

竹材的超声波处理及生物酶催化聚合研究

王 承 傅佳佳 *

(江南大学江苏省功能纺织品工程技术研究中心, 无锡 214122)

摘 要 采用超声波-漆酶系统联合处理竹材制备高聚物,在超声波水浴、超声波萃取条件下依次加入漆酶,对煮沸预处理所得竹粉萃取原液进行催化,并探寻漆酶聚合液应用于纺织生产的可行性。结果表明,超声波萃取、超声波水浴处理 120min 后,漆酶活性分别降为初始值的 82% 和 83.75%,剩余酶活性仍较高。同竹粉萃取原液相比,漆酶催化聚合所得反应液中 OH 含量明显下降,反应前后颜色变化明显。核磁共振氢谱分析表明,芳香族峰、烯丙基/OH 峰区域明显减弱或消失,证实了竹材中萃取物的有效聚合。漆酶聚合物对棉织物和毛织物有一定的染色效果,后续应进一步增强漆酶的聚合效果,改善其在织物中的应用。

关键词 竹材,超声波处理,漆酶,聚合物,纺织染色

中图分类号 TS10

文献标识码 A

文章编号:1006-3536(2020)07-0256-05

DOI:10.19817/j.cnki.issn 1006-3536.2020.07.058

Ultrasonic treatment and enzymatic polymerization of bamboo

Wang Cheng Fu Jiajia

(Jiangsu Engineering Technology Research Center for Functional Textiles,
Jiangnan University, Wuxi 214122)

Abstract Producing polymer from bamboo based on the ultrasonic-laccase system was mainly focused, and explored its application on textile industry. Laccase was used to catalyze the original bamboo extraction after boiling pretreatment through ultrasonic bath and ultrasonic probe respectively. The results shown that the residual enzyme activities of ultrasonic probe and ultrasonic bath treated for 120min decreased to 82% and 83.75% of the initial value, remaining a high value of the enzyme activity. Compared with the original bamboo extraction, the OH content in the laccase-catalyzed polymeric liquids decreased significantly with an obvious color changes after reaction. The ¹H-NMR test indicated that the aromatic peak and the allyl/OH peak regions were obviously weakened or disappeared, confirming an efficient polymerization of the extracts. The polymers obtained had a certain dyeing effect on the cotton and wool fabric, and subsequent research can be further optimized to enhance the polymerization effect and improve its practical textile application.

Key words bamboo, ultrasonic treatment, laccase, polymer, textile dyeing

竹子是一种生长极为迅速的天然木质纤维素物质,分布十分广泛^[1],其通常由半纤维素、木质素以及纤维素这 3 类高分子构成^[2]。随着生物材料的不断发展,竹材提取物的应用领域也在日益扩大,如木质素衍生物香草醛、酚醛以及对香豆酸等,这些提取物能够作为皮革鞣制过程中的聚合物和漆酶介质^[3-4]。

生物酶和超声波作为极具潜力的标准化学系统的环保替代品^[5],具有一定的经济可行性^[6]。使用超声波处理液体时,在超声波作用下一定范围内的液体产生暂时性负压区,从而在液体中形成气泡或者空穴。Yuan 等^[7]分析了漆酶催化时,超声波预处理过程对 α -乳白蛋白结构及其物理化学性能的影响,结果表明超声波预处理有利于漆酶催化反应中

基金项目:国家自然科学基金(31470509、31201134);“政府间国际科技创新合作”重点专项(2016YFE0115700);江苏省产学研前瞻性研究项目(BY2016022-23);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18_1837);江苏高校品牌建设工程资助项目(PPZY2015B147);中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51622A);中国博士后科学基金资助项目(2019T120390);江苏省博士后科研资助计划(2018K018A)

作者简介:王承(1994-),女,硕士,主要研究方向为生物酶处理纺织用纤维。

联系人:傅佳佳(1983-),女,博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向为纤维及其制品的功能改性研究。

聚合物的生成。Subhedar 等^[8]创新性地将超声波处理与酶法水解相结合,提出了一种生产生物乙醇的新方法,该方法绿色环保且经济实用。与传统酶法水解制备生物乙醇相比,还原糖的浓度释放速率增强了 2.4 倍,时间缩短了 11.5 倍。漆酶在生物处理反应中显示出巨大的潜力^[9-11],而超声波化学通过空化现象可进一步加强化学、物理应用程序,被广泛应用于天然材料萃取过程^[12-15],超声波-漆酶系统通过大规模的协同转移,利于反应性能的改善,进而降低生产成本。

本研究采用超声波-漆酶系统联合处理竹材制备高聚物。在煮沸预处理的基础上,通过超声波水浴、超声波萃取这 2 种方式对竹材进行超声处理,在竹粉萃取原液中加入漆酶进行催化聚合反应,并尝试将漆酶聚合液应用于纺织染色生产中,整个处理过程不使用任何有毒化学试剂,绿色环保无污染,为生物酶在木质纤维中的应用提供依据。

1 实验部分

1.1 原料与仪器

5 年生毛竹(研磨成粉末过 100 目筛);漆酶,产自 *Myceliophthora thermophila*;碳酸钠、Folin 试剂、冰醋酸、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、氘代二甲基亚砜(DMSO),均为分析纯,百灵威集团化学试剂有限公司。

超声波水浴清洗仪(SB25-12DT 型),宁波新芝生物科技股份有限公司;超声波/微波联合萃取仪(简称超声波萃取仪,SM-50 型),南京先欧仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis,UV-9600 型),北京瑞利分析仪器有限公司;烘箱(Y802 型),南通宏大实验仪器有限公司;25mL 离心机(Anke-TGL-20B 型),南通宏大实验仪器有限公司;电脑测色配色仪(Datacolor 650 型),美国 Datacolor 公司;电子分析天平(EL204 型),梅特勒-托利多仪器上海公司;傅里叶变换红外光谱仪(NICOLETIS10 型),赛默飞世尔科技有限公司;单道可调移液器,百得实验仪器有限公司;全数字化核磁共振氢谱仪(¹H-NMR,Bruker Aduance III 型,400MHz),德国 Bruker 公司。

1.2 实验过程

1.2.1 竹粉萃取原液的制备

称量竹粉 30g,按照浴比 1:10(质量比)加入 300mL 去离子水,充分溶解配成竹粉水溶液,煮沸 2h 后离心过滤,将所得竹粉萃取原液置于冰箱中冷

藏保存,以供后续超声处理,收集的固体放入烘箱中于 50℃ 烘至恒重。

1.2.2 超声波水浴漆酶聚合液的制备

取 20mL 竹粉萃取原液,在 40℃ 恒温、漆酶用量为 100U/mL 的条件下,利用超声波水浴清洗仪进行催化聚合反应,反应时间为 2h,得到超声波水浴漆酶聚合液。为了进行对比,制备了不添加漆酶的超声波水浴空白液。

1.2.3 超声波萃取漆酶聚合液的制备

取 20mL 竹粉萃取原液,在 40℃ 恒温、漆酶用量为 100U/mL 的条件下,利用超声波萃取仪进行催化聚合反应,反应时间为 2h,得到超声波萃取漆酶聚合液。为了进行对比,制备了不添加漆酶的超声波萃取空白液。

1.2.4 漆酶聚合物的制备

对超声波水浴漆酶聚合液、超声波萃取漆酶聚合液以及 2 种空白液分别进行冷冻干燥处理,得到相应的固体样品。

1.3 漆酶酶活性测试

以 ABTS 作为底物^[16],在波长 420nm 处通过检测待测溶液吸光度的变化,来测定漆酶的活性。测定方法如下:取 50μL 漆酶聚合液,添加至 150μL 浓度 0.5mmol/L 的 ABTS 溶液中,在波长 420nm 处测试时间 10min 内,每隔 10s 检测溶液吸光度的变化。其中酶活性单位 U 定义如下:1min 内氧化 1μmol ABTS 所需的酶总量,ABTS^{•+} 溶液摩尔消光系数为 30800L/(mol·cm)^[17]。根据朗伯比尔定律,按照式(1)计算漆酶的活性:

$$\text{漆酶活性}(U) = \frac{\Delta A \cdot V_1 \cdot 60 \cdot 1000 \cdot D}{\Delta t \cdot V_2 \cdot \epsilon \cdot d} \quad (1)$$

式中, Δt 为反应时间,s; d 为溶液吸收层的厚度,cm; ΔA 为波长 420nm 处吸光度变化值; V_1 为漆酶溶液和 ABTS 溶液的总体积,μL; V_2 为反应体系所加漆酶溶液的体积,μL; ϵ 为 ABTS^{•+} 自由基于 420nm 处的摩尔消光系数,L/(mol·cm); D 为稀释倍数。

1.4 剩余酶活性测试

以 ABTS 作为底物,对超声波水浴、超声波萃取条件下漆酶的酶活性进行测试^[11],以酶活性初始值作为标准,根据不同时间条件下待测溶液吸光度的变化计算出剩余酶活性值,以进行对比分析。测试过程如下:取 50μL 漆酶,添加 10mL 去离子水,充分振荡摇匀,在漆酶用量为 100U/mL、40℃ 恒温条件下,分别用超声波水浴清洗仪和超声波萃取仪

处理 2h, 每隔 30min 取样检测, 并计算不同时间条件下剩余酶活性值。

1.5 OH 含量测试

利用 Folin-ciocalteu 法对反应过程中的 OH 含量进行测试^[18], OH 含量用光密度(OD 值)表示。分别取竹粉萃取原液、超声波水浴漆酶聚合液、超声波萃取漆酶聚合液以及 2 种空白液进行测试。取上述液体各 100 μ L, 分别加入 500 μ L Folin 试剂、6mL 去离子水摇晃 1min; 再添加 2mL 碳酸钠溶液(质量分数为 15%)和 1.4mL 去离子水, 使得液体总体积达到 10mL, 遮光条件下静置 2h, 于波长 750nm 处测试 OD 值, 记录实验数据。

1.6 UV-Vis 测试

对反应液进行 UV-Vis 测试, 波长范围 230~630nm, 依次记录实验数据。

1.7 $^1\text{H-NMR}$ 测试

取 20mg 上述经冷冻干燥的固体样品, 溶解在 0.5mL DMSO 中, 利用全数字化核磁共振氢谱仪对样品进行 $^1\text{H-NMR}$ 测试, 内标为四甲基硅烷。

1.8 织物染色实验

使用漆酶聚合液对棉织物和毛织物进行染色处理, 记录织物颜色变化情况, 通过电脑测色配色仪测定染色织物最大吸收波长处染色浓度与棉布色泽深浅的比值, 即 K/S 值。

2 结果与讨论

2.1 漆酶酶活性分析

超声波处理条件下漆酶酶活性变化趋势见图 1。由图可知, 漆酶酶活性随着氧化时间的延长均呈现不同程度的下降趋势。使用超声波萃取仪处理时, 漆酶酶活性下降明显, 与超声波水浴清洗仪处理相比, 漆酶酶活性下降速率也更大, 120min 时漆酶酶活性降为初始酶活性的 82%。使用超声波水浴清洗仪处理时, 漆酶酶活性较为稳定, 降幅较小且下降速率更为缓慢, 120min 时漆酶酶活性降为初始酶活性的 83.75%, 剩余酶活性仍然很高。

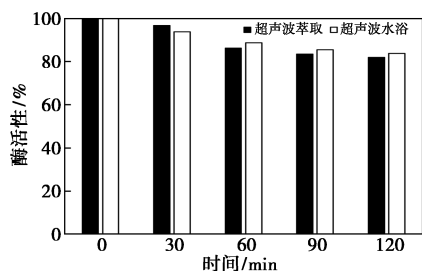


图 1 超声波处理条件下漆酶酶活性变化趋势图

2.2 OH 含量分析

竹材由大量复杂的有机物(蛋白质、脂肪等)构成, 其中木质纤维素和蛋白质成分中含有大量—COOH 和—OH 基团。此外, 漆酶在辅助酚类单体进行生物转化过程中, 可得到结构复杂的聚合物^[19]。研究表明在酚类单体的聚合过程中, 双酚单元彼此通过醚键相连, 反应则在另一个单体单元 para-位置上的 O—C 键发生, 同 orto-位置相比更容易参与反应^[20]。结合该类型的反应机理可知, 低聚/聚合物的自由 OH 基团可以被量化, 同对照组相比, OH 含量的减少是聚合的有力证明。

利用 Folin-ciocalteu 法对反应液中的 OH 含量进行测试(OH 含量用 OD 值表示), 结果见图 2。由图可知: 竹粉萃取原液中 OH 含量最高, OD 值为 0.416; 超声波水浴空白液、超声波萃取空白液中 OH 含量虽然有所下降, 但仍与竹粉萃取原液中 OH 含量很接近, 这表明不添加漆酶、通过超声波处理得到的液体成分与竹粉萃取原液成分基本相同。而经过超声波处理且加入漆酶所得聚合液中 OH 含量下降迅速, 超声波萃取漆酶聚合液中 OH 含量为竹粉萃取原液的 47.84%, 超声波水浴漆酶聚合液中 OH 含量为竹粉萃取原液的 42.07%, 表明竹粉萃取原液中的 OH 同漆酶发生了催化反应生成了漆酶聚合物, 使得 OH 含量下降。

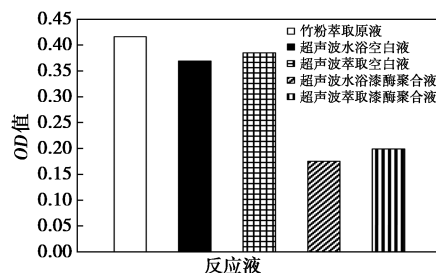


图 2 反应液中的 OD 值

2.3 UV-Vis 分析

木质素作为一种芳香化合物在紫外波段有着很强的吸收, 一般木质素在波长 200~208nm 以及 260~280nm 附近会出现 2 个吸收峰。超声波处理条件下反应液的 UV-Vis 谱图见图 3。由图可知, 紫外光谱的最大吸收峰在波长 270nm 处, 此处吸收峰对应于苯环中 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收, 因此可推测 270nm 处的吸收峰与木质素有关。由图还可以看出: 在超声波水浴和超声波萃取条件下, 竹粉萃取原液与空白液的吸光度非常接近, 而漆酶聚合液的吸光度则呈现上升趋势; 在波长 270nm 处漆酶聚合液的吸光度明显大于竹粉萃取原液和空白液的吸光

度,其中超声波水浴漆酶聚合液、超声波萃取漆酶聚合液的吸光度分别为 1.136 和 1.096。

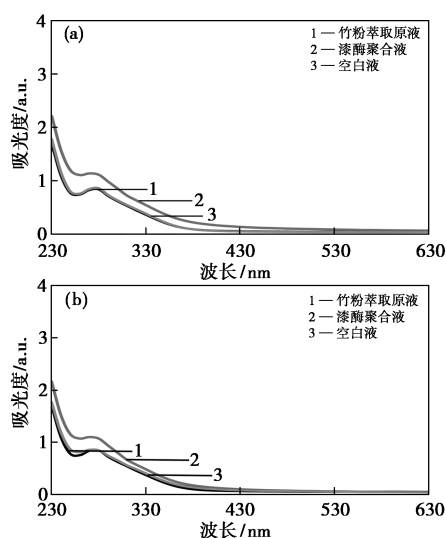


图3 超声波处理条件下反应液的 UV-Vis 谱图
[(a)超声波水浴;(b)超声波萃取]

2.4 $^1\text{H-NMR}$ 分析

通过分析对比可知,与超声波萃取相比,超声波水浴条件下漆酶剩余酶活性更高,漆酶聚合液中 OH 含量下降更明显,270nm 处吸光度更高,因此采用超声波水浴处理效果更佳。图 4 为竹粉萃取原液、超声波水浴漆酶聚合液及空白液的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图。由图可知:超声波水浴漆酶聚合液中芳香族质子(化学位移 $\delta=6.7$)信号强度降低,烯丙基/OH 峰区域(化学位移 $\delta=5.2$)消失;空白液的峰值与竹粉萃取原液相近,进一步证实超声波水浴漆酶聚合液中存在酚类聚合物。

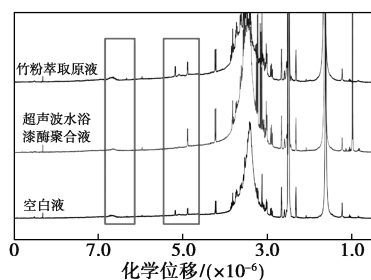


图4 竹粉萃取原液、超声波水浴漆酶聚合液及空白液的 $^1\text{H-NMR}$ 谱图

2.5 织物 K/S 值分析

通过对比竹粉萃取原液、超声波水浴漆酶聚合液的颜色发现,竹粉萃取原液经过漆酶氧化后,由浅黄色的澄清液变成深棕色的混合液,且底部可见一部分深色沉淀物。竹粉萃取原液颜色的变化与从竹材中提取出的酚类物质,如香草酸、5-羟甲基糠醛、

没食子酸、愈创木酚和香兰素^[21]等发生的聚合反应有关。

使用竹粉萃取原液、超声波水浴漆酶聚合液及其空白液、超声波萃取漆酶聚合液及其空白液分别对棉织物以及毛织物进行染色处理。结果表明:漆酶聚合液染色效果较好,2 种织物染色后颜色深;竹粉萃取原液和空白液染色效果均较差。

织物染色后的 K/S 值也是评价染色效果的一个重要指标。图 5 为不同织物染色后的 K/S 值。由图可以看出:毛织物的表观色差高于棉织物,其中用漆酶聚合液染色的毛织物其 K/S 值为 1.52,推测毛纤维中蛋白质所含的羧基同漆酶聚合物中的酚羟基发生了酯化反应,进而增强了毛织物对有色聚合物的吸附力,利于有色聚合物的沉淀与吸附。用空白液和竹粉萃取原液染色的织物其 K/S 值比较接近。综合分析表明,漆酶聚合物对织物的实际染色效果一般,后续应进一步增强漆酶的聚合效果,进而改善其在织物染色中的应用。

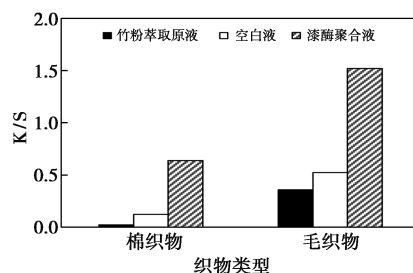


图5 不同织物染色后的 K/S 值

3 结论

(1)超声波处理条件下,漆酶酶活性随着氧化时间的延长呈现出一定的下降趋势。用超声波萃取仪处理 120min,漆酶酶活性降为初始值的 82%;漆酶在超声波水浴条件下更为稳定,酶活性降幅较小且下降速率更为缓慢,120min 时漆酶酶活性降为初始值的 83.75%。测试结果表明,超声波水浴处理效果更佳。

(2)漆酶聚合液中 OH 含量明显下降,超声波萃取条件下 OH 含量为竹粉萃取原液的 47.84%,超声波水浴条件下 OH 含量为竹粉萃取原液的 42.07%。竹材中 OH 同漆酶发生催化反应生成了聚合物,故 OH 含量下降。

(3) $^1\text{H-NMR}$ 分析表明,芳香族峰、烯丙基/OH 峰区域明显减弱或消失,证实了竹材中萃取物的有效聚合。

(4)棉织物及毛织物染色实验结果表明,漆酶聚

合物对织物有一定的染色效果,但表观色深一般,后续应增强漆酶的聚合效果,进而改善其在织物染色中的应用。

(5)以竹材为原料制备高聚物未添加任何化学试剂,制备过程环保无污染。

参考文献

- [1] Peng H, Hu Z, Yu Z, et al. Fractionation and thermal characterization of hemicelluloses from bamboo (*Phyllostachys pubescens* mazel) culm[J]. *Bioresources*, 2011, 7(1): 27-32.
- [2] Bai Y Y, Xiao L P, Shi Z J, et al. Structural variation of bamboo lignin before and after ethanol organosolv pretreatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(11): 21394-21413.
- [3] Camarero S, Ibarra D, Martínez Á T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(4): 1775-1784.
- [4] Suparno O, Covington A D, Phillips P S, et al. An innovative new application for waste phenolic compounds: use of kraft lignin and naphthols in leather tanning[J]. *Resources Conservation & Recycling*, 2005, 45(2): 114-127.
- [5] 王承, 段君禄, 刘文, 等. 竹子的超声波处理研究[J]. *化工新型材料*, 2018, 46(4): 247-250.
- [6] Gonçalves I, Silva C, Cavaco-Paulo A. Ultrasound enhanced laccase applications[J]. *Green Chemistry*, 2014, 17(3): 1362-1374.
- [7] Yuan X, Li X, Zhang X, et al. Effect of ultrasound on structure and functional properties of laccase-catalyzed α -lactalbumin[J]. *Journal of Food Engineering*, 2018, 223: 116-123.
- [8] Subhedar P B, Babu N R, Gogate P R. Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015, 22: 326.
- [9] Kobayashi S, Makino A. Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry[J]. *Chemical Reviews*, 2009, 109(11): 5288-5353.
- [10] 郭守娇, 杨慕莹, 邢铁玲, 等. 漆酶催化 ϵ -聚赖氨酸接枝蚕丝织物的抗皱整理工艺优化试验[J]. *蚕业科学*, 2012, 38(6): 1044-1050.
- [11] 袁萌萌, 王强, 范雪荣, 等. 羊毛织物的漆酶催化没食子酸原位染色与改性[J]. *印染*, 2016(22): 8-12.
- [12] 包鸿慧, 曹龙奎, 周睿. 旋转回归实验优化超声波提取玉米黄色素的工艺研究[J]. *中国食品添加剂*, 2007(2): 112-115.
- [13] 高霞, 仇农学, 庞福科, 等. 超声波辅助提取苹果籽油工艺研究[J]. *中国油料作物学报*, 2007, 29(1): 78-82.
- [14] 常秀莲, 王长海, 冯咏梅, 等. 超声波法提取库拉索芦荟花多糖[J]. *烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2005, 18(2): 137-141.
- [15] 王昌利, 杨景亮, 宋小妹. 超声技术在中草药提取方面的应用[J]. *陕西中医药大学学报*, 1993(3): 33-35.
- [16] Johannes C, Majcherczyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 78(2): 193-199.
- [17] Childs R E, Bardsley W G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen[J]. *Biochem J*, 1975, 145(1): 93-103.
- [18] Stankovikj F, McDonald A G, Helms G L, et al. Characterization of woody biomass pyrolysis oils' water soluble fraction[J]. *Energy & Fuels*, 2017, 31(2): 87-93.
- [19] Zerva A, Manos N, Vouyiouka S, et al. Bioconversion of biomass-derived phenols catalyzed by myceliophthora thermophila laccase[J]. *Molecules*, 2016, 21(5): 550.
- [20] Sun X, Bai R, Zhang Y, et al. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenolic compounds[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(7): 1673-1680.
- [21] Wang C, Tallian C, Su J, et al. Ultrasound-assisted extraction of hemicellulose and phenolic compounds from bamboo bast fiber powder[J]. *Plos One*, 2018, 13(6): 0197537.

收稿日期: 2018-11-12

修回日期: 2020-03-10

(上接第 255 页)

- [17] 聂翔, 郭孝东, 钟本和, 等. 锰源对燃烧法制备 5V 级正极材料 $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ 的影响[J]. *无机化学学报*, 2012, 28(12): 2573-2580.
- [18] Yu R, Sun Y, Zou B Y, et al. $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ based composite electrodes with improved properties prepared by a slurry spray deposition process[J]. *Journal of Power Sources*, 2017, 340: 258-262.
- [19] Risthaus T, Wang J, Friesen A, et al. Synthesis of spinel $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ with secondary plate morphology as cathode material for lithium-ion batteries[J]. *Journal of Power Sources*, 2015, 293(2): 137-142.
- [20] Wang Z L, Dupre N, Lajaunie L, et al. Effect of glutaric anhydride additive on the $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ electrode/electrolyte interface evolution: a MAS NMR and TEM/EELS study[J]. *Journal of Power Sources*, 2012, 215(5): 170-178.
- [21] Mao J, Ma M, Liu P, et al. The effect of cobalt doping on the morphology and electrochemical performance of high-voltage spinel $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ cathode material[J]. *Plos One*, 2016, 8(14): 9116.
- [22] Ma Y, Wang L, Zuo X, et al. Co-precipitation spray-drying synthesis and electrochemical performance of stabilized $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ cathode materials[J]. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 2018, 8: 1-7.
- [23] Li J, Li Q, Li S, et al. Preparation and properties of F-doped $\text{LiNi}_{0.5}\text{Mn}_{1.5}\text{O}_4$ materials[J]. *Rare Metal Materials and Engineering*, 2017(2): 439-444.

收稿日期: 2019-10-29

修回日期: 2020-05-04