

漆酶催化改性碱木质素与对甲苯酚共聚的研究

王璐瑶, 余昭琴, 贾红华, 周华*, 韦萍

(南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京211800)

摘要:利用酚化方法对木质素进行修饰,使其接入活性基团,考察了不同的酚单体对木质素改性效果的影响,优化了漆酶催化改性碱木质素和对甲苯酚的共聚反应过程,并对共聚产物进行了表征和性能测试。研究表明,邻苯二酚改性后的碱木质素的酚羟基质量摩尔浓度增加最显著,由6.95 mmol/g提高到10.83 mmol/g,提高了55.83%。共聚反应的最佳反应条件为:反应体系的最适质量分数为80%丙酮溶液,反应温度为30℃,pH 3.5,最适碱木质素与对甲酚质量比为0.5/1,最佳酶浓度为300 U/mL,反应时间为16 h。在最适条件下,共聚物产率显著提高,可达93.6%。邻苯二酚改性后的碱木质素和对甲酚聚合后的产物分子量明显增加,由2770 g/mol提高到20481 g/mol,增加了约10倍,热稳定分析表明聚合产物的热学稳定性比改性前有所提高。

关键词:木质素;酚化改性;漆酶;聚酚树脂;共聚

中图分类号:TQ031.2

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2017)05-0080-05

DOI:10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2017.05.019

Laccase catalyzing copolymerization of modified alkali lignin and *p*-cresol

WANG Lu-yao, YU Zhao-qin, JIA Hong-hua, ZHOU Hua*, WEI Ping

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211800, China)

Abstract: Lignin is modified with the phenolation method and inserted with active groups. The influences of various phenolic monomers on the modification of lignin are studied. Then the laccase catalyzing copolymerization reaction between lignin and phenol has been optimized, and the characterization and performance determination on the copolymerization products have been done. The results show that the phenolic hydroxyl content in alkali lignin modified by catechol increases significantly from 6.95 mmol/g to 10.83 mmol/g, an increase of about 55.83%. Moreover, the optimal copolymerization reaction conditions include 80% acetone solution, temperature 30℃, pH 3.5, substrate ratio of 0.5/1 between alkali lignin and *p*-cresol, enzyme concentration of 300 U/mL and reaction time 16 h. Under these optimum conditions, the yield of copolymer increases significantly, up to 93.6%. If catechol modifying lignin is used to copolymerize with *p*-cresol, the molecular weight of copolymers increases significantly from 2770 g/mol to 20481 g/mol, an increase of about 10 times. Thermal stability analysis shows that the thermal stability of copolymer has been improved by the modification.

Key words: alkalilignin; phenolation modification; laccase; polyphenol resin; copolymerization

木质素是一种具有应用潜质的天然资源^[1-2],近年来在合成树脂、聚氨酯等材料领域应用广泛^[3-4]。但木质素结构复杂,芳环上的位阻大,分子量呈多分散性和反应活性低,限制了其应用范围。通过接入活性基团是提高木质素利用率的重要手段,常用的木质素修饰的方式有脱甲基化改性、酚化改性等^[5]。工业上常用酚类、醛类、异氰酸酯类等与木质素缩聚或采用烯类单体与木质素共聚以合成一系列高分子质量的木质素改性产品,伴随人们环保意识的提高,木质素的酶法聚合也逐渐被重视。

用于催化生物聚合的酶多为氧化还原酶,最常见的是辣根过氧化酶(HRP)^[6-9]、大豆氧化酶(SBP)^[10-11]和漆酶(LAC)^[12-13]等,其中漆酶因能

直接用空气中的氧气为氧化剂进行反应,低pH环境下的高度稳定性等优点受到研究者的青睐^[14-15]。

笔者以提高碱木质素的利用率为出发点,采用酚化方法对木质素进行修饰,以漆酶为催化剂,考察温度、pH、碱木质素与对甲酚质量比、酶浓度等因素对酶法聚合的影响,探讨改性碱木质素与酚类单体共聚的优化工艺,并对聚合产物的结构及性能进行表征和测试。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

供试菌种:杂色云芝菌(*Coriolus Versicolor*),本试验室保藏。

收稿日期:2016-11-14

基金项目:国家自然科学基金(21406114)

作者简介:王璐瑶(1993-),女,硕士生,研究方向为生物催化与分离,025-58139931,18260038221@163.com;周华(1970-),男,博士,教授,研究方向为生物催化,通讯联系人,zhouhua@njtech.edu.cn。

实验试剂:苯酚(CP)、邻苯二酚(OP)、对苯二酚(DP)、间苯二酚(IP)、对甲酚(MP)、浓硫酸(AR)、乙醚(AR)、丙酮(AR)、FC试剂(BR)、碳酸钠(AR),国药集团化学试剂有限公司生产。

实验仪器:核磁共振波谱仪(Avance AV-500),瑞士Bruker公司生产;红外光谱仪(Nicolet 380),Thermo Electron Corporation生产;GPC(Waters 2695),美国奥泰公司生产;热重分析(Cahn TherMax 500),赛默飞世尔公司生产;差示扫描量热仪(SR-1),江苏太仓市实验设备厂生产;真空干燥箱(ZK-82A),上海实验仪器厂有限公司生产;恒温磁力搅拌器(85-2),金坛市医疗仪器厂生产。

1.2 碱木质素的酚化改性方法

精确称取1 g干燥的木质素,加入苯酚,混匀。再加入一定量的 H_2SO_4 ,搅拌5 min后,恒温反应。结束后静置,将上层有机相滴入适量的乙醚中,离心分离沉淀。风干后用80 mL丙酮溶解,除去不溶物。将清液旋转蒸发至5 mL,再滴加到适量乙醚中,离心后的沉淀用乙醚洗3~5次并干燥,即得木素酚。

1.3 菌种培养、粗酶液提取及漆酶酶活测定的方法

按照文献[16]中所述的方法培养杂色云芝菌产漆酶。在30℃摇床中培养7 d后,将发酵液于转速6 000 r/min下离心8 min,取上清液,即为漆酶粗酶液。

以ABTS为底物,按文献[17]中所述的方法测定粗酶液的酶活。酶活力单位(U)定义为1 mL酶液1 min内转化1 μ mol ABTS的酶量。

1.4 碱木质素与酚酶法共聚方法及共聚产物得率计算

取适量酚单体和改性后的木质素,溶于30 mL的甲醇溶液中,搅拌使其溶解后,再添加适量酶液,反应24 h,析出沉淀即为共聚产物。

聚合反应产物的得率为:

$$\text{得率} = (m_1/m_2) \times 100\%$$

其中: m_1 为收集到的产物质量; m_2 为反应时加入的酚单体与木质素的质量总和。

1.5 木质素酚羟基含量的测定方法

通常木质素酚羟基的测试方式分为UV法^[18]、NMR法^[19]、氨解法^[20]等。笔者采用FC法,具体参照文献[21]中所述的方法,使用苯酚作为标准物质绘制标准曲线,得到标准曲线为 $A = 0.0043x - 0.0037$ (x 为吸光度, A 为酚浓度)。

1.6 聚合产物的表征方法

利用Bruker Aduance核磁共振仪进行 1H -NMR检测,内标是四甲基硅烷(TMS)。利用Nicolet iS5型傅里叶变换红外光谱仪进行产物红外光谱分析,KBr压片。利用GPC测定聚合产物的分子质量,以四氢呋喃为溶剂,聚苯乙烯为标准品。利用热重(TG)和示差热量扫描(DSC)对聚合产物的热稳定性进行分析。

2 结果与讨论

2.1 不同种类酚对木质素改性效果的影响

选择不同种类的酚对碱木质素进行改性,反应条件为:酚单体/木质素质量比为3.3:1, H_2SO_4 质量

(上接第79页)

- [4] Phan A, Doonan C J, Uriberomo F J, *et al.* Synthesis, structure and carbon dioxide capture properties of zeolitic imidazolate frameworks [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2010, 43(1): 58-67.
- [5] Zhang J, Sun L, Xu F, *et al.* H_2 storage and CO_2 capture on a nanoscale metal organic framework with high thermal stability [J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(5): 759-761.
- [6] Hua D, Ong Y K, Wang Y, *et al.* ZIF-90/P84 mixed matrix membranes for pervaporation dehydration of isopropanol [J]. *Journal of Membrane Science*, 2014, 453: 155-167.
- [7] Seo J S, Whang D, Lee H, *et al.* A homochiral metal-organic porous material for enantioselective separation and catalysis [J]. *Nature*, 2000, 404(6781): 982-986.
- [8] Banerjee R, Furukawa H, Britt D, *et al.* Control of pore size and functionality in isoreticular zeolitic imidazolate frameworks and their carbon dioxide selective capture properties [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(11): 3875-3877.
- [9] Morris W, Doonan C J, Furukawa H, *et al.* Crystals as molecules: Postsynthesis covalent functionalization of zeolitic imidazolate

frameworks [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(38): 12626-12627.

- [10] Liu C, Liu Q, Huang A. A superhydrophobic zeolitic imidazolate framework (ZIF-90) with high steam stability for efficient recovery of bioalcohols [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(16): 3400-3402.
- [11] Huang A, Caro J. Covalent post-functionalization of zeolitic imidazolate framework ZIF-90 membrane for enhanced hydrogen selectivity [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(21): 4979-4982.
- [12] 李静,徐荣,钟琼,等. ZIF-78膜的制备及其在油气回收中的应用研究 [J]. *高校化学工程学报*, 2015, 29(4): 843-850.
- [13] Poshusta J C, Noble R D, Falconer J L. Temperature and pressure effects on CO_2 and CH_4 permeation through MFI zeolite membranes [J]. *Journal of Membrane Science*, 1999, 160(1): 115-125.
- [14] Bernal M P, Coronas J, Menéndez M, *et al.* Characterization of zeolite membranes by temperature programmed permeation and step desorption [J]. *Journal of Membrane Science*, 2002, 195(1): 125-138. ■

分数为 72%, 用量 20 mL/g, 反应时间为 120 min, 反应温度为 25℃, 结果如表 1 所示。

表 1 不同种类的酚对碱木质素改性效果

酚类	苯酚	邻苯二酚	间苯二酚	对苯二酚	对照
酚羟基摩尔浓度/ (mmol·g ⁻¹)	7.7	9.5	8.1	7.1	6.9

由表 1 可以看出, 用不同酚类改性后的碱木质素, 其酚羟基质量摩尔浓度均有一定程度的增加, 其中, 用邻苯二酚改性的木质素效果最佳。由于酚羟基为活性基团, 因此, 木质素酚化改性后反应活力增强。

2.2 不同有机溶剂对酶法聚合的影响

水相体系中催化获得的酚类聚合物一般是二聚或三聚体。其根本原因是由于反应底物和生成的产物的水溶解性比较差, 使得聚合物容易析出, 以至于达不到较高的分子质量。

而反应体系中有有机溶剂的加入将促进聚合反应的进行。选取乙醇、丙酮、甲醇、二氧六环 4 种有机溶剂, 考察其对聚合产率的影响, 结果如表 2 所示。

表 2 不同有机溶剂对聚合效果的影响

有机溶剂种类	乙醇	丙酮	甲醇	二氧六环
产率/%	52.6	87.8	48.2	59.1

由表 2 可以看出, 在丙酮/水体系中聚合产物产率最高。甲醇和乙醇极性较强, 所以他们争夺水分子的能力较强, 因而对酶的失活作用也较大, 故反应速度较慢, 影响产率。二氧六环的极性与丙酮相近, 在相同的条件下, 丙酮/水中的反应速度较快, 产率更高, 因此, 选择丙酮作为聚合反应的溶剂。

2.3 有机溶剂质量分数对聚合反应的影响

有机溶剂质量分数对聚合反应的影响如表 3 所示。

表 3 丙酮质量分数对聚合效果的影响

丙酮质量分数/%	0	20	40	60	80	100
产率/%	37.4	82.0	87.8	89.6	91.2	50.3

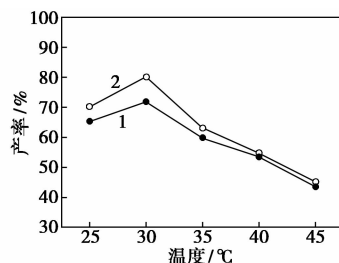
由表 3 可以看出, 丙酮质量分数在 20% ~ 80% 之间时, 随着丙酮质量分数的提高, 聚合物的产率也随之增大; 当丙酮质量分数达到 100% 时, 聚合物的产率明显下降, 约为 50%。这是由于丙酮质量分数过高, 导致酶蛋白变性。因此丙酮的最适质量分数

为 80%。而且当反应体系中只有酚单体时, 其产率仅为 37.4%, 远低于木质素-酚共聚物的产率, 因此, 木质素-酚共聚反应体系中的副反应(酚单体的自聚)对聚合反应的影响不大。

2.4 漆酶催化木质素与酚共聚的反应条件优化

2.4.1 聚合反应温度对聚合得率的影响

漆酶催化木质素与酚共聚时, 温度对聚合产率的影响如图 1 所示。由图 1 可以看出, 最佳反应温度为 30℃。



1—改性前; 2—改性后

图 1 温度对聚合效果的影响

温度对漆酶催化聚合的影响一般体现在两个方面: 一是由于温度的上升, 底物和产物在反应体系中的溶解度增加, 有助于促进反应的进行; 另一方面, 反应体系为质量分数为 80% 的丙酮溶液, 其沸点较低, 随着温度的上升, 部分丙酮挥发, 使整个体系中有有机溶剂的浓度降低, 故产率也会降低。

2.4.2 反应 pH 对聚合反应的影响

通常情况下, 反应体系的 pH 对漆酶的催化活力影响较大, 能够影响漆酶蛋白的解离程度, 因而对漆酶的催化效率有影响。漆酶催化木质素与酚共聚时, pH 对聚合产率的影响如表 4 所示。由表 4 可以看出, 反应的最适 pH 为 3.5。

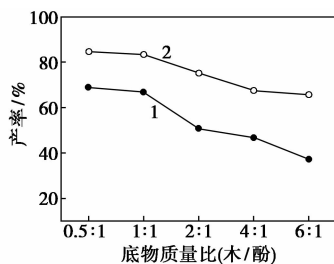
表 4 pH 对聚合效果的影响

pH	产率/%	
	改性前	改性后
3.5	60.9	81.8
4.0	57.2	78.3
4.5	51.0	75.2
5.0	47.6	68.8
5.5	44.7	64.5
6.0	53.9	59.8

2.4.3 反应物质量比对聚合的影响

在反应温度为 30℃, pH 为 3.5 的反应体系中, 加入不同质量比的木质素与酚单体, 考察漆酶催化

木质素与酚共聚反应中木/酚质量比对聚合产率的影响,结果如图2所示。由图2可以看出,反应的最适木/酚质量比为0.5/1。

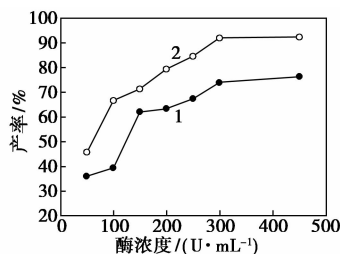


1—改性前;2—改性后

图2 底物质量比对聚合效果的影响

2.4.4 酶浓度对聚合的影响

在反应温度为30℃, pH为3.5的反应体系中,加入不同浓度的漆酶溶液,分别考察酶浓度对聚合产率的影响,结果如图3所示。



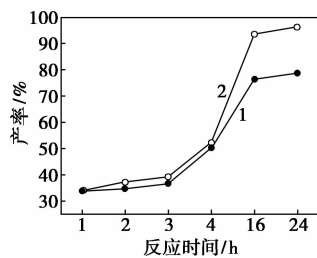
1—改性前;2—改性后

图3 酶浓度对聚合效果的影响

由图3可以看出,产率随着酶浓度的升高而增大,但是当酶液浓度升高到300 U/mL时,产率增长缓慢,这是由于底物被饱和,而酶有富余所致。因此,反应的最适酶浓度为300 U/mL。

2.4.5 反应时间对聚合的影响

在温度为30℃, pH为3.5的反应体系中,加入漆酶量为300 U/mL,每隔1 h取样,将其处理后干燥称重,测定其产率,考察反应时间对聚合的影响,结果如图4所示。



1—改性前;2—改性后

图4 反应时间对聚合效果的影响

由图4可知,随着反应时间的增长,聚合物的产

率渐渐增加,但16 h后,共聚物的产率增加缓慢。因此,选定最佳聚合时间为16 h。

2.5 共聚产物分子质量的分析结果

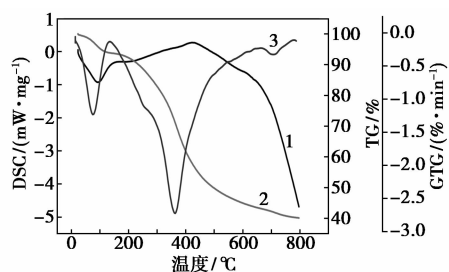
通过漆酶处理后的产物的分子质量的变化情况如表5所示。由表5可以看出,与碱木质素相比,改性后的碱木质素与酚共聚后的产物的分子质量均有所提高。其中,邻苯二酚改性对碱木质素的活化效果最佳,所得共聚产物的最大重均分子质量为20 481 g/mol。与碱木质素相比,共聚产物分子质量提高了约10倍。

表5 酶法聚合后木质素分子量变化

不同酚改性	共聚产物分子质量(M_w)
对照组1(不发生共聚反应的碱木质素)	2648
对照组2(未改性共聚)	6324
苯酚	12967
对甲酚	8085
邻苯二酚	20481
间苯二酚	7136
对苯二酚	7874

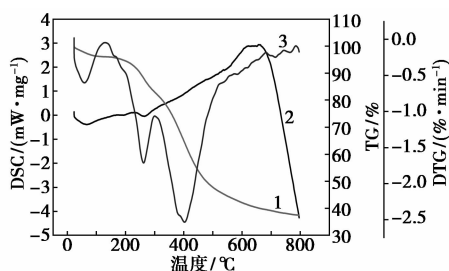
2.6 共聚产物的热稳定性分析

利用热重(TG)和示差热量扫描(DSC)对聚合物的热力学特性进行测定。精确称取聚合物产物5 mg左右,控制氮气流速为30 mL/min,升温速度为10℃/min,结果如图5和图6所示。



1—DSC;2—TG;3—DTG

图5 木质素的热失重曲线



1—DSC;2—TG;3—DTG

图6 木质素与酚共聚产物的热失重曲线

由图 5、图 6 中的 TG 和 DTG 曲线可知,碱木质素和共聚物均在 95℃ 左右时出现少量的质量损失,这是由于样品中水分的挥发,而 200 ~ 550℃ 是由于相变引起的失重。而在 DTG 曲线中,共聚物在约 250℃ 时出现了 1 个新的裂解峰,这是由于聚合过程中形成的部分小分子片段灰化所致。对比二图中的 DTG 曲线,碱木质素在 350℃ 时的失重率最大,在此温度下的碳化率为 50%。而共聚物在温度为近 400℃ 时,失重率达到最大,其碳化率仍能维持 50% 以上。由此表明碱木质素与酚共聚的热稳定性得到了提高。

3 结语

研究了改性碱木质素和对甲苯酚的酶法聚合中不同催化体系对聚合产率的影响,确定了漆酶催化聚合的最佳合成条件:反应体系的最适质量分数为 80% 丙酮溶液,反应温度为 30℃,pH 为 3.5,最适底物质量比为 0.5/1,最佳酶浓度为 300 U/mL,反应时间为 16 h。在最适条件下共聚物产率显著提高,可达 93.6%。

通过对共聚物的表征及性能测试发现,邻苯二酚改性后的木质素和对甲酚聚合后分子质量明显增加,由 2 770 g/mol 提高到 20 481 g/mol,增加了约 10 倍,改性碱木质素的聚合收率达到 93.6%,热重分析表明,共聚产物的热学稳定性有所改善,故碱木质素的酚化改性对提高木质素的利用率和改善聚合物的性能具有明显作用。

参考文献

- [1] 周建,曾荣,罗学刚. 木质素化学改性的研究现状[J]. 纤维素科学与技术,2006,14(3):59-66.
- [2] 王华,陈明强,张晔,等. 木质素分离研究进展[J]. 广州化工,2012,40(6):7-9.
- [3] 刘纲勇,邱学青,邢德松. 工业木质素在木材胶粘剂中应用的研究进展[J]. 精细化工,2007,24(2):190-193.
- [4] 王晨,李书平,邵志勇. 木质素改性皮革复鞣剂的制备与应用研究[J]. 皮革化工,2003,20(3):12-14.
- [5] Wang M, Leitch M, Xu C. Synthesis of phenol-formaldehyde resins using organosolv pine lignins[J]. European Polymer Journal, 2009,45(12):3380-3388.
- [6] Brunow G, Ronnberg M. Peroxidatic oxidation of some phenolic lig-

nin model compounds[J]. Acta Chemica Scandinavica Series B-Organic Chemistry and Biochemistry, 1979,33(1):22-26.

- [7] Fournand D, Cathala B, Lapiere C. Initial steps of the peroxidase-catalyzed polymerization of coniferyl alcohol and/or sinapyl aldehyde: Capillary zone electrophoresis study of pH effect[J]. Phytochemistry, 2003,62(2):139-146.
- [8] 汪学军. 反相微乳液酶催化合成木质素-对甲酚共聚物[J]. 纤维素科学与技术,2000,8(2):7-12.
- [9] Liu J, Li L, Cheng J, et al. Molecular weight and distribution of copolymer of lignin-phenol in copolymerization catalyzed by peroxidase[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2001,81(10):2408-2418.
- [10] Cheryl L B, Andreas B, Inmar Z M, et al. Enzymatic nitration of phe. Nols[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001,15:55-64.
- [11] Lemire J, Kumar P, et al. Metabolic adaptation and oxaloacetate Homeostasis in P-fluorescens exposed to aluminum toxicity[J]. Journal of Basic Microbiology, 2008,48(4):252-259.
- [12] Sterjiades R, Dean J F D, Gamble G, et al. Extracellular laccases and peroxidases from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell-suspension cultures[J]. Planta, 1993,190(1):75-87.
- [13] Lurgro G, Carrea G, Sportoletti G, et al. Oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1973,159(1):12-15.
- [14] 缪静,姜组茂. 漆酶最新研究进展[J]. 烟台师范学院学报, 2001,17:146-150.
- [15] Ikeda R, Uyama H, Kobayashi S. Novel synthetic pathway to a poly(phenylene oxide) Laccase-catalyzed oxidative polymerization of syringic acid[J]. Macromolecules, 1999,29(8):3053-3054.
- [16] 徐飞,贾红华,周华,等. 邻苯二酚在水相胶束中的酶促聚合[J]. 精细化工,2014,31(7):840-843.
- [17] 张鹏. 以 ABTS 为底物测定漆酶活力的方法[J]. 印染助剂, 2007,24(1):43-45.
- [18] 卜令习,鲁杰,杨瑞丰,等. 紫外可见光谱法测定黑液中木素含量[J]. 化工学报,2010,61(12):3266-3271.
- [19] Ewelyn A. Quantitative characterization of a Hardwood milled wood Lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2005,53(25):9639-9649.
- [20] Wegener G, Strobel C. Determination of phenolic hydroxyl groups in lignins and lignin fractions by means of aminolysis and FTIR spectroscopy[J]. Holz Als Roh Und Werkstoff, 1992,50(11):417-420.
- [21] 赖玉荣,张曾,黄干强,等. FC 法测定木素和纸浆中的酚羟基[J]. 中国造纸学报,2007,22(1):54-58. ■