

磺甲基化木质素的辣根过氧化物酶催化聚合研究*

杨东杰 伍晓蕾 昌娅琪 邱学青** 陶家媛

(华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室 化学与化工学院 广州 510640)

摘 要 以碱木质素为原料,采用磺甲基化反应,得到磺甲基化木质素(SAL),并进一步采用辣根过氧化物酶(HRP)催化以提高其分子量,制备了高分子量高磺化度磺甲基化木质素(HPSAL).采用凝胶渗透色谱、红外光谱、核磁共振氢谱、紫外光谱和顶空气相色谱等研究了改性前后SAL的结构特征.结果表明,经HRP催化后,与SAL相比,HPSAL的重均分子量和磺化度显著增加,分别提高20倍和30%以上,羧基含量升高,而甲氧基和酚羟基含量降低.HRP使SAL形成酚氧自由基,活化其酚羟基的邻、对和侧链C_β位,增加磺化反应活性,而磺化度的提高又有利于增加HRP催化SAL的聚合反应活性,其聚合方式主要为 β -O-4'、 β - β '、 β -1'和 β -5'联结.分子模拟结果表明,甲氧基含量的降低和磺酸基含量的增加能显著提高以 β -O-4'连接键为主的聚合反应活性.

关键词 辣根过氧化物酶,磺甲基化碱木质素,聚合,反应活性

碱法制浆过程中形成的碱木质素是造纸工业的主要污染物,对这一资源进行综合利用具有重大的经济、社会与环境效益.大量研究表明^[1,2],碱木质素分子缩合度高,缺乏强亲水官能团,反应活性不足,限制了其应用范围和实用价值,通过改性接入活性基团是木质素高效利用的关键,改性方法主要有磺化、氧化、烷基化、胺化、酚化和缩聚等^[3,4],其中通过磺化反应接入磺酸基是赋予其水溶性和表面物化性能最常用的方法.

磺酸基含量和分子量是影响碱木质素磺化产物性能的主要因素^[5,6].磺酸基含量的提高一般通过调节反应中磺化剂的用量来实现,而为得到高分子量的碱木质素磺化产物,常用膜分离技术(如超滤)或与醛类(如甲醛)缩合,但这些方法费时或原料毒性大,且产物分子量低.

随着人们环保观念的日益增强,生物法与化学法联合使用或生物法代替化学法是目前高分子合成领域研究的热点之一.生物酶的提取和保存工艺复杂,导致其产量低、价格昂贵,限制了其广阔应用.然而,随着生物酶的提取工艺已不断成熟,利用生物酶来制备高分子聚合物的优势日益彰显.

木质素在生物酶(如漆酶、过氧化物酶等)的

作用下可利用自由基间的传递实现木质素大分子或木质素模型物间的聚合.Kim等^[7]的研究证实了漆酶可聚合木质素磺酸盐,使分子量增大1700.Sasaki等^[8]发现芥子醇与松柏醇相比较,芥子醇在细胞壁过氧化物酶作用下有更强活性而在辣根过氧化物酶作用下则相反.

利用酶催化作用对磺化碱木质素进行结构修饰和反应活性的提高,减少了化学合成中醛类的污染,且反应条件温和,具有很高的选择性,可为未来碱木质素的改性提供一个绿色工艺,并且可得到分子量更大的磺化碱木质素,拓宽了磺化碱木质素的应用价值,有望可替代日益减少的木质素磺酸盐(酸法制浆副产品).

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是从辣根的根部提取出来的一种过氧化物酶,具有很强的催化活性,在过氧化氢的存在下可催化氧化酚类、芳胺类物质^[9,10],广泛应用于废水处理、生物传感器、皮革制造、有机合成等领域.辣根过氧化物酶也可催化氧化木质素及其模型物.Fournand等^[11]的研究表明,松柏醇在HRP/H₂O₂催化作用下主要生成 β -5、 β - β 和 β -O-4 3种连接方式的聚合物,且在低pH条件下有利于 β -O-4型聚合物的生成.Brunow等^[12]发现侧链较短的模

* 2013-08-27 收稿,2013-11-11 修稿;国家重点基础研究发展计划(973 计划,项目号 2012CB215302)、国家国际科技合作专项项目(项目号 2013DFA41670)、国家自然科学基金(基金号 21376100,21176096)和中央高校基本科研业务费专项资金资助.

** 通讯联系人,E-mail:cexqiu@scut.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2014.13299

型物(如香草醇)易于与 HRP 中心相结合而显示出较高的催化氧化效率. Grönqvist 等的研究表明^[13], HRP 对木质素具有聚合作用, 且聚合效果要比漆酶更为明显. 此外, HRP 还能催化木质素与酚类聚合, 使分子量大大提高^[14]. 然而, 目前关于 HRP 对木质素磺化衍生物的催化反应活性及其作用机制的研究还相当匮乏.

本课题组前期研究表明漆酶对木质素磺酸钠的改性过程既有降解又有聚合作用, 但漆酶对木质素磺酸钠分子量的增加幅度较小^[15]; 漆酶还可以增加碱木质素的磺甲基化反应活性, 使其磺化度提高 35%^[16]. 本研究以松木碱木质素为原料, 先采用磺甲基化法制备磺甲基化木质素, 再进一步采用辣根过氧化物酶对磺甲基化木质素进行催化聚合, 通过改变磺化剂用量, 采用 GPC、UV、FTIR、¹H-NMR、HS-GC 等测试技术研究了 HRP 催化磺甲基化木质素的聚合和磺化反应活性, 初步揭示 HRP 对磺甲基化木质素催化聚合机理, 为制备水溶性高磺化度高分子量的木质素磺化产物提供理论依据和技术路线.

1 实验部分

1.1 原料与试剂

松木碱木质素(alkali lignin, AL), 由吉林造纸集团提供, 来源于松木碱法制浆废液. AL 在使用前经过碱溶酸析提纯, 具体步骤是将一定量的 AL 溶解在质量浓度为 5% 的 NaOH 溶液中, 过滤除去不溶性杂质, 滤液用浓 HCl 调节 pH 至 2.0 左右, 使木质素沉淀析出, 过滤并取其滤渣, 用蒸馏水洗涤滤渣至滤液电导率低于 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 最后将洗涤后的 AL 用真空冷冻干燥以备用.

辣根过氧化物酶由上海雪满生物科技有限公司提供, 辣根过氧化物酶的酶活^[17]定义为在 pH = 6.0 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液中, 30 $^\circ\text{C}$ 时每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需要酶的量为一个活力单位, 即 1 U. 实验测得所用辣根过氧化物酶的酶活为 12708 U/g.

实验中所用的 2,2-连氨基-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 公司提供, 其他所有试剂均为分析纯.

1.2 改性方法

1.2.1 碱木质素的磺甲基化改性

用适量的氢氧化钠将碱木质素配成质量浓度

为 30% 的溶液, 在平行反应器(Carousel, 英国 Radleys 公司)上加热到 70 $^\circ\text{C}$ 后加入 15% 的甲醛溶液(以碱木质素的质量计), 在 600 r/min 下反应 1 h; 然后升温到 95 $^\circ\text{C}$, 加入一定量的无水亚硫酸钠固体, 在 600 r/min 下反应 3 h. 把产物 pH 调节至 6 左右, 抽滤除去不溶部分, 滤液用冷冻干燥机(Alpha1-2 LD plus, 德国 Christ 公司)干燥, 制得磺甲基化木质素(简称磺化碱木素, sulfomethylated alkali lignin, SAL; 通过改变磺化剂用量制得不同磺化度的磺甲基化碱木素记为 SAL1 ~ SAL6).

1.2.2 SAL 的酶促聚合反应

用 pH = 6.0 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲溶液配制 20 g/L 的 SAL 溶液, 加入 6 g/L HRP, 用体积分数为 2% 的 H_2O_2 启动反应, 在平行反应器上于 30 $^\circ\text{C}$ 、480 r/min 下反应 2 h 后, 煮沸 8 min 使 HRP 失活, 过滤, 将滤液冷冻干燥后, 制得辣根过氧化物酶聚合磺化碱木质素(horseradish peroxidase polymerized sulfomethylated alkali lignin, HPSAL; 采用不同磺化度的 SAL 制得相应的改性产品记为 HPSAL1 ~ HPSAL6).

1.3 测试方法

1.3.1 分子量分布测试

SAL 和 HPSAL 的分子量及其分布的测定采用凝胶渗透色谱法. 凝胶色谱仪(美国 Waters 公司, Waters 1515 Isocratic HPLP pump/Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector/UltrahydrageTM 250 和 UltrahydrageTM 120 色谱柱), 柱温 30 $^\circ\text{C}$, 流动相为 0.1 mol/L NaNO_3 (pH 10), 流速 0.5 mL/min, 以聚苯乙烯磺酸钠为标准物质.

1.3.2 磺化度的测定

SAL 和 HPSAL 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 905 Titrand 自动电位滴定仪测定其磺化度^[16].

1.3.3 红外吸收光谱测试

采用美国 Thermo 公司的 Nicolet 型红外光谱仪测定改性前后碱木质素的红外光谱. 扫描范围: 4000 ~ 400 cm^{-1} ; 分辨率 4 cm^{-1} ; 样品背景为 KBr.

1.3.4 ¹H-NMR 测试

取 30 mg 样品溶于 0.5 mL 氘代二甲基亚砜($\text{DMSO}-d_6$)试剂中, 采用德国 Bruker 公司 400 MHz DRX-400 核磁共振仪测试样品的 ¹H-NMR 谱图.

1.3.5 主要官能团含量的测定

羧基含量的测定是将 SAL 和 HPSAL 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,以对羟基苯甲酸为内标物,采用瑞士 Metrohm 公司 905 Titrand 自动电位滴定仪测定其羧基含量^[18]。

酚羟基含量的测定是以香草醛为标准品,采用 FC 法^[19]测定 SAL 和 HPSAL 中的酚羟基含量。

甲氧基含量的测定是以碘甲烷为标准品,采用顶空气相色谱法^[20]测定 SAL 和 HPSAL 中的甲氧基的含量。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)。

1.3.6 分子模拟

使用密度泛函中的 M06-2x 方法^[21],结合 6-31+g(d,p) people 基组^[22,23],采用极化介质 PCM 模型^[24,25],以水为溶剂对 HRP 催化聚合反

应进行模拟。所有计算都是在 Gaussian 09 程序包中完成。

下文讨论中所使用的反应焓值及自由能变化值是按如下方式进行计算的:

反应: $A \cdot + B \cdot \rightarrow AB$

$$\Delta H = H_{(A-B)} - H_{(A \cdot)} - H_{(B \cdot)},$$

$$\Delta G = G_{(A-B)} - G_{(A \cdot)} - G_{(B \cdot)}$$

2 结果与讨论

2.1 HRP 催化对分子量和磺化度的影响

分子量和磺化度是评价碱木质素磺化产物性能的一个重要指标,将相同用量磺化剂的 HPSAL 与 SAL 的重均分子量(M_w)之比定义为 HPSAL 的聚合度,以评价 HRP 催化聚合 SAL 的反应活性,采用磺化度评价磺化反应活性,测定了不同磺化剂用量下 SAL 及 HPSAL 的磺化度和分子量,结果列于表 1 中。

Table 1 The effect of dosage of Na₂SO₃ on M_w and sulfonation degree of SAL and HPSAL

Dosage of Na ₂ SO ₃ (g/100g AL)	SAL				HPSAL				Polymerization
	Sample	Sulfonation	<i>M</i> _w	<i>M</i> _w / <i>M</i> _n	Sample	Sulfonation	<i>M</i> _w	<i>M</i> _w / <i>M</i> _n	degree of HPSAL
		degree (mmol/g)				degree (mmol/g)			
5	SAL1	1.15	1100	3.66	HPSAL1	1.51	14600	4.61	13.27
20	SAL2	1.34	1700	6.06	HPSAL2	1.96	39100	7.39	23.00
30	SAL3	1.51	1800	4.88	HPSAL3	2.16	44500	7.52	24.72
40	SAL4	1.67	1800	5.91	HPSAL4	2.46	46700	7.63	25.94
50	SAL5	1.98	2000	5.85	HPSAL5	2.60	51800	8.26	25.90
60	SAL6	2.06	2100	6.47	HPSAL6	2.87	56600	8.47	26.95

随着磺化剂用量的增加,SAL 的磺化度由 1.15 mmol/g 增加到 2.06 mmol/g,而分子量变化不明显, M_w 最高仅为 2100,多分散性指数(M_w/M_n)为 3.66~6.47。在相同的磺化剂用量下,与 SAL 相比,HPSAL 的磺化度明显增加,增幅达 30%~50%,分子量增大更为显著,由催化改性前的 1100~2100 增加到 14600~56600,聚合度达到 13.27~26.95 倍,多分散性指数也增大。

此外,随着磺化剂用量的增加,HPSAL 的磺化度、分子量和平均聚合度均有较大幅度的提高,当磺化剂用量为 60% 时,HPSAL6 的 M_w 和磺化度分别为 56600 和 2.87 mmol/g,聚合度达到 26.95 倍。

由此可以得出,磺化度的提高有利于增加 HRP 催化 SAL 的聚合反应活性,同时 HRP 催化聚合 SAL 过程中也进一步提高了 SAL 的磺化反

应活性,这一结果与采用化学聚合法的现象截然不同。Zhou 等^[5,26]的研究表明,在采用磺化-甲醛缩合法制备磺化碱木质素的过程中,磺化和缩合反应均发生在酚羟基的邻位(即木质素苯丙烷结构的 C₅ 位),两者存在竞争效应,在增加磺化度的同时反而会降低产物的分子量,而本文采用先磺化然后用 HRP 催化聚合木质素磺化产物,则可同时实现磺化度和分子量的提高,为制备水溶性高磺化度高分子量的木质素系表面活性剂提供了一种新的技术路线。

2.2 红外光谱分析

红外光谱是研究木质素结构的重要手段之一,本文取磺化剂用量为 5% 和 60% 为例,对比了 SAL 和 HPSAL 的红外光谱图(图 1)。

在 3400 cm⁻¹附近的宽峰为 O—H 伸缩振动的吸收峰^[1],在 1650~1450 cm⁻¹附近的多个吸

收峰是木质素芳环骨架振动所引起的^[27], 1325 cm^{-1} 附近的小峰由酚羟基的面内变形振动和紫丁香基中 C—O 伸缩振动所引起^[28], 由图 1 可以看出, SAL 和 HPSAL 仍具有这些典型的木质素结构吸收峰, 表明碱木质素的磺化和 HRP 催化聚合过程并没有破坏木质素的基本结构, 只是引起部分官能团含量的变化。

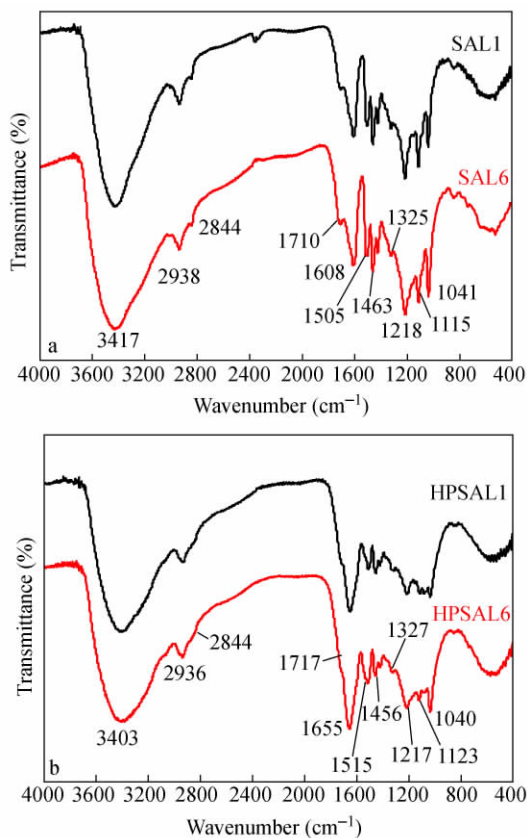


Fig. 1 IR spectra of SAL (a) and HPSAL (b)

从图 1(a)可以看出, 对比 SAL1 和 SAL6, 除了 SAL6 在 1041 cm^{-1} 附近的磺酸基 S=O 振动^[26]强度明显大于 SAL1 外, 各特征吸收峰的强度相近. 而从图 1(b)可以看出, 对比 HSAL1 和 HSAL6, HSAL6 除了在 1041 cm^{-1} 附近的磺酸基 S=O 振动强度明显大于 SAL1 外, 在 2844 cm^{-1} 处的甲氧基的 C—H 伸缩振动^[1]相比于 HSAL1 有所减弱, 而其他各特征吸收峰的强度则相近。

在相同的磺化剂用量下, 以 SAL6 和 HSAL6 为例, 可以看出, 与 SAL6 相比, HPSAL6 在 2844 cm^{-1} 处的甲氧基的 C—H 伸缩振动吸收峰基本消失了, 表明 HRP 催化过程具有脱甲氧基作用; 1717 cm^{-1} 处为非共轭羰基吸收峰^[27], 1463 cm^{-1} 处为—CH₃ 和 —CH₂ 中 C—H 的平衡变形振

动^[1,27], 1115 cm^{-1} 处的吸收峰归属于典型的芳环 C—H 面内弯曲振动^[1], SAL6 在以上吸收带和芳环骨架吸收带均有较强的吸收, 而 HPSAL6 在这些吸收峰处强度均减弱, 并在 1655 cm^{-1} 处形成了一个新的强共轭羰基吸收峰^[27,28], 这有可能是因为 HRP 催化聚合使木质素的苯环结构氧化成苯醌结构, 从而形成大量新的共轭羰基。

2.3 ¹H-NMR 谱图分析

图 2 为磺化剂用量为 5% 和 60% 下 SAL 和 HPSAL 的 ¹H-NMR 谱图, 可见 SAL 和 HPSAL 的 ¹H-NMR 谱图有较大差别. 将等量的样品溶于等量的 DMSO-*d*₆ 溶剂, 使用 DMSO 的交联信号归一化 ($\delta = 2.50$), 采用积分法对样品的 ¹H-NMR 进行了分析, 各氢谱信号的归属及强度列于表 2。

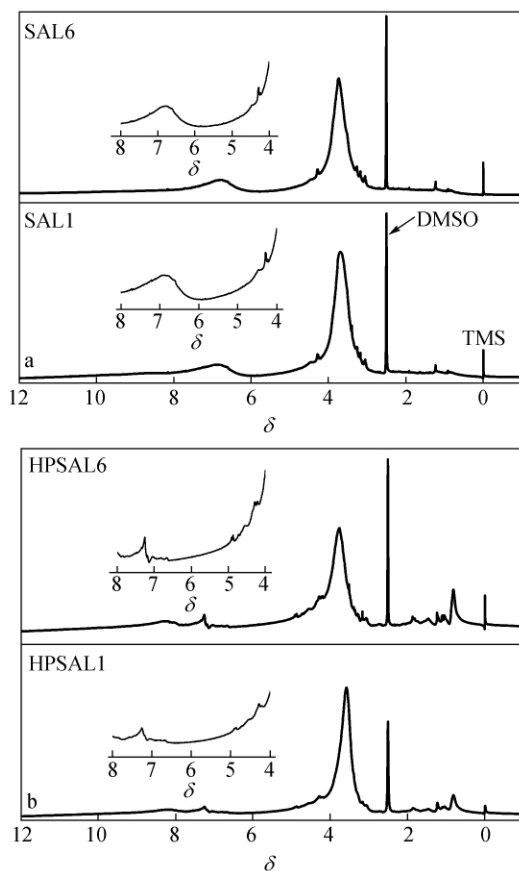


Fig. 2 ¹H-NMR spectra of SAL (a) and HPSAL (b)

$\delta = 11.50 \sim 8.00$ 的区域为羧基和醛基的质子信号, SAL1 和 SAL6 在此处的吸收强度约为 1.0, 而 HPSAL1 和 HPSAL6 在该处的信号则明显增强, 达到 1.5 以上, 尤其是高磺化度高分子量的 HPSAL6 在此处的信号强度达到 1.90, 说明酶催化聚合过程显著增加了羧基的含量。

Table 2 The assignment and intensity in ¹H-NMR spectra of SAL and HPSAL^[16,27]

Signal (δ)	Assignment	Intensity			
		SAL1	SAL6	HPASL1	HPSAL6
11.50 ~ 8.00	H of carboxyl and aldehyde group	1.03	1.05	1.59	1.90
7.80 ~ 7.25	Aromatic protons in hydroxy-phenyl units	1.41	1.18	1.19	1.27
7.25 ~ 6.80	Aromatic protons in guaiacyl units	1.51	1.46	0.89	0.79
6.80 ~ 6.25	Aromatic protons in syringyl units	1.41	1.54	0.90	0.86
6.25 ~ 5.75	H _α of β-O-4' and β-1' structures	0.76	0.70	0.82	0.91
5.75 ~ 5.24	H _α of β-5' structures	0.88	0.72	0.99	1.18
4.90 ~ 4.43	H _α and H _β of β-O-4' structures	1.49	1.36	1.55	2.07
4.30 ~ 4.00	H _γ of β-β' structures	1.67	1.89	1.56	2.44
4.00 ~ 3.20	H of methoxyl group	11.66	10.05	10.97	9.22
2.50	DMSO	1.00	1.00	1.00	1.00
1.60 ~ 0.38	Aliphatic protons	2.39	1.69	3.25	4.00

$\delta = 7.80 \sim 7.25, \delta = 7.25 \sim 6.80, \delta = 6.80 \sim 6.25$ 的区域分别为木质素对羟基苯环单元、愈创木基单元和紫丁香基单元上的质子信号,与 SAL1 相比,SAL6 的对羟基苯环单元、愈创木基单元含量降低,紫丁香基单元含量增加;与 SAL 相比,HPSAL 的中各单元结构中的芳香环质子含量降低,特别是愈创木基单元上的质子,其强度由 1.5 降至 0.8,表明愈创木基单元参与聚合反应的比例较大.然而高磺化度时 HPSAL6 中对羟基苯环上的质子强度却由原来的 1.18 增至 1.27,这可能是由于 HRP 的脱甲氧基作用使 SAL 中的对羟基苯环结构增多.

$\delta = 6.25 \sim 5.75, \delta = 5.75 \sim 5.24, \delta = 4.90 \sim 4.43, \delta = 4.30 \sim 4.00$ 的区域分别为 β -O-4'、 β -1'、 β -5' 和 β - β' 结构的质子信号,对比 SAL1 和 SAL6 可见,磺化程度的增加使这些区域的质子强度降低,而仅在 $\delta = 4.30 \sim 4.00$ 处的 β - β' 强度有所增强,表明磺甲基化反应会使 β -O-4'、 β -1' 和 β -5' 连接键的断裂,仅可形成 β - β' 连接键的聚合,这进一步说明仅采用磺甲基化反应难以提高产物的分子量.

经 HRP 催化聚合后, β -O-4'、 β -1'、 β -5' 和 β - β' 结构的质子信号均增强,特别是 β -O-4' 和 β - β' 结构,对比 SAL6 和 HPSAL6,强度分别由 1.36 增至 2.07 和由 1.89 增至 2.44,这表明了 HRP 催化聚合反应可形成 β -O-4'、 β -1'、 β -5' 和 β - β' 等连接方式的聚合物,且多以 β -O-4' 和 β - β' 键连接为主;HPSAL6 中 β -O-4'、 β -1'、 β -5' 和 β - β' 结构的质子信号强度也明显比 HPSAL1 强, β -O-4' 和 β - β' 结构的质子信号强度更是由 1.55 增至 2.07 和由 1.56 增至 2.44,表明磺化度的提高有利于 HRP 催化过程中形成 β -O-4' 和 β - β' 连接键,聚

合反应活性提高.

此外, $\delta = 4.00 \sim 3.20$ 区域的强吸收峰为木质素甲氧基中的质子信号峰,随磺化度增大,SAL 和 HPSAL 的甲氧基质子强度均减低,经 HRP 改性后的甲氧基质子强度有所降低,表明磺甲基化反应和 HRP 催化聚合过程均具有一定的脱甲基作用.

$\delta = 1.60 \sim 0.38$ 的多个吸收峰为脂肪族质子信号峰,HPSAL 在此处的吸收强度比 SAL 明显提高,也随磺化度的增大而由 3.25 增至 4.00,这是因为分子量的增大导致质子屏蔽效应增强,高磁场低位移的质子数增多.

2.4 HRP 催化对活性官能团的影响

磺甲基化木质素在 HRP 催化聚合过程中其活性官能团也会发生较大的变化,采用化学分析法测定了不同磺化剂用量下的 SAL 和 HPSAL 的羧基、酚羟基和甲氧基含量,结果列于表 3.

Table 3 Functional group content of different SAL and HPSAL

Sample	Carboxyl group (mmol/g)	Phenolic group (mmol/g)	Methoxyl group (mmol/g)
SAL1	1.15	2.12	3.56
SAL2	1.31	2.20	3.39
SAL3	1.42	2.11	3.16
SAL4	1.65	2.16	2.77
SAL5	2.10	2.19	2.42
SAL6	2.45	2.18	1.97
HPSAL1	2.47	1.08	2.09
HPSAL2	2.37	1.12	1.81
HPSAL3	2.44	1.14	1.74
HPSAL4	2.99	1.12	1.55
HPSAL5	3.41	1.10	1.50
HPSAL6	3.34	1.12	1.39

随磺化度的增大,SAL 和 HPSAL 的主要活性官能团的变化规律基本一致,均表现为羧基含量

增大,酚羟基含量基本不变,甲氧基含量明显降低;而相同磺化剂用量下,与 SAL 相比,HPSAL 的羧基含量显著增大,增幅为 36% ~ 115%;酚羟基和甲氧基含量则明显降低,降幅分别约为 50% 和 40% .

在 HRP 的催化聚合 SAL 过程中酚羟基含量显著降低,这表明酚羟基在聚合过程中起着关键性的作用. 在 H_2O_2 的存在下 HRP 首先将 SAL 中

的酚羟基氧化成酚氧自由基^[29],由于电子的离域(图 3),活化了 SAL 中酚羟基的邻、对位和侧链上的 C_β 位^[30],然后 SAL 分子的自由基间或 SAL 分子的自由基与 Na_2SO_3 间通过电子的传递形成新的化学键,使 SAL 发生聚合并进一步发生自由基磺化反应^[31]使其磺化度增大(表 1).

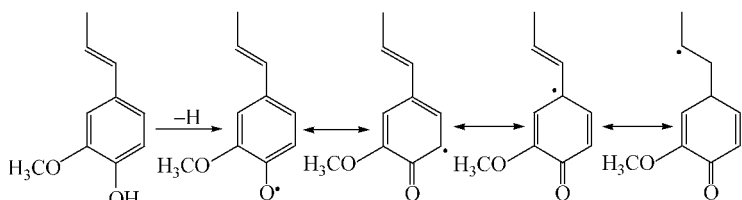


Fig. 3 Resonance structures of lignin phenoxy radicals

此外,经 HRP 催化聚合后,羧基的提高和甲氧基的降低与 HRP 的强氧化作用有关. HRP 的强氧化性使 SAL 结构中的羟基和醛基氧化成羧基,而甲氧基则被氧化成 CH_3OH 分子并从苯环上脱除掉,使木质素苯环结构变成苯醌结构^[32],供电基团酚羟基的存在可通过降低底物芳香核的氧化还原电位促进甲氧基的脱除^[32],因此 HPSAL 在红外谱图(图 2)中出现了新的强共轭羰基吸收峰,苯环骨架振动强度也有所减弱.

2.5 分子模拟

国内外研究人员使用分子模拟的方法对木质素模型物及其衍生物热裂解过程及其机理进行相关研究. Gnanakaran^[33] 和 Beckham^[34] 采用分子模

拟计算了木质素结构单元间各种常见连接方式 $\beta\text{-O-4}$ 、 $\beta\text{-5}$ 、 $\beta\text{-}\beta$ 、 $5\text{-}5$ 、 5-O-4 、 $\alpha\text{-O-4}$ 、 $\beta\text{-1}$ 的所形成的二聚体模型物的 BDEs 值,这些研究从分子水平上揭示木质素结构中不同连接方式. 本文采用密度泛函中的 M06-2x 方法,以对羟基苯型单体[H]及其磺酸盐[Hs]和愈创木基型单体[G]及其磺酸盐[Gs]为底物,计算各单体在 HRP 催化体系中形成 $\beta\text{-O-4'}$ 、 $\beta\text{-}\beta'$ 和 $\beta\text{-5'}$ 二聚体的热力学参数,初步探索主要连接方式的反应活性. HRP 对单体的聚合反应过程见图 4,模拟结果列于表 4 中.

由表 4 可以看出,各单体在 HRP 催化聚合过程中的焓变 ΔH 均为负值,表明该过程是一个吸热过程;其次,反应的自由能变化 ΔG 也都为负

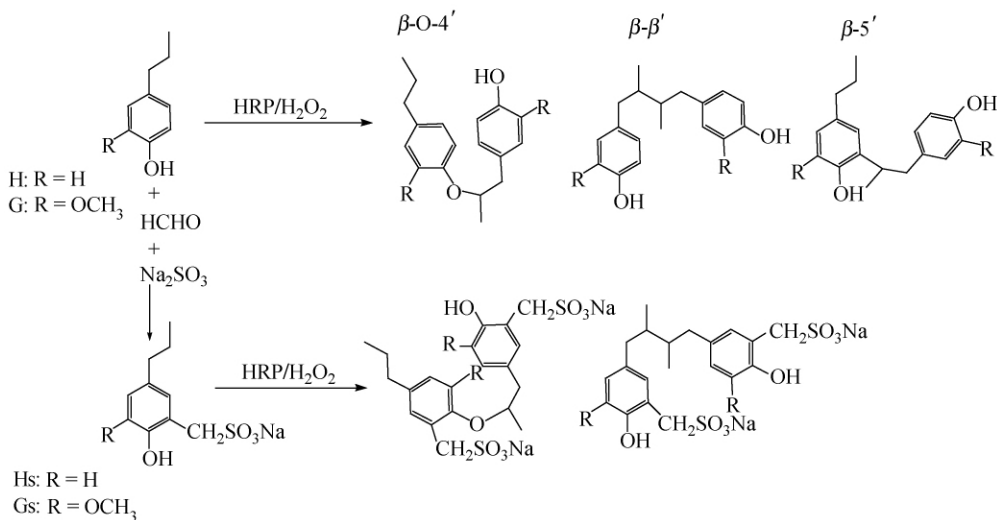


Fig. 4 Polymerization reaction in different bond ways of lignin model compounds

值,表示该反应为正向自发过程.

Table 4 Thermodynamics parameters of HRP polymerization in different bond ways

Dimer	ΔH (kJ/mol)			ΔG (kJ/mol)		
	β -O-4'	β - β'	β -5'	β -O-4'	β - β'	β -5'
H-H	-267.4	-355.2	-429.7	-202.1	-283.3	-363.6
H-Hs	-278.7	-347.7	-425.9	-215.1	-276.1	-355.2
Hs-H	-274.1	-347.7	-432.2	-210.9	-276.1	-365.7
Hs-Hs	-330.1	-353.1	-445.2	-246.0	-278.7	-370.3
G-G	-253.1	-356.9	-423.4	-187.9	-282.0	-367.8
G-Gs	-265.7	-356.1	—	-191.2	-284.1	—
Gs-G	-269.4	-356.1	-441.8	-196.6	-284.1	-370.3
Gs-Gs	-282.0	-370.7	—	-199.2	-293.7	—

对于 H 型(H 和 Hs)和 G 型单体(G 和 Gs),在相同的磺酸基含量下,木质素单体间以 β -O-4' 方式发生聚合反应时 H 型单体 ΔG 的绝对值大于 G 型单体,特别是 Hs-Hs 二聚体形成的 ΔG 的绝对值(246.0 kJ/mol)明显大于 Gs-Gs 二聚体形成的 ΔG 的绝对值(199.2 kJ/mol),表明 H 型单体比 G 型单体更容易以 β -O-4' 链接方式聚合.然而,对于以 β -5' 和 β - β' 方式发生聚合时,相同磺酸基含量下的 H 型和 G 型单体 HRP 聚合反应的 ΔG 绝对值则相近,表明两种类型的单体以 β -5' 和 β - β' 连接方式聚合的活性相当. H 型和 G 型单体最大的区别在于 G 型单体在苯环的 C₃ 位置多了 1 个甲氧基,由上述的结果可以推断出,底物甲氧基含量的降低会增加其形成 β -O-4' 型聚合物的反应活性,但对其形成 β -5' 型和 β - β' 型聚合物的反应活性影响不大.

对于同一类型单体,随着磺酸基含量的增多,木质素单体间以 β -O-4'、 β - β' 和 β -5' 方式发生聚合反应时 ΔG 的绝对值均有不同程度的增加(当 H 单体以 β - β' 方式键合成二聚体时除外),其中随磺酸基含量的增加时以 β -O-4' 方式键合成二聚体的 ΔG 绝对值增加幅度最大,H 型单体和 G 型单体分别由 202.1 kJ/mol 增至 246.0 kJ/mol 和由 187.9 kJ/mol 增至 199.2 kJ/mol,这表明磺化程度的提高更有利于促进单体以 β -O-4' 连接方式聚合.

此外,还比较了相同单体和磺酸基含量下,3 种常见连接方式的反应难易程度.以表 5 第一行 H-H 的数值为例, β -O-4'、 β - β' 和 β -5' 聚合反应所对应的 ΔG 绝对值分别为 202.1、283.3 及 363.6

kJ/mol,其它单体也都具有相同的趋势,表明键合的容易程度依次为 β -5' > β - β' > β -O-4'.但在实际反应中,由于高磺化度的木质素 C₅ 位大多数被占据,使得反应体系中的 C₅ 数量不多,聚合反应较难以 β -5' 方式进行,反而是 β - β' 和 β -O-4' 方式较容易,这可在¹H-NMR 测试结果中得到证实(表 3). Smith 等^[35]使用密度泛函(DFT)方法研究木质素 3 种单体间的自由基偶联反应,计算了单体自由基通过自身或者交叉偶联形成二聚体的过程中的反应焓及自由能,结果表明, β -O-4 及 β - β' 聚合更加容易,与本文的研究结果相符.

综上所述,可推断 HRP 催化聚合 SAL 过程中反应活性的影响主要有三方面的原因:第一,磺酸基和羧基含量的提高增加了碱木质素的水溶性使其更好地与 HRP 的活性中心结合,产生更多的自由基,有利于提高聚合反应活性;第二,甲氧基是限制木质素反应活性的主要因素,磺基化反应和酶氧化作用使甲氧基含量降低,有利于提高其以 β -O-4' 方式聚合反应活性;第三,磺酸基含量的增加使木质素单体在 HRP 催化聚合过程中 ΔG 变化的绝对值更高,聚合反应更易形成 β -O-4'、 β - β' 和 β -5' 等连接键.

3 结论

(1)采用辣根过氧化物酶 HRP 可有效催化聚合磺甲基化木质素,磺化度的提高有利于增加 HRP 催化聚合反应活性,同时 HRP 催化聚合过程中也进一步提高了的磺化反应活性,经催化后产物的重均分子量和磺化度显著增加.

(2)HRP 催化聚合过程中产物的磺酸基和羧基含量增加,酚羟基和甲氧基含量降低. HRP 在 H₂O₂ 的存在下首先将 SAL 酚羟基氧化成酚氧自由基,由于电子的离域活化了 SAL 的酚羟基邻、对位和侧链上的 C _{β} 位,然后自由基间通过电子的传递形成 β -O-4'、 β - β' 和 β -5' 等连接键从而发生聚合,同时与 Na₂SO₃ 发生自由基磺化反应使其磺化度增大.

(3)分子模拟结果表明,HRP 催化聚合反应是一个吸热过程,甲氧基含量的降低有利于增加以 β -O-4' 型连接方式的聚合反应活性,而磺酸基含量的增加显著提高聚合反应活性,聚合反应更容易以 β -O-4'、 β - β' 和 β -5' 等连接键进行.

REFERENCES

1 Sun Y, Qiu X Q, Liu Y Q. Biomass Bioenergy, 2013, 55: 198 ~ 204

2 Guo Wenyuan(郭闻源), Yang Dongjie(杨东杰), Li Rong(李荣), Qiu Xueqing(邱学青), Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2012, (9): 988 ~ 996

3 Wu H R, Chen F G, Feng Q H. Bioresources, 2012, 7(3): 2742 ~ 2751

4 Pan H, Sun G, Zhao T. Int J Biol Macromol, 2013, 59: 221 ~ 226

5 Zhou M S, Kong Q, Pang B, Qiu X Q, Yang D J, Lou H M. Fuel, 2010, 89(3): 716 ~ 723

6 Kamoun A, Jelidi A, Chaabouni M. Cem Concr Res, 2003, 33(7): 995 ~ 1003

7 Kim S, Silva C, Zille A, Lopez C, Evtuguin D V, Cavaco-Paulo A. Polym Int, 2009, 58(8): 863 ~ 868

8 Sasaki S, Nishida T, Tsutsumi Y, Kondo R. FEBS Lett, 2004, 562: 197 ~ 201

9 Reihmann M H, Ritter H. Macromol Chem Phys, 2000, 201: 798 ~ 804

10 Setti L, Scali S, Angeli I D, Pifferi P G. Enzyme Microb Technol, 1998, 22(8): 656 ~ 661

11 Fournand D, Cathala B, Lapierre C. Phytochemistry, 2003, 62: 139 ~ 146

12 Brunow G, Rönnerberg M, Teien G, Pakkanen T, Servin R, Sternerup H, Wistrand L, Nørskov L, Schroll G. Acta Chem Scand, 1979, 33: 22 ~ 26

13 Grönqvist S, Viikari L, Niku-Paavola M L, Orlandi M, Canevali C, Bucher J. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(4): 489 ~ 494

14 Alexander M B, Jonathan S D. Polym Sc. , Part A: Polym Chem, 1993, 31(7): 1839 ~ 1846

15 Zhou H F, Yang D J, Wu X L, Deng Y H, Qiu X Q. Holzforschung, 2012, 66(7): 825 ~ 832

16 Yang Dongjie(杨东杰), Zhou Haifeng(周海峰), Xie Shaoqu(谢绍珣), Wu Xiaolei(伍晓蕾), Qiu Xueqing(邱学青), Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2013, (2): 232 ~ 240

17 Silva R A, Carmona-Ribeiro A M, Petri D F S. Int J Biol Macromol, 2007, 41: 404 ~ 409

18 Zhou Mingsong(周明松), Huang Kai(黄恺), Qiu Xueqing(邱学青), Yang Dongjie(杨东杰). CIESC Journal(化工学报), 2012, 63(1): 258 ~ 265

19 de Sousa F, Reimann A, Björklund J M. Estimating the amount of phenolic hydroxyl groups in lignins. In: 11th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry. France: Nice, 2000. 649 ~ 653

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

21 Zhao Y, Truhlar D G. Theor Chem Acc, 2008, 120: 215 ~ 241

22 Hariharan P C, Pople J A. Thermochim Acta, 1973, 28: 213 ~ 222

23 Franci M M, Petro W J, Hehre W J, Binkley J S, Gordon M S, DeFrees D J, Pople J A. J Chem Phys, 1982, 77: 3654 ~ 3665

24 Miertus S, Tomasi J. J Chem Phys, 1982, 65: 239 ~ 245

25 Cossi M, Barone V, Robb M A. J Chem Phys, 1999, 111: 5295 ~ 5302

26 Zhou M S, Qiu X Q, Yang D J, Lou H M, Ouyang X P. Fuel Process Technol, 2007, 88(4): 375 ~ 382

27 Jahan M S, Chowdhury D A N. , Islam M K, Moeiz S M I. Bioresour Technol, 2007, 98: 465 ~ 469

28 Deng Yonghong((邓永红), Guo Yunqing(郭运清), Qian Yong(钱勇), Lou Hongming(楼宏铭), Qiu Xueqing(邱学青). Acta Polymerica Sinica(高分子学报), 2012, (8): 838 ~ 846

29 Hage R E, Brosse N, Chrusciel L, Sanchez C, Sannigrahi P, Ragauskas A. Polym Degrad Stab, 2009, 94(10): 1 ~ 7

30 Zhang Guoping(张国平), Nicell J A, Zou Yongliao(邹永廖). Research of Environmental Sciences(环境科学研究), 2000, 13(2): 12 ~ 14

31 Watanabe M, Meshitsuka G, Ishizu A. Mokuzai Gakkaishi, 1992, 38(2): 173 ~ 179

32 Kersten P J, Kalyanaraman B, Alyanaraman, Hammel K E, Reinhammar B, Kirk T K. Biochem J, 1990, 268(2): 475 ~ 480

33 Parthasarathi R, Romero R A, Redondo A, and Gnanakaran S. J Phys Chem Lett, 2011, 2(20): 2660 ~ 2666

34 Kim S, Chmely S C, Nimlos M R, Bomble Y J, Foust T D, Paton R S, Beckham G T. J Phys Chem Lett, 2011, 2: 2846 ~ 2852

35 Sangha A K, Parks J M, Standaert R F, Ziebell A, Davis M, Smith J C. J Phys Chem B, 2012, 116: 4760 ~ 4768

Horseradish Peroxidase Catalyzed Polymerization of Sulfomethylated Alkali Lignin

Dong-jie Yang, Xiao-lei Wu, Ya-qi Chang, Xue-qing Qiu*, Jia-yuan Tao

(State Key Lab of Pulp and Paper Engineering, School of Chemistry and Chemical Engineering,

South China University of Technology, Guangzhou 510640)

Abstract Alkali lignin was used as raw material to prepare sulfomethylated alkali lignin (SAL). SAL was then further incubated by horseradish peroxidase (HRP) to obtain the products (HPSAL) with high degree of sulfonation and high molecular weight. The gel permeation chromatography (GPC), infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance (NMR), ultra violet-visible spectrum (UV-Vis) and headspace gas chromatography (HS-GC) were used to investigate the structural characteristics of HPSAL. Compared with SAL, the molecular weight (M_w) and the sulfonation degree of HPSAL increased by above 20-fold and 30% after HRP incubation, respectively. It was also indicated that the carboxyl content increased while the phenolic and methoxyl groups decreased after HRP incubation. HRP incubation could oxidize phenolic group to form phenoxyl radicals. The free electron of the phenoxyl radicals could transfer to the *ortho*-, *para*- positions of phenolic groups and C_β of SAL side chains, inducing the increase of sulfonation reactivity. On the other hand, the increase of sulfonic group content was beneficial to the polymerization of SAL by HRP incubation. The polymerization was achieved by radicals coupling, including β -O-4', β - β' , β -1' and β -5' linkages. The results of molecular simulation indicated that the chances of β -O-4' linkage increased significantly due to the decrease of methoxyl content and increase of sulfonic group content.

Keywords Horseradish peroxidase, Sulfomethylated alkali lignin, Polymerization, Reactivity

* Corresponding author: Xue-qing Qiu, E-mail: cexqqiu@scut.edu.cn