

研究与开发

漆酶活化木材产生活性氧类自由基的处理条件研究

周冠武^{1,2}, 段新芳¹, 李家宁¹, 陈永圣², 曹远林²

(1. 中国林科院木材工业研究所, 北京 100091; 2. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要: 自由基对漆酶活化木材产生胶合力起着关键性的作用。通过试验分析反应体系 pH 值、处理温度、酶用量、处理时间及树种等因子, 对漆酶处理木粉产生的活性氧类自由基的相对浓度的影响。研究结果表明, 5 个因子均对活性氧类自由基相对浓度有极显著影响。当采用思茅松心材木粉、处理 4 h、反应体系 pH 值为 4、酶用量为 1.5 U/g 木粉、处理温度为 60 ℃ 时, 漆酶活化木材产生的活性氧类自由基的相对浓度最高。

关键词: 活性氧类自由基; 木材; 漆酶; 思茅松; 枫香

中图分类号: TQ351 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-8654(2006)05-0017-04

A Study of Reaction Parameters for Laccase Activation of Wood to Produce Reactive Oxygen Species Free Radicals

ZHOU Guan-wu^{1,2}, DUAN Xin-fang¹, CAO Yuan-lin², CHEN Yong-sheng², LI Jia-ning¹

(1. Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Free radicals play a key role when wood is activated by laccase to gain self-adhesion. The relative intensities of reactive oxygen species (ROS) free radicals generated when woodflour was incubated with laccase at different pH values, incubation temperatures, dosages of laccase, periods of incubation and wood species were investigated. The effect of these factors on the relative intensities of ROS free radicals was analyzed and discussed. The results showed that there was an extraordinarily significant difference in the relative intensities of ROS free radicals at different factorial levels. The optimum value was reached when the woodflour of *Pinus kesiya* heartwood was treated for 4 hours of incubation, pH 4, enzyme dosage of 1.5 U/g woodflour and incubation temperature of 60℃ were used. The current research lays the theoretical foundations of the upcoming optimization of processing parameters for the manufacture of fiberboards by laccase-catalyzed oxidation of wood fibers.

Key words: reactive oxygen species free radicals; wood; laccase; szemao pine; beautiful sweetgum

由脲醛树脂胶、酚醛树脂胶等传统胶黏剂生产的人造板, 在加工和使用过程中存在释放对人体有害的挥发性有机物问题, 因此开发对环境和人体健康无害的胶黏剂, 成为当前人造板用胶黏剂研究的热点。漆

酶(EC 1. 10. 3. 2)作为一种氧化还原酶, 在氧气存在的条件下, 能催化酚羟基进行单电子氧化反应, 产物为酚氧自由基和水^[1]。通过自由基反应, 漆酶能使木素合成和降解, 在自然界的木素合成及降解过程中起着重要的作用^[2]。有研究表明, 漆酶能够活化木纤维表面的木素, 使木纤维相互胶合。如 Kharazipour^[3]等在普通热压条件下, 以经漆酶处理的木纤维为原料, 压制的中密度纤维板符合德国国家标准要求; 朱

收稿日期: 2005-07-21; 修改稿: 2006-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471352)。

作者简介: 周冠武(1981—), 男, 中国林科院木材工业研究所硕士研究生。

通讯作者: 曹远林, 男, 中国科学院生物物理研究所副研究员。

万方数据

家琪^[4]等在试验室条件下,用漆酶处理思茅松纤维并压制纤维板,板材密度为 1.16 g/cm³ 时,其内结合强度可达 1.54 MPa。

漆酶处理木纤维产生的胶合作用,与经漆酶处理的木纤维中形成的相对稳定的酚氧自由基有关^[2]。Felby^[5]等在漆酶催化氧化的欧洲水青冈木纤维上,发现了半衰期超过两个星期的稳定的酚氧自由基,并推测漆酶催化木材进行的氧化反应也产生了活性氧类自由基,即超氧阴离子自由基和羟基自由基等。在木素的真菌降解过程中,已经检测出了活性氧类自由基^[6-7]。曹永建^[8]考察了漆酶处理木材产生的活性氧类自由基的相对浓度与酶法纤维板内结合强度的相关性,发现二者呈正相关关系。

但迄今为止,对漆酶活化木材产生活性氧类自由基的相对浓度与酶促反应条件间的关系鲜有研究报道。本试验研究漆酶活化木材过程中产生的活性氧类自由基,进一步探究漆酶处理木纤维的胶合机理,旨在为利用漆酶活化木纤维生产纤维板的工艺提供理论依据,以加速这项技术的工业化进程。

1 材料和方法

1.1 材料

漆酶液:由诺维信中国有限公司(Novozymes China)提供,测定漆酶活性时使用的底物为丁香醛连氮(syringaldazine)的乙醇溶液^[9]。一个酶活单位(U)指一定反应条件下,每 min 催化 1μmol 丁香醛连氮转化为产物所需要的酶量。本试验所用漆酶处理液的比活性为 1.2 U/mL。

仪器:HITACHI U-2010 紫外可见分光光度计,测定波长为 525 nm,温度为 30℃,反应体系 pH 值为 5,乙醇占总反应体系的体积分数为 10%,比色杯光程为 1 cm。

试材:思茅松(*Pinus kesiya*)原木心材,由云南景谷林业股份有限公司提供;枫香(*Liquidambar formosana*)木纤维,为实验室磨浆机加工。两者均被加工成 60~80 目木粉,含水率约 9%。

其他试剂:自旋捕捉剂 N 叔丁基-α 苯基硝酮(N-tert-butyl-α-phenylnitron, PBN)和丁香醛连氮,均为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 漆酶处理木粉 称量 45 mg 木粉装入 1.5 mL 的离心管中,再将离心管放入碎冰中;然后向离心管中依次加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液、40 mmol/L 的 PBN 溶液 50 μL(终浓度 4 mmol/L)、漆酶酶液,总反应体系为 500 μL。将装有反应混和液的离心管,敞口放置于水浴中恒温处理一段时间,以利于空气中的氧气充分溶于反应混合物中。反应结束后将离心管放入碎冰中终止反应,向反应体系中加入乙酸乙酯 300 μL,萃取 PBN 与活性氧类自由基的加合物,漩涡混合、离心处理后,用微量进样器抽取上层清液进行电子自旋共振检测。

1.2.2 电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)检测 测试条件为:中心磁场 338.5 mT,扫描宽度 40 mT,调制幅度 0.32 mT,增益 4×10⁵,微波功率 20 mW。ESR 信号的强度与样品中所含自旋数或未成对电子数成正比。本试验采用测量活性氧类自由基相对浓度的方法,即测量 ESR 图谱中三线峰的峰高,以峰高总和作为该样品的自由基相对浓度。

2 试验设计

试验重点考察 5 个因子:树种、反应体系 pH 值、处理温度、酶用量和处理时间,对木粉经漆酶处理产生的活性氧类自由基相对浓度的影响。除树种选 2 个水平外,其余因子和水平见表 1。试验采用正交表 L₁₆(4⁴×2³)进行设计安排,每种条件重复试验 3 次。采用方差分析确定各个因子的显著性及其最佳水平搭配。

表 1 因子及水平

Tab. 1 Experimental factors and levels

因子	水平			
	1	2	3	4
A pH 值	3	4	5	6
B 处理温度 /℃	30	40	50	60
C 酶用量 /U	0.3	1.5	3	6
D 处理时间 /h	0.5	2	4	6
E 树种	思茅松心材		枫香	

注:酶用量相对于每 g 绝干木粉而计量。

3 结果与讨论

3.1 漆酶处理木材的特征图谱分析

从图 1a 可见,未处理的思茅松木粉,其 ESR 图谱为典型的无超精细分裂的粉状图谱,与 Felby 等^[2]的欧洲水青冈木纤维的 ESR 谱图相同,其 g 值为 2.0038,与酚氧自由基的 g 值相同。而图 1b 所示漆酶处理思茅松木粉悬浮液中自由基与图 1a 明显不同,其 g 值为 2.005, a_N(超精细分裂常数)=1.5 mT。自旋捕捉剂 PBN 能捕捉超氧阴离子自由基、羟基自由基、脂类自由基以及其他活性氧类自由基, PBN 与活性氧类自由基加合物(PBN-ROS adduct)的 ESR 波谱为 3~6 线峰的谱图, g 值为 2.005,

$\alpha_N=1.5\text{ mT}^{[10]}$,故图 1b 所示为典型的 PBN 与活性氧类自由基加合物的 ESR 谱图。

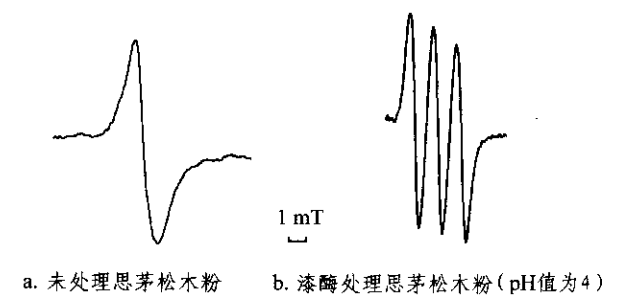


图 1 未处理和漆酶处理思茅松木粉的 ESR 谱图比较分析
Fig. 1 ESR spectra of untreated and laccase activated Szemao pine woodflour

3.2 各因子对活性氧类自由基相对浓度影响的方差分析

正交试验结果如表 2 所示。其中 K_i 为各因子第 i 水平的试验指标观测值之和; F 列和 G 列为空白列或误差列,用于正交设计的方差分析。结果的方差分析见表 3。

3.2.1 树种 树种对活性氧类自由基相对浓度的影响最显著。从表 2 可见,思茅松心材木粉的漆酶处理效果明显好于枫香木粉。导致此结果的原因之一,木素是漆酶活化木材时的酶促反应底物,针叶树材的木素含量(25%~35%)高于阔叶树材(18%~22%);另一个原因是,枫香木粉是由热磨后的枫香木纤维再碎而得,在其热磨离解过程中,热磨温度超过了木素的玻璃态转化温度,木素发生软化、塑化,待温度恢复到室温后,木素再次固化,并在纤维表面结成了一层玻璃状的硬壳,胞间层木素的形态发生了改变^[11]。底物形态的改变可能影响酶促反应的进程,进而降低了产物的得率。

3.2.2 处理时间 漆酶处理时间对活性氧类自由基相对浓度有极显著影响。从表 2 数据可知,处理时间为 4 h 时,活性氧类自由基相对浓度最高。反应时间太短,酶促反应未进行完全;反应时间太长,PBN 与活性氧类自由基加合物可能由于光照等作用而分解,由于超氧阴离子自由基及羟基自由基等活性氧类自由基的反应性极强,分解后随即相互耦合,导致相对浓度减小。

3.2.3 反应体系的 pH 值 pH 值对活性氧类自由基相对浓度有极显著影响。从表 2 可见,pH 值为 4 时,活性氧类自由基相对浓度最高。其原因是酶活力受 pH 值的影响很大,各种酶在一定条件下都有其特

表 2 正交试验结果								
Tab. 2 The orthogonal experimental data								
试验号	因子水平							
	A pH 值	B 处理温度	C 酶用量	D 处理时间	E 树种	F 列	G 列	3 次重复的活性氧自由基的相对浓度/cm
1	1	1	1	1	1	1	1	6.80±1.47
2	1	2	2	2	1	2	2	9.77±1.50
3	1	3	3	3	2	1	2	10.63±1.45
4	1	4	4	4	2	2	1	4.47±0.12
5	2	1	2	3	2	2	1	22.40±5.03
6	2	2	1	4	2	1	2	10.37±0.35
7	2	3	4	1	1	2	2	10.83±0.85
8	2	4	3	2	1	1	1	23.33±1.07
9	3	1	3	4	1	2	2	10.67±1.59
10	3	2	4	3	1	1	1	15.43±1.95
11	3	3	1	2	2	2	1	6.97±0.06
12	3	4	2	1	2	1	2	4.30±0.44
13	4	1	4	2	2	1	2	2.63±0.45
14	4	2	3	1	2	2	1	3.67±0.38
15	4	3	2	4	1	1	1	17.40±2.31
16	4	4	1	3	1	2	2	19.63±4.99
K_1	95.00	127.50	131.30	76.80	341.60			
K_2	200.80	117.70	161.60	128.10	196.30			
K_3	112.10	137.50	144.90	204.30				
K_4	130.00	155.20	100.10	128.70				

注:试验结果表示为($\bar{x}\pm s$)。

表 3 试验结果方差分析及显著性检验						
Tab. 3 Analysis of variance and significance testing for the experimental factors						
变异来源	自由度	离差平方和	均方平方和	F 值	显著性	
pH 值	3	539.83	179.94	41.50	★★	
处理温度	3	64.06	21.35	4.92	★★	
酶用量	3	169.68	56.56	13.04	★★	
处理时间	3	689.66	229.89	53.02	★★	
树种	1	439.84	439.84	101.44	★★	
F 列	1	1.17	1.17			
G 列	1	87.75	87.75	20.24	★★	
误差	32	141.92	4.43			
总误差(机误+ F 列)	33	143.09	4.34			
总计	47	2133.91				

注: $F_{\alpha}(0.01,3,32)=4.5$, $F_{\alpha}(0.01,1,32)=7.5$;★★表示 0.01 水平下,差异显著。

定的最适 pH 值,但酶的最适 pH 值非常数,可受许多因素的影响,如底物种类和浓度、缓冲液种类和浓度等。

3.2.4 酶用量 酶用量对活性氧类自由基相对浓度有极显著影响。从表 2 可见,酶用量为 1.5U/g 木粉时,活性氧类自由基相对浓度最高。酶用量过高时,反而会对酶促反应有抑制作用。找出木粉为底物时漆酶的最佳用量,可以为生产降低成本提供指导。

3.2.5 处理温度 处理温度对活性氧类自由基相对浓度有极显著的影响。每种酶在一定条件下都有其最适温度,在此温度下,酶促反应的速率达到最大值。

从表 2 可见,在本次试验条件下,漆酶以木粉为底物时的最适反应温度为 60℃。

4 结论

1) 各因子对漆酶处理木材产生的活性氧类自由基相对浓度影响的主次顺序为:树种、处理时间、pH 值、G 列的交互作用、酶用量、处理温度。当对思茅松心材木粉漆酶处理 4 h、反应体系 pH 值为 4、每 g 绝干木粉酶用量为 1.5 U、处理温度为 60℃时,活性氧类自由基的相对浓度最高。可在此条件下进行漆酶活化木纤维的后期压板试验,验证活性氧类自由基与木纤维胶合效果的关系。

2) 不同因子间的交互作用可以体现在正交表的空列上。本试验中正交表的空列 G 列在 0.01 水平下差异极显著,表明 G 列的交互作用不可忽视,因此各因子交互作用对试验指标的影响有待深入研究。

参考文献:

- [1] YAROLOV A I, SKOROBOGATKO O V, VARTANOV S S, et al. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1994, 49(3): 257-280.
- [2] FELBY C, NIELSEN B R, OLESEN P O, et al. Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalyzed oxidation of wood fibers from beech[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1997, 48(4): 459-464.

- [3] KHARAZIPOUR A, HÜTTERMANN A, LUEDEMANN H D. Enzymatic activation of wood fibers as a means for the production of wood composites[J]. J Adhesion Sci Technol, 1997, 11(3): 419-427.
- [4] 朱家琪, 史广兴. 酶活化处理条件及其对松木纤维胶合性能的影响初探[J]. 林业科学, 2004, 40(4): 153-156.
- [5] FELBY C, PEDERSEN L S, NIELSEN B R. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases [J]. Holzforschung, 1997, 51(3): 281-286.
- [6] AMER G I, DREW S W. The concentration of extracellular superoxide radical as a function of time during lignin degradation by the fungus *Coriolus versicolor* [J]. Dev Ind Microbiol, 1980, 22(3): 479-484.
- [7] BES B, RANJEVA R, BOUDET A M. Evidence for involvement of activated oxygen in fungal degradation of lignocellulose[J]. Biochimie, 1983, 65(4): 283-289.
- [8] 曹永建. 漆酶活化木材生产人造板及其胶合机理研究[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2005.
- [9] LEONOWICZ A, GRZYWNOWICZ K. Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate[J]. Enzyme Microb Technol, 1981, 3(1): 55-58.
- [10] CAO Y L, GUO P, XU Y C, et al. Simultaneous detection of NO and ROS by ESR in biological systems [J]. Methods in Enzymology, 2005, 396: 77-83.
- [11] HÜTTERMANN A, MAI C, KHARAZIPOUR A. Modification of lignin for the production of new compounded materials[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 55(4): 387-394.

(责任编辑 向 琴)

2007 年《林产工业》杂志征订启事

国家林业局林产工业规划设计院和中国林产工业协会共同主办、中国林业机械协会协办的双月专业技术性刊物, 1964 年创刊, 全国中文核心期刊, “中国期刊全文数据库”、“中国科学引文数据库”、“中国学术期刊综合评价数据库”、“万方数据——数字化期刊群”、“中文科技期刊数据库”、“中国核心期刊(遴选)数据库”、美国《AGRICOLA》、英国《CAB Abstracts》等收录期刊。2001 年被评为“双效期刊”; 2002、2003 年获国家林业局优秀期刊一等奖、二等奖。

办刊宗旨: 面向生产, 以应用技术为主, 融科技性、实用性、学术性、信息性于一体。

报道内容: 林产工业发展的技术方针和政策; 介绍制材、木材干燥, 各类木质、非木质人造板及饰面、地板、家具制造, 胶料生产和应用等方面的新技术、新材料、新设备、新工艺; 报道上述领域的科研

设计成果; 综述国内外林产工业现状、水平及发展趋势。

主要栏目: 综述、研究与分析、生产与应用、专题讲座、国外技术、综合信息、企业平台等, 并辟有黑白/彩色广告版。

适读对象: 本行业及相关行业的企业、科研、设计、教育单位及管理部门从事生产、管理、科研和开发、设计、教学、咨询及市场营销的人员。

大 16 开 64 页, 单月中旬出版, 国内外公开发行。定价每期 8 元, 全年 48 元, 挂号每期另加 3 元。邮发代号: 2-141, 读者可向当地邮局或本刊编辑部订阅。

地址: 100010, 北京朝内大街 130 号

电话: 010-65220126, 65221187, 65135577-6223

Email: cfpipaper@cfpi.cn

http: //www. cfpi. cn