

漆酶活化产生的活性氧类自由基与竹粉板性能的关系

金春德¹ 王 进¹ 毛胜凤² 叶结旺¹ 杜春贵¹ 孙芳利¹ 段新芳³

(1 浙江林学院工程学院 2 浙江林学院林业与生物技术学院

3 中国林业科学研究院木材工业研究所)

摘要:为研究漆酶处理毛竹材制板过程中产生的活性氧类(ROS)自由基相对浓度对竹粉板性能的影响规律,该文以酶用量、反应体系 pH 值、处理时间、处理温度及 Cu^{2+} 浓度作为酶处理因子,在不同的酶处理条件下对竹粉进行漆酶活化处理,并于每种处理条件下分别进行自由基相对浓度的检测和竹粉板制板试验。结果表明:①板材的内结合强度(*IB*)、静曲强度(*MOR*)、吸水厚度膨胀率(*TS*)等物理力学性能都与漆酶处理毛竹材产生的 ROS 自由基相对浓度关系密切。②ROS 自由基相对浓度与板材的 *IB*、*MOR* 均呈对数函数关系,而与 *TS* 呈双曲线函数关系,其相关系数均在 0.93 以上。

关键词:漆酶;活性氧类自由基;竹粉板

中图分类号:S781.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-1522(2009)02-0119-03

JIN Chun-de¹; WANG Jin¹; MAO Sheng-feng²; YE Jie-wang¹; DU Chun-gui¹; SUN Fang-li¹; DUAN Xin-fang³. **Treatment of bamboo flour by reactive oxygen species free radicals: Effects on panel properties.**

Journal of Beijing Forestry University (2009) 31(2) 119-121 [Ch, 7 ref.]

1 School of Engineering, Zhejiang Forestry University, Lin'an City, 311300, P.R. China;

2 School of Forestry and Bio-technology, Zhejiang Forestry University, Lin'an City, 311300, P.R. China;

3 Research Institute of Wood Industry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091, P. R. China.

Bamboo flour treated with reactive oxygen species (ROS) free radicals, which was produced by laccase activation, was used to produce panels. The effects of laccase dosage, pH value of the reaction system, incubation time and temperature, and concentration of Cu^{2+} were assessed. The relative concentration of ROS free radicals in laccase-treated bamboo was analyzed by electron spin resonance. The resulting panels were assessed by internal bond strength (*IB*), modulus of rupture (*MOR*), and thickness swelling (*TS*). Board properties were highly correlated with the concentration of ROS free radicals. These results suggest that pre-treatment with ROS free radicals can be used to improve the properties of bamboo composites.

Key words laccase; reactive oxygen species (ROS) free radicals; bamboo flour panel

利用漆酶的催化氧化特性来活化生物质的木素成分,实现自生胶合的生物酶学方法,对生产无甲醛人造板意义重大。Felby 等^[1-2]采用电子自旋共振波谱证实了漆酶处理木材后使木素酚羟基形成酚氧游离基,游离基反应在木素合成及降解过程中起着重要的作用,漆酶处理使板材的力学性能得到了提高;Vikari 等^[3]采用漆酶活化方法得到的纤维板,在力

学性能上有了明显的提高;朱家琪等^[4]对松木(*Pinus*)纤维进行酶处理制造纤维板,所制板材的内结合强度有明显提高;曹永建等^[5]采用漆酶处理工业木素、木素磺酸铵制备胶黏剂生产杨木胶合板,发现板材的胶合强度值均达到并超过国家标准规定的Ⅲ类胶合板的强度要求。本文将漆酶应用于竹材,探索 ROS 自由基相对浓度对竹粉板的物理力学性

收稿日期:2008-03-10

<http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目(Z305054)、浙江林学院“创新团队支持计划”项目(2006B03)、生物质材料科学与技术教育部重点实验室 2004 年度开放课题基金项目。

第一作者:金春德,博士,教授。主要研究方向:木材科学与技术。电话:0571-63732061 Email: jincd@zjfc.edu.cn 地址:311300 浙江林学院工程学院。

责任作者:段新芳,博士,研究员。主要研究方向:木材科学与技术。电话:010-62888324 Email: xfduan@forestry.ac.cn 地址:100091 北京颐和园后中国林业科学研究院木材工业研究所。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

能的影响规律,为漆酶活化处理制造竹材人造板的胶合机理研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

漆酶:由诺维信中国有限公司提供,测定漆酶活性时使用的底物为 2,2'-连氮-双 3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(简称 ABTS)。一个酶活单位(U)指一定反应条件下,每分钟催化 1 μmol ABTS 转化为产物所需要的酶量。本试验所用漆酶处理液的活性为 362.8 U/mL。

试材:毛竹(*Phyllostachys heterocycla*)刨花,由杭州百孚竹地板有限公司提供。将刨花加工成 60~80 目竹粉,含水率为 8.4%。

仪器设备:德国 Bruker ER200D-SRC, X-band 电子自旋共振波谱仪;XLB-D 450×450×1 平板热压机;MWD-50 型微机控制式木材万能试验机。

试剂:自旋捕捉剂 N 叔丁基-α-苯基硝酮(PBN)和 ABTS,均为 Sigma 公司产品;磷酸氢二钠、柠檬酸、硫酸铜均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 试验设计

实验因子水平安排如表 1。在酶用量为 20 U/g、反应体系的 pH 值为 5、处理时间 2 h、处理温度 60℃、Cu²⁺浓度为 10 mmol/L 等 5 个酶处理因子中固定 4 个,改变第 5 个因子水平,逐一测定漆酶处理竹粉产生 ROS 自由基的相对浓度,并在同样条件下制造竹粉板检测板材物理力学性能,研究自由基浓度对板材物理力学性能的影响。

表 1 试验因子与水平

TABLE 1 Experimental factors and levels					
因子	水平				
	1	2	3	4	5
酶用量/(U·g ⁻¹)	0	10	20	30	40
pH	3	4	5	6	7
处理时间/h	0.5	1	2	3	4
处理温度/℃	40	50	60	70	80
Cu ²⁺ 浓度/(mmol·L ⁻¹)	0	10	20	30	40

注:酶用量相当绝干竹粉计。

1.2.2 ROS 自由基的检测

取竹粉 45 mg 分别装入 1.5 mL 的离心管,置于碎冰中,依次加入漆酶、CuSO₄ 溶液、40 mmol/L 的 PBN 溶液 50 μL 以及磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液。将装有反应混合物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。反应一段时间后,将离心管置于碎冰中,采用文献[6]的方法向反应体系中加入乙酸乙酯 300 μL,漩涡混合 2 min,萃取 PBN 与 ROS 自由基加

合物,以 9 000 r/min 速度离心处理 4 min 后,用微量进样器抽取上层清液进行电子自旋共振(ESR)波谱检测。测试条件为:中心磁场 3 385 G,扫描宽度 400 G,调制幅度 3.2 G,增益 400 000,微波功率 20 mW。测量 ESR 图谱中 3 线峰的峰高,以 3 峰高的总和作为样品的自由基相对浓度。每个水平进行 3 次平行试验,取其平均值。

1.2.3 竹粉板的制造及性能检测

板材设定尺寸为 20 cm×20 cm×1 cm,设定密度为 0.70 g/cm³。取一定量竹粉,加入缓冲溶液、漆酶、硫酸铜,通过缓冲溶液调节混合液的 pH,水浴调节处理温度,通入氧气处理一定时间后,预压挤水成型,在热压温度 200℃、热压时间 18 min、热压压力 3.0 MPa 条件下热压成板。每个水平压制板材 4 张,按 GB/T 17657-1999^[7] 检测板材内结合强度(IB)、静曲强度(MOR)和 2 h 吸水厚度膨胀率(TS)。

2 结果与讨论

当漆酶活化竹材产生的 ROS 自由基相对浓度在 54.91~267.03 mm 内变化时,竹粉板的 IB 在 0.16~0.46 MPa 内变化,MOR 在 2.4~7.8 MPa 内变化,TS 在 34.2%~21.7% 内变化。在酶用量为 30 U/g、反应体系的 pH 值为 4、处理温度 60℃、处理时间 2 h、Cu²⁺浓度为 30 mmol/L 的酶处理条件下,ROS 自由基相对浓度最高(267.03 mm),板材的物理力学性能最佳,即 IB 为 0.46 MPa、MOR 为 7.8 MPa、TS 为 21.7%。

2.1 ROS 自由基与竹粉板 IB 的关系

在相同酶处理条件下,ROS 自由基相对浓度与板材 IB 的关系如图 1 所示。

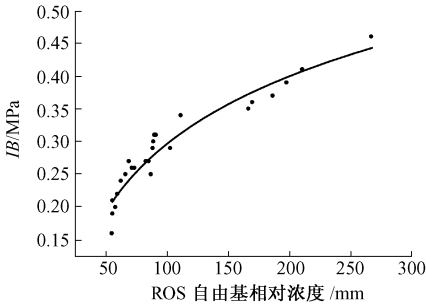


图 1 ROS 自由基相对浓度与竹粉板 IB 的关系

FIGURE 1 Relations between relative concentration of ROS free radicals and IB of the bamboo flour panel

由图 1 可知,随着 ROS 自由基相对浓度的增加,竹粉板的 IB 也随之增加。这是因为漆酶是一种多酚氧化酶,能催化竹材中木素酚羟基的单电子氧化反应,形成酚氧自由基。自由基浓度愈高,意味着单位质量竹粉中的自由基愈多,说明其电子活化

能力愈高,与其它物质结合的能力愈强,自由基和竹材表面官能团结合几率愈高,结合强度愈高。为了能对竹粉板的 *IB* 变化进行定量分析,将 *IB* 与 ROS 自由基相对浓度进行了回归,其回归方程为: $y = 0.15 \ln x - 0.38$,相关系数 $r = 0.967$ 。竹粉板的 *IB* 与 ROS 自由基相对浓度呈对数函数关系。

2.2 ROS 自由基与竹粉板 MOR 的关系

在相同酶处理条件下,ROS 自由基相对浓度与板材 MOR 关系如图 2 所示。

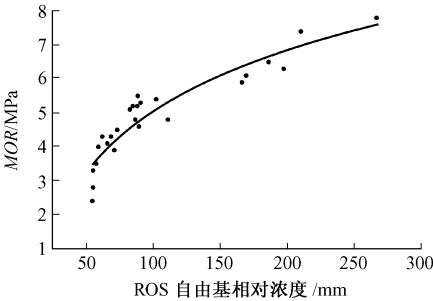


图 2 ROS 自由基相对浓度与竹粉板 MOR 的关系
FIGURE 2 Relations between relative concentration of ROS free radicals and MOR of the bamboo flour panel

由图 2 可知,随着 ROS 自由基相对浓度的增加,竹粉板的 MOR 也随之增加。竹粉板 MOR 主要由竹粉板界面胶合强度和竹粉本身单元强度决定。因此,自由基相对浓度的增加引起板材 *IB* 增加,竹粉板界面胶合强度得到提高,随之板材 MOR 也得到提高。板材的 MOR 与 ROS 自由基相对浓度的回归方程为: $y = 2.60 \ln x - 6.90$,相关系数 $r = 0.935$ 。竹粉板的 MOR 与 ROS 自由基相对浓度呈对数函数关系。

2.3 ROS 自由基与竹粉板 TS 的关系

在相同酶处理条件下,ROS 自由基相对浓度与板材 TS 的关系如图 3 所示。

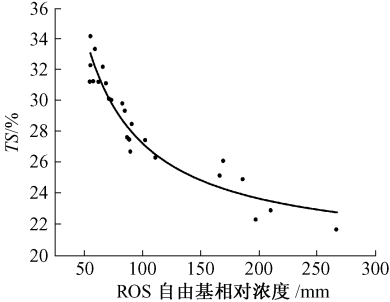


图 3 ROS 自由基相对浓度与竹粉板 TS 值的关系
FIGURE 3 Relations between relative concentration of ROS free radicals and TS of the bamboo flour panel

由图 3 可知,随着 ROS 自由基相对浓度的增加,竹粉板的 TS 随之减小。ROS 自由基浓度愈高,则其在成板过程中与竹材表面亲水官能团结合的几率愈高,从而能够减少竹材表面的亲水基团数量,降

低板材的吸水性能。板材 *TS* 与 ROS 自由基相对浓度的回归方程为: $y = 709.17/x + 20.17$,相关系数 $r = 0.955$ 。竹粉板的 *TS* 与 ROS 自由基呈双曲线函数关系。

3 结 论

采用漆酶活化制造竹粉板的过程中产生的 ROS 自由基相对浓度与板材的 *IB*、*MOR*、*TS* 率等物理力学性能关系密切。随着 ROS 自由基相对浓度的提高,竹粉板的 *IB* 及 *MOR* 随之提高,*TS* 随之降低。板材的 *IB* 与 ROS 自由基相对浓度呈对数函数关系,其回归方程为: $y = 0.15 \ln x - 0.38$,相关系数 $r = 0.967$;板材的 *MOR* 与 ROS 自由基相对浓度呈对数函数关系,其回归方程为: $y = 2.60 \ln x - 6.90$,相关系数 $r = 0.935$;板材的 *TS* 与 ROS 自由基相对浓度呈双曲线函数关系,其回归方程为: $y = 709.17/x + 20.17$,相关系数 $r = 0.955$ 。

参 考 文 献

[1] FELBY C, OLESEN P O. Enzymatic bonding systems[C]//PRASE P N. Science and technology of polymers and advanced materials. New York: Plenum Press, 1998.

[2] FELBY C, LARS S P, NIELSEN B R. Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases [J]. Holzforschung, 1997, 51 (3): 281-286.

[3] VIKARI L, HASE A, HANNUS J, et al. Lignin-based adhesives and a process for the preparation thereof: Finland, WO1998/031764 [P]. 1998-07-23.

[4] 朱家琪,史广兴. 酶活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.

ZHU J Q, SHI G X. Study of wood activation with laccase and the effect on the auto adhesion of Pinus fibers [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2004, 40(4): 153-156.

[5] 曹永建,段新芳,曹远林,等. 漆酶活化木素磺酸盐条件对胶合板强度的影响[J]. 林产工业, 2007, 34(2): 13-17.

CAO Y J, DUAN X F, CAO Y L, et al. Effect of laccase treatment conditions of lignosulphonate on shearing strength of plywood [J]. China Forest Products Industry, 2007, 34(2): 13-17.

[6] 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, 39(6): 387-394.

[7] 国家技术监督局. GB/T17657—1999 人造板及饰面人造板理化性能试验方法[S]. 北京:中国标准出版社, 2002.

China State Bureau of Technical Supervision. GB/T 17657—1999 Test methods of evaluating the properties of wood-based panels and surface decorated wood-based panels [S]. Beijing: Standards Press of China, 2002.

(责任编辑 李文军)