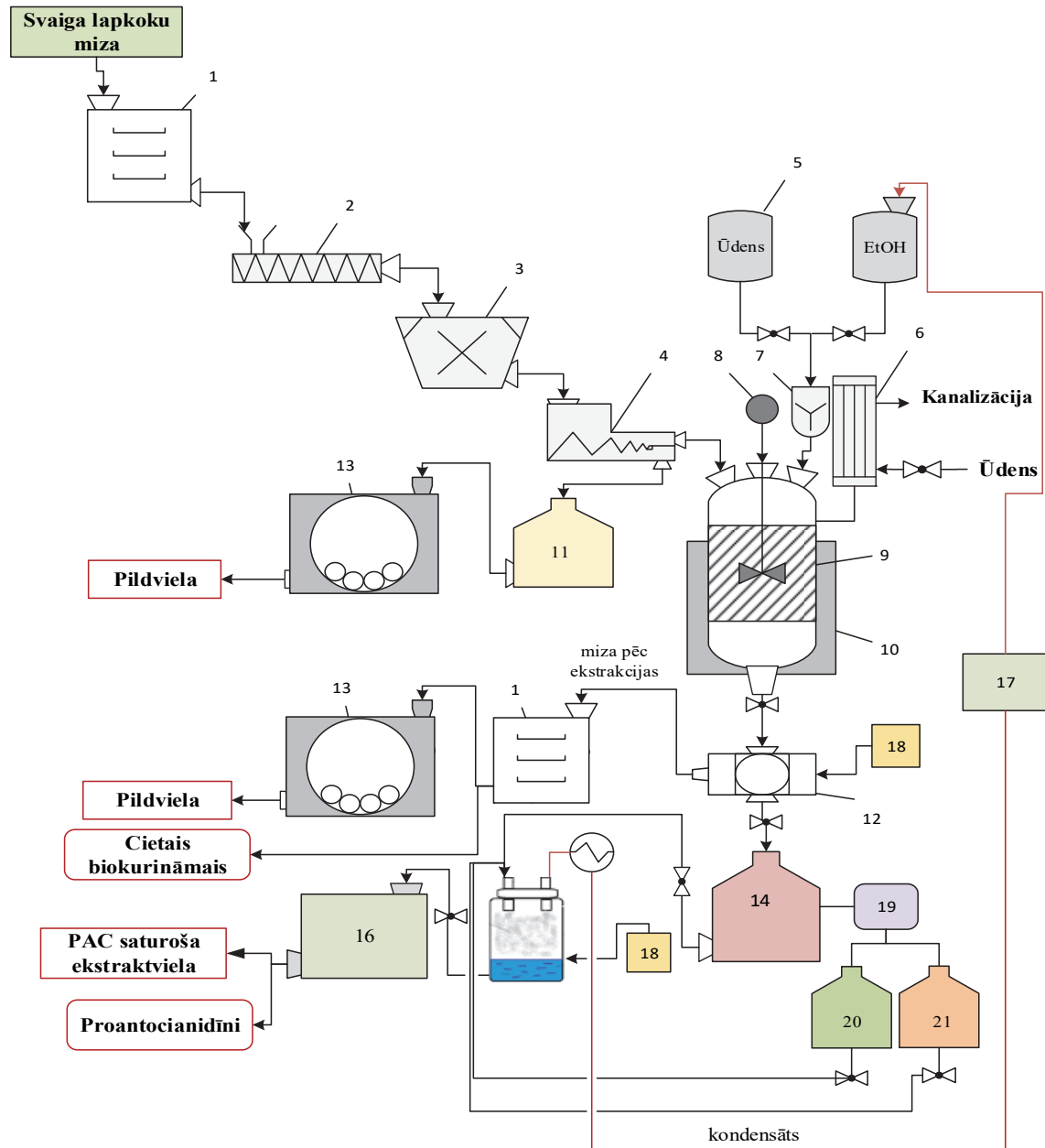
8. attēls. Proantocianidīnu pāreja no baltalkšņa mizas ekstraktā.

Pamatojoties uz iegūtajiem eksperimentāliem datiem, ir izstrādāta PACE un PAC izdalīšanas tehnoloģiskā shēma no lapkoku mizas, kas pietuvināta izmantošanai rūpnieciskos apstākļos (9. attēls). Tehnoloģiskā shēma nodrošina lapkoku mizas bezatlikuma pārstrādi, iegūstot daudzveidīgus dabas produktus, tajā skaitā proantocianidīnus un citus to tālākai izmantošanai. Lapkoku miza pēc ekstrakcijas (lignocelulozes atlikums) var tikt izmantota kā izejviela pildvielas iegūšanai, lai uzlabotu skuju koksnes celulozes papīra mehāniskās īpašības, vai kā cietais biokurināmais ar palielinātu siltumspēju.

3.4. PACE un PAC iegūšanas tehnoloģiskā shēma

Tieksme pilnvērtīgi izmantot koksni liek domāt par efektīvu koksnes atkritumu izmantošanu, tajā skaitā lapkoku mizu, tādēļ liela nozīme ir jaunu tehnoloģiju un produktu izstrādei un izmantošanai dažādās tautsaimniecības nozarēs, aizstājot sintētiskos produktus ar daudz pilnvērtīgākiem dabas produktiem. Kokapstrādes rūpniecās apaļkoku apstrādes procesā gadā veidojas apmēram 0,5 milj. m³ mizas, ko pārsvarā izmanto vietējās katlumājās siltumenerģijas ražošanai vai izved noglabāšanai izgāztuvēs, kas saistīts ar papildu izmaksām

to izvešanai un izgāztuvju uzturēšanai. Ņemot to vērā, racionālākais iegūto rūpniecisko koksnes atkritumu utilizācijas veids ir mizas izmantošana augstvērtīgu, ekoloģiski drošu dabas produktu iegūšanai. Rekomendējamā mizas pilnvērtīgās pārstrādes tehnoloģiskā shēma parādīta 9. attēlā.



1 – žāvētājs, 2 – mizas transportieris, 3 – smalcinātājs, 4 – sijāšanas siets, 5 – šķīdinātāju tvertne, 6 – kondensators, 7 – ekstrahenta tvertne, 8 – maisītājs, 9 – reaktors, 10 – elektriskais sildītājs, 11 – mizas krātuve (daļiņu izmērs < 0,5 mm), 12 – filtrs, 13 – bumbu dzirnavas, 14 – tilpne ar ekstraktu, 15 – ietvaicētājs, 16 – liofilizācijas iekārta, 17 – reģenerācijas iekārta, 18 – vakuums; 19 – proantocianidīnu izdalīšanas kolonna.

9. attēls. PACE un PAC iegūšanas tehnoloģiskā shēma.

Lapkoku miza pēc apaļkoku mizošanas tiek žāvēta (1) un, sasniedzot mitruma saturu < 10 %, ar transportiera (2) palīdzību tiek padota smalcinātājā. Pēc mizas sasmalcināšanas tā nonāk uz sijāšanas sietiem (3), kur tiek atsijāta mizas smalkākā frakcija (< 0,5 mm), kas no krātuves (11) nonāk bumbu dzirnavās (13), kur tiek samalta līdz nanodaļiņu izmēram pildvielas iegūšanai. Pārējā mizas frakcija ar daļiņu izmēriem no 0,5–2 mm tiek padota ekstraktorā (9) proantocianidīnus saturošā ekstrakta izdalīšanai. Optimālo ekstrakcijas temperatūru nodrošina elektriskais sildītājs (10). Ekstrakcijas rezultātā no lapkoku mizas tiek iegūti divi produkti: proantocianidīnus saturošs ekstrakts un lapkoku mizas (lignocelulozes) atlikums. Lignocelulozes atlikums tiek padots žāvētājā (1), bet pēc tam nonāk bumbu dzirnavās (13) pildvielas iegūšanai vai, izlaižot malšanas procesu, siltumenerģijas ražošanai.

Atkarībā no gala produkta mērķuzdevuma proantocianidīnu ekstrakts no tvertnes (14) tiek padots liofilajā žāvētavā (16) sausas ekstraktvielas iegūšanai vai, otrā gadījumā, individuālu savienojumu – proantocianidīnu – izdalīšanai kolonnā (19), kurai seko destilācija (15) un liofilā žāvēšana sausu proantocianidīnu iegūšanai. Abos gadījumos destilācijas rezultātā atdalītais kondensāts tiek padots reģenerācijas iekārtā (19) un atkārtoti izmantots kā ekstrahents proantocianidīnu ekstraktvielu iegūšanai.

Pamatojoties uz sešu gadu ilgu PAC skrīningu lapkoku mizās (5. tabula), iegūtie rezultāti liecina, ka PAC izdalīšana no mizas ir dārgs un darbietilpīgs process. No ekonomiskā viedokļa rūpnieciska šo savienojumu iegūšana ar iznākumu < 7,8 % (2009. gada dati, veicot pētījumus VPP ietvaros) no Latvijas augošo lapkoku mizas nav racionāla, ko nevar teikt par PACE iegūšanu.

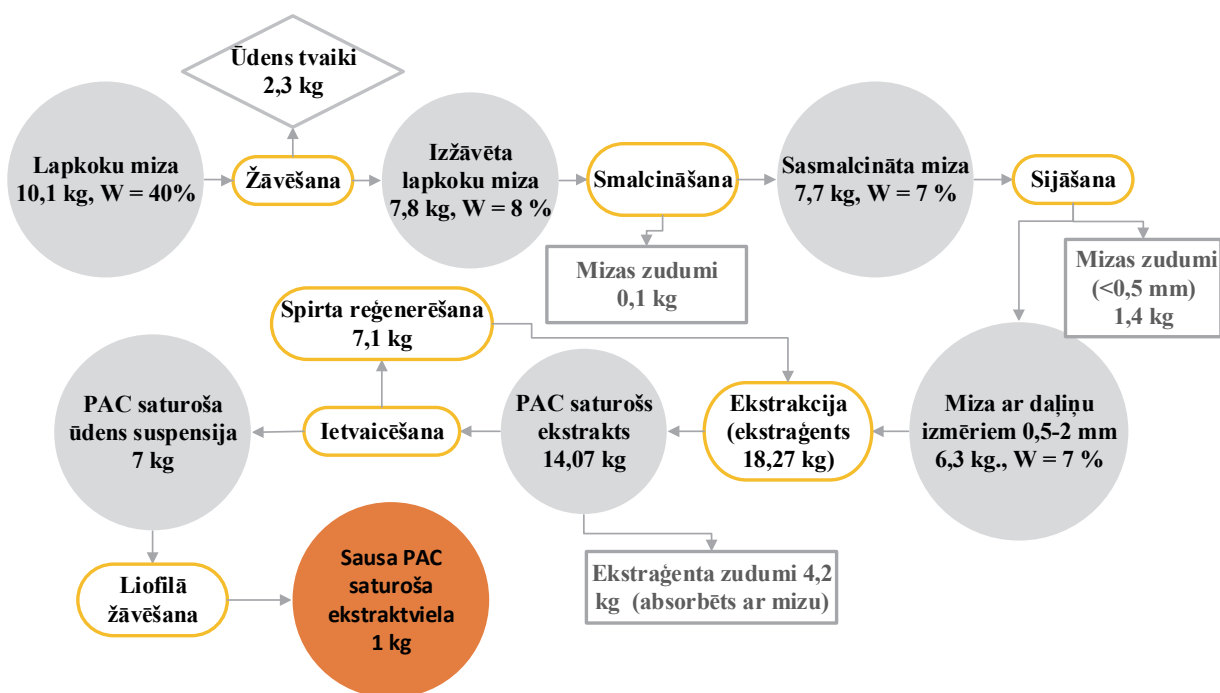
5. tabula

PACE un PAC iznākums no lapkoku mizas izmantojot secīgo ekstrakciju

Baltalkšņa miza						
Mizas ievākšanas gads	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PACE iznākums no mizas, %	17,0	15,4	14,1	14,8	12,7	17,2
PAC iznākums no mizas, %	7,8	6,5	3,5	5,2	5,3	7,2
Melnalkšņa miza						
Mizas ievākšanas gads	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PACE iznākums no mizas, %	16,2	15,1	12,3	14,2	13,7	16,8
PAC iznākums no mizas, %	5,7	5,3	3,0	6,0	6,3	6,4
Blīgzņas miza						
Mizas ievākšanas gads	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PACE iznākums no mizas, %	–	–	15,4	18,1	14,4	12,6
PAC iznākums no mizas, %	–	–	2,5	3,8	2,0	3,0

3.5. PACE rūpnieciskās ražošanas iespējas novērtējums

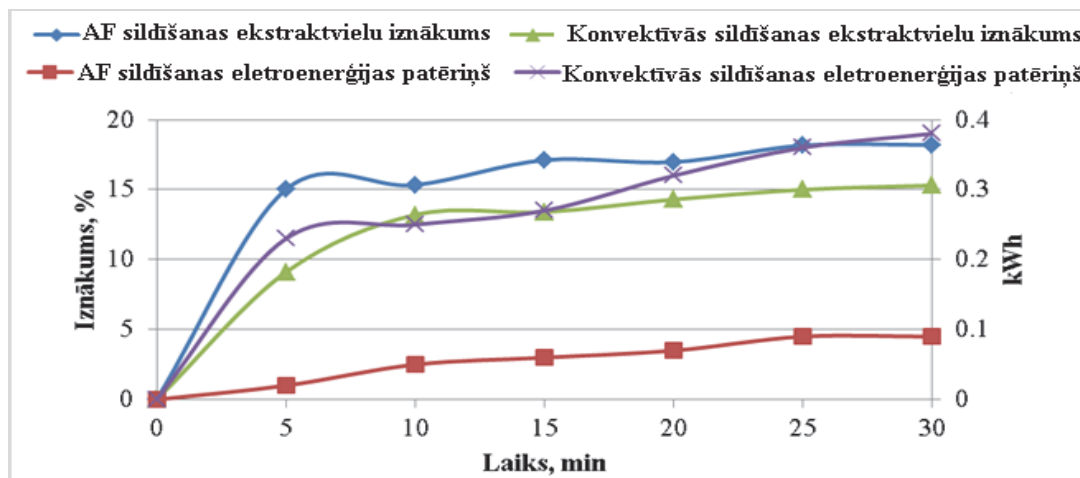
Proantocianidīnu ekstraktvielu (PACE) iegūšanas izmaksas veido vairākas galvenās pozīcijas – kokapstrādes atkritumu (mizas) cena, enerģētiskie izdevumi, darbaspēka izmaksas, ražošanas iekārtu cena, kas iekļauj sevī uzstādīšanas un amortizācijas izmaksas. Lai iegūtu 1 kg PACE, ir nepieciešami 6,3 kg mizas ar mitruma saturu 7 % un daļiņu izmēru 0,5–2 mm. Lapkoku mizas izmaksas ir minimālas, jo kā izejvielu pārsvarā izmanto kokapstrādes atlikumus no vietējām kokzāģētavām, piemēram, melnalksnis kā ātraudzīgs koks joprojām ir pieprasīts mēbeļu rūpniecībā gan finieru, gan apdares materiālu ražošanā. Kas attiecas uz baltalksni, blīgznu un osi, kas nav plaši pieprasīti mēbeļu rūpniecībā, svaigas mizas iepirkšanas cena ir ~ 500 EUR/t. Vislielākā daļa no kopējiem izdevumiem ir elektroenerģijas izmaksas, it īpaši proantocianidīnu ekstraktu liofilā žāvēšana, lai iegūtu sausu ekstraktvielu. Laboratorijas mērogā etilspirta rekuperācija samazina reaģentu izmaksas, līdz ar to – arī gatavā produkta izmaksas. Lapkoku mizas PACE iegūšanas blokshēma un šī procesa materiālā bilance parādīta 10. attēlā.



10. attēls. PACE iegūšanas blokshēma ar procesa materiālo bilanci.

Energoefektivitāte ir viens no noteicošākajiem raksturojumiem jebkuram tehnoloģiskajam procesam, tāpēc, lai samazinātu PACE iegūšanai nepieciešamo enerģijas patēriņu, alternatīva izskatītajai vienpakāpes ekstrakcijai ir ekstrakcija mikroviļņu laukā (MV ekstrakcija), kas būtiski samazina substrāta uzsildīšanas laiku, salīdzinot ar konvektīvo sildīšanu. Ir pierādīts, ka, izmantojot MV ekstrakciju un patērējot mazāk elektroenerģijas, var iegūt PACE ar lielāku iznākumu nekā konvektīvās sildīšanas gadījumā. Savstarpēji salīdzinot PACE iznākumus no baltalkšņa mizas un enerģijas patēriņu, iegūstot šo mērķproduktu, tika konstatēts, ka pirmo

piecu minūšu laikā, izmantojot MV ekstrakciju, PACE iznākums bija 1,6 reizes augstāks – 82 % no kopēja PACE iznākuma no mizas, patērējot tikai 0,02 kWh (11. attēls).

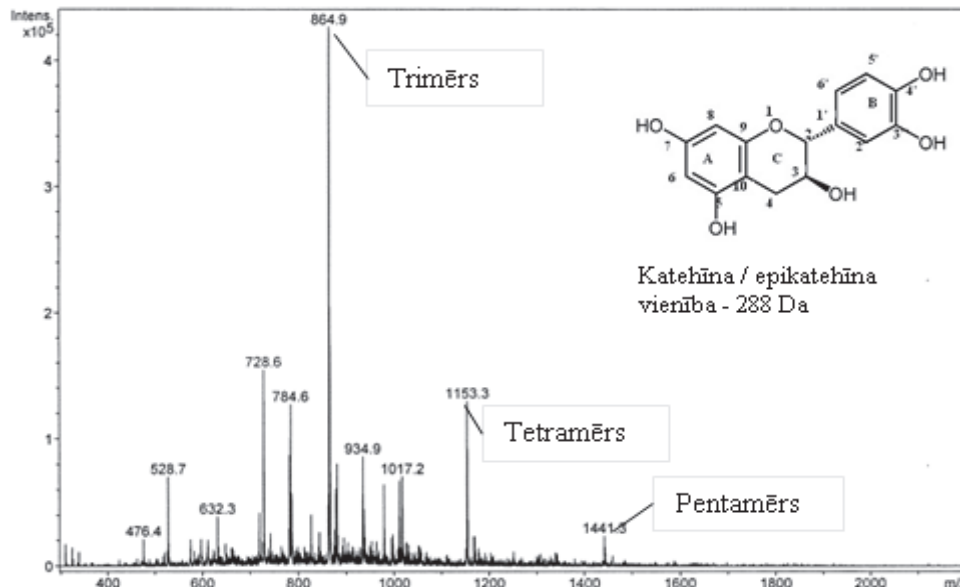


11. attēls. PACE iznākums un elektroenerģijas patēriņš, izmantojot MV ekstrakciju un konvektīvo sildīšanu.

MV ekstrakcija ietaupa patērēto enerģiju, tādējādi būtiski samazina mērķproduktu ieguves laiku un izmaksu. Aptuvenā cena līdzīgu polifenolu produktu analogiem, ko ir iespējams iegūt no mizas, saskaņā ar literatūras pētījumu rezultātiem ir robežās no 1000 EUR/kg līdz pat 8000 EUR/kg – atkarībā no produkta veida un tā satura mizā. *Picnogenola*[®] cena atkarībā no proantocianidīna satura ekstraktvielā ir 60–120 EUR/100 mg [9]. Veicot iegūto proantocianidīnu saturošo ekstraktvielu pašizmaksas aprēķinu, šā produkta cena laboratorijas mērogā, neiekļaujot iekārtu izmaksas (iekārtu cena, uzturēšana, amortizācija), būtu apmēram 300 EUR/kg. Lielākā daļa jeb 70 % no produkta cenas veido darbaspēks. Strādājot piecas dienas nedēļā septiņas stundas dienā, 1 kg PACE iegūšanai ir nepieciešama viena nedēļa, t. i., 35 darba stundas. Pie šādas noslodzes darbaspēka izmaksas būtu 217 EUR. Darba procesa automatizēšana varētu būtiski samazināt mērķprodukta pašizmaksu.

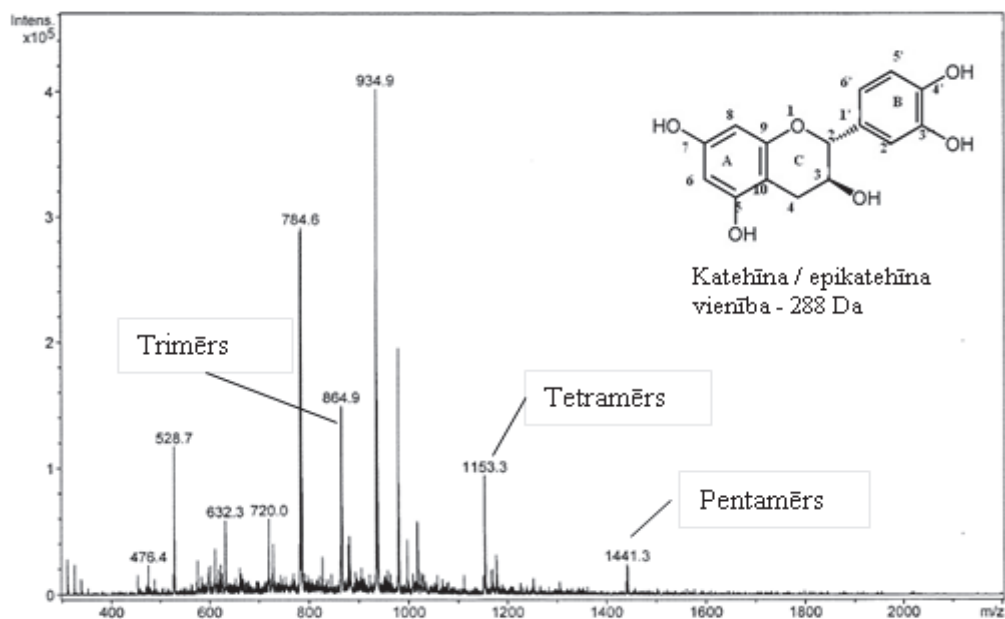
3.6. No alkšņu mizas izdalīto PAC raksturojums

Individuālo savienojumu – proantocianidīnu – izdalīšana tika veikta no baltalkšņa un melnalkšņa mizas ekstraktvielām, pamatojoties uz to augsto saturu ekstraktvielās (5. tabula). Pēc butanola-HCl metodes no alkšņu mizas ekstraktvielām izdalītie proantocianidīni, salīdzinot ar procianidīna B2 standartu, parādīja augstu tīrības pakāpi ($\approx 99\%$). Iegūtie TOF-MS masspektri (12. un 13. attēli) parādīja, ka attīrīto proantocianidīnu molekulārā masa nepārsniedz 1441 Da, kas liecina par to, ka proantocianidīni ir oligomērie polifenola savienojumi.



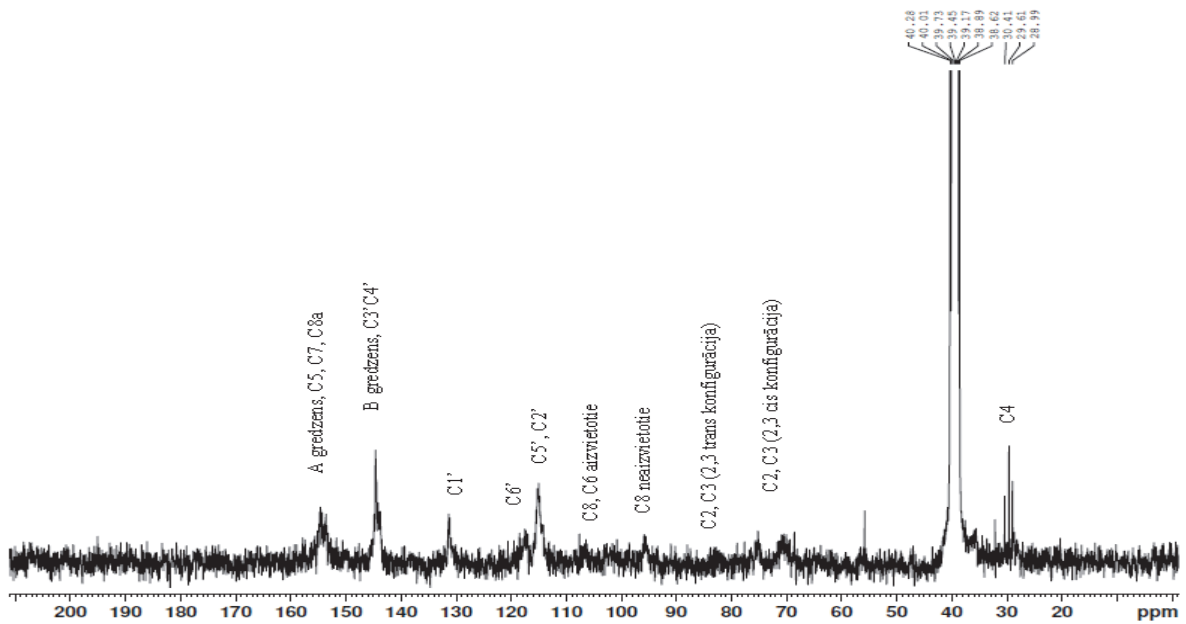
12. attēls. Baltalkšņa mizas attīrīta proantociānīda TOF masspektrs.

Regulāra fragmentācija pa 288 Da, kas atbilst katehīna/epikatehīna vienībai, norāda, ka proantociānīdu sastāvā ir katehīna/epikatehīna trimēri (865 Da), tetramēri (1153 Da) un pentamēri (1441 Da).

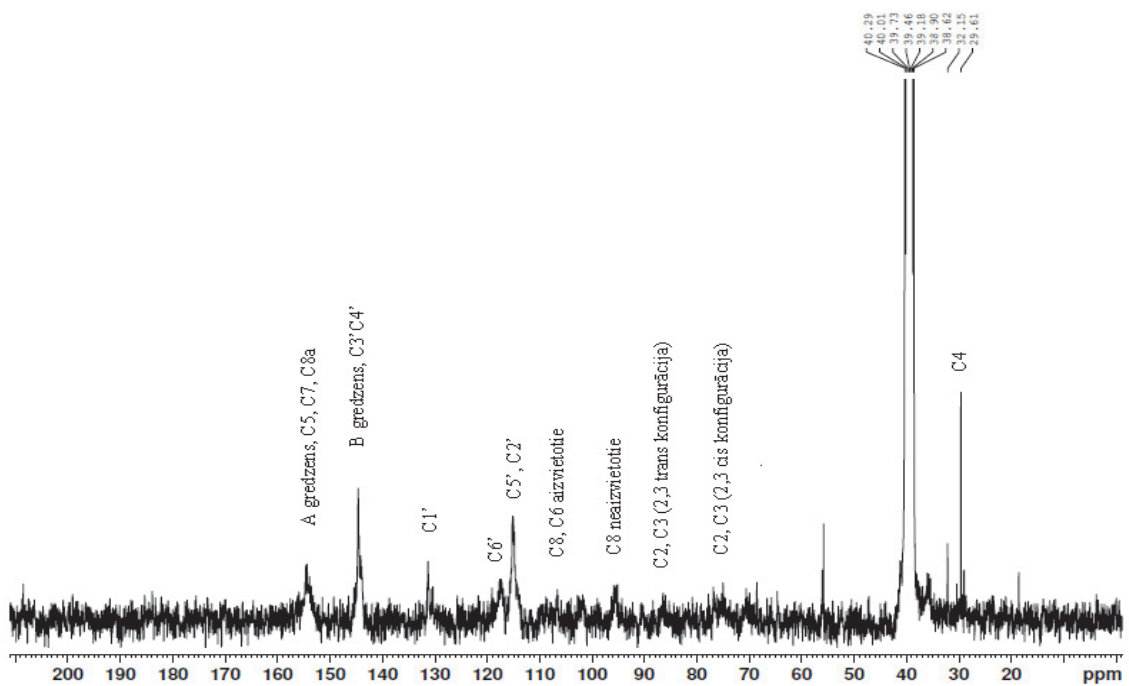


13. attēls. Melnalkšņa mizas attīrīta proantociānīda TOF masspektrs.

Uzņemot ¹³C-KMR spektrus attīrītajiem proantociānīdiem, tika iegūta detalizētāka informācija par pētāmā savienojuma substrukturām un funkcionālajām grupām, kas ļāva identificēt analizējamā proantociānīda ķīmisko struktūru (14. un 15. attēli). ¹³C KMR spektra signālu interpretēšana tika veikta, pamatojoties uz literatūras datiem, kas liecina, ka analizējamā viela veido procianidīna (katehīna vai epikatehīna) vienības.



14. attēls. Baltalkšņa mizas attīrīta proantociānīdīna ^{13}C -KMR spektrs.



15. attēls. Melntalkšņa mizas attīrīta proantociānīdīna ^{13}C -KMR spektrs.

Apvienojot TOF-MS un ^{13}C -KMR analīzes rezultātus, tika pierādīts, ka izdalītie proantociānīdīni no Latvijā augošiem alkšņiem ir B tipa procianidīni, kuros katehīna/epikatehīna monomēra vienības oligomēros ar polimerizācijas pakāpi 2–5 ir saistītas ar C4–C8 saiti.

3.7. PACE un PAC antioksidatīvā aktivitāte

Salīdzinot lapkoku mizas ekstraktvielu antioksidanto aktivitāti, tika novērota sakarība starp polifenolu saturu ekstraktvielā un to antioksidanto aktivitāti – palielinoties polifenola savienojuma saturam ekstraktvielā, palielinās radikāļu deaktivēšanas aktivitāte ABTS⁺⁺ un DFPH^{*} testos. No pētītajiem PACE blīgzņas mizas ekstraktviela parādīja visaugsto antioksidatīvo aktivitāti, salīdzinot ar pārējām ekstraktvielām (6. tabula).

6. tabula

PACE antioksidatīvā aktivitāte ABTS⁺⁺ un DFPH^{*} testos

Paraugs	Kopējais polifenolu saturs ekstraktvielā, GSE·g ⁻¹	Ogļhidrātu saturs ekstraktvielā, %	IK ₅₀ , mg·L ⁻¹	
			ABTS ⁺⁺	DFPH [*]
PACE no BL mizas	0,51	5,5	2,2	3,8
PACE no MA mizas	0,39	25,8	3,3	6,1
PACE no BA mizas	0,46	37,1	4,3	7,5
Troloks	–	–	4,0	4,95

Analizējot proantocianidīnus, visaugstāko antioksidanto aktivitāti, salīdzinot ar Troloksu, parādīja attīrītie alkšņu mizas proantocianidīni (7. tabula). Salīdzinot ar iepriekš iegūtajiem rezultātiem, redzams, ka, izdalot proantocianidīnus no ekstraktvielām, antioksidantā aktivitāte šiem savienojumiem palielinās.

7. tabula

Proantocianidīnu antioksidantā aktivitāte

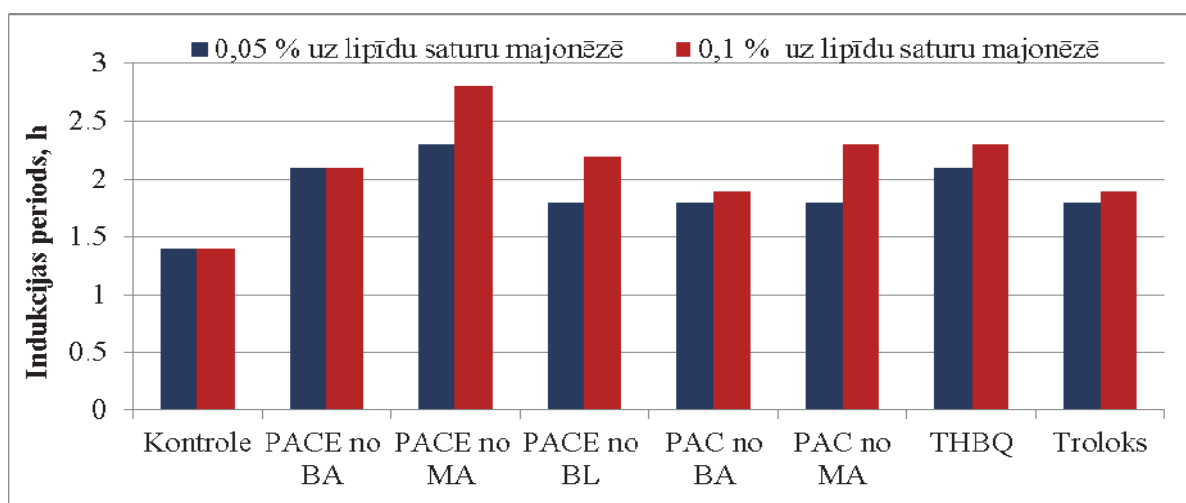
Paraugs	IK ₅₀ testā ar ABTS ⁺⁺ , mg·L ⁻¹	IK ₅₀ testā ar DFPH [*] , mg·L ⁻¹	ORAC tests, (mmol TE)·g ⁻¹
PAC no BL mizas	1,4	3,0	5,3
PAC no MA mizas	1,1	2,4	4,8
Troloks	4,0	4,7	4,0

IK₅₀ – antioksidantu masas koncentrācija, kas ir nepieciešama, lai panāktu 50% brīvā radikāļa inhibēšanu; mmol TE·g⁻¹ – Troloksa ekvivalentu mmoli (TE) uz 1 gramu pētāmā antioksidanta.

Skābekļa radikāļu absorbcijas kapacitāte (ORAC – ir viena no visplašāk izmantojamām metodēm, kas sniedz informāciju par antioksidantu spēju aizsargāt substrātu (konkrētā gadījumā fluoresceīnu) no oksidēšanās ar skābekļa peroksilradikāļiem. Šis tests tika veikts no baltalkšņa un melnalkšņa mizas ekstraktvielām izdalītajiem proantocianidīniem. Izmantojot testam 0,0025 % proantocianidīnu šķīdumu, fluoresceīna oksidēšanās indukcijas periods ir ≈ 25 min. Salīdzinot ar Troloksu (4,0 mmol TE·g⁻¹), ir redzams, ka proantocianidīni kā antioksidanti ir efektīvāki (4,8–5,3 mmol TE·g⁻¹), aizsargājot fluoresceīnu no oksidēšanās (7. tabula).

3.8. PAC un PACE ietekme uz produktu oksidēšanās procesu

Lipīdus saturošie produkti ražošanas un uzglabāšanas laikā ir pakļauti gaisa un skābekļa iedarbībai, kas izraisa virkni oksidēšanās reakciju, kuru rezultātā samazinās produktu uzturvērtība un derīguma termiņš. Galvenais veids, kā pasargāt produktus no oksidēšanās, ir antioksidantu lietošana. Pamatojoties uz darbā iegūtajiem rezultātiem (6. un 7. tabulas) par lapkoku mizas proantocianidīnu un to saturošo ekstraktvielu augsto antioksidatīvo aktivitāti, neitralizējot brīvos radikāļus, tika pētītas PACE un PAC kā antioksidantu izmantošanas iespējas praktiskai pārtikas produktu un kosmētikas stabilizācijai. Antioksidantu (AO) koncentrācijas ietekme uz majonēzes oksidēšanās laiku dota 16. attēlā.



16. attēls. PACE un PAC ietekme uz majonēzes oksidēšanās laiku.

Pievienojot majonēzei 0,05–0,1 % PACE, majonēzes stabilitāte būtiski palielinās, salīdzinot ar izejas paraugu. Salīdzinot ar sintētiskiem antioksidantiem, perspektīvākais dabiskais antioksidants ir no melnalkšņa mizas izdalītā PAC ekstraktviela. Pievienojot 2 % PACE no melnalkšņa mizas kosmētiskam krēmam, tā stabilitāte palielinājusies 2,4 reizes. Neskatoties uz proantocianidīnu augsto antioksidatīvo aktivitāti, izdalītie proantocianidīni uzrādīja zemāku aizsardzības faktoru abu produktu oksidēšanas testā nekā PACE. Visticamāk, ka ekstraktvielu polifenolu savienojumu grupai piemīt sinerģiska bioloģiskā aktivitāte, kas paaugstina aizsardzības efektivitāti produkta oksidēšanas laikā.

Viena no PACE un PAC kā antioksidantu-stabilizatoru perspektīvām izmantošanas jomām ir poliuretānu (PU) sintēze, pievienojot 2 % minēto antioksidantu poliuretānu kompozīcijā priekšpolimerizācijas stadijā. Kā liecina 8. tabulā apkopotie dati, pievienojot antioksidantus, poliuretāna destrukcijas sākuma temperatūra pieaug un termooksidācija tiek kavēta, salīdzinot ar nestabilizētu PU destrukciju, kas sākas jau pie 285 °C. Salīdzinot ar sintētisko antioksidantu *Irganoks 1010*, dabiski antioksidanti efektīvāk kavē PU oksidēšanos, paaugstinot to termostabilitāti. Efektīvākie PU termostabilizatori ir no baltalkšņa mizas izdalītie proantocianidīni.

Antioksidantu ietekme uz PU plēvju termooksidēšanās destrukciju

Paraugs	T _{start} , °C	T _{max} , °C	Masas zudumi (mg·min ⁻¹) 285 °C
PU bez antioksidanta	285	323	0,31
PU + Irganoks 1010	293	323	0,27
PU + PACE no baltalkšņa mizas	310	342	0,16
PU + PAC no baltalkšņa mizas	319	341	0,08
PU + PACE no melnalkšņa mizas	300	342	0,28
PU + PAC no melnalkšņa mizas	316	342	0,10
PU + PACE no blīgzņas mizas	310	341	0,19

3.9. PACE un PAC bioloģiskā aktivitāte bioloģiskajās sistēmā

Sadarbībā ar RSU Cilvēka fizioloģijas un bioķīmijas katedru, proantociānīdiem un to saturošām ekstraktvielām tika veikti *in vitro* testi, lai novērtētu to izmantošanas potenciālu veselības aprūpē. Attiecībā uz amilāzes aktivitāti, iegūtie rezultāti parāda, ka pievienotais PACE daudzums-100 μl aktivizē aktivitāti, palielinot amilolītisko spēku par 15-30 %. PAC un PACE samazina lipīdu uzsūkšanos asinīs, nomāc aizkuņģa dziedzera lipāzes aktivitāti un samazina piruvāta koncentrāciju asins plazmā no 3 mg/dl uz 2,2-2,5 mg/dl, kas norāda uz cukura samazinājumu asinīs.

3.10. PACE izmantošana poliēteru poliolu sintēzē

Oksipropilējot PACE no baltalkšņa mizas, tika iegūti poliēteru polioli. Salīdzinot ar citu biomasu viskozitāti, kuras izmanto poliolu sintēzei, iegūto poliolu zemā viskozitāte – 0,8 Pa·s, atvieglo poliuretānu ieguvī, ļaujot strādāt ar mazāku spiedienu izsmidzināšanas iekārtās. Iegūto poliolu viskozitāte, salīdzinājumā ar citu biomasu viskozitāti, kas atrodama literatūrā, dota 9. tabulā.

Biomasa viskozitāte poliēteru poliolu sintēzei

Biomasa	Viskozitāte, Pa·s
PACE no baltalkšņa mizas	0,8
Kviešu salmu organosolv lignīns [24]	63,7
Dateļu sēklas [25]	6,9
Organosolv lignīns [24]	93,0

3.11. PACE izmantošana adhezīvu iegūšanai

Pamatojoties uz PACE komponentu funkcionālo sastāvu, no baltalkšņa mizas iegūta PAC ekstraktviela tika pētīta videi draudzīgu saistvielu iegūšanai kokskaidu plātņu un saplākšņu ražošanai.

Daļēja fenola aizvietošana ar PACE fenolformaldehīda sveķu sintēzē

Sadarbībā ar CHIMAR laboratoriju (Griekija) tika sintezēti FF sveķi, aizvietojo 20 % fenola ar 2012. gadā iegūto no baltalkšņa mizas proantocianidīnu saturošu ekstraktvielu. PACE procentuālais saturs (20 %) tika ņemts, pamatojoties uz literatūras datiem [28] par proantocianidīnu augsto reaģētspēju ar formaldehīdu. Veicot paraugu testēšanu, izmantotie PACE-FF sveķi kā kokmateriālu saistviela uzrādīja līdzvērtīgus stiprības rādītājus, sasniedzot ≥ 1 MPa vērtību, kas atbilst EN 314. punkta 5.1.3. un 5.1.1. definētajām prasībām (10. tabula). Sausiem ekspluatācijas apstākļiem bīdes stiprības vērtības saplāksnim, kas tika līmēts, izmantojot PACE-FF sveķus, bija lielākas, salīdzinot ar FF sveķiem līmētiem kontroles paraugiem.

10. tabula

Saplākšņu testēšanas rezultāti

Saistviela	Robežstiprība, MPa			Formaldehīda emisija $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	Bez iepriekšējās apstrādes	Sausiem apstākļiem 1. klase	Mitriem apstākļiem 2. klase	
FF	2,6	1,5	1,3	0,09
PACE-FF	2,1	1,6	1,1	0,05

Daļēji aizvietojo fenolu ar PACE, formaldehīda emisija saplāksnim samazinājās 1,9 reizes, salīdzinot ar kontroli (FF).

Adhezīvi uz PACE bāzes

Lai izveidotu jaunus, videi draudzīgus adhezīvus koksnes materiālu iegūšanai, PACE no 2013. gadā ievāktas baltalkšņa mizas tika modificēta ar celulozes rūpniecībā plaši izmantojamo polietilēnimīnu (PEI). Lai pārbaudītu laboratorijas apstākļos iegūtās PACE-PEI saistvielas līmētspēju, tika izgatavoti kokskaidu plātnes un saplākšņa paraugi.

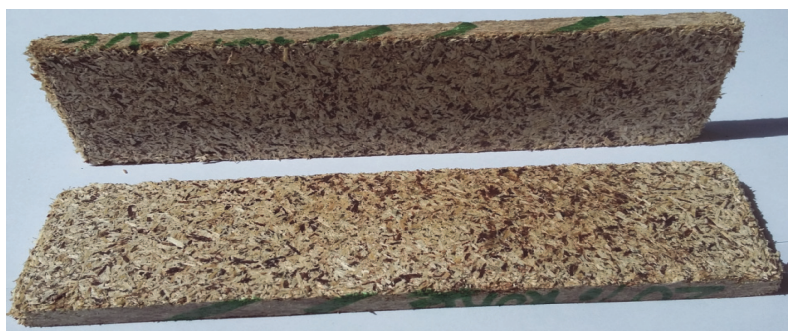
Kokskaidu plātnes tika izgatavotas no priežu skaidām, piesūcinot tās ar PACE-PEI adhezīvu. Eksperimenta gaitā tika noteikta optimālā PACE un PEI šķīdumu koncentrācija, kas bija attiecīgi 20 % un 50 %. Savukārt optimālā PACE un PEI masas attiecība bija 2:1, kas nodrošināja vieglu gēla iejaukšanu skaidu masā. Kokskaidu plātņu presēšanas režīmi: temperatūra – 150 °C, laiks – 15 minūtes, spiediens – 2 MPa. Iegūtās kokskaidu plātnes tika testētas izmantošanai sausos apstākļos, nosakot paraugiem stiprības robežu un elastības moduli statiskā liecē saskaņā ar EN 310 standartu. Lieces stiprības un elastības moduļa vērtības kokskaidu plātnēm dotas 11. tabulā.

Kokskaidu plātņu testēšanas rezultāti

Saistvielas daudzums uz sausu skaidu, %	Robežstiprība statiskā liecē, MPa	Elastības modulis statiskā liecē, MPa	Robežstiprība statiskā liecē, MPa EN 312-P2	Elastības modulis statiskā liecē, MPa EN 312-P2
PACE no baltalkšņa mizas (40 % PACE ūdens šķīdums)				
20	13,2	1305	11	1800
PACE (20 % PACE ūdens šķīdums) modificēts ar polietilēnimīnu (PEI) – 2:1				
20	16,9	1904	11	1800

Iegūtie stiprības rādītāji liecina, ka kokskaidu plātnes, kas piesūcinātas ar PACE-PEI saistvielu, atbilst kokskaidu plātņu standarta EN312-P2 prasībām.

Daudzsološus rezultātus uzrādīja kokskaidu plātnes, kuru izgatavošanai kā adhezīvs tika izmantots PACE 40 % ūdens šķīdums. Ievērojamā rezultātu izkliede ir skaidrojama ar nevienmērīgu saistvielas sadalījumu skaidu masā. Kopumā robežstiprība un elastības moduli statiskā liecē parādīja saistvielas potenciālo izmantošanu kokskaidu plātņu izgatavošanai sausiem izmantošanas apstākļiem. Izgatavoto kokskaidu plātņu biezums bija 10 mm, blīvums 1010–1100 kg/m³ (17. attēls).



17. attēls. Eksperimentāli iegūtais kokskaidu plātnes paraugs.

Saplākšņu izgatavošanai (18. attēls) vidējais PACE-PEI saistvielas patēriņš bija 170–230 g/cm³. Saplākšņu stiprības pārbaudes rezultāti (12. tabula) parādīja, ka saistviela ar PACE-PEI saturu līdz 60 % ir daudzsološa, sasniedzot ≥ 1 MPa vērtību, kas atbilst standarta EN 314 punkta 5.1.3. un 5.1.1. definētajām prasībām.



18. attēls. Eksperimentāli iegūtais saplākšņa paraugs.

Testēšanas rezultāti saplākšņiem, iegūtiem uz PACE-PEI-FF bāzes

PACE-PEI saturs saistvielā	Robežstiprība sausos apstākļos, MPa		Robežstiprība mitros apstākļos, MPa	
	PACE ar 25 % PAC saturu PACE-PEI sastāvā	PACE ar 46 % PAC saturu PACE-PEI sastāvā	PACE ar 25 % PAC saturu PACE-PEI sastāvā	PACE ar 46 % PAC saturu PACE-PEI sastāvā
80 %	0,9	1,0	izjuka	izjuka
60 %	1,2	1,5	0,9	1,3
40 %*	1,3	1,8	1,2	1,3
20 %	1,3	1,8	1,2	1,6
FF	2,3	2,3	1,7	1,7

* Formaldehīda emisija saplākšnim – 0,027 mg/m²·h (EN 717-2:1994), kas ir tuvu E0 klasei pēc EN 13986 Latvija Finiera saplākšņa formaldehīda emisija atbilst Eiropas prasību E1 klasei pēc EN 13986 (emisija <3,5 mg/(m²·h) [2].

Izmantojot adhezīvu iegūšanai ekstraktvielu ar augstāko proantocianidīnu saturu – 46 % uz a. s. ekstraktvielu (PACE no 2013. gadā ievāktas BA mizas) pretstatā 25 % (PACE no 2011. gadā ievāktas BA mizas), saplākšņu stiprības vērtības ir salīdzinoši augstākas, kas izskaidro *Li K.* un citu līdzautoru pētījumos iegūto paraugu augstās stiprības vērtības, izmantojot adhezīvus uz attīrīta proantocianidīna bāzes un testējot tos saplākšņu iegūšanai.

Saplākšņu lieces stiprības un elastības moduļa vērtības, mainot PACE-PEI saturu adhezīvā, bija tuvas un variēja robežās 996–1058 MPa. Rezultātu izkļedes dēļ, kas ir raksturīga dabīgām līmēm, ir grūti spriest par saplākšņu elastības izmaiņām. Izgatavoto saplākšņu blīvums bija robežās no 666–736 kg/m³.

Iegūtie rezultāti liecina, ka adhezīvi uz PACE-PEI bāzes ir potenciāli izmantojami kokskaidu plātņu un saplākšņu izgatavošanai, daļēji aizvietojot komerciālos FF sveķus ar PACE-PEI saistvielu.

3.12. Lapkoku mizas atlikuma izmantošana

Sekojojot biorafinērijas koncepcijai, ir parādīta baltalkšņa mizas atlikuma kā cietā biokurināmā izmantošanas perspektivitāte. Elementanalīzes un analītiskās pirolīzes rezultāti liecina, ka lapkoku mizas atlikums pēc secīgas ekstrakcijas ir kļuvis bagātāks ar oglekli. Pamatojoties uz literatūras avotiem, ir zināms, ka biomasai ar lielāku oglekļa saturu siltumspēja ir lielāka. Mizas paraugu augstāko (ASS) un zemāko (ZSS) sadedzes siltumu aprēķināja, izmantojot regresijas vienādojumus [26, 27], iekļaujot tajos iegūtos elementanalīzes datus. Salīdzinot sadedzes siltumu mizai un mizas atlikumam pēc ekstrakcijas, atlikumam sadedzes siltums ir lielāks (13. tabula).

Baltalkšņa mizas un mizas atlikuma raksturlielumi

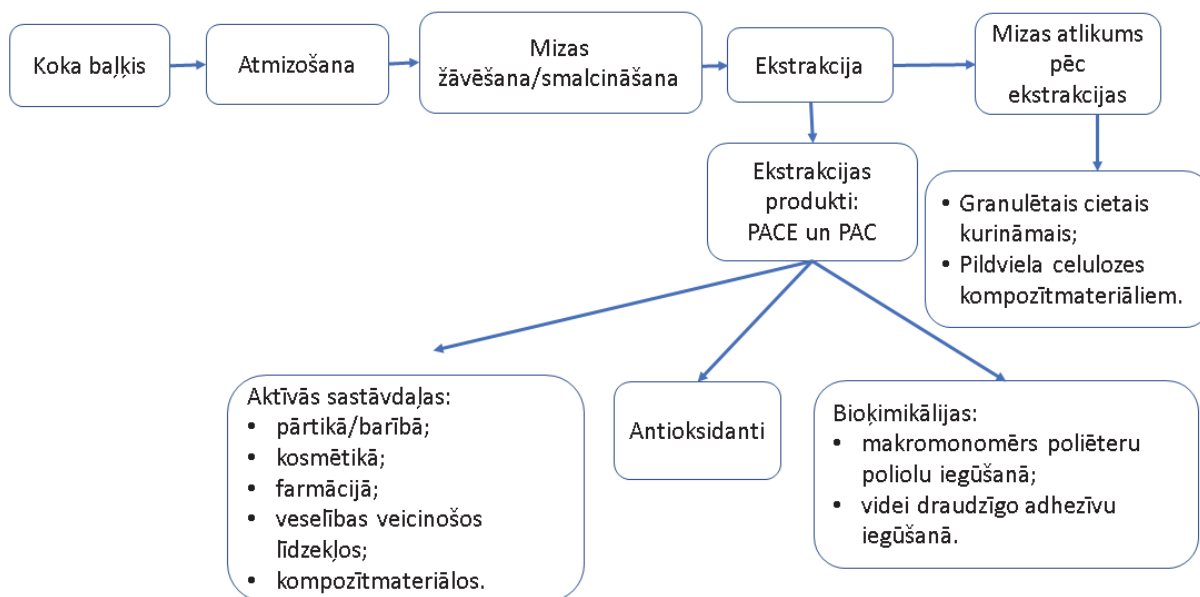
Parametrs	Baltalkšņa miza	Baltalkšņa mizas atlikums
C saturs, % uz sausu paraugu	50,0	51,6
C saturs pēc AP rezultātiem, % uz sausu paraugu	21,3	24,3
H saturs, % uz sausu paraugu	6,63	6,67
N saturs, % uz sausu paraugu	1,19	1,38
ASS, MJ uz 1 kg sausa parauga	20,2	21,0
ZSS, MJ uz 1 kg sausa parauga	18,8	19,5
Pelnu saturs, % uz sausu paraugu	3,4	3,5

Mizas atlikumu izmantošana kompozītmateriālos

Sadarbībā ar KĶI Celulozes laboratoriju līdz nanodaļiņu izmēram sasmalcināta baltalkšņa miza un tās atlikums pēc ekstrakcijas tika pārbaudīts kā pildviela celulozes kompozītmateriālu mehānisko īpašību uzlabošanai. Tika izgatavoti atlējumi no skujkoksnes celulozes ar nanodaļiņu koncentrāciju 5–20 % kā pildvielu. Pētījumi parādīja, ka baltalkšņa mizas atlikuma gadījumā, ja pildvielas saturs ir 20 %, stiepes indekss sausā un mitrā stāvoklī palielinās par 44 %, bet caurspiešanas indekss par 90 %. Izejas baltalkšņa mizas gadījumā šo atlējumu stiepes indekss sausā stāvoklī pieauga par 28 %, mitrā stāvoklī neizmainījās, bet caurspiešanas indekss palielinājās par 78 %.

3.13. Koku mizas biorafinērijas klasteris

Koku mizas biorafinērijas klastera izstrāde ļauj pārvērst lapkoku mizu par izejvielu ar pievienoto vērtību. Izstrādātā kompleksā mizas racionālā izmantošanas shēma iekļauj PAC saturošo ekstraktvielu un PAC alternatīvu izmantošanu dažādu produktu un izstrādājumu kvalitātes uzlabošanai un saglabāšanai, mizas atlikumu izmantošanu papildu enerģijas ieguvei un dažādu materiālu īpašību modificēšanai. Shēma ļauj kombinēt tās klasterus atkarībā no reģionālajiem apstākļiem, t. i., vajadzības pēc noteikta produkta, esošās izejvielu bāzes, izejvielu un produktu piegādes loģistikas utt. Lapkoku mizas vienkāršota biorafinērijas shēma parādīta 19. attēlā.



19. attēls. Lapkoku mizas vienkāršota biorafinērijas shēma.

SECINĀJUMI

1. Noskaidrots, ka no baltalkšņa, melnalkšņa, oša un blīgznas mizām lielāko proantocianidīnu saturošo ekstraktvielu (PACE) un proantocianidīnu (PAC) iznākumu nodrošina baltalkšņa un melnalkšņa mizas.
2. Blīgznas miza ir potenciāls katehīna un katehīna dimēra ieguves avots.
3. Noteikti optimālie PACE un to sastāvā esošo PAC izdalīšanas režīmi no baltalkšņu mizas vienpakāpes ekstrakcijā, kā ekstrahentu izmantojot 40 % etanolu. Lai samazinātu elektroenerģijas patēriņu, iespējams aizvietot konvektīvo sildīšanu ar augstfrekvences sildīšanu.
4. Veicot secīgu ekstrakciju ar heksānu, etilacetātu un 40 % etanolu, iespējams papildus iegūt triterpenoīdus un zemmolekulāros polifenolus, kā arī nedaudz palielināt PAC iznākumu, tomēr būtiski pieaug elektroenerģijas patēriņš, kas nav ekonomiski izdevīgi.
5. Izpētīts Latvijā augošu lapkoku mizas PACE un PAC ķīmiskais sastāvs un struktūra. PACE dominējošie komponenti ir ogļhidrāti, polifenoli un to glikozīdi, bet PAC veido procianidīna vienības, kuros katehīna/epikatehīna monomēra vienības oligomēros ar polimerizācijas pakāpi 2–5 ir saistītas ar C4–C8 saiti.
6. Pierādīta PACE un PAC augstā radikāļu dezaktivēšanas efektivitāte, kas ļauj ekstraktvielas izmantot kā antioksidantus vai piedevas veselības aprūpē un profilaksē, PU plēvju, lipīdus saturošo pārtikas produktu un kosmētisko līdzekļu stabilizācijai.
7. Parādītas PACE izmantošanas iespējas adhezīvu iegūšanai kokskaidu plātņu un saplākšņu ražošanā, daļēji vai pilnīgi aizvietojot komerciālos FF sveķus, kā arī daļējai naftas izcelsmes fenolu aizvietošanai komerciālo FF sveķu sintēzē.
8. Lapkoku mizas atlikumus pēc ekstrakcijas iespējams izmantot kā izejvielu nanoizmēru pildvielu iegūšanai, par 80 % palielinot skujkoksnes celulozes papīra mehānisko stiprību, vai kā cieto biokurināmo to palielinātās siltumspējas dēļ.

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

1. Telysheva G., Dizhbite T., Bikovens O., Ponomarenko J., **Janceva S.**, Krasilnikova J. Structure and antioxidant activity of diarylheptanoids extracted from bark of grey alder (*Alnus incana*) and potential of biorefinery-based bark processing of European trees. - *Holzforschung*, 2011, 65(4), pp. 623–629, <http://dx.doi.org/10.1515/HF.2011.096>. WoS, Scopus.
2. **Janceva S.**, Dizhbite T., Telisheva G., Spulle U., Klavinsh L., Dzenis M. Tannins of deciduous trees bark as a potential source for obtaining ecologically safe wood adhesives. – In: *Environment, Technology, Resources: Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference*, June 20-22, 2011, Rezekne (Latvia), Volume I, RA Izdevniecība: Rezekne, 2011, pp. 265–270. WoS, Scopus.
3. **Janceva S.**, Dizhbite T., Telysheva G., Arshanitsa A., Spulle U., Klavinsh L., Dzenis M. Isolation and testing of condensed tannins from alder bark for obtaining environment friendly adhesives and biofuel granules. – In: *The third Nordic Wood Biorefinery Conference NWBC 2011*, 22–24 March, 2011, Stockholm, Sweden, pp. 351–352.
4. Arshanitsa A., Krumina L., **Janceva S.**, Telysheva G. Study of the reactivity of Kraft and organosolv lignins with 4,4'-diphenylmethane diisocyanate and characterization of the obtained products. – In: *The third Nordic Wood Biorefinery Conference NWBC 2011*, 22-24 March, 2011, Stockholm, Sweden, pp. 348–350.
5. Teliševa, G.; Dižbite, T.; Krasilņikova, J.; Ponomarenko, J.; **Janceva S.**; Bikovens, O.; Roze, L.; Lauberts, M.; Andersone, A., Latvijas koku sugu mizas valorizācija fitoķīmikāliju un biomateriālu ar pievienoto vērtību ieguvei. Vietejo resursu (zemes dziļū, meža, pārtikas un transporta) ilgtspējīga izmantošana-jauni produkti un tehnoloģijas (*NatRes*), VPP 2010–2013 rakstu krājums, 2013, Rīga, KĶI, lpp. 136–140.
6. **Janceva S.**, Papadopoulou E., Kulish L., Lauberts M., Dizhbite T., Telysheva G. Evaluation of grey alder bark tannin as phenol substitute in the synthesis of phenol-formaldehyde resins suitable for plywood. 13th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, EWLP-2014, Seville, Spain, June 24–27, 2014, pp. 443–446.
7. **Janceva S.**, Dizhbite T., Vevere L., Telysheva G., Dzenis M. Characterization of bark extract from deciduous trees with emphasis on their antioxidant activity. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 111, Baltic Polymer Symposium 2015, Sigulda, September 16.–18., 2015, 1–4 pp., doi: 10.1088/1757-899X/111/1/012013, WoS, Scopus.
8. **Janceva S.**, Dizhbite T., Telysheva G., Vevere L., Krasilnikova J., Dzenis M. Assessment of alder trees bark potential as a renewable source of proanthocyanidins in Latvia. -*Materials Science and Applied*, 2016, No 33, 26–30 pp., doi: 10.1515/msac-2016-0005.

9. **Janceva S.**, Lauberte L., Dizhbite T., Telysheva G., Krasilnikova J., Dzenis M. Proanthocyanidins rich extracts from bark of deciduous trees growing in Latvia as antioxidant additive for lipid based systems. -14th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Autrans, France, June 28–30, 2016, 413–416 pp.
10. Laka M., Vikele L., Rozenberga L., **Janceva S.** Nanoparticle Fillers obtained from wood processing wastes for reinforcing of paper. AIP Conf. Proceedings, 2016, No 1736, <http://dx.doi.org/10.1063/1.4949687>. WoS, Scopus.
11. **Janceva S.**, Andzs M., Tupciauskas R., Telysheva G., Dizhbite T., Dzenis M. Condensed tannins rich grey alder bark extract potentials as a raw material for wood adhesive production. Proceedings of the 12 th meeting of the Northern European Network for Wood Science and Engineering (WSE). Wood science and engineering. 12th Annual Meeting of the Northern European Network for Wood Science and Engineering WSE, Riga, Latvia, September 12–13, 2016, 58–62 pp.
12. **Janceva S.**, Lauberte L., Dizhbite T., Krasilnikova J., Telysheva G., Dzenis M. Protective effects of proanthocyanidins extracts from bark of deciduous trees in lipid systems. *Holzforschung*, 2016, doi:10.1515/hf-2016-0185. WoS, Scopus.
13. **Janceva S.**, Lauberts M., Lauberte L., Arsanica A., Dizbite T., Telysheva G. Bark of European deciduous trees as a potential source for production of proanthocyanidins-rich extract. ISCHP 2017 – International Scientific Conference on Hardwood Processing (6th Edition), Lahti, Finland, September 25–27, 2017 (iesniegts publicēšanai ISCHP-2017 rakstu krājumā).

Patents

Krasilnikova J., Zalomonson M., Teliševa G., Dižbite T., **Janceva S.** Latvijas Republikas Patents 15130 A. Līdzeklis piruvāta līmeņa pazemināšanai asins plazmā. Patenta pieteikšanas datums 20.06.2016. <http://www.lrpv.gov.lv/sites/default/files/20160620.pdf>.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Kabir M. S. H., *et. al.* Evaluation of total flavonols, total proanthocyanidins content and thrombolytic activity of methanol extracts of three Bangladeshi plants // *International Journal of Pharmacy*. – 2015, – No 5(3), – 747–751 pp.
2. Г. Г. Борисова, А. А. Ермошин, М. Г. Малева, Н. В. Чукина. ОСНОВЫ БИОХИМИИ ВТОРИЧНОГО ОБМЕНА РАСТЕНИЙ. Учебно-методическое пособие. – Екатеринбург Издательство Уральского университета, 2014, ISBN 978-5-7996-1296-2, 40–41 с.
3. Garcia D. E., Glasser W. G., Pizzi A., Paczkowski S. P., Laborieef M.-P. Modification of condensed tannins: from polyphenol chemistry to materials engineering // *New J. Chem.* – 2016, – No 40, – 36–49 pp.
4. Oligomeric Proanthocyanidins (OPCs) // *Alternative Medicine Review*. – 2003, – No 8 (4), 442–450 pp.
5. Porter L. J. Structure and chemical properties of the condensed tannins // Chapter, *Plant Polyphenols*, Volume 59 of the series *Basic Life Sciences*, – 245–258 pp., doi: 10.1007/978-1-4615-3476-1.
6. Fine A. M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and hytopharmaceutical applications// *Alternative Medicine Review*. – 2000, – No 5 (2), – 144–151 pp.
7. Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds // *Food and Chemical Toxicology*. – 2002, No 40, – 599–607 pp.
8. Oliff H. S., Barrett M. Scientific and clinical monograph for Pycnogenol®. American Botanical Council. // Internets – http://abc.herbalgram.org/site/DocServer/Pycnog_FullMono120809_LOW.pdf?docID=1741.
9. Pycnogenol // Internet- <http://www.pycnogenol.com/home/>.
10. Stuard S., Belcaro G., Cesarone M. R., *et al.* Kidney function in metabolic syndrome may be improved with Pycnogenol // *Panminerva Med.* – 2010, – No 52 (2 Suppl 1), – 27–32 pp.
11. Belcaro G., Luzzi R., Dugall M., Ippolito E., Saggino A. Pycnogenol® improves cognitive function, attention, mental performance and specific professional skills in healthy professionals aged 35–55 // *J. Neurosurg Sci.* – 2014, – No 58, – 239–248 pp.
12. Khanna S., Venojarvi M., Sashwati R., Sharma N., Trikha P., *et. al.* Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2002, – No 33 (8), – 1089–1096 pp.
13. Mehansho H., Butler L. G., Carlson D. M., Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms // *Annual Review of Nutrition*. – 1987, – No 7, – 423–440 pp.
14. Vchovsek U., Vanzo A., Nemanic J. Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine, cv. Blaufränkisch // *Vitis*. – 2002, – No 41 (1), – 47–51 pp.

15. Genebra T., Santos R. R., Francisco R., Pinto-Marijuan M., Brossa R., et al. Proanthocyanidin accumulation and biosynthesis are modulated by the irrigation regime in Tempranillo seeds // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014, – No 15(7), – 11862–11877 pp., doi: 10.3390/ijms150711862.
16. Патент – 2072895. Способ получения сорбента ионов металлов (варианты) и способ выделения металлического элемента из его раствора. 1997 г.
17. Ogata T., Nakano Y. Mechanisms of gold recovery from aqueous solutions using a novel tannin gel adsorbent synthesized from natural condensed tannin // *Water Research*, – 2005, – No 39 (18), – 4281–4286 pp.
18. Docker / Internets – [http:// https://litoshop.ru/Neytralnyy-preobrazovatel-rzhavchiny-DOCKER-NITTRON-11_1649t.html](http://https://litoshop.ru/Neytralnyy-preobrazovatel-rzhavchiny-DOCKER-NITTRON-11_1649t.html).
19. Wan Nik W. B., Hajar H. M., Noor Idora M. S., Suriani M. J., Yabuki A. Effect of mangrove bark condensed tannins (*Rhizophora apiculata*) as corrosion inhibitor for mild steel in simulated splash zone // *Journal of Scientific Research and Development*. – 2015, – No 2 (13), – 59–63 pp.
20. Benmeziane, F., Djamaï, R., Cadot, Y. and Seridi, R. Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis Vinifera*) // *International Food Research Journal*, – 2014, – No 21 (3), – 1061–1065 pp.
21. Wengui D., Ohara S., Hashida K., Makino R. Condensed tannins from steamed *Acacia mearnsii* bark // *Holzforschung*, –2005, – No 59(3), – 289–294 pp.
22. Chew K. K., Ng S. Y., Thoo Y. Y., Khoo M. Z., Wan Aida W. M., Ho C. W. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts // *International food research journal*, – 2011, No 18, – 571–578 pp.
23. Janceva S. Baltalkšņa kondensēto tanīnu (proantociānīdīnu) raksturošana un testēšana videi draudzīgo adhezīvu iegūšanai // *RTU*, – 2010, – 33–35 pp.
24. Nadji H., Bruzzese C. Oxypropylation of lignins and preparation of rigid polyurethane foams from the ensuing polyols // *Macromolecular Material and Engineering*. – 2005, – 290, – 1009–1016 pp.
25. Rodrigo Briones a, Luis Serrano. Polyol production by chemical modification of date seeds // *Industrial Crops and Products*, – 2011, – 34, – 1035–1040 pp.
26. Bridgeman T., Jones J., Shield I., Williams P. Torrefaction of reed canary grass, wheat straw and willow to enhance solid fuel qualities and combustion properties // *Fuel*. – 2008, – No 87, 844–856 pp.
27. Friedl A., et al. Prediction of heating values of biomass fuel from elemental composition // *Anal. Chem*, – 2005, – 554, – 191–198 pp.
28. Papadopoulou E. The challenge of bio-adhesives for the wood composite industries / Internets-http://www.chimarhellas.com/wp-content/uploads/2009/03/paper_9th-pacific-rim_final-2_.pdf
29. Lauberts M., Telysheva G., Venskutonis P. R., Lauberte L., Dizhbite T., Kazernavičiute R., Pukalskas A. Diarylheptanoid rich extract of grey and black alder barks – an effective dietary antioxidant in mayonnaise // *Chemical Papers*, -2016, DOI :10.1007/s11696-016-0017-3.