竹子超声波萃取液特性及其漆酶催化研究

段君禄[1], 刘 文[1], 傅佳佳[1], 王鸿博[1], 陈太球[2], 蒋春燕[2]
(1.江南大学 江苏省功能纺织品工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122; 2.圣华盾防护科技股份有限公司, 江苏 无锡 214000)

摘 要: 竹子属于木质纤维素的一种,其主要成分为纤维素、半纤维素和木质素。超声波是一种频率在20~50 kHz范围内的声波,超声波提取就是利用超声波产生的空化、振动、粉碎和搅拌的综合效应对天然产物中的有效成分进行萃取。利用超声波对竹子的萃取、漆酶催化超声波萃取,构建竹子-超声波处理体系和竹子-漆酶催化氧化体系,研究超声波对竹子的萃取效果和漆酶对竹子超声波萃取液的催化氧化效果。通过分析扫描电镜、傅里叶红外变换光谱和紫外分光测试结果表明:超声波作为一种环保温和的处理方式可以将竹子中部分木素酚类分子提取出来;漆酶可以催化氧化超声波萃取液,生成新的物质,且对环境无污染。

关键词: 竹; 超声波; 萃取; 漆酶; 催化
中图分类号: TS102.511 **文献标识码**: B **文章编号**: 1001-2044(2018)03-0054-05

Bamboo ultrasonic extractions and its laccase catalysis

DUAN Junlu[1], LIU Wen[1], FU Jiajia[1], WANG Hongbo[1], CHEN Taiqiu[2], JIANG Chunyan[2]
(1.Jiangsu Engineering Technology Research Center for Functional Textiles, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)
(2.The Swoto Protection and Technology Co., Ltd., Wuxi 214000, China)

Abstract: Bamboo is a kind of lignocellulose material, and its main components are cellulose, hemicellulose and lignin. Ultrasonic is a sound wave with frequency in the range of 20~50 kHz. Ultrasonic extraction takes the use of ultrasonic cavitation, vibration, crushing and the combined effect of stirring on the extraction of active ingredients from natural resources. The ultrasonic extraction of bamboo with laccase catalysisis focused on. The bamboo-ultrasonic system and bamboo ultrasonic-laccase catalyzing system are constructed. The ultrasonic extraction on bamboo and the laccase catalysis effect are studied. The results with scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy and UV spectroscopy indicate that ultrasonic treating is an environmentally friendly pretreatment method to extract part of bamboo lignin phenols from bamboo, and the use of laccase can catalyze and have oxidation on the bamboo ultrasonic extraction to produce new substances without pollution.

Key words: bamboo; ultrasonic wave; extraction; laccase; catalysis
DOI:10.16549/j.cnki.issn.1001-2044.2018.03.018

竹子是一种独特的禾本科植物,具有抗菌、抗紫外线等多种特性,而且可以被生物降解[1]。我国竹类资源丰富,具有得天独厚的优势及非常悠久的竹子栽培与使用历史[2]。研究开发竹类资源对于替代化石资源、发展低碳经济和促进可持续发展具有重要意义。

近年来超声波、微波和超临界萃取技术逐渐发展起来,其中超声波辅助提取因具有作用条件温和、提取时间短和提取效率高等优点而备受关注。目前超声波被广泛应用于金属探伤、医学诊断与治疗、食品工业和生物工程等方面[3],近年来也有学者将超声波在纺织行业中进行了尝试性应用[4],并取得了一些效果,比如在前道加工和后整理等工序中运用超声波处理织物,可改善织物品质,赋予其独特的性能。

随着低碳理念不断深入人心,为了得到功能性大分子,改善织物特性,可采用环保的生物酶对超声波提取出来的小分子进行催化反应生成新物质。酶具有高效、专一、反应条件温和、活性可调节等多种优点[5]。漆酶作为一种多铜氧化还原酶[6],可以利用氧气催化氧化底物而不依赖其他化学试剂。同时漆酶的作用底物非常广泛,加入某些介体提高漆酶的氧化还原电势还能扩大它的底物范围[7]。本文采用超声波对竹子进行萃取,再采用漆酶催化超声波萃取液,构建竹子-超声波处理体系和竹子-漆酶催化氧化体系,评定超声波对竹子的萃取效果和漆酶对竹子超声波萃取液的催化氧化效果。

1 试验过程

1.1 原料与试剂

五年生毛竹,产自安徽黄山,经粉碎机粉碎后过100目筛,收集粉末装袋备用;甲苯、无水乙醇、浓硫

收稿日期: 2017-06-05
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);江苏省基础研究计划(自然科学基金)青年基金项目(BK2012112);江苏省产学研前瞻性研究项目(BY2013015-24、BY2016022-23);现代丝绸国家工程实验室技术创新基金项目资助(苏州大学丝绸工程省级重点实验室开放课题)(KJS1312);中央高校基本科研业务费专项资金资助(JUSRP51622A);江南大学校级大学生创新训练计划项目(2016194Y);江苏省功能纺织品工程技术研究中心项目(BM2014399)
作者简介: 段君禄(1994—),男,河北廊坊人,主要从事纤维材料及其制品的功能改性研究。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酸、氯化钡,以上均为 AR,国药集团化工试剂有限公司制;漆酶,由葡萄牙米尼奥大学 CEB 中心提供;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、脱碱木质素,均由百灵威集团化学试剂有限公司制。

1.2 主要仪器

索氏提取器,HH-4 型数显恒温水浴锅(江苏荣华仪器制造有限公司),单道可调移液枪(德国 Eppendorf 股份有限公司),有塞三角烧瓶,玻璃砂芯漏斗,抽滤瓶,SHZ-D(Ⅲ)型循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司),85-2A 型数显测速恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市友联仪器研究所),干燥器,电热鼓风干燥箱(南通宏大实验仪器有限公司),EL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海公司),球形冷凝管,超声波微波组合反应系统和超声波信号发生器(南京先欧仪器制造有限公司),LTC2 型低温循环水浴槽(英国固兰特仪器有限公司),UV-9600 型紫外/可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司),冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),25 mL Anke-TGL-20B 型离心机(南通宏大实验仪器有限公司),pH 计(北京鼎国昌盛生物技术有限公司),傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 有限公司),ThermoMixer(德国 Eppendorf 股份有限公司),Synergy H1 Microplate Reader(美国伯腾仪器有限公司)。

1.3 竹粉有机抽提

称量约 4 g 竹粉,用滤纸包好,放入索氏提取器中,然后将甲苯和乙醇按 1∶2 的体积比放入索氏提取器中抽提竹粉,抽提时间为 4~6 h,直到索氏提取器中的液体变为无色或者接近无色,水浴温度为 99℃。为防止甲苯等有毒气体挥发,整个抽提过程在通风橱中进行[8]。抽提结束后,将竹粉放在通风处自然晾干。为获得抽提液中的溶解物质,需将抽提液进行有效浓缩。将取抽提后的有机混合溶液加入索氏提取器中,方法与竹粉抽提相同,每隔一段时间将提取器中无色液体取出,留下圆底烧瓶中物质,不断浓缩。

1.4 竹粉中木质素含量的测定

参考 GB/T 5889—1986《苎麻化学成分定量分析方法》,分别称取约 0.5 g 抽提过的竹粉,放置于已知质量的有塞三角烧瓶中,在 105℃条件下烘干 2 h,然后立刻置于干燥器中冷却 30 min,称重,记录。加入 15 mL 72%的硫酸溶液,在 5℃~18℃条件下放置24 h,然后转移到锥形瓶中,并用蒸馏水定容至 150 mL;然后安装球形冷凝管沸煮 1 h,稍冷,用已知质量的玻璃砂芯漏斗反复抽滤、洗涤,用 10%氯化钡溶液进行检测,直到滤液中不含有硫酸根离子为止;取下玻璃砂芯漏斗,在 105℃烘箱中烘至恒重,取出迅速置于干燥器中冷却,并称重记录。

1.5 超声波处理竹粉

根据之前校正过的最优参数,称取 4 g 干燥竹粉置于超声波反应仪器中,按照浴比 1∶10 加入 40 mL 去离子水,探头伸入液面下 15 mm,探头直径为 6 mm,超声功率为 700 W,超声频率为超声 2 s、间歇 4 s,超生时间为 30 min,冷凝水浴温度为 0℃[9]。用此参数分别处理有机抽提前后的竹粉,用 10 mL 试管将处理后的竹粉溶液分装好,并做好标记进行区分。将试管放入离心机中离心,试管呈中心对称放置,每个试管中样品量要大致相同,离心时间为 5 min,转速为 8 000 r/min。离心结束后取出试管放于试管架上,用滴管将上清液和竹粉分离开,分装好并做好标记。为了确定上清液中可溶物成分,采用冷冻干燥的方法去除水分,可以最大限度保持样品原来的空间结构和体积,避免产生浓缩现象,获得萃取液中的固体作为待测样备用。

1.6 漆酶催化竹子超声波萃取液反应

1.6.1 漆酶酶活测定

酶活定义为在最适合条件下,1 min 内转化1 μmol 底物所需要的酶量[10]。通常漆酶酶活的测定采用 ABTS 法[11],即以 ABTS 溶液作为漆酶作用的底物。漆酶将 ABTS 溶液转化为 ABTS 自由基,ABTS 自由基在 420 nm 处的吸光度系数远远大于 ABTS,随着反应的进行,420 nm 处的吸光度值会变大,通过计算单位时间内 420 nm 处吸光度的变化,可以得到漆酶的酶活。具体方法为:量取 2.8 mg ABTS 固体溶解在 10 mL 去离子水中,因 ABTS 溶液对光敏感,所以将溶解后的 ABTS 溶液用锡纸包住。用 pH 为 5 的醋酸缓冲液将漆酶稀释一系列梯度。取 100 μL 稀释后的酶液和 100 μL ABTS 溶液滴加到酶标仪测试板上,设置温度为 45℃,在 420 nm 处,用动力学方法,设置测试反应时间 10 min,读数间隔为 1 min,计算漆酶酶活。

1.6.2 漆酶与竹子超声波萃取液

反应总体积为 2 mL,漆酶推荐最适 pH 为 4~5[12],这里选用 pH 为 5 的醋酸缓冲液,漆酶浓度为

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 U/mL,恒温混匀仪温度为 40℃,转速为 300 r/min,反应时间为 24 h。试验设置 3 组,第 1 组为试验组,第 2 组为试验平行组,第 3 组为对照组,每组所加试剂见表 1。将反应结束的样品离心 5 min,转速为 8 000 r/min,将上清液和沉淀分离并分装好做好标记,冷冻干燥 24 h,保存备用。

表 1 漆酶与竹粉上清液反应配料 μL

项目	酶	醋酸缓冲液	竹粉上清液
第 1 组(试验组)	10	990	1 000
第 2 组(试验组平行样)	10	990	1 000
第 3 组(对照组)	0	1 000	1 000

1.7 测试表征

1.7.1 SEM 测试

利用扫描电镜观察有机抽提前后及超声波萃取前后竹粉表面结构的变化。取适量待测样品,用导电胶将竹粉粘到铝制托盘上,然后用离子溅射镀膜仪在样品表面镀一定厚度的金属膜。将制好的样品放到电镜下观察表面结构变化[13],电镜放大倍数为 2 500 倍。

1.7.2 傅里叶红外变换光谱(FTIR)测试

采用溴化钾压片法进行固体样品分析。将待测样置于温度为 105℃的烘箱中,烘干 2~3 h,然后取出迅速放到干燥器中干燥 30 min 备用。称取 1 mg 干燥后的样品和 100 mg KBr 于洁净干燥玛瑙研钵中进行研磨,使两者充分混合,直至固体挂壁。随后取一定量的混合样品放于洁净干燥的压片模具中,用压片机压至透明的薄片。将制好的压片样品放到红外光谱仪器上进行测试[14],首先未放样品时采集背景,然后再测试样品,设定扫描范围为 4 500~500 cm^{-1}[15],观察并保存谱图。

1.7.3 紫外光谱(UV)测试

在漆酶与竹粉上清液的反应过程中,每隔一段时间取反应溶液检测吸光度变化,方法是取 100 μL 反应溶液放到酶标仪中进行检测,波长范围为 260~500 nm[16],时间点分别选取 0、1、2、6、12、24 h。

2 试验结果

2.1 竹粉有机抽提前后性能分析

观察有机抽提溶剂在竹粉抽提前后的色泽变化可见,抽提前,有机试剂为无色混合液,抽提后呈现明显的黄色。这一现象说明,通过抽提,竹粉中部分物质会溶解在甲苯和乙醇混合液中。

通过对抽提后有机混合溶液中的抽提剂进行挥发,浓缩后得到的固体的红外光谱图见图 1。

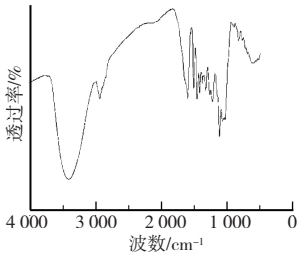
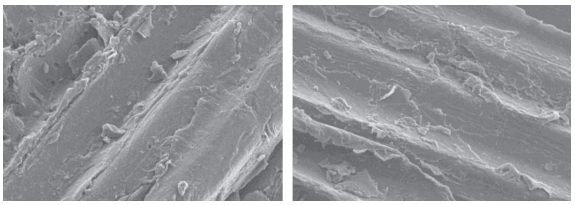


图 1 有机抽提液提取物红外谱图

可见,在 1 602 cm^{-1} 处为 C=C 的伸缩振动,1 456 cm^{-1}和 1 384 cm^{-1}处为亚甲基和甲基等类脂物弯曲振动的特征峰值[17]。由此可以推测有机抽提液将竹粉表面部分类脂物萃取下来。

有机抽提前后竹粉的表观结构见图 2。



(a) 原始竹粉 (b) 有机抽提后

图 2 有机抽提前后竹粉 SEM 图

图 2(a)为原始竹粉图片,可见原始竹粉表面比较光滑,因为有类脂物和部分果胶包裹在竹粉表面。由图 2(b)可见,竹粉经过有机溶剂抽提之后,表面变得粗糙复杂。结合抽提前后有机溶剂颜色的变化可以推测出,有机抽提将包覆在竹子表面的类脂物等物质从竹子表面脱离下来,使竹子内部结构更多地暴露出来。

2.2 竹粉中木质素含量及性能

第 1、2 组竹粉中木质素含量分别为 30.43%和 32.90%。可以看到,两组平行测试组竹粉中的木质素含量都高于 30%,竹中木质素含量平均值约为 31%,木素含量较高,可以确保后续超声波萃取试验中有一定量的有效木素酚类物质存在。

对从竹子中提取出的木质素进行红外分析,红外光谱图见图 3。

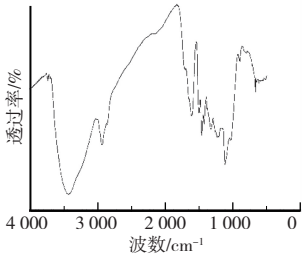


图 3 制得木质素样品红外光谱测试

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

谱图中 1 520~1 500 cm^{-1}及 1 470~1 460 cm^{-1}处为木质素特征峰[18],进一步确定竹粉中有效木素含量较高。

2.3 超声波萃取前后竹粉及萃取液特性分析

对超声波处理后的上清液进行冷冻干燥并做红外测试,结果见图 4。

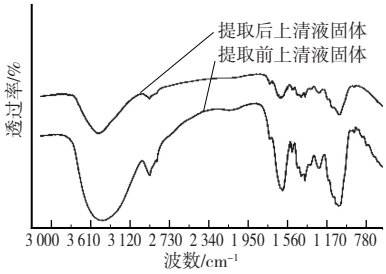


图 4 竹粉超声波萃取液冷冻干燥后 FTIR 测试

图 4 中 1 605 cm^{-1}处是苯环的伸缩振动峰,1 245 cm^{-1}处是 O-H 弯曲振动峰,这些是木质素的特征峰[18],可见超声波对原始竹粉和有机抽提之后的竹粉均有一定的萃取效果,超声波处理将竹中木素类小分子通过空化作用萃取出来。为进一步确认萃取液中成分,对萃取液进行了 UV 测试,并与标准木质素溶液进行比对,结果见图 5。

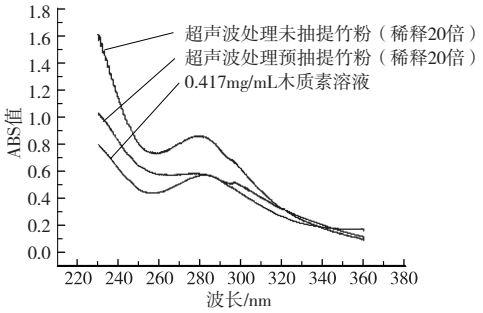
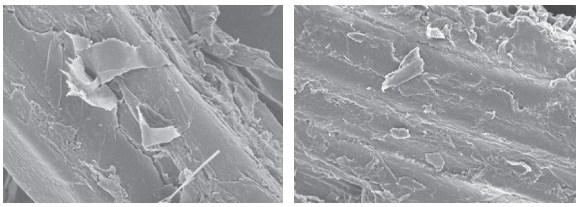


图 5 萃取液 UV 测试

由图 5 可以看出,无论是抽提后的竹粉还是原始竹粉,经超声波萃取后在波长 280 nm 处都和纯的脱碱木质素有相同的峰值。查表可知,波长 280 nm 处峰值代表酚羟基[19],可知超声波处理后的竹粉上清液中都含有可溶性酚类物质。

空化效应是超声波十分典型的物理效应[20]。在液体当中,超声波或者涡流的作用使得液体中的某一范围内产生部分区域的暂时性负压区,从而在液体中形成气泡或者空穴。这些气泡因为含有蒸汽或空气而处于一种不稳定的状态,它们瞬间闭合时形成的急波使得部分细微范围内有极大的压强。此外,气泡自身的非线性振动以及它们破裂时造成的极其巨大的压力,使得这一种空化现象出现的同时会伴随着一系列的物理以及化学效应。超声波处理前后竹粉的形貌见图 6。



（a）原始竹粉 （b）有机抽提后

图 6 超声波处理之后竹粉的扫描电镜图

通过对比图 6 和图 2 可以看出,在未进行超声波处理之前,竹粉的表面结构比较致密,内部空隙和孔洞比较少,反应活性低;经过超声波预处理之后,竹粉表面形成了许多沟壑,竹子内部空隙和孔洞比较多。推测这应该与超声波处理过程中产生的空化作用有关,即在超声波的机械作用下,竹粉表面结构受到破坏,竹子致密的结构被打开,竹子内部成分被萃取出来,增加了反应比表面积。

2.4 漆酶对竹子超声波萃取液的反应体系研究

漆酶酶活测试结果见表 2。

表 2 漆酶酶活测定数据

项目		稀释倍数	
		100 000	500 000
不同时刻 *OD* 值（试验组与平行组的均值）	0 min	0.068 5	0.063 5
	1 min	0.111 0	0.074 5
	2 min	0.161 0	0.083 5
	3 min	0.216 5	0.095 5
	4 min	0.277 5	0.108 5
	5 min	0.344 0	0.122 5
	6 min	0.413 5	0.138 0
	7 min	0.492 5	0.153 5
	8 min	0.569 5	0.171 0
	9 min	0.651 0	0.191 5
	10 min	0.736 5	0.210 5
每分钟 *OD* 值变化的均值		0.066 8	0.0147
酶活 *U*/mL		394.3	433.9
平均酶活 *U*/mL		414	

本试验中漆酶酶活大约为 414 U/mL,属于高活力漆酶,可以尝试用于与超声波萃取的竹粉上清液进行酶促反应。

观察反应前后漆酶与超声波萃取竹粉的上清液反应溶液颜色变化,可以看到溶液颜色由浅黄色变成了黄褐色,说明漆酶能够与超声波萃取的竹粉上清液发生发应。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在反应进行的不同阶段,取样进行UV测试,检测得到的*OD*值为平行组减去空白组得到的差值,对此差值取平均值进行作图分析,结果见图7。

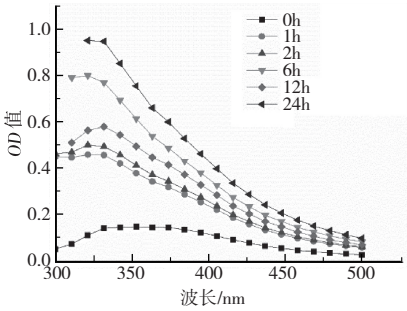


图7 漆酶与竹粉反应各时刻UV测试

从图7可以看出,0 h时刻时350 nm处的峰值不明显;随着时间的延长,350 nm处的峰值逐渐变强;到了24 h后,峰值变为0.85。而在相同稀释倍数下检测280 nm处的峰值,发现峰值由0.373变为0.258。由此可以推断,漆酶与萃取液中酚类分子发生反应生成了新的物质,从而在350 nm处出现增强峰。

3 结 语

(1)通过扫描电镜观察抽提前后竹粉表面的结构变化,发现有机抽提后的竹粉表面由于去掉了类脂物而变得粗糙。红外光谱检测发现,抽提前后竹粉主成分并未发生明显变化,而且通过检测发现,竹粉中木质素含量高达31%,可见竹粉中木质素含量丰富。

(2)通过UV测试发现,超声波萃取后的溶液在280 nm处有明显出峰,可见超声波预处理能够有效提取出竹粉中木质素酚类物质;通过扫描电镜观察超声波处理前后竹粉表面结构变化发现,超声波处理后竹粉表面致密的结构被打破,内部结构暴露出来,合理优化超声波工艺参数以后,有望提高萃取效率。

(3)根据酶活定义测定实验室漆酶酶活发现,漆酶对ABTS底物具有较高的催化能力,酶活高达414 U/mL。在漆酶催化氧化木质素标准溶液以及竹粉的超声波萃取液试验中,通过检测各时刻反应溶液*OD*值及反应结束后对溶液进行紫外测试发现,漆酶能够作用于木质素标准溶液和竹粉超声波萃取液,生成新物质。如果选择合适的催化底物并优化工艺条件,可以提高催化效率,增加产物量。

参考文献:

[1] 赵燕,张娟,杨益琴.几种竹子原料的化学组成及纤维形态的研究:广东省造纸学会第九次会员代表大会暨2011年学术年会[C].2011.
[2] 胡敏君.竹子价值的设计开发[D].上海:同济大学,2006.
[3] 禹文峰,任凤莲,吴晓斌.百合多糖的超声波提取工艺研究[J].广州化学,2007(2):36-40.
[4] 谷勋刚.超声波辅助提取新技术及其分析应用研究[D].合肥:中国科学技术大学,2007.
[5] 王祎宁,赵国柱,谢响明,等.漆酶及其应用的研究进展[J].生物技术通报,2009(5):35-38.
[6] MINUSSI R C,PASTORE G M,DURAN N.Potential applications of laccase in the food industry[J].Trends in Food Science & Technology,2002,13(6):205-216.
[7] 王国栋,陈晓亚.漆酶的性质、功能、催化机理和应用[J].植物学通报,2003(4):469-475.
[8] 杜晓莹.超声波辅助竹子酶解体系构建及其机理研究[D].无锡:江南大学,2017.
[9] 张昌军,原方圆,邵红兵.超声波法在提取多糖类化合物中的应用研究[J].化工时刊,2007(2):54-56.
[10] 林俊芳,刘志明,陈晓阳,等.真菌漆酶的酶活测定方法评价[J].生物加工过程,2009(4):1-8.
[11] ZHANG P.Test method for the laccase activity with ABTS as the substrate[J].Textile Auxiliaries,2007,24(1):43-45.
[12] 季立才,胡培植.漆酶催化氧化反应研究进展[J].林产化学与工业,1997(1):81-86.
[13] 徐柏森,杨静,刘军利.扫描电镜技术在纤维开发研究中的应用[J].中国野生植物资源,2007(6):49-51.
[14] 邱卫华,陈洪章.红外光谱分析木质素在漆酶酶法改性中的反应性[J].光谱学与光谱分析,2008(7):1501-1505.
[15] 覃益民,吴苗苗,刘幽燕.超声波辅助碱法预处理提高蔗渣酶解糖化活性的研究[J].可再生能源,2009(6):28-32.
[16] 赵旭红,石海强,张健,等.紫外光谱定量测定木质纤维预水解液中溶解性木素和糠醛含量[J].化工学报,2015(6):2295-2302.
[17] 彭湃.竹子主要组分的分离及结构鉴定[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.
[18] 林奕贤,杜文琴.竹纤维的性能及其产品开发[J].五邑大学学报(自然科学版),2006,20(3):76-78.
[19] 路瑶,魏贤勇,宗志敏,等.木质素的结构研究与应用[J].化学进展,2013(5):838-858.
[20] 廖维良,赵美顺,杨红.超声波辅助提取技术研究进展[J].广东药学院学报,2012(3):347-350.

欢迎订阅《上海纺织科技》
邮发代号: 4-397 联系电话:021-55211341

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net