

تعیین ساختارهای غیرمتراکم لیگنین صنوبر دلتوئیدس با استفاده از روش تخریبی DFRC

علی عبدالخانی^{۱*}، یحیی همزه^۲، سحاب حجازی^۳ و علی نقی کریمی^۴

^۱ استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۲ دانشیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۳ استادیار دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران

^۴ استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران و استاد انستیتو جنگل و فرآورده‌های جنگلی (INTROP) دانشگاه پوترا

مالزی (UPM)

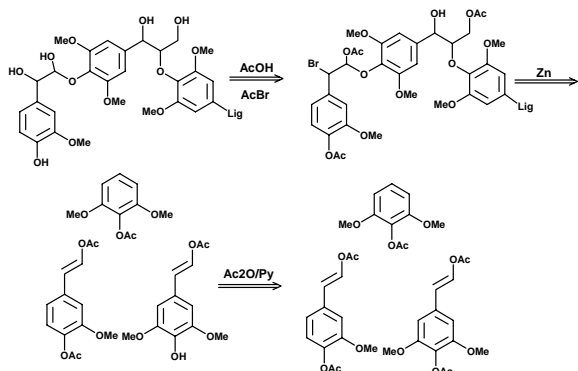
(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۵، تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۵)

چکیده

ساختار شیمیایی لیگنین چوب صنوبر دلتوئیدس با استفاده از روش تخریبی DFRC اصلاح شده به منظور تعیین مقدار ساختارهای غیرمتراکم در لیگنین‌های استخراج شده با روش‌های مختلف بررسی شد. برای این منظور لیگنین چوب آسیاب شده و آنزیمی پس از استخراج تحت عمل‌آوری شیمیایی تخریبی اکسایش-کاهش بر اساس روش DFRC اصلاح شده قرار گرفت. در روش اصلاحی به کار برده شده، محصولات تخریبی حاصل از لیگنین تحت عمل‌آوری‌های متیلاسیون، استیلاسیون و پروپیلاسیون قرار گرفت تا به ترتیب ساختارهای فنولی ناشی از β -O-4 فنولی غیر متراکم، α -O-4 غیرمتراکم و β -O-4 اتری غیرمتراکم در لیگنین سلولیتیک و لیگنین چوب آسیاب شده به تفکیک نشان داده شود. بررسی ساختارهای تخریبی ایجاد شده با استفاده از کروماتوگرافی نفوذ ژلی و گازی نشان داد که لیگنین سلولیتیک نسبت به لیگنین چوب آسیاب شده دارای ساختارهای غیرمتراکم بیشتری است که ناشی از عدم تخریب لیگنین طی فرآیند استخراج است. نتایج مربوط به محاسبات مقدار تراکم با داده‌های مربوط به تحلیل مقاداری به وسیله ^{13}C NMR مورد مقایسه قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: لیگنین چوب آسیاب شده، لیگنین آنزیمی، روش‌های تخریبی، ساختارهای متراکم، متیلاسیون.

مقدمه



شکل ۱- فرآورده های تشکیل شده در اثر تخریب DFRC

اما برخلاف دیگر روش های تخریبی، DFRC گزینندگی مناسبی در گسست اتصالات دارد و این عمل را بدون هیچ تغییری بر ساختارها انجام می دهد. بنابراین، به وسیله کروماتوگرافی ستونی می توان دی مرها و حتی تری مرهای لیگنین را با استفاده از GC-MS شناسایی کرد (Hu et al., 2006). مشکلی که در بررسی ساختارهای غیرمتراکم به وسیله روش DFRC وجود دارد، عدم امکان تعیین منشاء ساختارهای تخریب شده است. در این روش امکان تشخیص اینکه ساختارهای تخریب شده متعلق به کدام بخش لیگنین اعم از اتری و فنولی است، وجود ندارد زیرا تمام ساختارها به طور جامع استیل دار هستند. به وسیله به کار بردن روش های عمل آوری دیگر همچون متیلاسیون و پروپیلایسیون طی تخریب ساختار لیگنین می توان بخش های مختلف را از یکدیگر تفکیک و به یک تحلیل مناسب از منشاء ساختارهای غیر متراکم دست یافت.

در این تحقیق سعی گردید ساختارهای غیرمتراکم لیگنین های چوب آسیاب شده و آنزیمی پس از استخراج با استفاده از روش DFRC تعیین، مقایسه و منشاء آنها با اصلاح روش مشخص گردد.

مواد و روش ها

مواد

برای جداسازی و تهیه لیگنین از چوب صنوبر دلتوئیدس (*Populus deltoides*)، (با سن تقریبی ۱۵ سال) به دلیل تندرشد بودن در میان گونه های صنوبر و اهمیت آن در

لیگنین به عنوان فراوان ترین پلیمر طبیعی دنیا پس از سلولز، ساختار فوق العاده پیچیده ای دارد و هنوز به طور کامل، به خصوص در مورد پهن برگان، مورد بررسی و ارزیابی قرار نگرفته است (Novaes et al. 2009; Sher et al. 2000). علیرغم مطالعات زیادی که در مورد ساختار لیگنین طی پنج دهه اخیر صورت گرفته است، ساختار شیمیایی لیگنین پهن برگان به خصوص گونه های تندرشد تا کنون مشخص نشده است. روش های تخریبی متعددی برای شناسایی ساختار لیگنین از طریق بررسی ترکیبات با وزن مولکولی اندک وجود دارد (Pew, 1957). به وسیله آنالیز دقیق این ترکیبات می توان به تصویری از لیگنین دست پیدا کرد. دی مرها و تری مرهای لیگنین که حاوی اکثر اتصالات بین مولکولی می باشند توسط روش های مختلفی همچون تیواسیدولیز (Ikeda et al., 2002) و اکسیداسیون با پرمنگنات (Wu & Argyropoulos, 2003) بررسی شده است. متأسفانه این روش ها بسیار پیچیده و وقت گیر بوده و به مراحل آماده سازی و زمان آنالیز زیادی نیاز دارند. به علاوه، آنالیز مقداری آنها به دلیل بازده کم محصولات تخریبی تشکیل شده امکان پذیر نیست. روش DFRC¹ که آخرین روش ارائه شده برای این منظور است، محدودیت های گفته شده را ندارد. این روش بر پایه تیمار لیگنین با استفاده از استیل برومید و تخریب آلفا-آریل اترها و تشکیل مشتقات آلفا برومیددار استیل و گسست کاهشی اتصالات بتا-آریل اتری می باشد (Lu & Ralph, 1997). ساختارهای کانفیویل الکل استیل شده بیشترین محصولات به دست آمده از DFRC هستند که از واحدهای 4-O-β ناشی می شوند (شکل ۱).

همانند دیگر روش های تخریبی، DFRC این نقص را دارد که نتیجه گیری بایستی بر اساس بازده استخراج محصولات مونومری باشد. در حقیقت این روش بر اساس آزاد شدن ساختارهای حاوی گروه انتهایی الکیلی از ساختارهای 4-O-β است.

¹ Derivatization Followed by Reductive Cleavage

فرآیندهای کاغذسازی و مناسب بودن رشد این گونه در ایران استفاده شد. آنزیم‌های تجاری زیر با توانایی هیدرولیز سلولز برای تفکیک و خالص‌سازی لیگنین از شرکت فلوکا^۱ خریداری و مورد استفاده قرار گرفت: زایلاناز خالص به عنوان ۱،۴-β-زایلاناز (EC: 3.2.1.8) از *Thermomyces lanuginosus* با قدرت ۲۵۰۰ واحد بر گرم، سلولاز حاصل از قارچ *Aspergillus* به عنوان اندوسلولاز (EC: 3.2.1.4) با قدرت ۱۰۰۰ واحد بر گرم، سلولاز قارچ *Aspergillus Niger* به عنوان آگزوسلولاز (EC: 3.2.1.91) با قدرت ۲۵۰ واحد بر گرم، β-گلوکوزیداز به عنوان گلوکوزیداز (EC: 3.2.1.21) با قدرت ۴۰ واحد بر گرم و پروتئاز کلیایی Sabistilin Type III از *Bacillus licheniformis*.

دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت آلدریچ^۲ با خلوص آزمایشگاهی تهیه شد. در تمام مراحل آزمایشات برای شستشو از آب یون‌زدایی شده استفاده شد.

تهیه لیگنین چوب آسیاب شده

لیگنین چوب آسیاب شده (MWL)^۳ بر اساس روش ارائه شده توسط Lawther و همکاران جداسازی شد (Lawther et al., 1997). ابتدا چوب صنوبر به وسیله آسیاب معمولی خرد و به وسیله الک با اندازه منافذ ۲۰ مش غربال گردید. ذرات ۲۰ مش سپس به وسیله استون به مدت ۴۸ ساعت استخراج شد. پس از ۴۸ ساعت آرد چوب به وسیله آب سرد به مدت ۱۰ دقیقه عمل‌آوری صوتی شد. آرد چوب عاری از مواد استخراجی به وسیله آسیاب تویی چرخشی به مدت یک هفته در یک مخزن ۵ لیتری به همراه گلوله‌هایی از جنس آلومینا آسیاب شد. به منظور یکدست شدن ذرات، چوب آسیاب شده به مدت یک ساعت در آسیاب گریز از مرکز توسط ۴۰ عدد گلوله ۳ میلی‌متری آسیاب شد. چوب آسیاب شده توسط محلول دیوکسان: آب (96:4, 10ml/g) طی ۳ مرحله ۲۴ ساعتی (۷۲ ساعت) استخراج شد. پس از تفکیک لیگنین خام از بخش محلول بوسیله سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور بر دقیقه) و تغلیظ، لیگنین خام به وسیله خشک کن

انجمادی جداسازی شد. برای خالص‌سازی لیگنین MWL، لیگنین خام در مقدار ۱۰ میلی لیتر اسید استیک ۹۰ درصد حل و در ۴۰۰ میلی لیتر آب ته‌نشین شد. لیگنین ته‌نشین شده پس از خشک کردن به وسیله خشک‌کن انجمادی، در مقدار ۲۰ میلی لیتر حلال دی کلرو اتان: اتانول (۲:۱، نسبت حجمی) حل و در دی اتیل اتر ته‌نشین شد تا لیگنین خالص به دست آید. لیگنین خالص در خشک‌کن انجمادی خشک شد.

تهیه لیگنین آنزیمی

مراحل تهیه لیگنین آنزیمی^۴ (EL) در شکل ۳ نشان داده شده است. برای تهیه لیگنین آنزیمی (EL) چوب آسیاب شده پس از استخراج با استون (۴۸ ساعت) و تیمار صوتی در آب سرد به وسیله آسیاب تویی چرخشی (۴۸ ساعت) و آسیاب گریز از مرکز همانند MWL خرد و سپس به وسیله توالی آنزیم‌های زیر عمل‌آوری شد:

تیمار با زایلاناز

۴۰ گرم چوب در بافر فسفات (800 ml, pH: 7, 50mM) معلق و سپس مقدار ۴ گرم آنزیم زایلاناز (با فعالیت ۲۵۰۰ U/g) به آن اضافه شد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور عمل‌آوری شد. پس از اتمام مدت زمان عمل‌آوری، ذرات چوب ۳ مرتبه با استفاده از آب شستشو شد.

تیمار با اندوسلولاز و آگزوسلولاز

پس از سانتریفوژ کردن ماده محلول مرحله قبل، بخش جامد باقیمانده در حضور بافر فتالات (pH: 5.5, 50 mM, 800 ml) توسط مخلوط آنزیم اندوسلولاز (۴ میلی لیتر) و آگزوسلولاز (۴ میلی لیتر) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تیمار گردید. پس از اتمام مدت زمان عمل‌آوری، ذرات چوب ۳ مرتبه با استفاده از آب شستشو شد.

تیمار با گلوکوزیداز

پس از سانتریفوژ کردن ماده محلول مرحله قبل، بخش جامد باقیمانده در حضور بافر استات (pH: 5 50 mM)

¹ Fluka

² Aldrich

³ Milled Wood Lignin

⁴ Enzymatic Lignin

محلول به دست آمده پس از سانتریفوژ با استفاده از اسید کلریدریک تا pH: 2 اسیدی شده و بخش جامد ته‌نشین شده بازیابی شد.

مرحله دوم: تیمار شیمیایی ملایم

نمونه لیگنین حاصل از مرحله قبلی در دی متیل استامید در دمای ۰°C به مدت ۱ ساعت تیمار گردید. سپس لیگنین از توده جامد باقیمانده توسط محلول دیوکسان: آب (96:4, 10ml/g) همانند MWL استخراج و خشک گردید. مراحل مختلف استخراج در شکل ۲ نشان داده شده است.

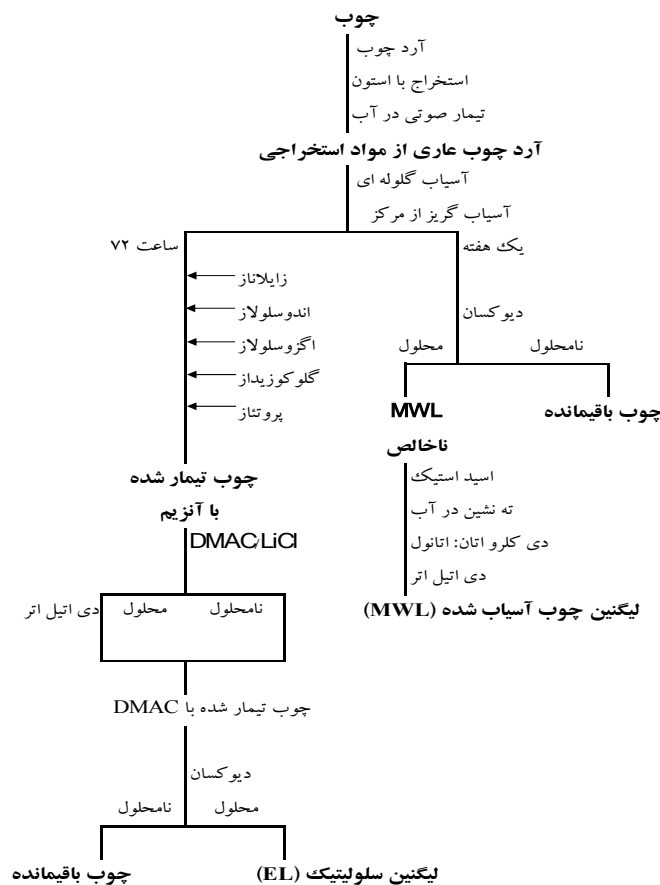
توسط آنزیم بتا-گلوکوزیداز (۴۰ واحد) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور تیمار گردید. پس از اتمام مدت زمان عمل‌آوری، ذرات چوب ۳ مرتبه با استفاده از آب شستشو شد.

تیمار شیمیایی

تیمار شیمیایی برای خالص‌سازی لیگنین EL خام به وسیله روش‌های زیر انجام شد:

مرحله اول: تیمار با پروتئاز قلیایی

تیمار با پروتئاز و بافر کربنات (pH: 8.5) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. محلول حاصل سانتریفوژ شده و بخش نامحلول بازیابی شد.



شکل ۲- فرایند تهیه لیگنین‌های مورد استفاده

تخریب DFRC

متیلاسیون نمونه‌ها در روش DFRC به وسیله دی آزو متان انجام شد. دی آزومتان در آزمایشگاه با کمک دیازالد (ان-متیل-ان-نیتروزو-تولون سولفونامید) تهیه گردید. به طور خلاصه ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ به ۵ گرم هیدروکسید پتاسیم محلول در ۸ میلی لیتر آب اضافه گردید تا محلول قلیایی واکنش تهیه شود. به این محلول، ۴۵ میلی لیتر محلول دیازالد (۵ گرم دیازالد در ۴۵ میلی لیتر اتانول) در فاصله زمانی ۶۰ دقیقه اضافه شد. گاز دی آزومتان ناشی از واکنش دیازالد با باز از طریق یک لوله و مبرد به یک ظرف حاوی اتر منتقل شد. ۵۰۰ میلی گرم لیگنین در مقدار ۲۰ میلی لیتر دیوکسان/متانول (۱:۲، نسبت حجمی) حل و سپس مقدار ۵ میلی لیتر دی آزومتان محلول در اتر به آن اضافه شد. این مجموعه به مدت ۳ ساعت در دمای محیط همزده شد. فاز اتری با کمک خلاء تبخیر و مجدداً با دی آزومتان تیمار شد. تیمار با دی آزومتان ۳ بار تکرار و پس از آخرین مرحله حلال‌ها با کمک خلاء تبخیر و لیگنین با استفاده از خشک کن انجمادی خشک شد. روش تخریبی DFRC بر اساس روش ارائه شده توسط Ralph و همکاران با اندکی اصلاحات انجام شد (Ralph & Lu, 1998). مقدار ۱۰۰ میلی گرم لیگنین متیله شده با اسید استیک/استیل برومید (۵ میلی لیتر؛ ۴:۱، نسبت حجمی) به همراه ۵ میلی گرم تتراکوزان به عنوان استاندارد داخلی مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شد. واکنش به وسیله حذف حلال تحت خلاء خاتمه داده شد و بلافاصله در ۵ میلی لیتر مخلوط دیوکسان/اسید استیک/آب (۱:۴:۵، نسبت حجمی) حل و به آن ۲۵۰ میلی گرم پودر روی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. پس از ۳۰ دقیقه پودر روی به وسیله کاغذ صافی جدا و محلول باقیمانده ۲ بار به وسیله دی کلرو متان خالص (۲۰ میلی لیتر) استخراج شد. پس از حذف حلال، توده جامد در ۲ میلی لیتر پیریدین/پروپیونیک انیدرید (۱:۱، نسبت حجمی) حل و

به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. واکنش با حذف حلال متوقف شد.

کروماتوگرافی نفوذ ژلی (GPC)

برای اندازه‌گیری توزیع وزن مولکولی لیگنین‌های تهیه شده و محصولات تخریبی DFRC از کروماتوگرافی تراوش ژلی (Gel Permeation Chromatography) استفاده شد. اندازه‌گیری در دستگاه کروماتوگرافی Viscotek GPC Tetradetector انجام گردید. از ۳ ستون به صورت سری از جنس پلی‌استایرن و دتکتور^۱ LALS برای تحلیل استفاده شد. سرعت جریان محلول در حد ۱ میلی لیتر بر دقیقه تنظیم گردید. لیگنین‌های استیله شده در تترا هیدرو فوران حل و با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر به دستگاه تزریق شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه تزریق گردید. توزیع وزن مولکولی نسبت به استاندارد پلی‌استایرن تعیین شد.

کروماتوگرافی گازی-اسپکتروسکوپی جرمی برای

شناسایی محصولات تخریبی DFRC

ترکیبات تخریب شده در اثر عمل‌آوری DFRC در مقدار ۰/۵ میلی لیتر دی کلرومتان حل شد. مقدار ۲ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 5975) مجهز به ستون DB-5 (30 m×0.25) سیلیکا تزریق شد. تزریق در دمای ۲۷۰ درجه اولیه انجام گردید. کوره از ۱۰۰ تا ۲۸۰ درجه با نرخ ۸ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه گرم گردید. برای تعیین بازده مونومری محصولات تخریبی DFRC، لیگنین تخریب شده در دی کلرومتان حل و به دستگاه تزریق گردید. ترکیبات یونیزه شده به وسیله طیف‌سنج جرمی و الگوی گسست آنها به وسیله مقایسه با مرجع Wiley و NIST شناسایی شدند.

طیف‌سنجی کمی ¹³C NMR

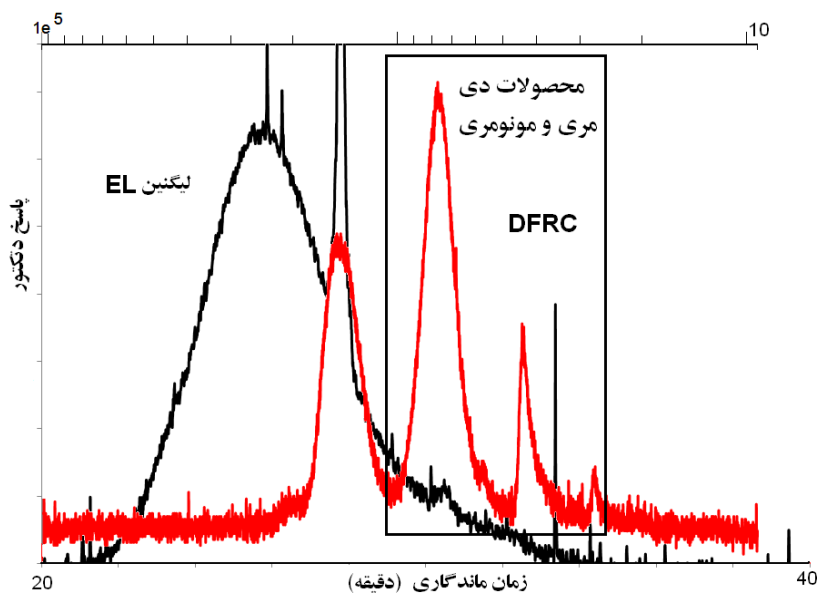
تحلیل کمی ¹³C NMR لیگنین‌ها با استفاده از دستگاه MERCURY 400 MHz انجام گردید. در هر مورد ۰/۵

¹ Low Angle Light Scattering

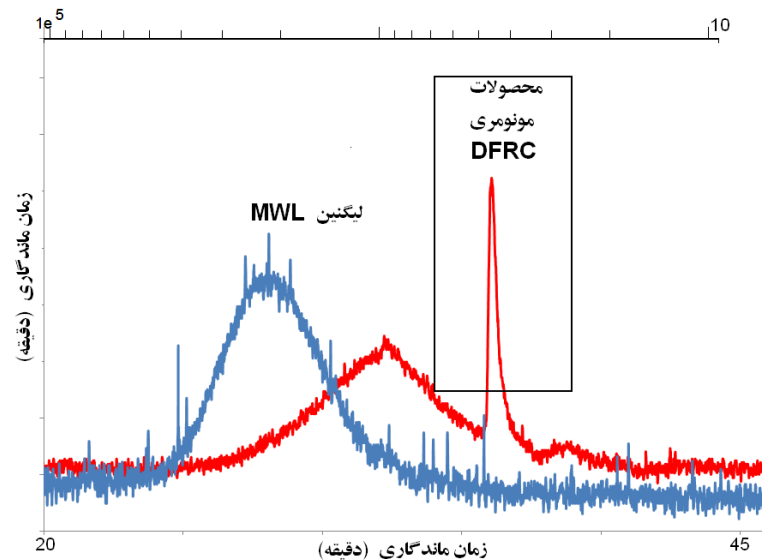
محصولات تخریبی ناشی از فرآیند DFRC به وسیله کروماتوگرافی گازی-اسپکتروسکوپی جرمی شناسایی شدند. همچنین توزیع وزن مولکولی ترکیبات تخریب شده به وسیله DFRC در هر دو لیگنین تهیه شده با استفاده از GPC تعیین گردید. شکل‌های ۳ و ۴ کروماتوگرام توزیع وزن مولکولی لیگنین‌ها را نشان می‌دهند.

گرم نمونه لیگنین در ۴ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO-d₆) حل گردید. عملیات اسکن تحت شرایط دوره‌ای زیر انجام گرفت: پهنای پالس ۹۰ درجه، زمان اسکن (جمع آوری داده) ۱/۴ ثانیه و دوره تاخیر ۱۱ ثانیه. در کل، تعداد ۱۰۰۰۰ اسکن بر روی نمونه‌ها انجام گردید.

نتایج



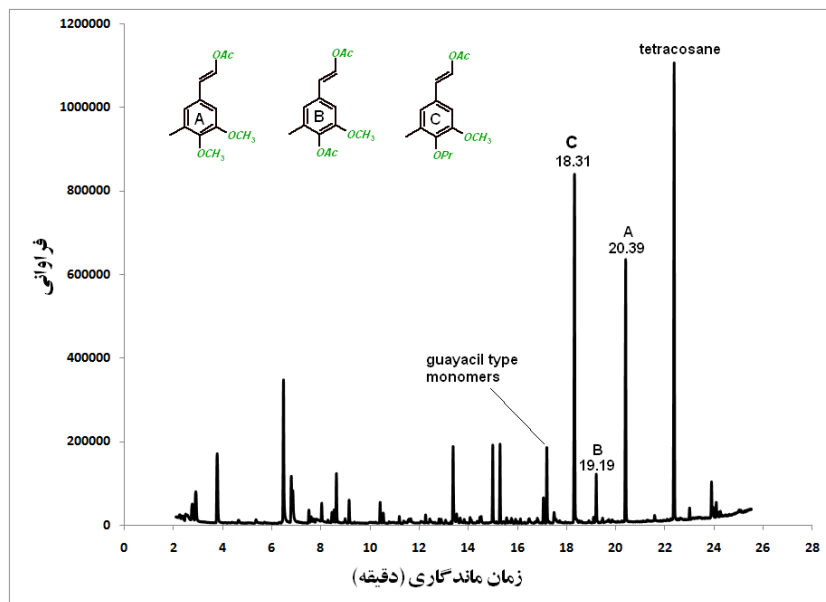
شکل ۳- توزیع وزن مولکولی لیگنین EL پس از DFRC



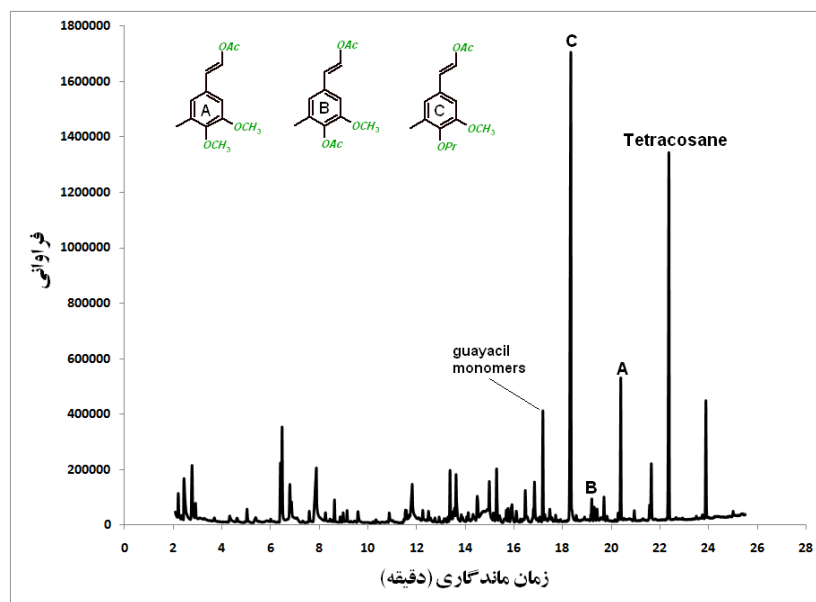
شکل ۴- توزیع وزن مولکولی لیگنین MWL پس از DFRC

شناسایی شدند. ترکیبات A، B و C ناشی از تخریب ساختار β -O-4 به عنوان ساختار اصلی لیگنین شناسایی گردیدند.

کروماتوگرام محصولات مربوط به لیگنین‌های سلولیتیک و چوب آسیاب شده در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. محصولات یونیزه شده به وسیله طیف‌سنج جرمی



شکل ۵- کروماتوگرام گازی محصولات مونومری مشتق شده از تخریب DFRC لیگنین MWL



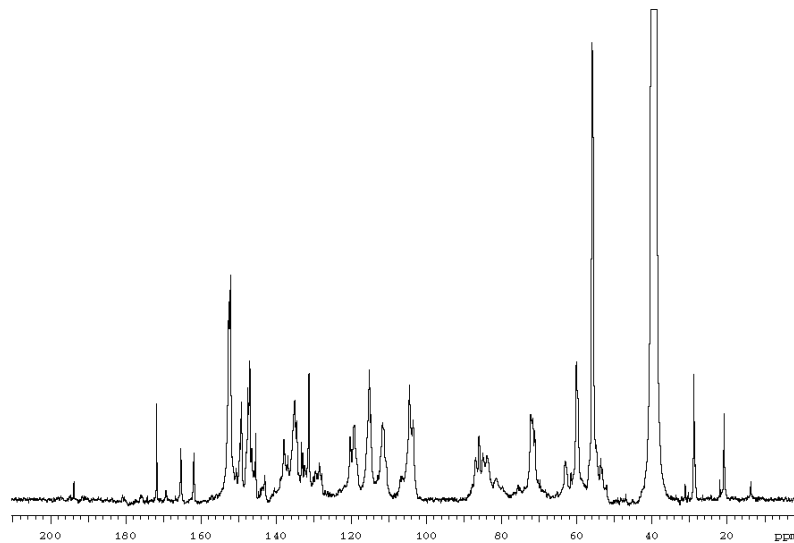
شکل ۶- کروماتوگرام گازی محصولات مونومری مشتق شده از تخریب DFRC لیگنین EL

لیگنین‌ها نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج ارائه شده در جدول ۲ به صورت تعداد ساختارها به ازاء هر واحد آروماتیکی (C_9) بیان شده است. در محاسبه کمی گروه‌های عاملی و ساختارهای لیگنین، انتگرال دامنه

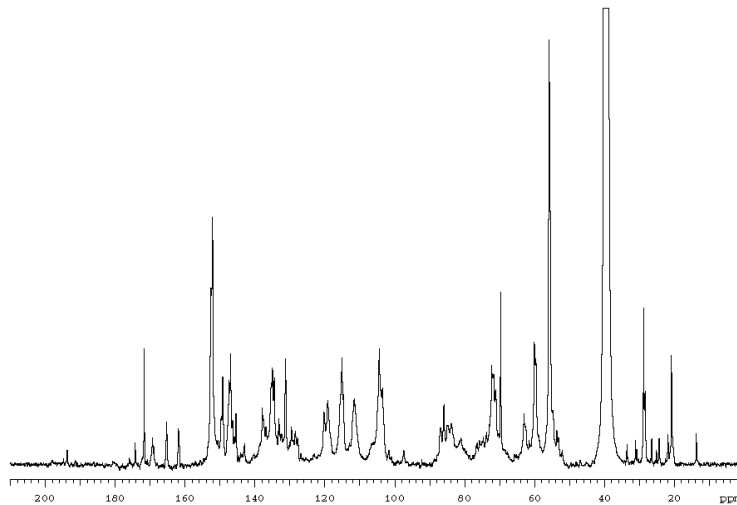
^{13}C NMR کمی

طیف‌های ^{13}C NMR کمی لیگنین‌های MWL و EL در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده‌اند. تحلیل داده‌ها و محاسبه واحدهای ساختاری و گروه‌های عاملی مختلف

۱۶۲-۱۰۲ ppm به عنوان ناحیه آروماتیکی و مبنا در نظر گرفته شد.



شکل ۷- طیف ^{13}C NMR کمی لیگنین MWL



شکل ۸- طیف ^{13}C NMR کمی لیگنین EL

شده است. محصولات مونومری و دی‌میری کاملاً مجزا در کروماتوگرام EL به وضوح قابل مشاهده است. در مورد MWL بخشی از لیگنین در اثر تخریب، محصول مونومری (زیر ۵۰۰ دالتون) را تشکیل داده و بخش اعظم لیگنین به صورت پلیمر با وزن مولکولی در حد لیگنین تخریب نشده باقی مانده است. از آنجاکه هدف از عمل‌آوری DFRC در واقع سنجش مقدار بخش‌های

بحث و نتیجه‌گیری

آنالیز DFRC

مقایسه دو کروماتوگرام (شکل‌های ۳ و ۴) نشان می‌دهد که لیگنین EL به میزان زیادی در اثر عمل‌آوری DFRC تخریب شده است. از این جهت می‌توان نتیجه‌گیری نمود که به کارگیری فرآیند DFRC به منظور تخریب ساختار لیگنین به محصولات دی‌میری و مونومری کاملاً موثر واقع

عنوان ساختار اصلی لیگنین شناسایی گردیدند. در میان محصولات شناسایی شده فقط ترکیبات مشتق شده از لیگنین‌های گویاسیل و هیدروکسی بنزیل الکل مشاهده گردید. ترکیبات شناسایی شده مشتق از واحدهای گویاسیل بخش عمده (بیش از ۹۵ درصد) ساختارهای مونومری (بدون احتساب ترکیبات فنولی) را تشکیل می‌دهند. بر این اساس در بررسی طیف‌ها فقط محصولات ناشی از گویاسیل بررسی شدند (جدول ۱).

متراکم نشده در لیگنین است، بنابراین محصولات تخریبی بیشتر در اثر DFRC (به‌طور گزینشی از β -O-4 و α -O-4) می‌تواند دلیلی برای وجود تراکم کمتر در ساختار لیگنین باشد. شکل‌های ۵ و ۶ کروماتوگرام محصولات تخریبی در اثر تخریب DFRC به کار برده شده را نشان می‌دهد. در این کروماتوگرام‌ها محصولات یونیزه شده به وسیله طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند. ترکیبات A، B و C ناشی از تخریب ساختار β -O-4 به

جدول ۱. داده‌های مربوط به بازده کل و ترکیب مونومری ناشی از تخریب DFRC استخراج شده از شناسایی محصولات به وسیله طیف‌سنجی جرمی. A (β -O-4 فنولی متراکم نشده)، B (α -O-4 متراکم نشده)، C (β -O-4 اتری متراکم نشده).

لیگنین	ترکیب مونومری (%)			بازده کل	وزنی
	A	B	C	$\mu\text{mol/g}$	%
MWL	۳۹/۲	۷/۱	۵۳/۷	۳۰۳	۷
EL	۱۶/۴	۳/۲	۸۰	۴۱۳	۱۱

کمتر بودن مقدار واحدهای C در لیگنین MWL به این دلیل است که واحدهای اتری موجود در درشت مولکول لیگنین در اثر آسیاب کردن شکسته شده و واحدهای فنولی جدیدی را ایجاد کرده‌اند (Ikeda et al., 2002). بیشتر بودن مقدار گروه‌های هیدروکسیل فنولی لیگنین MWL نیز می‌تواند دلیلی برای این مطلب باشد.

همان‌طور که مشاهده می‌شود بازده مونومری ناشی از مجموع ترکیب‌های A (ناشی از β -O-4 فنولی متراکم نشده)، B (α -O-4 متراکم نشده) و C (β -O-4 اتری متراکم نشده) در لیگنین EL (۱۱ درصد) بیشتر از MWL (۷ درصد) است. این نشان می‌دهد که در مجموع لیگنین EL مقدار گروه‌های متراکم کمتری دارد و در اثر تخریب DFRC محصولات مونومری بیشتری را تشکیل می‌دهد (جدول ۱). در این میان مقدار ترکیب مونومری C در لیگنین سلولیتیک (EL) با ۸۰ درصد بیشترین مقدار شناسایی شده در بین محصولات بوده است. این مقدار مربوط به ساختارهای β -O-4 اتری متراکم نشده است. این نتیجه با داده‌های محاسبه شده به وسیله ^{13}C NMR که مقدار واحدهای اتری متراکم نشده در لیگنین EL به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از لیگنین MWL است، مطابقت دارد. بیشتر بودن مقدار واحدهای A و

تعیین درجه تراکم به وسیله ^{13}C NMR کمی

محاسبات نشان می‌دهد که لیگنین آنزیمی از لحاظ ساختاری بسیار سالم‌تر از لیگنین چوب آسیاب شده است. به‌طور مثال، مقدار گروه‌های β -O-4/ α -OH که جزء اصلی تشکیل دهنده لیگنین است در لیگنین آنزیمی ۰/۵۶ و در لیگنین چوب آسیاب شده ۰/۴۳ می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲- محاسبه کمی واحدهای ساختاری متراکم لیگنین‌های MWL و EL.

ساختار	محاسبات	مقدار به ازاء واحد ساختاری (C ₉)	
		MWL	EL
β-1	(I 50-48) _{ac} - III	۰/۰۳	۰/۰۲
5-5'	(I 144-141) _{na} -III	۰/۰۴	۰/۰۳
β-O-4/α-OH (I)	(I 78-70) _{na} - VI- IV - 3× carbohydrates	۰/۴۳	۰/۵۶
S	(I 106-100) _{ac} : 2-V _s OMe-1+h	۰/۳۵	۰/۳۶
G	(I 113-111) _{ac} +V _s	۰/۶۰	۰/۶۰
H:G:S(100%)	g=1-s-h	۵:۶۰:۳۵	۵:۶۰:۳۶
درجه تراکم	[3g+2(s+2h)]- (II26-102)	۰/۲۳	۰/۱۰

تراکم دو لیگنین به ترتیب ۰/۲۳ و ۰/۱ به دست می‌آید (جدول ۲). در مورد پهن‌برگان به دلیل وجود توام ساختارهای سیرینجیل (S) و گویاسیل (G) این روش امکان‌پذیر نیست. در این مورد بایستی از نسبت واحدهای سیرینجیل (S)، گویاسیل (G) و پارا کوماریل الکل (H) استفاده کرد. در این روش از نسبت H:G:S برای محاسبه نظری C_{Ar-H} استفاده می‌شود. سپس مقدار نظری و مقدار واقعی انتگرال‌گیری شده در ناحیه C_{Ar-H} (۱۰۳ ppm - ۱۲۷) از یکدیگر تفریق می‌شود.

نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل‌های مختلف نشان داد که به کارگیری روش‌های عامل‌دار کردن متیلاسیون و پروپیل‌اسیون می‌تواند سبب تفکیک مناسب محصولات تخریبی با منشاء مختلف با بازده مناسب شود. همچنین مقدار ساختارهای غیرمتراکم در لیگنین تهیه شده با روش آنزیمی از روش MWL بیشتر می‌باشد. کاهش زمان آسیاب کردن چوب و به کارگیری روش‌های گزیننده استخراج با آنزیم سبب بهبود قابل ملاحظه ساختار لیگنین استخراج شده در مقایسه با روش متداول MWL می‌شود.

ساختار آریل-گلیسرول β-آریل اتر واحد عمده تشکیل دهنده لیگنین سوزنی‌برگان و پهن‌برگان است. تحلیل ناحیه آروماتیک طیف ¹³C NMR نیز تفاوت‌های ساختاری MWL و EL را نشان می‌دهد. ناحیه آروماتیک را می‌توان به کربن آروماتیک اکسیژن‌دار (C_{Ar-O})، کربن‌های آروماتیک متراکم شده (C_{Ar-C}) و کربن‌های آروماتیک پروتون‌دار (۱۰۳-۱۲۷ ppm) تقسیم‌بندی نمود (Guerra et al., 2008). دو قسمت آخر می‌تواند بیانگر یک نوع تخمین از مقدار تراکم (اتصالات C-C) در ساختار درشت مولکول لیگنین باشد. ناحیه آروماتیک کربن-کربن (C_{Ar-C}) شامل موقعیت C₁ زنجیر جانبی و موقعیت C₅ اتصالات آروماتیکی کندانس شده شامل ساختارهای فنیل کوماران یا بی‌فنیل است. اما محاسبه درجه تراکم به وسیله انتگرال‌گیری این ناحیه سبب بروز خطا می‌گردد، زیرا این ناحیه به‌وسیله کربن‌های ساختارهای بنزآلدئیدی و C_β در سینامیل‌آلدئید هم-پوشانی دارد (Lapierre et al., 1985). انتگرال این ناحیه برای لیگنین‌های MWL و EL به ترتیب ۲/۴۷ و ۲/۶۰ است. با تفریق این مقادیر از مقدار حداکثر کربن‌های حلقه فنولی در حالت غیرمتراکم (۳ موقعیت)، درجه

References

- Guerra, A., Lucia, L. A., Argyropoulos, D. S. 2008. Isolation and characterization of lignins from *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus globulus* Labill. by enzymatic mild acidolysis (EMAL). *Holzforschung*. 62 (1). 24-30 pp.
- Hu, Q. Y., Daneault, C., Robert, S. 2006. Use of a Nitrogen-Centered Peroxide Activator to Increase the Chromophore Removal Potential of Peroxide-Lignin Model Compound Study. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 26 (2). 165 -174 pp.
- Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J. F., Chang, H.-m., Jameel, H. 2002. Studies on the Effect of Ball Milling on Lignin Structure Using a Modified DFRC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (1). 129-135 pp.
- Ikeda, T., Holtman, K., Kadla, J., Chan, H., Jammel, H. 2002. Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50. 129-138 pp.
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C., de Chirale, L. 1985. Thioacidolysis of Lignin: Comparison with Acidolysis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 5 (2). 277-292 pp.
- Lawther, J. M., Sun, R. C., Banks, W. B. 1997. Isolation and Characterization of Organosolv Lignin under Alkaline Condition from Wheat Straw. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. 3 (2). 159-175 pp.
- Lu, F., Ralph, J. 1997. Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC method). a new method for lignin analysis: protocol for analysis of DFRC monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45. 2590-2597 pp.
- Novaes, E., Osorio, L., Drost, D. R., Miles, B. L., Boaventura-Novaes, C. R. D., Benedict, C., Dervinis, C., Yu, Q., Sykes, R., Davis, M., Martin, T. A., Peter, G. F., Kirst, M. 2009. Quantitative genetic analysis of biomass and wood chemistry of *Populus* under different nitrogen levels. *New Phytologist*. 182 (4). 878-890 pp.
- Pew, J. C. 1957. Properties of Powdered Wood and Isolation of Lignin by Cellulytic Enzymes. *TAPPI*. 40. 553-560 pp.
- Ralph, J., Lu, F. C., The DFRC method for lignin analysis. 6. 1998. A simple modification for identifying natural acetates on lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46. 4616-4624 pp.
- Sher, A. A., Marshall, D. L., Gilbert, S. A. 2000. Competition between native *Populus deltoids* and invasive *Tamarix ramosissima* and the implications for reestablishing flooding disturbance. *Conservation Biology*. 14 (6). 1744-1754 pp.
- Wu, S., Argyropoulos, D. 2003. An improved method for isolating lignin in high yield and purity. *Journal of Pulp and Paper Science*. 29. 235-243 pp.

Determination of Uncondensed Structures of *Populus deltoides* Lignin using DFRC Degradation Method

A. Abdolkhani^{*1}, Y. Hamzeh², S. Hedjazi³ and A. Karimi⁴

¹ Assistant Prof., Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran

² Associate Prof., Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran

³ Assistant Prof., Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran

⁴ Professor, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, I.R. Iran and Institute of Tropical Forestry & Forest Products (INTROP), University Putra Malaysia

(Received: 26 May 2011, Accepted: 26 December 2011)

Abstract

Chemical structures of different isolated lignins were elucidated to determine the uncondensed structures through DFRC degradation method. Milled wood lignin and the so called enzymatic lignin were isolated and degraded via a modified chemical oxidative-reductive DFRC procedure. In the modified method, the degraded products were functionalized with methylation, acetylation and propylation modification processes to exclude the uncondensed phenolic β -O-4, uncondensed α -O-4 and uncondensed etherified β -O-4 groups. The subsequent characterization of the products by gel permeation chromatography and gas chromatography showed that enzymatic lignin had more uncondensed structures compared with milled wood preparation which could be a consequence of less degradation during the isolation process. The data were further evaluated by quantitative ¹³C NMR and the calculation of degree of condensity.

Keywords: Milled Wood Lignin, Enzymatic Lignin, Degradative methods, Condensed structures, Methylation