

漆酶活化碱木质素的磺甲基化反应活性研究*

杨东杰 周海峰 谢绍胸 伍晓蕾 邱学青**

(华南理工大学化学与化工学院 制浆造纸国家重点实验室 广州 510640)

摘 要 采用漆酶对碱木质素进行活化预处理,并对活化碱木质素进行磺甲基化改性,揭示了漆酶活化对碱木质素磺甲基化反应活性影响的作用机理.采用顶空气相色谱、红外光谱、凝胶渗透色谱、核磁共振等研究了漆酶活化碱木质素的结构特征,结果表明,漆酶对碱木质素既有聚合作用又有解聚作用,分子量变化不大,多分散性增加;漆酶活化使得碱木质素发生脱甲基作用,酚羟基含量增大,紫丁香基含量减低;另外,漆酶可氧化酚羟基变成苯氧自由基使碱木质素聚合.采用分子模拟对漆酶活化碱木质素的电子云密度进行了计算,结果表明脱甲基作用增大了木质素苯环上的电子云密度,有利于磺甲基化反应的进行.采用电位滴定测试磺甲基化产物的磺化度来表征其反应活性的大小,结果表明漆酶活化磺甲基化碱木质素的磺化度提高了35%,且对二氧化钛悬浮体系的分散性能得到明显提高.

关键词 漆酶,碱木质素,磺甲基化反应活性,分散性能

木质素是植物中含量仅次于纤维素的高分子聚合物,它的研究开始于100多年前,Freudenberg^[1]和McCarthy^[2]等学者认为,木质素是由苯基丙烷类聚合物(主要是愈创木基、紫丁香基和对羟基苯丙基)在酶引发和化学作用下,通过对羟基肉桂基前体脱氢以碳碳键和醚键等高度交联聚合而成的高分子.

碱木质素是碱法制浆过程的副产品,为天然木质素的次级转化产物,分子中含有酚羟基、醇羟基、羰基、羧基等活性官能团,对木质素进行改性,可赋予其乳化、分散、稳定等性能,应用于油田用表面活性剂、混凝土添加剂、农用化学品、工业黏合剂、建筑业、染料和农业等多个领域^[3-6].然而,碱木质素在反应条件剧烈的制浆过程中,破坏了原有木质素的结构,造成了木质素的反应活性降低;同时木质素分子中缺乏强亲水性官能团,水溶性差及易于聚集^[7],限制了其工业应用.

为提高碱木质素的应用性能,常用的改性方法是化学法,如通过氧化、羟甲基化、磺化、磺甲基化、接枝共聚等^[8,9]反应增加其亲水性官能团含量或提高其分子量等.磺化反应是提高碱木质素水溶性,赋予其表面活性及分散性能的重要途径,一直是国内外的研究热点.对于木质素的磺化反

应人们初期一般采用高温磺化法,即将木质素与亚硫酸钠在150~200℃下反应,使木质素侧链的 α 碳位上引入磺酸基^[10].然而,高温磺化反应的成本较高,我们前期研究表明在氧化剂作用下碱木质素的自由基磺化反应可在较低温度下进行^[11],利用微波辅助氧化磺化工艺制备的木质素磺酸盐的磺化度可达到1.75 mmol/L,高于其他氧化剂和氧化条件下的产物. Matsushita等^[12]以木浆碱木质素为原料,用苯酚活化后采用磺甲基化、羟甲基化和芳基磺化工艺,所得产物用作石膏分散剂时的分散性能都比作为商业用途的木质素磺酸盐(来源于酸法制浆副产品)好.当木质素溶于碱性介质,经与甲醛反应引入羟甲基以后,可在较低温度条件下与亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦硫酸钠、二氧化硫等发生磺甲基化反应,在愈创木基和对羟基苯基的酚羟基邻位引入磺酸基.此时,侧链的磺化反应则较少发生. Adler等^[13]在100~160℃条件下,利用甲醛和亚硫酸钠与木质素进行磺甲基化反应,生产水溶性木质素磺酸钠.1985年, Dilling^[14]采用 Adler发明专利的条件将碱木质素磺甲基化后可用作染料分散剂. Pang等^[15]对木质素磺酸钙进行了氧化、羟甲基化、磺甲基化改性,并研究了改性对木质素磺酸钙在碱性溶液中

* 2012-07-20 收稿,2012-10-11 修稿;国家重点基础研究发展计划(973计划,项目号2012CB215302,2010CB732205)、国家杰出青年科学基金(基金号20925622)和国家自然科学基金(基金号21176096)资助项目.

** 通讯联系人, E-mail: cexqiu@scut.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2013.12222

的表面活性、发泡能力、吸附能力、分散能力、络合能力的影响. 研究发现羟甲基化和磺甲基化均能提高木质素磺酸钙的表面活性、发泡能力. Wu 等^[16]采用氧化及磺甲基化反应对碱法萃取的玉米秆木质素进行改性, 发现其表面活性得到明显改善. 尽管木质素的磺化改性得到了广泛的应用, 但仍存在反应温度偏高, 磺化产物磺化度低等缺点, 如何提高碱木质素磺化反应的反应活性仍需进一步探讨.

碱木质素的化学改性需添加大量化学试剂, 如强酸、碱、加高压等, 条件相对剧烈, 副反应多, 相对而言, 生物法活化具有反应条件温和, 绿色环保, 增加某一活性官能团的同时较少破坏其他活性官能团的特点^[17].

目前应用于木质素生物反应中最广泛的微生物和酶分别为白腐菌和漆酶. 1994 年, Call 等^[18]申请了关于漆酶催化反应中使用的氧化还原介体的专利, 这一发现导致对各种漆酶和介体, 以及纸浆漂白之外的各种应用的过热研究. 研究表明, 漆酶对木质素类底物既有聚合作用又有解聚作用, 可使木质素分子内一些联结键断裂, 发生脱羧基、脱甲基等作用, 也可氧化酚羟基变成苯氧自由基, 使木质素分子交联^[17,19,20]. 目前, 生物改性木质素的研究主要用于生物制浆、生物漂白、废水处理等领域^[21]. 由于木质素本身的结构复杂, 漆酶对木质素的作用机理至今仍未研究透彻, 尤其是采用漆酶对碱木质素进行结构修饰进而提高反应活性的研究鲜见报道.

本文利用漆酶对碱木质素进行活化预处理, 并对活化碱木质素进行磺甲基化反应. 采用顶空气相色谱、红外光谱、凝胶渗透色谱、核磁共振等研究了漆酶活化对碱木质素结构的影响, 采用电位滴定测试磺甲基化产物的磺化度来表征其反应活性的大小, 采用分散稳定仪等研究磺化产物对悬浮体系的分散性能.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

杨木碱木质素 (alkali lignin, KL), 由图们市石岬前进化工股份合作公司提供, 来源于杨木碱法制浆废液. 实验中所用的 2,2-连氮基-二(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸盐) (ABTS)、57% 氢碘酸 (HI)、福林酚 (FC) 试剂及香草醛由 Sigma 提供. 所有其他的试剂均为分析纯.

二氧化钛粉末, 由天津科密欧化学试剂有限公司提供, 纯度为 99%. 二氧化钛颗粒的粒径由 EyeTech 激光粒度粒形分析仪 (荷兰 ANKERSMID L 有限公司) 测定, 平均直径大小 5.43 μm .

漆酶由上海丹尼悦生物科技有限公司提供, 漆酶酶活^[22]定义为在 pH = 4.9 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 40℃ 时每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需要的酶量为一个活力单位, 即 1 U. 实验测得所用漆酶的酶活为 88 U/g.

1.2 碱木质素的漆酶活化方法

用 pH = 4.9 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液配制 100 g/L 的碱木质素溶液, 分别加入 5、20 U/g 漆酶 (以碱木质素的质量计), 在平行反应器上 (Carousel, 英国 Radleys 公司) 于 40℃ 下反应不同时间后, 煮沸 10 min 使漆酶失活, 过滤, 将滤液冷冻干燥后, 得到漆酶活化碱木质素. 空白 (control) 是指没有经过漆酶活化的碱木质素.

1.3 碱木质素的磺甲基化反应

将 5 g 碱木质素溶于 10% 的 NaOH 溶液中, 升温到 75℃ 后, 加入 37% 的甲醛溶液 1.0 g, 恒温反应 90 min 后, 升温至 90℃, 加入无水 Na_2SO_3 0.5 g, 恒温反应 2 h 后冷却出料, 离心分离出不溶物, 得到磺甲基化碱木质素 (sulfomethylated alkali lignin, SKL) 溶液.

1.4 磺化度的测定

磺甲基化碱木质素经阴阳离子交换树脂纯化, 除去溶液中的有机酸分子、盐类和不纯物, 采用瑞士 Metrohm 公司 809 Titrando 自动电位滴定仪测定^[11].

1.5 分子量分布测试

磺甲基化碱木质素的分子量及其分布的测定采用凝胶渗透色谱法. Waters 1515 Isocratic HPLP pump/Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector 凝胶色谱仪 (美国 Waters 公司). 色谱柱由 UltrahydrationTM 500, UltrahydrationTM 250 和 UltrahydrationTM 120 柱串联构成, 柱温 30℃, 流动相为 0.1 mol/L NaNO_3 , 流速 0.5 mL/min, 进样体积 60 μL , 以聚苯乙烯磺酸钠为标准物质.

1.6 酚羟基含量的测定

以香草醛为标准品, 采用 FC 法^[23]测定碱木质素样品中的酚羟基含量.

1.7 甲氧基含量的测定

以碘甲烷为标准品, 采用顶空气相色谱法^[24]测定甲氧基的含量. GC9800 气相色谱仪 (上海科

创色谱仪器有限公司);DK-3001A 型顶空进样器及顶空瓶和手动压盖器(北京中兴分析仪器新技术研究所). 顶空条件:顶空瓶加热温度为 60℃,进样环温度为 120℃,传输线温度为 140℃;样品平衡时间为 30 min. 色谱条件:色谱柱,DB-624 (60 m×0.32 mm×1.8 μm);载气,高纯氮气;氢气流量,25 mL/min;空气流量,300 mL/min;柱压,0.05 MPa;进样口温度,260℃;FID 检测器温度,270℃;分流比,10:1.

1.8 红外吸收光谱测试

碱木质素及其磺甲基化样品的红外光谱分析在美国 Thermo 公司的 Nicolet 型红外光谱仪上进行. 扫描范围为 4000~400 cm⁻¹;分辨率 4 cm⁻¹;样品与 KBr 的质量比为 1:100.

1.9 ¹H-NMR 测试

取 30 mg 碱木质素样品溶于 0.5 mL 氘代二甲亚砜(DMSO-d₆)试剂中,采用德国 Bruker 公司 400 MHz DRX-400 核磁共振仪测试碱木质素

样品的¹H-NMR 谱图.

1.10 分散稳定性测试

磺甲基化碱木质素对二氧化钛悬浮体系的分散稳定性测试采用分散稳定性分析仪(法国 Formulaction 公司)进行测试. 悬浮体系的固含量为 10 wt%,磺甲基化碱木质素的用量为二氧化钛的 0.5 wt%,测试方法见文献[25]. 采取程序扫描,2 min/次共 1 h,在 25℃下对样品进行扫描.

2 结果与讨论

2.1 漆酶活化对碱木质素的磺化度和分子量的影响

碱木质素的磺甲基化反应历程如图 1 所示,第一步是碱木质素的羟甲基化,甲醛与木质素的苯环上发生亲电加成反应,这是进一步磺甲基化反应的关键,第二步是羟甲基化碱木质素的磺甲基化反应.

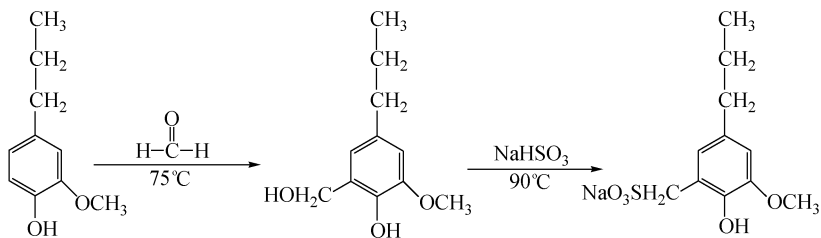


Fig. 1 Synthesis of sulfomethylated lignin model

图 2 为不同漆酶用量不同活化时间对磺化碱木质素磺化度的影响. 由图 2 可以看出,随着活化反应时间的延长,磺化度先增大后减小,当漆酶活化时间为 24 h 时,磺化度达到最大值. 增大漆酶的用量,磺化度增大,但磺化度增大的幅度并不

大. 当漆酶用量为 20 U/g,活化 24 h 时,碱木质素的化学反应活性提高约 35%.

磺甲基化碱木质素的分子量大小对其性能有较大影响,Yang 等^[26]的研究表明,较高分子量的木质素磺酸钠具有更好的分散降粘效果. 因此,本文测试了经漆酶活化后,磺甲基化碱木质素的分子量大小,结果列于表 1 中,经漆酶活化后,磺甲

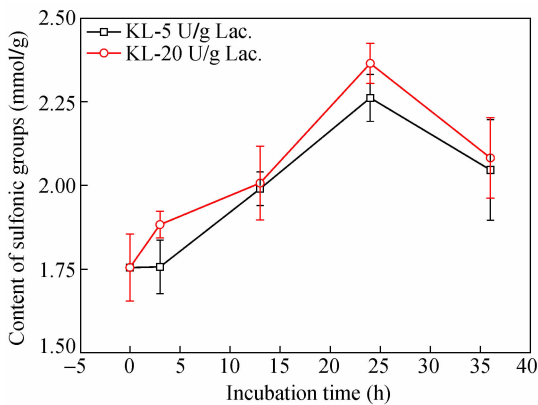


Fig. 2 Influence of different dosages of laccase on the content of sulfonic groups of SKL at different incubation times

Table 1 Influence of different dosages of laccase on the molecular weight distribution of SKL at different incubation time

Dosage of laccase (U/g)	Incubation time (h)	M _n	M _w	M _w /M _n
Control		2200	2900	1.30
5	3	2300	2900	1.31
5	12	2300	3100	1.35
5	24	2500	3400	1.42
5	36	2300	3000	1.37
20	3	2300	3100	1.33
20	12	2300	3300	1.36
20	24	2500	3500	1.44
20	36	2200	2900	1.38

基化碱木质素的分子量变化不大,随着活化时间的延长,分子量先少许增大后减小,多分散性也先增大后减小.当增大漆酶用量时,分子量及多分散性指数均略有增加,差别不大,这与磺化度的变化规律一致.漆酶对木质素类底物既具有聚合作用又具有解聚作用,Nugroho 等^[27]和 Areskog 等^[28]的研究表明,漆酶氧化末端酚羟基生成稳定的苯氧自由基,进行自由基-自由基交联导致分子量增大,酚羟基含量减少.然而,漆酶也可使木质素分子内一些联结键断裂^[17,29],发生脱羧基、脱甲基等作用,使分子量降低^[19,20].本文中,分子量的增大伴随着多分散性及磺化度的增大,这很可能是由于漆酶优先作用于较小的木质素分子,使小分子木质素降解,并与大分子木质素聚合,木质素分子暴露出更多的活性位点,磺化度增大;后期分子量、多分散性及磺化度的降低,很可能是因为部分大分子木质素降解及小分子木质素之间聚合造成的,该过程比较缓慢,因而磺化度降低.

2.2 漆酶活化对碱木质素活性官能团的影响

采用碱木质素磺甲基化反应的关键在于木质素的羟甲基化反应,该反应是亲电加成反应,甲氧基、醚化或非醚化的羟基对苯环有供电作用.因此,本文测定了漆酶活化对碱木质素中的甲氧基及酚羟基含量的影响,以揭示其漆酶活化反应机理.

碱木质素样品中甲氧基含量的测定采用顶空气相色谱法.根据 Zeisel 确立的化学法测定有机物中甲氧基含量的原理,采用 57% 的 HI 使之转变成 CH₃I,采用气相色谱进行定量分析.

比较了 CH₃I 标准品与经 HI 处理后的碱木质素样品的气相色谱图,结果如图 3 所示,由图可知,碱木质素样品的出峰时间与 CH₃I 标准品基本一致.以保留时间为 10.6 左右的峰面积为纵坐标,采用不同质量的 CH₃I 制备标准曲线为 $y = 11523.7x - 3986.9, R^2 > 0.99$, x 表示的是 CH₃I 质量 (mg), y 表示的是峰面积.

根据峰面积计算其甲氧基含量,漆酶的用量和活化时间对甲氧基含量的影响结果如图 4 所示,由图可知,漆酶活化使得碱木质素发生脱甲基作用,甲氧基含量降低,且随着漆酶用量的增加,降低幅度增加.

图 5 是不同漆酶用量不同活化时间对碱木质素酚羟基含量的影响,随着漆酶活化时间的延长,酚羟基含量先增大后减小,但是当漆酶用量为 5

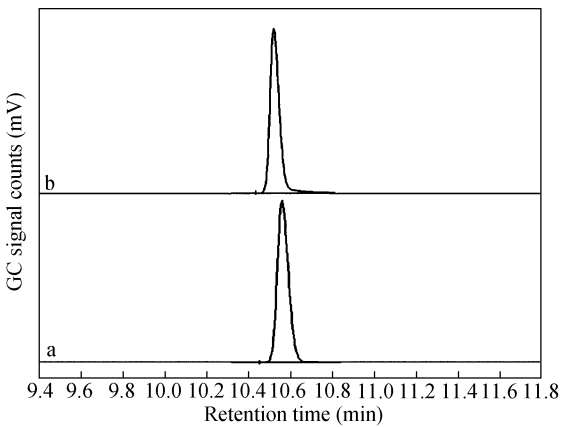


Fig. 3 Chromatograms of CH3I (a) and KL (b)

U/g 时,酚羟基含量先减小,而后增大又减小,酚羟基的含量是一个动态变化的过程.随着漆酶用量增加到 20 U/g,酚羟基的含量增大.这主要是由于漆酶的氧化作用使碱木质素发生脱甲基作用,使得酚羟基含量增大,同时,漆酶可氧化酚羟基变成苯氧自由基,进行非选择性交联使得分子量增大,导致多分散性增大.当漆酶用量较少时,活化初期,漆酶优先作用于酚羟基,导致酚羟基含量减少,另外有少量的漆酶作用于碱木质素的甲氧基及其他联结键,使得甲氧基含量略有减少,而随着活化时间的延长,甲氧基含量逐渐减少,酚羟基含量开始增大.当加大漆酶用量时,脱甲基作用相对较强,使酚羟基含量增大.

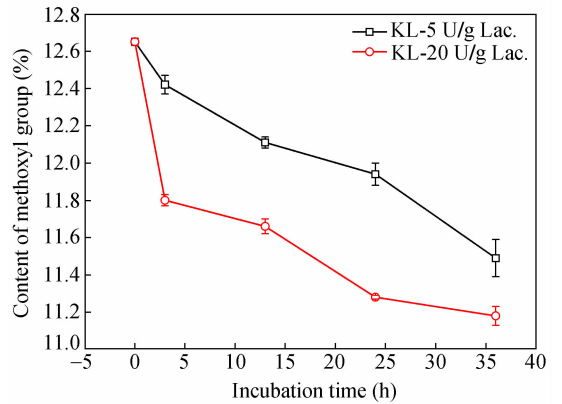


Fig. 4 Influence of different dosages of laccase on the content of methoxyl group of KL at different incubation times

由图 4 和图 5 结果可见,当活化时间达到 24 h 后,酚羟基的量不再增大,甲氧基的变化也趋于稳定,这很可能是由于漆酶脱甲基的作用已达到极限造成的.结合图 2 结果可见,虽然当漆酶用量较少时,酚羟基的含量低于未活化碱木质素,但是活化磺甲基化产品的磺化度还是呈增大趋势的,

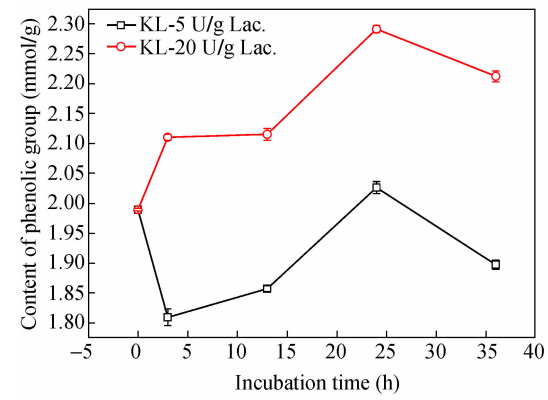


Fig. 5 Influence of different dosages of laccase on the content of phenolic group of KL at different incubation times

这主要是因为漆酶的氧化作用使得碱木质素分子暴露出更多的活性位点以及部分联结键锻炼引起的空间位阻的减弱造成的。

2.3 漆酶活化碱木质素及磺甲基化产品的红外光谱

红外光谱被广泛用来研究木质素的结构^[30],图6谱线a,b为未活化碱木质素以及漆酶用量20 U/g,活化时间为24 h时碱木质素样品的红外光谱图.由图可知,漆酶活化并不会引起官能团的消失或者增加,只是官能团的含量发生了变化.

采用红外光谱的半定量法来研究活化前后碱木质素中官能团含量的变化,分析计算了碱木质素苯环在1578,1500和1417 cm⁻¹(*A*₁₅₇₈, *A*₁₅₀₀和*A*₁₄₁₇)处^[31]的特征吸收峰峰面积,其中*A*₁₄₂₅/*A*₁₅₀₀比值约为1.087,在误差范围内可视为定值,表明漆酶活化并不会影响木质素的苯环结构,反应主要发生在侧链及苯环上的活性官能团上.以1500

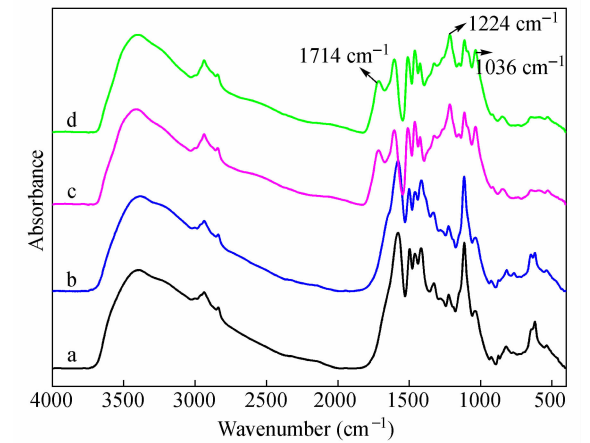


Fig. 6 IR spectra of KL and SKL (a) KL-Control, (b) KL-20U/g Lac., 24 h, (c) SKL-Control and (d) SKL-20U/g Lac., 24 h

cm⁻¹处的苯环振动峰作为参照吸收峰,分别计算了木质素的其他特征吸收峰与峰1500 cm⁻¹的峰面积比,结果列于表2中.在3388 cm⁻¹附近的宽吸收峰是O—H的伸缩振动吸收所引起的,经漆酶活化后,其含量增大;2841 cm⁻¹附近的吸收归峰属于—OCH₃中C—H的伸缩振动吸收^[32,33],活化后含量降低.1327 cm⁻¹为酚羟基和甲基的面内变形振动,1292 cm⁻¹归属于愈创木基苯环的呼吸振动,1226 cm⁻¹为酚醚键中C—O的伸缩振动,1116 cm⁻¹归属于紫丁香基苯环的呼吸振动和环上C—O的伸缩振动^[31,34,35],经漆酶活化后,紫丁香基的含量减少,酚羟基含量增大,说明活化过程存在脱甲基作用;另外C—O键有所增加,表明漆酶活化过程存在一定程度的聚合作用,导致分子量增大.

Table 2 IR bands assignment of KL and the ratio of the characteristic peak and the reference peak at 1500 cm⁻¹

Wavenumber	Assignment	Control	20 U/g Lac., 24 h
<i>A</i> ₃₃₈₈ / <i>A</i> ₁₅₀₀	OH stretching in phenolic and aliphatic structures	2.615	3.429
<i>A</i> ₂₉₃₅ / <i>A</i> ₁₅₀₀	C—H vibration in —CH ₃ and —CH ₂	0.932	1.370
<i>A</i> ₂₈₄₁ / <i>A</i> ₁₅₀₀	C—H vibration in methoxyl groups	1.013	0.978
<i>A</i> ₁₄₆₀ / <i>A</i> ₁₅₀₀	C—H deformations band of asymmetric methyl and methylene	0.951	0.992
<i>A</i> ₁₃₂₇ / <i>A</i> ₁₅₀₀	Aliphatic C—H stretching in methyl groups and phenolic hydroxyl	0.809	0.888
<i>A</i> ₁₂₉₂ / <i>A</i> ₁₅₀₀	G ring plus C—O stretching	0.702	0.771
<i>A</i> ₁₂₂₆ / <i>A</i> ₁₅₀₀	C—O stretching	0.690	0.752
<i>A</i> ₁₁₁₆ / <i>A</i> ₁₅₀₀	S ring and C—O stretching	1.007	0.936
<i>A</i> ₁₀₄₀ / <i>A</i> ₁₅₀₀	Aromatic C—H in-plane deformation	0.590	0.658

图6谱线c,d为直接磺甲基化碱木质素和20 U/g漆酶活化24 h后磺甲基化碱木质素样品的红外光谱图.由图可以看出,漆酶活化磺甲基化碱木质素的结构跟直接磺甲基化碱木质素是一致

的,只是官能团含量的差别.通过将磺甲基化产品与碱木质素进行对比发现,1714 cm⁻¹处出现新的峰,分析认为此处主要是未反应的甲醛的—C—O键,而1224 cm⁻¹和1036 cm⁻¹处的吸收峰明显

增大,这主要是接入的 —SO_3^{2-} 的特征吸收峰^[36].

2.4 漆酶活化碱木质素的¹H-NMR 谱图

漆酶活化碱木质素样品的¹H-NMR 如图 7 所示, $d=7.2\sim6.8$ 的区域为木质素愈创木基单元上的质子信号, $d=6.8\sim6.2$ 的区域归属于木质素紫丁香基单元上的质子信号^[37, 38], $d=5.70\sim5.3$ 之间的信号归属于 $\beta\text{--}5'$ 结构中的 H_α 、 H_β 信号, $d=5.20\sim4.90$ 之间的信号归属于残余的木聚糖的质子信号^[38], $d=4.90\sim4.75$, $d=4.70\sim4.5$ 的区域分别归属于 $\beta\text{--}0\text{--}4'$ 结构中的 H_α 、 H_β 信号^[38, 39], $d=4.0\sim3.5$ 区域为木质素甲氧基的信号峰^[39, 40]. 将氢谱各区段的信号强度积分,表征各特定区域的质子数,用以测定木质素中各结构的相对含量,结果如表 3 所示. 由表 3 可见,经漆酶活化后,木质素中紫丁香基单元含量减小,愈创木基单元含量明显增大,且甲氧基含量减小. 漆酶

的氧化作用很可能使 $\beta\text{--}0\text{--}4'$ 及 $\beta\text{--}\beta'$ 联结键上的氢信号减弱,也可能使部分联结键断裂;另外, $\beta\text{--}5'$ 结构信号略有增加,说明漆酶氧化酚羟基变成苯氧自由基,木质素分子重新聚合^[17, 41].

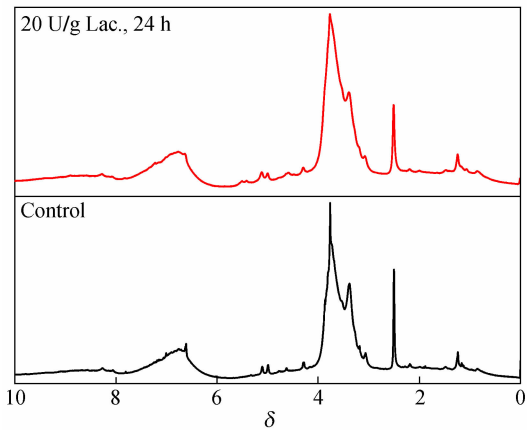


Fig. 7 ¹H-NMR spectra of KL

Table 3 Signal assignment of ¹H-NMR spectra of KL

Signal (δ)	Assignment	Control	20 U/g Lac., 24 h
7.2 ~ 6.8	H ₂ , H ₅ , H ₆ in guaiacyl units (G)	1.80	1.96
6.8 ~ 6.2	H ₂ , H ₆ in syringyl units (S)	1.89	1.46
5.7 ~ 5.25	H _{α} , H _{β} in $\beta\text{--}5'$ substructures	0.45	0.52
4.9 ~ 4.75	H _{α} in $\beta\text{--}0\text{--}4'$ structures	0.25	0.23
4.75 ~ 4.5	H _{β} in $\beta\text{--}0\text{--}4'$ structures	0.39	0.39
4.0 ~ 3.5	H in methoxyls	6.69	5.57
3.1 ~ 3.0	H _{β} in $\beta\text{--}\beta'$ structures	0.38	0.32
2.6 ~ 2.3	DMSO	1	1
2.3 ~ 2.1	H in aromatic acetates	0.51	0.56
2.1 ~ 1.8	H in aliphatic acetates	0.71	0.66
1.8 ~ 0.8	Aliphatic H	2.33	2.32

2.5 漆酶活化对碱木质素的磺甲基化反应活性影响机理分析

因甲醛与木质素的苯环发生的是亲电加成反应,且甲氧基、醚化或非醚化的羟基对苯环有供电作用,使供电基团的邻位或对位富集电子云,亲电反应容易发生在供电基团的邻位和对位. 经漆酶活化后,紫丁香基脱甲基作用导致酚羟基含量增大,图 8 表示的是木质素单体模型化合物紫丁香

基(LA)经漆酶活化后变成 LB 的空间立体结构和电子云密度图.

其空间构象采用 ChemBio3D Ultra 11.0 软件通过分子动力学势能最小方法进行了优化. 对 LA, LB 苯环 C₂ 和 C₆ 上的电子云密度分布进行了计算,结果列于表 4 中,经漆酶活化后的 LB 模型化合物上的电子云密度明显高于未经漆酶改性的 LA 模型,说明甲氧基转变为羟基能增加苯环的羟

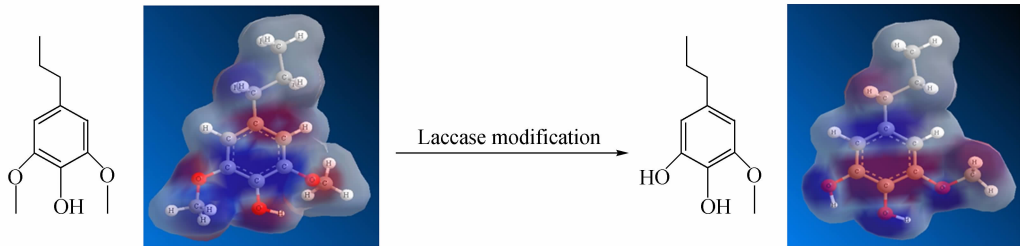


Fig. 8 Charge density of lignin model compounds

甲基化反应活性. 然而,当漆酶用量较少时,尽管有一定的脱甲基化作用,但是酚羟基含量减少,此时化学反应活性的提高主要归因于化学键断裂后空间位阻作用的减弱.

Table 4 Charge density of lignin model compounds on C₂ and C₆

Lignin model	Charge density on C ₂ and C ₆	
	C2	C6
LA	-0.185	-0.192
LB	-0.202	-0.212

2.6 漆酶活化磺甲基化碱木质素对二氧化钛体系的分散稳定性的影响

采用分散稳定仪研究了漆酶活化磺甲基化碱木质素对 TiO₂体系的分散稳定性的影响. 由图 9 和图 10 可见,漆酶活化磺甲基化碱木质素样品对二氧化钛体系的分散稳定性明显高于直接磺甲基化碱木质素,当漆酶用量为 20 U/g 时,其粒径显著降低,基本稳定在 2.3 μm,不会发生团聚.

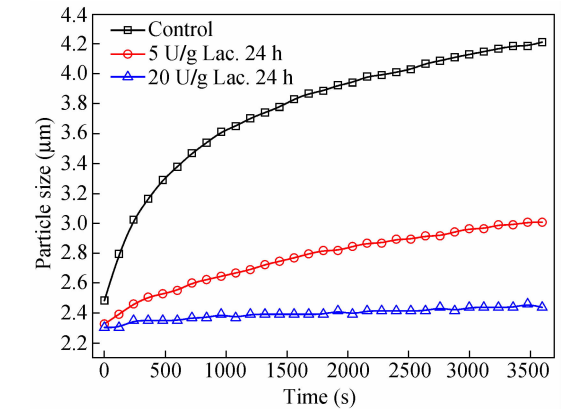


Fig. 9 Influence of SKL by laccase modification on the particle size of TiO₂ slurry

采用分散稳定仪可表征二氧化钛体系的分散稳定性,其与相对于初始状态时二氧化钛悬浮体系的反射光、透射光的强度变化速率有关. 二氧化钛悬浮体系随时间变化的反射光、透射光的光强度变化越小,稳定性越好^[25]. 漆酶活化磺甲基化碱木质素对二氧化钛悬浮体系的反射光强的影响

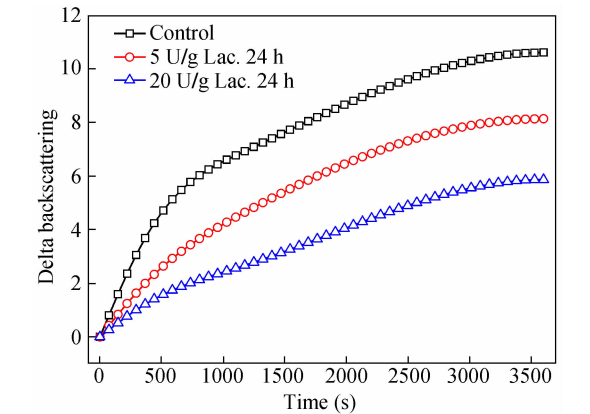


Fig. 10 Influence of SKL by laccase modification on the delta backscattering of TiO₂ slurry

如图 10 所示,随放置时间的延长,反射光的强度增加,而经漆酶活化后,反射光的强度变化最小, TiO₂体系的分散稳定性得到显著提高.

3 结论

采用漆酶对碱木质素进行活化,碱木质素的磺甲基化反应活性明显提高. 漆酶对碱木质素具有一定的脱甲基作用,可使酚羟基含量增大,紫丁香基含量减少,使苯环上的电子云密度增大,化学反应活性提高.

漆酶对碱木质素分子中的部分联结键的断裂及脱甲基引起的空间位阻作用的减弱,也有利于化学反应活性的提高;尤其是当漆酶用量较少时,漆酶优先氧化酚羟基使得酚羟基含量减少,此时化学反应活性的提高主要是由于联结键的断裂和脱甲基化作用引起的. 由于木质素本身的结构复杂,漆酶对碱木质素的作用机理还有待进一步研究.

漆酶对碱木质素进行活化预处理不仅能提高其磺甲基化反应活性,也可使磺甲基化产物对悬浮体系的分散稳定性得到显著改善. 因此,采用漆酶活化预处理提高碱木质素的反应活性的思路对于木质素的高效利用具有重要的理论指导意义.

REFERENCES

1 Freudenberg K, Neish A C. The constitution of lignin. In: Freudenberg K, Neish A C, ed. Constitution and Biosynthesis of Lignin. Berlin: Springer-Verlag, 1968. 46 ~ 122

2 McCarthy J L, Islam A. Lignin chemistry, technology, and utilization; a brief history. In: Glasser W, Schultz T P, ed. Lignin: Historical, Biological and Materials Perspectives. Washington, DC: American Chemical Society, 2000. 2 ~ 99

3 Ouyang X P, Qiu X Q, Chen P. Colloids Surf, A: Physicochem Eng Aspects, 2006, 282: 489 ~ 497

4 Qiu X Q, Kong Q, Zhou M S, Yang D J. J Phys Chem B, 2010, 114(48): 15857 ~ 15861

5 Cheng Fa(程发),Wang Donghua(王东华),Wei Yuping(魏玉萍). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2002,(3):349~353

6 Wang Mingcun(王明存). Acta Polymerica Sinica(高分子学报),2011,(12):1433~1438

7 Deng Y H,Feng X J,Zhou M S,Qian Y,Yu H F,Qiu X Q. Biomacromolecules,2011,12:1116~1125

8 Mister J J. J Macromol Sci-Polymer Reviews,2002,C42(2):235~289

9 Liang Wenxue(梁文学),Qiu Xueqing(邱学青),Yang Dongjie(杨东杰),Lou Hongming(楼宏铭). Journal of South China University of Technology(Natural Science)(华南理工大学学报(自然科学版)),2007,35(5):117~121

10 Shin E W,Rowell R M. Chemosphere,2005,60(8):1054~1061

11 Ouyang X P,Ke L X,Qiu X Q,Guo Y X,Pang Y X. J Disper Sci Technol,2009,30(1):1~6

12 Matsushita Y,Yasuda S. Bioresour Technol,2005,96(4):465~470

13 Alder E. US patent,US2680113. 1954-06-01

14 Dilling P. US patent,US4551151. 1985-11-05

15 Pang Y X,Qiu X Q,Yang D J,Lou H M. Colloids Surf, A: Physicochem Eng Aspects,2008,312(2-3):154~159

16 Wu H R,Chen F G,Feng Q H,Yue X P. BioResources,2012,7(3):2742~2751

17 Leonowicz A,Cho N S,Luterek J,Wilkolazka A,Wojtas-Wasilewska M,Matuszewska A,Hofrichter M,Wesenberg D,Rogalski J. J Basic Microbiol,2001,41(3-4):185~227

18 Call H P. WO patent,WO/1994/029510. 1994-12-22

19 Mishra V,Pandeya S,DeClercq E,Pannecouque C,Witvrouw M,Leu Y L,Chan Y Y,Wu T S,Lopretti M,Cabella D. Process Biochem,1998,33(6):657~661

20 Ibrahim V,Mendoza L,Mamo G,Hatti-Kaul R. Process Biochem,2010,46(1):379~384

21 Widsten P,Kandelbauer A. Enzyme Microb Technol,2008,42(4):293~307

22 Childs R E,Bardsley W G. Biochem J,1975,145(1):93

23 Sousa F D,Reimann A,Björklund Jansson M,Nils-Olof N. 11th ISWPC,Nice,France,2001,3:649~653

24 Li H L,Chai X S,Liu M R,Deng Y H. J Agric Food Chem,2012,60(21):5307~5310

25 Li Pengwei(李朋伟),Yang Dongjie(杨东杰),Lou Hongming(楼宏铭),Qiu Xueqing(邱学青). Journal of Fuel Chemistry and Technology(燃料化学学报),2008,36(5):524~529

26 Yang D J,Qiu X Q,Zhou M S,Lou H M. Energy Convers Manage,2007,48(9):2433~2438

27 Nugroho Prasetyo E,Kudanga T,Østergaard L,Rencoret J,Gutiérrez A,DelRío J C,Ignacio Santos J,Nieto L,Jiménez Barbero J,Martínez A T. Bioresour Technol,2010,101:5054~5062

28 Areskogh D,Li J,Gellerstedt G,Henriksson G. Biomacromolecules,2010,11:904~910

29 Kawai S,Umezawa T,Shimada M,Higuchi T. FEBS lett,1988,236(2):309~311

30 Pandey K,Pitman A. Int Biodeterior Biodegrad,2003,52(3):151~160

31 Martínez A,Almendros G,González-Vila F,Fründ R. Solid State Nucl Magn Reson,1999,15(1):41~48

32 Tejado A,Pena C,Labidi J,Echeverria J,Mondragon I. Bioresour Technol,2007,98(8):1655~1663

33 Yuan T Q,He J,Xu F,Sun R C. Polym Degrad Stab,2009,94(7):1142~1150

34 Pandey K,Pitman A. J Polym Sci,Part A: Polym Phys,2004,42(10):2340~2346

35 Gierlinger N,Goswami L,Schmidt M,Burgert I,Coutand C,Rogge T,Schwanninger M. Biomacromolecules,2008,9(8):2194~2201

36 Shao L,Qiu J,Feng H,Liu M,Zhang G,An J,Gao C,Liu H. Synth Met,2009,159(17):1761~1766

37 Jahan M S,Chowdhury D A,Islam M K,Moeiz S M. Bioresour Technol,2007,98(2):465~469

38 Kubo S,Kadla J F. Macromolecules,2004,37(18):3904~6911

39 Balakshin M,Capanema E,Chen C L,Gratzl J,Kirkman A,Gracz H. J Mol Catal B:Enzym,2001,13(1):1~16

40 Toledano A,Serrano L,Garcia A,Mondragon I,Labidi J. Chem Eng J,2010,157(1):93~99

41 Xu Q H,Qin M H,Shi S L,Jin L Q,Fu Y J. Enzyme Microb Technol,2006,39(5):969~975

SULFOMETHYLATION REACTIVITY OF ALKALI LIGNIN WITH LACCASE MODIFICATION

Dong-jie Yang, Hai-feng Zhou, Shao-qu Xie, Xiao-lei Wu, Xue-qing Qiu

(School of Chemistry and Chemical Engineering, State Key Lab of Pulp and Paper Engineering,
South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract The alkali lignin was modified by laccase, followed by sulfomethylation. To study the mechanism of laccase modification on the influence of sulfomethylation reactivity, the control and laccase modified alkali lignins were characterized by chemical, spectroscopic and chromatographic methods. The molecular weight of sulfomethylated lignins was measured by gel permeation chromatography (GPC), and the structural changes in laccase modified lignins were characterized by functional groups measurements, headspace gas chromatography (GC), infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR). It is proposed that laccase was able to promote both polymerization and depolymerisation. The molecular weight (M_w) changed a little, but the polydispersity was larger than that of the control. The demethylation by laccase oxidation made the increase of the content of phenolic group, while the content of syringyl decreased. At the same time, laccase could oxidise the phenolic end-groups into stabilized radicals that subsequently undergo radical-radical coupling. The charge density of lignin model compounds was calculated by molecular simulation. It was indicated that why demethylation benefited the sulfomethylation. According to structural changes in lignin, the mechanism of the influence laccase modification on the sulfomethylation reactivity was deduced. The sulfomethylation reactivity, measured by the content of sulfonic groups, was increased by 35% after laccase modification. It was mainly due to the increase of the content of phenolic groups and the decrease of steric hindrance. In addition, the dispersion efficiency of sulfomethylated alkali lignin with laccase modification on the TiO_2 slurry improved significantly.

Keywords Laccase, Alkali lignin, Sulfomethylation reactivity, Dispersion efficiency