

# مقایسه ساختار شیمیایی لیگنین‌های MWL و EL استخراج شده از چوب صنوبر دلتوئیدس

سید احمد میرشکرایی

تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه شیمی

علی عبدالخانی\*<sup>+</sup>، یحیی همزه، علی نقی کریمی•

کرج، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی کرج، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ

**چکیده:** در این پژوهش ساختار شیمیایی لیگنین آنزیمی (EL) با لیگنین چوب آسیاب شده (MWL) مقایسه شده است. برای جداسازی لیگنین با روش آنزیمی، ترکیبی از آنزیم‌های مخرب کربوهیدرات‌های چوب به ترتیب شامل زایلاناز، سلولاز و گلوکوزیداز به همراه خالص سازی آنزیمی با پروتئاز قلیایی و سپس خالص سازی شیمیایی به وسیله دی متیل استامید استفاده شد. مطالعه شیمیایی لیگنین‌ها با استفاده از فناوری‌های طیف‌سنجی FT-IR و <sup>13</sup>C NMR کمی، روش‌های کروماتوگرافی و تخریبی به همراه روش‌های شیمی تر انجام شد. بررسی‌ها نشان داد که استفاده از توالی آنزیمی مورد استفاده به همراه کاهش زمان آسیاب کردن سبب جداسازی ملایم لیگنین با تغییرهای ساختاری اندک می‌شود. بررسی ساختاری لیگنین آنزیمی با روش‌های گفته شده نشان داد که لیگنین چوب صنوبر (*P. deltoides*) از نظر ساختاری دارای واحدهای ۴- (۳-هیدروکسی-۱-پروپنیل)-۲-متوکسی فنول (لیگنین گوایاسیل) بیشتری نسبت به ۴- (۳-هیدروکسی-۱-پروپنیل)-۲-متوکسی فنول (لیگنین سیرینجیل) است. لیگنین باقیمانده در چوب پس از استخراج لیگنین آنزیمی به طور عمده از ساختارهای متراکم تشکیل شده است. همچنین بررسی ساختارهای تخریب 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 در طی فرایند استخراج است.

**واژه‌های کلیدی:** لیگنین آنزیمی، سلولاز، کروماتوگرافی، طیف‌سنجی NMR کمی، DFRC.

**KEY WORDS:** Enzymatic lignin, Cellulase, Chromatography, Quantative NMR spectroscopy, DFRC.

## مقدمه

استرالیا و کشورهای مختلف جنوب شرقی آسیا و ایران به خوبی رشد می‌کند [۱]. سرعت رویش، سادگی گسترش گیاهی و کیفیت چوب از ویژگی‌های این گونه است که موضوع پژوهش‌های بسیاری بوده است. این گونه از اندک درختانی است که فقط

صنوبر درختی با رشد تند است که گونه‌های گوناگون آن در کشورهای بسیاری رشد می‌کنند. در میان گونه‌های مختلف آن *Populus deltoides* یکی از کوتاه عمرترین و در عین حال با تندترین سرعت رشد گونه هاست که بومی آمریکای شمالی بوده و در اروپا،

+E-mail: [abdolkhani@ut.ac.ir](mailto:abdolkhani@ut.ac.ir)

\*عهده دار مکاتبات

• نشانی دیگر: پژوهشکده INTROP، مالزی

استفاده از یک توالی آنزیمی با عملکرد تجزیه تدریجی بخش‌های گوناگون زنجیر پلی ساکاریدی، می‌تواند خلوص لیگنین را بالا ببرد و سبب تهیه یک لیگنین عاری از کربوهیدرات شود. به کارگیری چنین شیوه‌ای می‌تواند ضامن آزاد سازی لیگنینی شود که از نظر ساختاری شبیه لیگنین موجود در چوب است. اما این خطر وجود دارد که لیگنین به دست آمده به پروتئین آلوده شود. به همین منظور، استفاده از یک روش تخلیص آنزیمی به همراه یک روش شیمیایی ملایم می‌تواند آلودگی حاصل را به کمترین میزان برساند. در این پژوهش لیگنین چوب صنوبر (*Populus deltoids*) به عنوان یک گونه پهن برگ با رشد تند که ساختار شیمیایی لیگنین آن تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است، مورد بررسی قرار می‌گیرد.

### بخش تجربی

#### مواد

برای جداسازی و تهیه لیگنین از چوب صنوبر به دلیل داشتن سرعت رشد بالا در میان گونه‌های صنوبر و مناسب بودن رشد این گونه در ایران استفاده شد. آنزیم‌های تجاری زیر با توانایی هیدرولیز سلولز برای جداسازی و خلص سازی لیگنین از شرکت Sigma خریداری و مورد استفاده قرار گرفت: زایلاناز خالص به عنوان  $\beta$ -۱,۴-زایلاناز (EC: 3.2.1.8) از *Thermomyces lanuginosus* با قدرت ۲۵۰۰ واحد بر گرم، سلولاز *Aspergillus sp.* به عنوان اندوسلولاز (EC: 3.2.1.4) با قدرت ۱۰۰۰ واحد بر گرم، سلولاز قارچ *Aspergillus Niger* به عنوان اگزوسلولاز (EC: 3.2.1.91) با قدرت ۲۵۰ واحد بر گرم،  $\beta$ -گلوکوزیداز به عنوان گلوکوزیداز (EC: 3.2.1.21) با قدرت ۴۰ واحد بر گرم، پروتئاز قلیایی Sabistilin Type III از *Bacillus licheniformis* دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck با خلوص آزمایشگاهی تهیه شد. در تمامی مرحله‌های آزمایش‌ها برای شستشو از آب یون زدایی شده استفاده شد.

#### تهیه لیگنین MWL

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. چوب آسیاب شده به منظور یکدست شدن ذره‌ها به مدت یک ساعت در آسیاب گریز از مرکز

برای تهیه خمیر و کاغذ کشت می‌شود. رشد بسیار تند این درخت موضوع مناسبی برای بررسی‌های ساختاری و ترکیب‌های بیشتر آن بوده است [۲]. در این میان، مطالعه ای بر روی ویژگی‌های لیگنین آن با وجود اثرهای مستقیم این پلیمر بر روی فرآوری‌های صنعتی این چوب همانند خمیر و کاغذسازی انجام نشده است. در عمل، مقدار لیگنین، ساختار شیمیایی آن در قالب واحدهای پارا-هیدروکسی فنیل (H)، گواپاسیل (G) و سیرینجیل (S)، همچنین مقدار برخی پیوندهای بین مولکولی عامل‌های بسیار مهمی در طی فرایند تبدیل چوب به فرآورده‌های گوناگون هستند.

لیگنین به عنوان فراوان‌ترین پلیمر طبیعی دنیا پس از سلولز، ساختار بسیار پیچیده ای دارد و هنوز به طور کامل، به‌ویژه در مورد پهن برگان، مورد بررسی و ارزیابی قرار نگرفته است [۳،۴]. با وجود مطالعه‌های زیادی که در مورد ساختار لیگنین در طی پنج دهه اخیر صورت گرفته است، ساختار شیمیایی لیگنین پهن برگان به ویژه گونه‌های با سرعت رشد بالا تا کنون مشخص نشده است. مشکل اصلی در ارزیابی ساختار لیگنین، عدم توانایی در جدا سازی آن بدون تغییر یا تخریب شیمیایی آن است. اولین تلاش برای جداسازی لیگنین بدون تغییر شیمیایی آن توسط یورکمن (۱۹۵۴) انجام گرفت [۵] که در طی آن لیگنین از چوب به شدت آسیاب شده به کمک دیوکسان استخراج شد. این لیگنین که به آن لیگنین چوب آسیاب شده<sup>(۱)</sup> (MWL) گفته شد، به عنوان نمایاننده لیگنین واقعی چوب معروف شد و از آن برای ارزیابی واکنش‌های فتوشیمیایی لیگنین استفاده شد [۸ - ۶].

تلاش‌های دیگر برای بهبود فرایند جداسازی لیگنین بدون تغییر ساختار آن، به تخریب گزیننده پلی ساکاریدها به وسیله آنزیم‌های سلولاز و تهیه لیگنین سلولیتیک<sup>(۲)</sup> (CEL) منجر شد. اما این لیگنین دارای مقدار قابل دیدن کربوهیدرات به صورت ناخالصی است [۹]. سلولز، ترکیب بیشتر پلی ساکاریدی چوب، از بخش‌های کریستالی و آمورف تشکیل شده و تا حدودی در برابر تخریب آنزیمی (بخصوص بخش کریستالی) مقاوم است [۱۱ و ۱۰]. آنزیم‌های مخرب سلولز یا سلولازها، مجموعه ای پیچیده از پروتئین‌هایی هستند که توانایی تخریب بخش خاصی از پیوندهای گلیکوزیدی را دارا هستند. در حال حاضر لیگنین CEL تنها به وسیله آنزیم‌های تجاری اندوسلولاز (EC: 3.2.1.4) تهیه می‌شود [۳].

بنابراین می‌توان انتظار داشت که لیگنین تهیه شده با یک آنزیم اغلب دارای ناخالصی از نوع کربوهیدرات باشد [۱۲]. به نظر می‌رسد که

(۱) Milled Wood Lignin

(۲) Cellulytic Lignin

۵۰ درجه سانتی گراد عمل آوری شد. واکنش به‌وسیله حذف حلال تحت خلاء خاتمه داده شد و بی‌درنگ در ۵ میلی‌لیتر مخلوط دیوکسان/استیک اسید/آب (۵:۴:۱، نسبت حجمی) حل و به آن ۲۵۰ میلی‌گرم پودر روی اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط هم‌زده شد. پس از ۳۰ دقیقه پودر روی به‌وسیله کاغذ صافی جدا و محلول باقیمانده ۲ بار به‌وسیله دی کلرو متان خالص (۲۰ میلی‌لیتر) استخراج شد. فاز آلی به‌وسیله سدیم سولفات خشک و با استفاده از خلاء حذف شد. توده جامد در ۲ میلی‌لیتر پیریدین/پروپیونیک انیدرید (۱:۱، نسبت حجمی) حل و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط هم‌زده شد. واکنش با حذف حلال متوقف شد.

#### مقدار لیگنین و ترکیب عناصر پایه، متوکسیل و هیدروکسیل

مقدار لیگنین موجود در چوب و لیگنین‌های تهیه شده با استفاده از استیل برومید تعیین شد [۱۴]. مقدار کربن، هیدروژن و نیتروژن نمونه‌ها به‌وسیله CHN تجزیه تعیین شد. مقدار اکسیژن از تفریق مجموع مقدار این عناصرها فوق از ۱۰۰ تعیین شد. همچنین، مقدار گروه‌های متوکسیل و هیدروکسیل به‌وسیله  $^{13}\text{C}$  NMR به‌صورت کمی تعیین شد.

#### تعیین ترکیب قندی

برای بررسی اثر عمل آوری آنزیمی بر تخریب قندهای چوب، لیکور به دست آمده از هر مرحله عمل آوری به‌وسیله فناوری کروماتوگرافی مایع High-Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC) تجزیه شد. لیکورها به‌وسیله آب رقیق شده و با کمک کروماتوگرافی HPAEC (Dionex DX-500) مجهز به ستون CarboPac PA-1 و دتکتور آمپرومتریک تحلیل شد. قندهای حل شده توسط آنزیم نسبت به نمونه‌های مونومری قندی و استاندارد داخلی فوکوز تعیین شدند. مقدار ناخالصی قندی موجود در لیگنین‌های تهیه شده بر اساس روش Blakeney و همکاران تعیین شد [۱۵]. نمونه لیگنین ابتدا در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به‌وسیله سولفوریک اسید ۷۲ درصد اسیدولیز و قندهای حل شده پس از احیا با سدیم بورهیدرید استیله شدند. قندهای کاهش یافته به‌وسیله کروماتوگرافی گازی (Shimadzu GC 14-A) نسبت به استاندارد داخلی اینوزیتول تعیین شدند. برای تعیین قندها از ستون DB-5 و دتکتور FID استفاده شد.

توسط ۴۰ عددگلوله ۳ میلی‌متری آسیاب شد. چوب آسیاب شده توسط محلول دیوکسان: آب (۱۰ mL/g، ۴:۹۶) طی ۳ مرحله ۲۴ ساعتی (۷۲ ساعت) استخراج شد. لیگنین خام از بخش محلول پس از جداسازی به‌وسیله سانتریفوژ (۸۰۰۰ دور بر دقیقه) و تغلیظ، به‌وسیله خشک کن انجمادی جداسازی شد. برای خالص‌سازی لیگنین MWL، لیگنین خام در مقدار ۱۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۹۰ درصد حل و در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب ته نشین شد. لیگنین ته نشین شده پس از خشک کردن به‌وسیله خشک کن انجمادی، در مقدار ۲۰ میلی‌لیتر حلال دی کلرو اتان: اتانول (۲:۱، نسبت حجمی) حل و در دی اتیل اتر ته نشین شد تا لیگنین خالص به دست آید.

#### تهیه لیگنین آنزیمی<sup>(۱)</sup> (EL)

برای تهیه لیگنین آنزیمی (EL) چوب آسیاب شده پس از استخراج با استون (۴۸ ساعت) و عمل آوری صوتی در آب سرد به‌وسیله آسیاب تویی چرخشی (۴۸ ساعت) و آسیاب گریز از مرکز همانند MWL خرد و سپس به‌وسیله توالی آنزیم‌های زایلاناز، اندوسولولاز، آگزوسولولاز و گلوکوزیداز به همراه یک مرحله عمل آوری شیمیایی طبق روش‌های ارائه شده در پیشینه پژوهش تیمار شد [۱۳].

#### متیلاسیون

متیلاسیون نمونه‌ها در روش DFRC به‌وسیله دی آزو متان انجام شد. دی آزومتان در آزمایشگاه با کمک دیازالد (ان - متیل - ان - نیتروژن - تولوئن سولفونامید) تهیه شد مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم لیگنین در ۲۰ میلی‌لیتر دیوکسان/متانول (۲:۱، نسبت حجمی) حل شد. سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر 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 دوباره با دی آزومتان عمل آوری شد. عمل آوری 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.

#### DFRC<sup>(۲)</sup>

مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم لیگنین متیله شده با استیک اسید / استیل برومید (۵ میلی‌لیتر؛ ۴:۱، نسبت حجمی) به همراه ۵ میلی‌گرم تتراکوزان به عنوان استاندارد داخلی مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای

(۱) Enzymatic Lignin

(۲) Derivatization Followed Reductive Cleavage

**طیف سنجی FTIR**

(Agilent 5975) مجهز به ستون DB-5 (۰٫۲۵ × ۳۰ m) سیلیکا تزریق شد. تزریق در دمای ۲۷۰ درجه اولیه انجام شد. کوره از ۱۰۰ تا ۲۸۰ درجه با نرخ ۸ درجه سانتی گراد بر دقیقه گرم شد. ترکیب‌های یونیزه شده به‌وسیله طیف سنج جرمی شناسایی شدند و الگوی گسست آنها به‌وسیله مقایسه با مرجع NIST و Wiley شناسایی شدند.

از طیف سنجی FTIR برای تعیین خلوص لیگنین استفاده شد. در این مورد، از روش قرص‌های KBr استفاده شد. مقدار ۲ میلی‌گرم لیگنین با ۲۰۰ میلی‌گرم برومید پتاسیم مخلوط و پس از تهیه قرص توسط دستگاه اسپکترومتر Bruker Equinox-55 تحلیل شدند. مقدار جذب نمونه‌ها با وضوح  $8 \text{ cm}^{-1}$  تعیین و در کل ۶۴ اسکن بر روی نمونه انجام شد.

**طیف سنجی کمی  $^{13}\text{C}$  NMR**

از طیف سنجی  $^{13}\text{C}$  NMR برای کمی کردن و تعیین مقدار گروه‌های عاملی گوناگون و مقایسه ساختار لیگنین‌ها استفاده شد. تحلیل کمی  $^{13}\text{C}$  NMR لیگنین‌ها به‌وسیله دستگاه BRUKER 400 MHz انجام شد. در هر مورد ۷۰۰ میلی‌گرم نمونه لیگنین در ۴ میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO-d6) حل و درون تیوب‌های ۱۰ میلی متر قرار داده شد. عملیات اسکن تحت شرایط دوره‌ای زیر انجام گرفت: پهنای پالس ۹۰ درجه، زمان اسکن (جمع آوری داده) ۱/۴ ثانیه و دوره تاخیر ۷ ثانیه. در کل، تعداد ۱۰۰۰۰ اسکن بر روی نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌های لیگنین MWL، EL و نمونه‌های استیل‌ه شده آنها مورد تحلیل قرار گرفتند.

**کروماتوگرافی تراوش زلی (GPC)**

برای اندازه‌گیری توزیع وزن مولکولی لیگنین‌های تهیه شده و فراورده‌های تخریبی DFRC از کروماتوگرافی نفوذ زلی (Gel Permeation Chromatography) استفاده شد. اندازه‌گیری در دستگاه کروماتوگرافی Viscotek GPC Tetradetector انجام شد. از ۳ ستون به‌صورت سری از جنس پلی استایرن و دکتور LALS برای تحلیل استفاده شد. سرعت جریان محلول در حد ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. لیگنین‌های استیل‌ه شده در ترا هیدروفوران حل و با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دستگاه تزریق شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به دستگاه تزریق شد. توزیع وزن مولکولی نسبت به استاندارد پلی استایرن تعیین شد.

**کروماتوگرافی Py-GC/MS**

پیرولیز لیگنین به منظور تعیین ناخالصی‌ها و نسبت واحدهای سیرینجیل به گویاسیل انجام شد. پیرولیز به‌وسیله Curie-point flash pyrolyzer متصل به کروماتوگرافی گازی دستگاه Agilent 6890 GC/MS و ستون DB-5  $30\text{m} \times 0.25\text{m}$  انجام شد. کوره از ۴۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد با شیب ۳۰ درجه بر دقیقه داغ شد. از گاز هلیوم به عنوان فاز متحرک استفاده شد. برای تعیین بازده مونومری فراورده‌های تخریبی DFRC، لیگنین تخریب شده در دی کلرومتان حل و به دستگاه تزریق شد. از تتراکوزان به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. فراورده‌ها در طیف سنج جرمی نسبت به مخزن اطلاعاتی NIST و Wiley شناسایی شدند.

**کروماتوگرافی گازی-اسپکتروسکوپی جرمی برای شناسایی فراورده‌های تخریبی DFRC**

ترکیب‌های تخریب شده در مقدار ۰٫۵ میلی‌لیتر دی کلرو متان حل شد. مقدار ۲ میکرولیتر از این نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی

**نتیجه‌ها و بحث****تجزیه پایه**

نتیجه‌های مربوط به تحلیل اولیه لیگنین‌های تهیه شده در جدول ۱ نشان داده شده است. بالاتر بودن بازده استخراج لیگنین آنزیمی نسبت به روش متداول چوب آسیاب شده نشان دهنده مؤثر بودن عملیات عمل آوری آنزیمی در استخراج لیگنین است. بازده استخراج MWL در حد ۲۶/۵ درصد است. مقدار بازده ۵۸ درصد لیگنین آنزیمی با در نظر گرفتن کمتر بودن زمان آسیاب چوب (۴۸ ساعت) نشان دهنده مؤثر بودن حلال دیوکسان برای استخراج لیگنین پس از تجزیه بخشی از قندهای چوب به‌وسیله عمل آوری با آنزیم است. Guerra و همکاران بیشترین بازده ۳۴ درصد برای لیگنین MWL را پس از مدت زمان آسیاب ۲۸ روز برای گونه *E. globules* به‌دست آورده‌اند [۱۶]. بنابراین، کاهش زمان آسیاب کرده چوب در این پژوهش اثری بر بازده استخراج نداشته است. این شرایط می‌تواند تضمین‌کننده استخراج یک نوع لیگنین سالم برای ارزیابی‌های ساختاری باشد. به‌طور کلی، بازده استخراج به نوع ماده اولیه چوبی، زمان آسیاب و دسترس‌پذیری

جدول ۱- تجزیه و تحلیل اولیه لیگنین‌های تهیه شده.

MWL	EL	
۲۶٫۵	۵۸	بازده (%)
۹۷	۹۵٫۴	خلوص (لیگنین استیل برومید)
۱٫۸۲	۴۹	کربوهیدرات (%)
۵۹٫۱	۵۷٫۶	کربن (%)
۶	۶٫۲	هیدروژن (%)
۳۴٫۷	۳۳	اکسیژن (%)
<۰٫۵	<۰٫۵	نیتروژن (%)
۰٫۱۴	۰٫۱۱	هیدروکسیل (فنولی)
۱٫۵۳	۱٫۴۲	هیدروکسیل (آلیفاتیک)
۰٫۰۴	۰٫۰۶	کربونیل
$C_9H_{112}O_{27.8}(OCH_2)_{137}$	$C_9H_{117}O_{27.8}(OCH_2)_{137}$	فرمول مولکولی (C9)
۲۰٫۶	۲۸٫۹	وزن مولکولی واحد C9

جدول ۲. ترکیب مونومری قندهای موجود در نمونه های لیگنین به دست آمده.

	رامنوز	آرابینوز	زایلوز	مانوز	گالاکتوز	گلوکز
EL	۰٫۱۴	۰٫۲۳	۳٫۲۵	۰٫۱۹	۰٫۲۷	۰٫۸۲
MWL	۰٫۰۳	۰٫۱	۰٫۸	۰٫۰۹	۰٫۱	۰٫۷

ذره‌های چوب به وسیله حلال بستگی دارد. بازده لیگنین آنزیمی در گستره‌ی ۲۰ تا ۸۰ درصد گزارش شده است [۱۷]. اگرچه می‌توان با افزایش مدت زمان آسیاب کردن بازده را نیز افزایش داد ولی این نوع روش استخراج با تخریب درشت مولکول لیگنین نیز همراه است. شکل ۱ قندهای حل شده از چوب طی عمل آوری‌های آنزیمی را نشان می‌دهد که به وسیله HPAEC تجزیه شده است. قندهای جدا شده از چوب نشان دهنده موثر بودن آنزیم‌ها می‌باشد. مقدار ناخالصی قند در لیگنین استخراج شده آنزیمی اندکی از لیگنین MWL بیشتر است. ترکیب قندهای موجود در نمونه‌های لیگنین، تجزیه شده به وسیله GC، در شکل ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است. مقدار نیتروژن نمونه آنزیمی در حد ناچیزی قرار دارد که نشان دهنده عدم آلودگی لیگنین در طی استخراج است. همان‌گونه که دیده می‌شود بازده و خلوص لیگنین آنزیمی بسیار بیشتر از لیگنین چوب آسیاب شده است. بیشتر بودن مقدار هیدروژن نیز نشان دهنده کمتر بودن تراکم در لیگنین آنزیمی نسبت به لیگنین چوب آسیاب شده است. وزن واحد مولکولی

لیگنین آنزیمی بسیار بیشتر از لیگنین چوب آسیاب شده است. این نتیجه‌ها در کل نشان می‌دهند که ساختار فیزیکی لیگنین آنزیمی در طی فرایند جداسازی کمتر دچار تخریب شده است.

#### توزیع وزن مولکولی

شکل ۳ توزیع وزن مولکولی لیگنین‌های استیل‌شده را نشان می‌دهد. توزیع وزن مولکولی هر دو لیگنین از نظر شکل کروماتوگرام بسیار مناسب است. در تجزیه لیگنین EL وزن مولکولی بسیار بیشتری نسبت به لیگنین MWL دارد و توزیع آن نیز گسترده تر می‌باشد. این مسئله از روش تعیین Mw و Mn و نشان دادن توزیع وزن مولکولی قابل بیان است. الگوی انحنای کروماتوگرام EL دارای اندکی بی نظمی است که می‌تواند به دلایلی حل نشدن کامل نمونه استیل‌شده به دلیل وجود ناخالصی قندی به صورت LCC<sup>(۱)</sup> باشد. بالاتر بودن وزن مولکولی می‌تواند به علت تخریب کمتر در فرایند تهیه لیگنین باشد. در واقع استفاده از یک سامانه تجزیه تدریجی و ملایم سبب تخریب کمتر در لیگنین می‌شود.

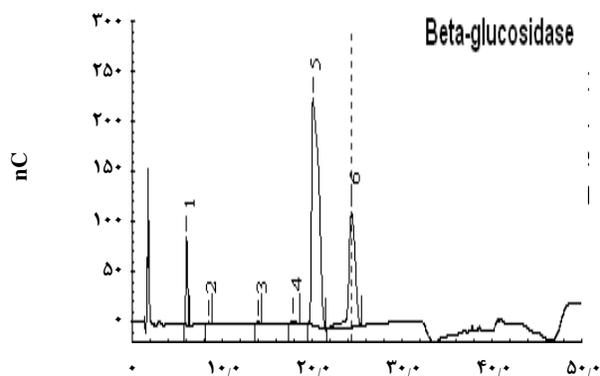
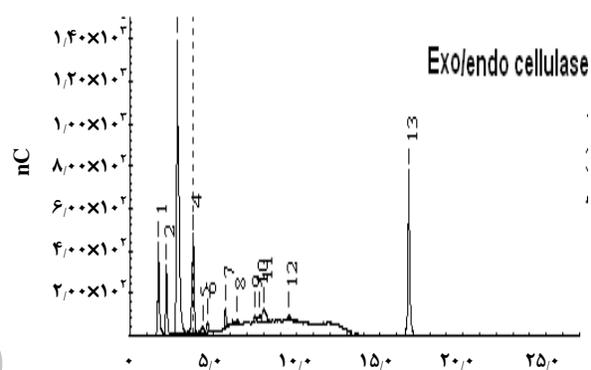
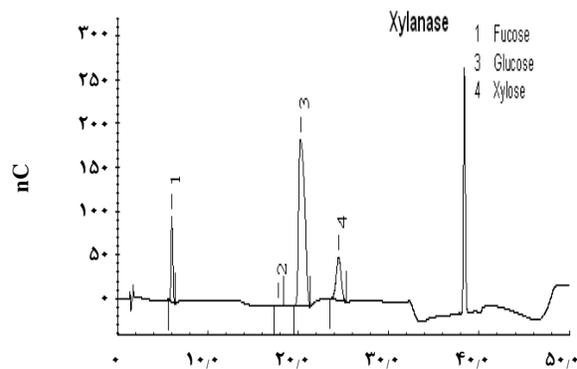
(۱) Lignin-Carbohydrate Complex

در کل هر دو لیگنین دارای جزء های با وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد هستند. وزن مولکولی لیگنین در نقطه بیشینه کروماتوگرام های MWL و EL به ترتیب ۴۹۰۰ و ۹۱۰۰ است. در مورد لیگنین EL فراوانی بخش های با وزن مولکولی بالا، بیشتر از اجزای با وزن مولکولی پایین است، در حالی که در مورد لیگنین MWL فراوانی بخش های با وزن مولکولی پایین بیشتر است. این مسئله از یک طرف هم می تواند نشان دهنده مؤثر بودن فرایند آنزیمی به کار برده شده در استخراج لیگنین و از سوی دیگر توانایی آن در حفظ ساختار لیگنین با تخریب کمتر باشد که به طور عمده ناشی از پایین بودن زمان آسیاب کردن چوب است. بالا بودن وزن مولکولی لیگنین EL می تواند دلیلی برای بیشتر بودن واحد ساختاری بیشتر لیگنین یعنی  $\beta$ -O-4 باشد. درجه بس پاشیدگی<sup>(۱)</sup> لیگنین EL بسیار بیشتر از لیگنین MWL است که این مسئله نشان دهنده یکنواخت بودن بیشتر لیگنین MWL از نظر وزن مولکولی است. بالا بودن درجه پلیمریزاسیون لیگنین EL به دلیل دامنه وسیع بخش های گوناگون و اختلاف بیشتر وزن مولکولی بخش های سنگین تر نسبت به بخش های سبک می باشد. این مسئله نشان می دهد که روش خالص سازی به کار برده شده در تهیه لیگنین EL اثر چندانی در حذف ساختارهای کوچک استخراج شده لیگنین ندارد.

#### طیف سنجی FT-IR

طیف هر دو نمونه، الگوی عمومی یکسانی را نشان می دهد (شکل ۴). این بدان معناست که به طور کلی لیگنین های به دست آمده از لحاظ ساختاری متعلق به ناحیه مشخصی از ساختار دیواره سلول چوبی هستند [۱۸]. نتیجه های به دست آمده در ناحیه های گوناگون طیف مؤید نتیجه های به دست آمده از تحلیل کمی با  $^{13}\text{C}$  NMR است که برخی گروه های عاملی (همانند گروه های هیدروکسیل فنولی) در لیگنین MWL دارای مقدار بیشتری نسبت به EL هستند که می تواند دلیلی برای تخریب بیشتر ساختار لیگنین در طی استخراج آن باشد (جدول ۳). ولی همان گونه که گفته شد الگوی کلی لیگنین های تهیه شده یکسان است.

جدول ۳ منشاء هر یک از نوارهای جذبی و درصد آنها را نسبت به شدیدترین جذب نشان می دهد. طیف این لیگنین EL نشان می دهد که نمونه استخراج شده و خالص سازی شده دارای کمترین جذب های اضافی مربوط به ناخالصی های غیر لیگنینی



شکل ۱- کروماتوگرام قندهای تجزیه شده در طی عمل آوری آنزیمی تجزیه شده به وسیله HPAEC.

(۱) Polydispersity

جدول ۳- ارزیابی طیف FT-IR لیگنین MWL و EL تهیه شده.

MWL	EL	باند ( $\text{cm}^{-1}$ )	منشا نوار جذبی	شدت جذب	
				EL	MWL
۰/۰۴۸	۰/۰۴۵	۱۷۲۷	C=O مزدوج نشده	۲۰	۱۶/۷
۰/۰۵۸	۰/۰۵۲	۱۶۵۶	C=O مزدوج شده	۶۰	۶۱/۱
۰/۱۱۳	۰/۰۸۸	۱۵۹۴	حلقه آروماتیکی	۶۶/۷	۷۲/۲
۰/۱۳۱	۰/۰۹۷	۱۵۰۷	حلقه آروماتیکی	۶۶/۷	۶۶/۷
۰/۰۹۸	۰/۱۲۲	۱۴۶۱	C-H گروههای متیلنی	۵۳/۳	۵۵/۶
۰/۰۹۰	۰/۰۸۰	۱۴۲۲	حلقه آروماتیکی	۴۶/۷	۵۰
۰/۰۹۶	۰/۰۷۱	۱۳۲۸	حلقه سیرینجیل - ارتعاش خمشی هیدروکسیل فنولی	۶۶/۷	۷۷/۸
۰/۱۴۳	۰/۱۰۴	۱۲۷۰	حلقه گواپاسیل	۶۶/۷	۷۲/۲
۰/۱۲۶	۰/۱	۱۲۲۶	حلقه سیرینجیل - ارتعاش کششی هیدروکسیل فنولی	۱۰۰	۱۰۰
۰/۱۱۲	۰/۱	۱۰۳۰	C-H در الکل های نوع دوم و اترهای آلیفاتیک	۶۶/۷	۶۱/۱
۰/۰۲۵	۰/۰۲۱	۸۵۱	C-H آروماتیک خارج از صفحه (ارتعاش خمشی)	۱۳/۳	۱۶/۷

ساختارهای همانندی از هر دو لیگنین ایجاد می شود. پیروگرام لیگنین آنزیمی صنوبر *P. deltoids* در شکل ۵ نشان داده شده است. ساختارهای شناسایی شده ناشی از لیگنین به همراه فراوانی نسبی مولی آنها در جدول ۵ نشان داده شده است. در میان این ترکیب های فنول های گواپاسیل و سیرینجیل مشتق شده از واحدهای گواپاسیل و سیرینجیل شناسایی شده اند. تنها میزان اندکی از فنول های مشتق شده از پاراهیدروکسی سینامیل در میان ترکیب ها شناسایی شدند. بیشترین ترکیب های شناسایی شده شامل گواپاسیل (۳)، ۴ - متیل گواپاسیل (۵)، ۴ - وینیل گواپاسیل (۸)، و سیرینجول (۱۰) هستند. برخلاف دیگر پهن برگان، تجزیه نشان می دهد که واحدهای مشتق شده از گواپاسیل به میزان قابل توجهی

در باند  $1656 \text{ cm}^{-1}$  است (جدول ۴). میزان لیگنین استیل برومید نمونه خالص سازی شده لیگنین همانطور که در جدول ۲ عنوان شد برای لیگنین های EL و MWL به ترتیب ۹۵.۵ و ۹۷ درصد تعیین شد.

#### تجزیه پیرولیز - کروماتوگرافی گازی / طیف سنجی جرمی

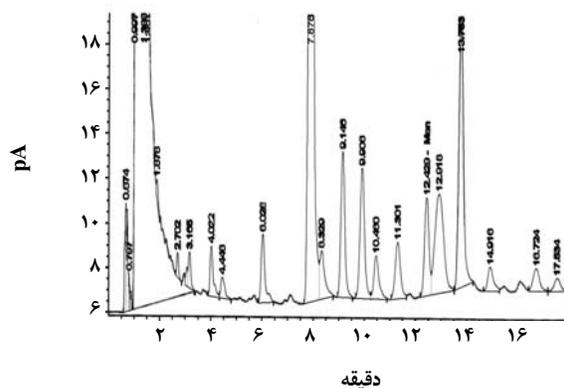
Py-Gc/MS یک فناوری سریع برای تجزیه ساختار لیگنین است. از این فناوری به میزان زیادی برای تعیین نسبت S/G در پهن برگان استفاده شده است [۱۹]. پیروگرام لیگنین تهیه شده از صنوبر با هر دو روش آنزیمی و چوب آسیاب شده ساختارهای لیگنینی همانندی را نشان می دهد. در لیگنین آنزیمی مقدار اندکی از ساختارهای ناشی از کربوهیدرات ها نیز در پیروگرام دیده می شود ولی با تمرکز بر لیگنین، در اثر پیرولیز

از واحدهای سیرینجیل بیشتر هستند. نسبت H:G:S در لیگنین گونه *P. deltoides* در حدود ۵:۵۹:۴۰ است. نسبت S/G ناشی از ترکیب‌های لیگنینی در حدود ۰/۶۷ است. این مقدار به تقریب ۱/۱ برابر مقدار به‌دست آمده از نتیجه‌های NMR است. پژوهش‌های *Sarkanen* و همکاران (۱۹۷۱) نشان داده است که نتیجه‌های به‌دست آمده از روش‌های تخریبی مقدار واحدهای S را بیشتر از حد واقعی نشان می‌دهد که این مسئله به دلیل درصد تراکم پایین تر این واحدها در لیگنین است [۲۰]. بیشتر بودن مقدار واحدهای گویاسیل در گونه *P. deltoides* برخلاف دیگر گونه‌های پهن برگ مانند اکالیپتوس که در آن واحدهای سیرینجیل بیشتر هستند [۲۱]. یک عامل بازدارنده برای انجام پخت‌های قلیایی است زیرا ساختارهای گویاسیل پتانسیل بیشتری برای واکنش‌های تراکمی، به دلیل آزاد بودن موقعیت ۳ یا ۵ حلقه بنزیلی، را دارا هستند [۲۲]. بنابراین به‌طور نظری ساختارهای G مقاومت بیشتری را در برابر شرایط قلیایی پخت از خود نشان می‌دهند. در نتیجه تعیین درصد تراکم لیگنین عامل مهمی برای تعیین کارایی پخت چوب *P. deltoides* می‌باشد.

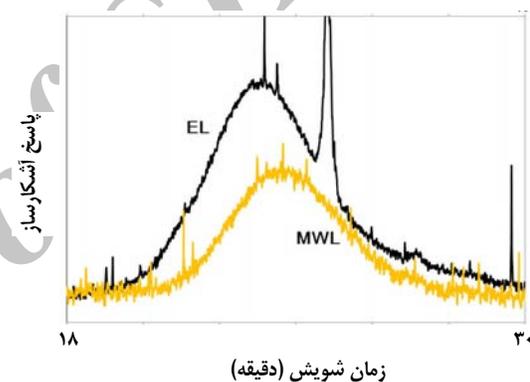
### تحلیل کمی $^{13}\text{C}$ NMR

طیف‌های  $^{13}\text{C}$  NMR کمی لیگنین‌های EL و MWL در حالت عادی و استیله شده در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند. تحلیل داده‌ها و محاسبه واحدهای ساختاری و گروه‌های عاملی گوناگون لیگنین‌ها نیز در جدول ۵ نشان داده شده است. نتیجه‌های داده شده در تمام جدول‌ها به‌صورت تعدادساختارها به ازای هر واحد آروماتیکی بیان شده است. ساختارهای مورد اشاره در جدول‌ها در شکل ۸ نشان داده شده‌اند. در محاسبه کمی گروه‌های عاملی و ساختارهای لیگنین انتگرال دامنه ۱۰۲-۱۶۲ ppm به‌عنوان ناحیه آروماتیکی و مینا در نظر گرفته شد.

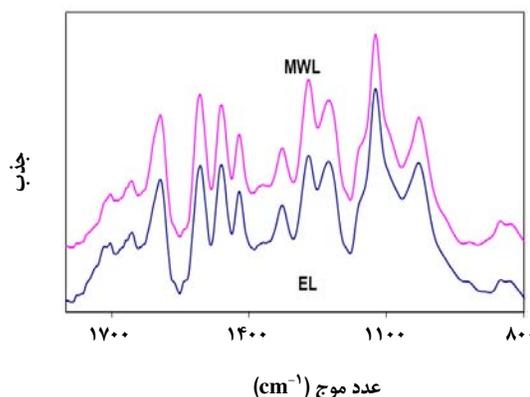
محاسبه‌ها نشان می‌دهد که لیگنین آنزیمی از لحاظ ساختاری بسیار سالم تر از لیگنین چوب آسیاب شده است. به‌طور مثال، مقدار گروه‌های  $\beta$ -O-4 که جزء اصلی تشکیل دهنده لیگنین است در لیگنین آنزیمی ۰/۶۴ و در لیگنین چوب آسیاب شده ۰/۵۳ می‌باشد. (جدول ۵). ساختار آریل-گلیسرول- $\beta$ -آریل اتر واحد بیشتر تشکیل دهنده لیگنین سوزنی برگان و پهن برگان است. بنابراین بالا بودن مقدار آن دلیلی بر سالم تر بودن لیگنین است. این نتیجه‌ها با نتایج به‌دست آمده از کروماتوگرافی تراوش ژلی سازگار است که در آن لیگنین EL دارای متوسط وزن مولکولی بیشتری



شکل ۲- کروماتوگرام ترکیب قندی نونه لیگنین آنزیمی تجزیه شده توسط کروماتوگرافی گازی. قندهای اصلی شناسایی شده در جدول ۲ نمایش داده شده‌اند.



شکل ۳- کروماتوگرام توزیع وزن مولکولی لیگنین‌های EL و MWL با استفاده از دکتور LALS.

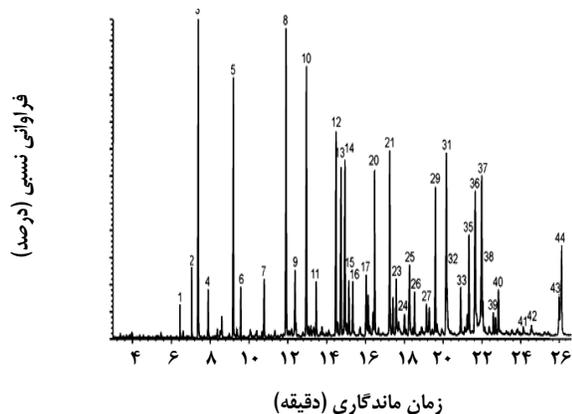


شکل ۴- طیف های FT-IR لیگنین‌های آنزیمی (EL) و چوب آسیاب شده (MWL).

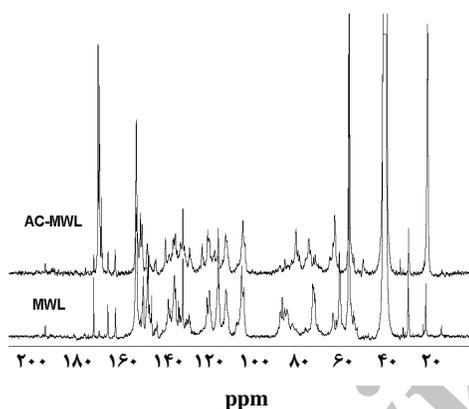
جدول ۴- ترکیب‌های مونومری شناسایی شده توسط طیف سنجی جرمی لیگنین چوب آسیاب شده پس از پیرولیز.

شماره	ترکیب	فرآوانی نسبی (%)	منشاء
۲۳	<i>trans</i> -Coniferyl alcohol	۴/۳	G
۲۴	<i>trans</i> -Coniferaldehyde	۴/۷	G
۲۵	Syringol	۸/۱	S
۲۶	4-Methylsyringol	۴/۲	S
۲۷	4-Ethylsyringol	۱	S
۲۸	4-Vinylsyringol	۴/۲	S
۲۹	4-Allylsyringol	۱/۱	S
۳۰	<i>cis</i> -Propenylsyringol	۰/۹	S
۳۱	Propine-syringol	۰/۶	S
۳۲	Propine-syringol	۰/۷	S
۳۳	<i>trans</i> -Propenylsyringol	۳/۲	S
۳۴	Syringaldehyde	۴/۲	S
۳۵	Homosyringaldehyde	۱	S
۳۶	Syringic acid methyl ester	۰/۵	S
۳۷	Acetosyringone	۲/۲	S
۳۸	Syringylacetone	۰/۵	S
۳۹	Propiosyringone	۰/۴	S
۴۰	Syringyl vinyl ketone	۱	S
۴۱	Dihydrosinapyl alcohol	۰/۳	S
۴۲	<i>cis</i> -Sinapyl alcohol	۰/۳	S
۴۳	<i>trans</i> -Sinapyl alcohol	۱/۵	S
۴۴	<i>trans</i> -Sinapaldehyde	۴	S

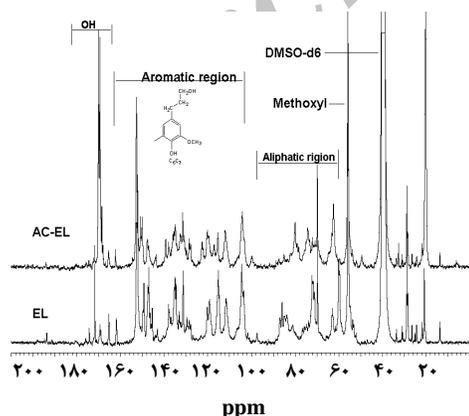
شماره	ترکیب	فرآوانی نسبی (%)	منشاء
۱	4-Hydroxybenzaldehyde	۰/۸	H
۲	Phenol	۱/۵	H
۳	Methylphenol	۱/۲	H
۴	Dimethylphenol	۱/۴	H
۵	Guaiacol	۹	G
۶	4-Methylguaiacol	۷	G
۷	4-Ethylguaiacol	۱/۵	G
۸	4-Vinylguaiacol	۸/۳	G
۹	Eugenol	۱/۵	G
۱۰	<i>cis</i> -Isoeugenol	۱/۳	G
۱۱	<i>trans</i> -Isoeugenol	۴/۹	G
۱۲	Vanillin	۴/۷	G
۱۳	Propine-guaiacol	۱/۵	G
۱۴	Propine-guaiacol	۱/۴	G
۱۵	Homovanillin	۱/۵	G
۱۶	Vanillic acid methyl ester	۰/۵	G
۱۷	Acetoguaiacone	۲/۶	G
۱۸	Guaiacyl-acetone	۱	G
۱۹	Propiovanillone	۰/۴	G
۲۰	Guaiacyl vinyl ketone	۲/۲	G
۲۱	Dihydroconiferyl alcohol	۰/۲	G
۲۲	<i>cis</i> -Coniferyl alcohol	۰/۸	G



شکل ۵- پیروگرام اجزای ساختاری لیگنین آنزیمی.



شکل ۶- طیف‌های  $^{13}\text{C}$  NMR لیگنین چوب آسیاب شده معمولی (MWL) و استیل‌شده (MWL-AC).

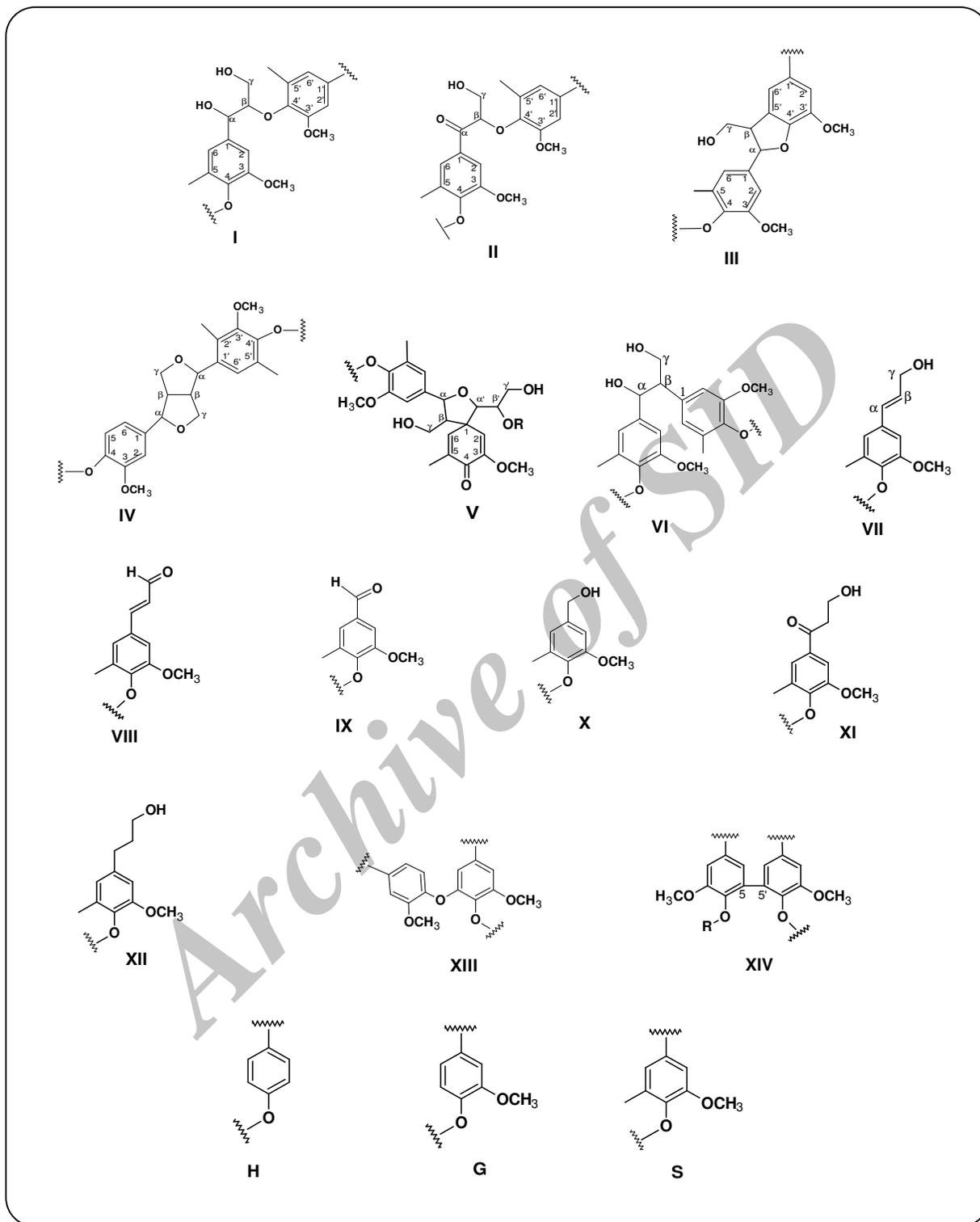


شکل ۷- طیف‌های  $^{13}\text{C}$  NMR لیگنین آنزیمی معمولی (EL) و استیل‌شده (EL-AC).

نسبت به لیگنین MWL است. مقدار کربن‌های زنجیر جانبی واحد ساختاری فنیل پروپان از لحاظ نظری ۳ است. محاسبه‌های کمی نشان می‌دهد که این مقدار در لیگنین EL در حدود ۲/۷۲ و در لیگنین MWL در حدود ۲/۱۷ است. دیده می‌شود که این مقدار در لیگنین آنزیمی مقدار بیشتری نسبت به MWL است. از آنجایی که آسیب کردن شدید سبب تخریب ساختار لیگنین و ایجاد واکنش‌های تراکمی می‌شود، دیده می‌شود که مقدار تراکم در لیگنین MWL با مقدار ۰/۳۳ بسیار بیشتر از لیگنین EL (۰/۲۰) است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که کاهش زمان آسیاب کردن و به‌کارگیری روش‌های گزیننده آنزیمی، سبب وارد آمدن تخریب کمتر به ساختار لیگنین طی استخراج می‌شود. مقدار گروه‌های متوکسیل لیگنین MWL و EL در ناحیه ۵۴-۵۷ ppm در حدود ۱/۳۰ واحد به ازای هر حلقه آروماتیک می‌باشد. سیگنال ppm ۱۹۳-۱۹۶ متعلق به اتم‌های کربن گروه کربونیل در سینامل آلدهید (VII) و  $\alpha$ -کربونیل واحدهای  $\beta$ -O-4 (II) در لیگنین‌های MWL و EL در حد ۰/۰۳ و ۰/۰۱ به ازای هر حلقه آروماتیک می‌باشد. همچنین ساختارهای  $\alpha$ -آلدهیدی (IX) (رزانس C- $\alpha$  در ۱۹۰-۱۹۳ ppm) فقط در MWL و به مقدار ۰/۰۳ دیده شد. وجود ساختارهای  $\alpha$ -کربونیل نشان دهنده احتمال وقوع اکسیداسیون طی فرایند آسیاب کردن است [۳]. همچنین وجود ساختارهای بنزآلدهیدی نشان می‌دهد که فرایند آسیاب کردن نه تنها سبب اکسیداسیون زنجیر جانبی می‌شود بلکه سبب تخریب ساختاری نیز می‌شود (اگرچه وجود این ساختارها ناچیز است). تحلیل ناحیه آروماتیک طیف  $^{13}\text{C}$  NMR نیز تفاوت‌های ساختاری MWL و EL را نشان می‌دهد. ناحیه آروماتیک را می‌توان به کربن آروماتیک اکسیژن دار ( $\text{C}_{\text{Ar-O}}$ )، کربن‌های آروماتیک متراکم شده ( $\text{C}_{\text{Ar-C}}$ ) و کربن‌های آروماتیک پروتون دار (۱۰۳-۱۲۷ ppm) تقسیم‌بندی نمود [۱۰]. دو قسمت آخر می‌تواند بیانگر یک نوع تخمین از مقدار تراکم (اتصال‌های C-C) در ساختار درشت مولکول لیگنین باشد. ناحیه آروماتیک کربن-کربن ( $\text{C}_{\text{Ar-C}}$ ) شامل موقعیت  $\text{C}_1$  زنجیر جانبی و موقعیت  $\text{C}_5$  اتصال‌های آروماتیکی کندانس شده شامل ساختارهای فنیل کوماران (III) یا بی فنیل (XIV) باشد. اما محاسبه درجه تراکم به‌وسیله انتگرال‌گیری این ناحیه سبب بروز خطا می‌شود، زیرا این ناحیه به‌وسیله کربن‌های ساختارهای بنزآلدهیدی و  $\text{C}_\beta$  در سینامیل آلدهید هم پوشانی دارد [۳]. استفاده از ناحیه آروماتیکی پروتون دار (۱۰۳-۱۲۷ ppm) برای تعیین درجه تراکم در سوزنی برگان دقت بیشتری دارد. انتگرال

جدول ۵ - محاسبه کمی واحدهای ساختاری و گروه‌های عاملی لیگنین‌های MWL و EL. اندیس na (استیله نشده)، ac (استیله شده)، g (گواپاسیل)، s (سیرینجیل) می‌باشد. ساختارهای مورد اشاره در پرانتز در شکل ۸ نمایش داده شده‌اند.

ساختار	محاسبات	مقدار به ازاء واحد ساختاری (C9)	
		EL	MWL
$\alpha$ -CO/ $\beta$ -O-4 (II)	(I196-193) <sub>na</sub>	۰/۰۳	۰/۰۲
spirodienone structures (V)	(I 182.5-180)=V <sub>g</sub>	<۰/۰۱	<۰/۰۱
	(I 177.5-175)=V <sub>s</sub>	۰/۰۲	<۰/۰۱
pino/syringyresinol (IV)	(I 54-52) <sub>ac</sub> /2	۰/۰۵	۰/۰۴
	(I 54-52) <sub>na</sub> -III/2		۰/۰۴
phenylcoumaran (III)	(I 87-85.5) <sub>ac</sub>	۰/۰۵	۰/۰۵
$\beta$ -1 (VI)	(I 50-48) <sub>ac</sub> - III	۰/۰۳	۰/۰۲
5-5' (XIV)	(I 144-141) <sub>na</sub> -III	۰/۰۴	۰/۰۳
$\beta$ -O-4/ $\alpha$ -OH (I)	(I 78-70) <sub>na</sub> - VI- IV - 3× carbohydrates	۰/۴۳	۰/۵۶
Ar-CH <sub>2</sub> OH structures (X)	(I 65.5-61) <sub>na</sub> - III- VI- V	۰/۲	۰/۱۴
$\beta$ -O-4 total	(I 88-82) <sub>na</sub> - III- IV	۰/۵۳	۰/۶۴
$\gamma$ -O-Alk total	(I 77-65)-OH <sub>acc</sub>	۰/۲۷	۰/۳
Alk-O-Ar	(I 90-77)-IV-V(×2)	۰/۸۱	۰/۷۸
Phenolic OH	(I 168.3-166.1) <sub>ac</sub> -COOR conj	۰/۱۴	۰/۱۱
total OH	(I 171.6-166.1)	۱/۳۷	۱/۵۳
Side chain	(I 100-45)-OMe-5.5(carb%)+(I 174-165) <sub>na</sub> +(I 210-190)	۲/۷۲	۲/۱۷
S	(I 106-100) <sub>ac</sub> : 2-V <sub>s</sub> , OMe-!+h	۰/۳۵	۰/۳۶
G	(I 113-111) <sub>ac</sub> +V <sub>s</sub>	۰/۶	۰/۶
H:G:S(100% base)	g=1-s-h	۵:۶:۰:۳۵	۵:۶:۰:۳۶
Degree of condensation	[3g+2(s+h)]- (I126-102)	۰/۳۳	۰/۲
etherified total	1- OHph-V	۰/۸۷	۰/۸۶
S-etherified	Total s -PhOHs-V <sub>s</sub>	۰/۲۳	۰/۲۳
G-etherified	Total g -PhOH <sub>g</sub> -V <sub>g</sub>	۰/۵۴	۰/۵۴
G-etherified noncondensed	(I 151-149) <sub>na</sub>	۰/۴۱	۰/۴۱
4-O-5' <sub>et</sub> (XIII <sub>et</sub> )	g <sub>et</sub> -(I 149-143) <sub>ac</sub>	۰/۱۹	۰/۱۹



شکل ۸ - ساختارهای بررسی شده در لیگنین.

به میزان زیادی در اثر عمل آوری DFRC تخریب شده است. از این رو می‌توان نتیجه‌گیری نمود که به‌کارگیری این فرایند به منظور تخریب ساختار لیگنین به فرآورده‌های دی‌مری و مونومری به‌طور کامل مؤثر واقع شده است. فرآورده‌های مونومری و دی‌مری به‌طور کامل مجزا در کروماتوگرام EL به روشنی قابل دیدن است. در مورد MWL بخشی از لیگنین در اثر تخریب، فرآورده‌ی مونومری (زیر ۵۰۰ دالتون) را تشکیل داده است و بخش اعظم لیگنین به‌صورت الیگومر با وزن مولکولی در حد لیگنین عمل آوری نشده باقی مانده است. از آنجایی‌که هدف از عمل آوری DFRC در واقع سنجش مقدار بخش‌های متراکم نشده در لیگنین است، بنابراین فرآورده‌های تخریبی بیشتر در اثر DFRC (به‌طور گزینشی از  $\beta$ -O-4 و  $\alpha$ -O-4) می‌تواند دلیلی برای تراکم کمتر در ساختار لیگنین باشد.

کروماتوگرام فرآورده‌های مربوط به لیگنین‌های آنزیمی و چوب آسیاب شده در شکل‌های ۱۱ و ۱۲ نشان داده شده است. فرآورده‌های یونیزه شده به‌وسیله طیف سنج جرمی شناسایی شدند. ترکیب‌های A، B و C ناشی از تخریب ساختار  $\beta$ -O-4 به‌عنوان ساختار اصلی لیگنین شناسایی شدند. در میان فرآورده‌های شناسایی شده فقط ترکیب‌های مشتق شده از لیگنین‌های گویاسیل و هیدروکسی بنزیل الکل دیده شد. ترکیب‌های شناسایی شده مشتق از واحدهای گویاسیل بخش بیشتر (بیش از ۹۵ درصد) ساختارهای مونومری (بدون احتساب ترکیب‌های قندی) را تشکیل می‌دهند. بر این اساس در بررسی طیف‌ها فقط فرآورده‌های ناشی از گویاسیل بررسی شدند.

همانطور که در کروماتوگرام‌ها مشاهده می‌شود ترکیب A (ناشی از  $\beta$ -O-4 فنولی متراکم نشده)، B ( $\alpha$ -O-4 متراکم نشده) و C ( $\beta$ -O-4 اتری متراکم نشده) در لیگنین EL بیشتر از MWL است. این نشان می‌دهد که در کل لیگنین EL مقدار گروه‌های متراکم کمتری دارد و در اثر تخریب DFRC فرآورده‌های مونومری بیشتری را تشکیل می‌دهد.

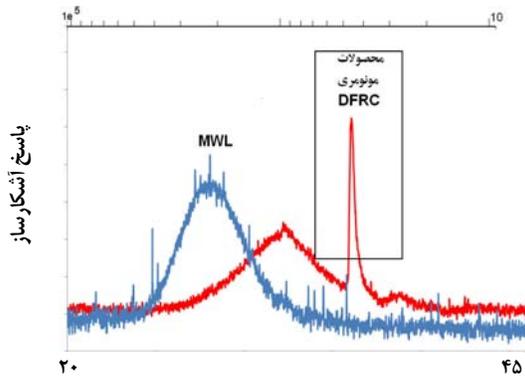
این نتیجه‌ها تا حدودی با نتایج مربوط به طیف‌سنجی  $^{13}\text{C}$  NMR مطابقت دارد، اگرچه بررسی این ساختارهای مونومری و نتیجه‌گیری در مورد مقدار تراکم لیگنین به‌وسیله NMR به دلیل همپوشانی ساختارها همواره با خطا همراه است و بهتر است برای تعیین این ویژگی از روش‌های تخریبی مانند DFRC استفاده نمود.

این ناحیه برای لیگنین‌های MWL و EL به‌ترتیب ۲/۴۷ و ۲/۶۰ است. با تفریق این مقادیر از مقدار حداکثر کربن‌های حلقه فنولی در حالت غیرمتراکم (۳ موقعیت)، درجه تراکم دو لیگنین به‌ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۲ به‌دست می‌آید. در مورد پهن برگان به دلیل وجود هم‌زمان 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  $C_{\text{Ar-H}}$  استفاده می‌شود. سپس مقدار نظری و مقدار واقعی انتگرال گیری شده در ناحیه  $C_{\text{Ar-H}}$  (۱۰۳-۱۲۷ ppm) از یکدیگر تفریق می‌شود (جدول ۵). مقادیرهای  $C_{\text{Ar-O}}$  و  $C_{\text{Ar-C}}$  را به دلیل وجود سیگنال‌های s-4 در ناحیه ۱۳۴-۱۳۸ ppm و همپوشانی یا  $C_{\text{Ar-C}}$  همانند لیگنین سوزنی برگان به راحتی نمی‌توان محاسبه نمود. انتگرال ناحیه ۱۴۲-۱۶۲ ppm لیگنین استیله شده MWL (۱/۸۹) و EL (۱/۹۹) به دلیل جابه‌جایی C-4 در گروه‌های هیدروکسیل واحدهای گویاسیل کاهش می‌یابد. بدیهی است که اختلاف بین مقدار انتگرال ناحیه ۱۴۲-۱۶۲ ppm در لیگنین‌های MWL و EL استیله نشده و استیله شده بیانگر گروه‌های هیدروکسیل واحدهای گویاسیل (g-OH) است.

مقدار ساختارهای فنیل کوماران (III) به‌وسیله انتگرال ناحیه ۸۵.۵-۸۷ ppm در لیگنین استیله شده هر دو لیگنین در حد مشابهی (۰/۰۵) است. انتگرال ناحیه ۴۸-۵۰ ppm طیف استیله شده هر دو لیگنین شامل واحدهای فنیل کوماران و  $\beta$ -۱ (VI) است. سرانجام، مقدار  $\beta$ -۱ (VI) در EL و MWL در حد ۰/۰۲ و ۰/۰۳ به‌دست می‌آید. به‌دلیل وضوح مناسب  $C_{\beta}$  در پینو - سیرینجورزینول ( $\beta$ - $\beta$ ) نسبت به سیگنال گروه‌های متوکسیل، برخلاف لیگنین سوزنی برگان محاسبه بسیار راحت است که در EL و MWL در حد ۰/۰۴ و ۰/۰۵ است. نتیجه‌های مربوط به محاسبه ساختارهای گوناگون هر دو لیگنین در جدول ۵ نشان داده شده است.

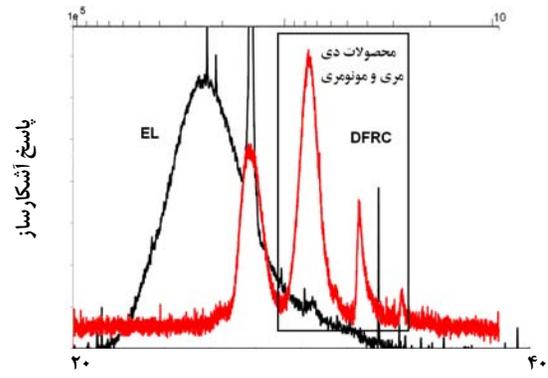
### تجزیه DFRC

فرآورده‌های تخریبی ناشی از فرایند DFRC به‌وسیله کروماتوگرافی گازی - اسپکتروسکوپی جرمی شناسایی شدند. همچنین توزیع وزن مولکولی ترکیب‌ها تخریب شده به‌وسیله DFRC در هر دو لیگنین تهیه شده با استفاده از GPC تعیین شد. شکل‌های ۹ و ۱۰ کروماتوگرام ترزیع وزن مولکولی لیگنین‌ها را نشان می‌دهد. مقایسه دو کروماتوگرام نشان می‌دهد که لیگنین EL



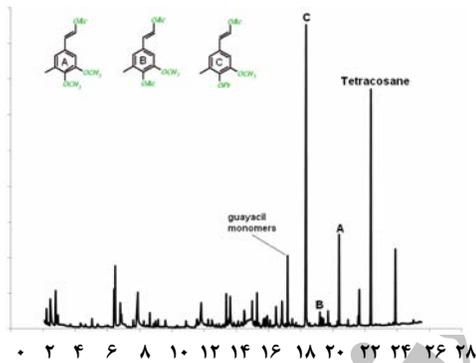
زمان شویش (دقیقه)

شکل ۱۰ - توزیع وزن مولکولی لیگنین MWL پس از DFRC.



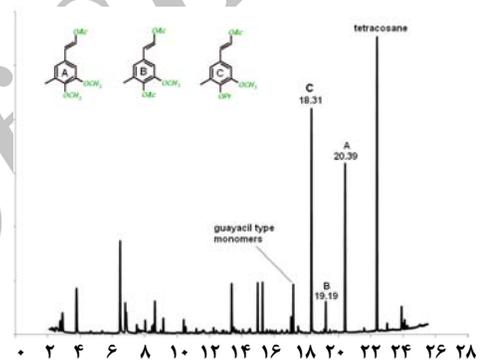
زمان شویش (دقیقه)

شکل ۹ - توزیع وزن مولکولی لیگنین EL پس از DFRC.



زمان ماندگاری (دقیقه)

شکل ۱۲ - کروماتوگرام گازی محصولات مونومری مشتق شده از تخریب DFRC لیگنین EL.



زمان ماندگاری (دقیقه)

شکل ۱۱ - کروماتوگرام گازی محصولات مونومری مشتق شده از تخریب DFRC لیگنین MWL.

واکنش‌های گوناگون لیگنین در فرایندهای گوناگون همچون خمیرسازی، رنگبری و فرایند زرد شدن نوری و حرارتی کاغذ بسیار مؤثر باشد و مشکل نبود مدل واقعی لیگنین در این بررسی‌ها را برطرف سازد.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۹/۷

## مراجع

- [۱] ریاحی فر، ن؛ فلاح، ا؛ محمدی سمائی، ک. و ی. گرجی مهلبانی، مقایسه رویش دو گونه صنوبر و پالونیا در فواصل کشت مختلف در شمال ایران. *فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران*، (۳) ۳۳، ص ۴۴۴-۴۵۴، (۱۳۸۷).
- [۲] دانشور، ح؛ مدیر رحمتی، ع، مقایسه رشد طولی، قطری و حجمی کلن‌های مختلف صنوبر در استان اصفهان. *فصلنامه علمی پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران*، (۱) ۳۱، ص ۴۹-۶۰، (۱۳۸۷).
- [3] Ikeda T., Holtman K., Kadla J., Chang H., Jameel H., Studies on the Effect of Ball Milling on Lignin Structure Using a Modified DFRC Method, *J. Agric. Food Chem*, **50**(1), p. 12 (2002).
- [4] Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu, F., Kim H., Schatz P, Marita J., Hatfield R., Ralph S., Christensen J., Boerjan W., Lignins: Natural Polymers from Oxidative Coupling of 4-Hydroxyphenylpropanoids, *Phytochemistry*, **3**(2), p. 29 (2004).
- [5] Bjorkman, A., Studies on Finely Divided Wood. Part I. Extraction of Lignin with Neutral Solvents, *Svensk Papperstid*, **59**, p. 477 (1956).
- [6] Argyropoulos D.S., Zhang L., Semiquantitative Determination of Quinonoid Structures in Isolated Lignins by 31P Nuclear Magnetic Resonance, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** (11), p. 4634 (1998).
- [7] Wang R., Chen C.-L., Gratzl J. S., Ozonation of Pine Kraft Lignin in Alkaline Solution. Part 1: Ozonation, Characterization of Kraft Lignin and Its Ozonated Preparations, *Holzforchung*, **58**(6), p. 622 (2004).
- [8] Argyropoulos D.S., Heitner C., Schmidt J.A., Observation of Quinonoid Groups during the Light-Induced Yellowing of Softwood Mechanical Pulp, *Res. Chem. Intermediates*, **21**, p. 263 (1995).
- [9] Chang H., Cowling E., Brown W., Comparative Studies on Cellulolytic Enzyme Lignin and Milled Lignin of Sweetgum and Spruce, *Holzforchung*, **29**, p. 153 (1975).
- [10] Walker L.P., Wilson D.B., Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview, *Bioresource Technology*, **36**(1), p. 3 (1991).
- [11] Wu S., Argyropoulos D.S., An Improved Method for Isolating Lignin in High Yield and Purity, *J. Pulp Pap. Sci.*, **29**, p. 235 (2003).
- [12] Holtman K., Chang, Solution-State Nuclear Magnetic Resonance Study of the Similarities Between Milled Wood Lignin and Cellulolytic Enzyme Lignin, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, p. 720 (2004).
- [13] Abdulkhani A., Karimi A., Mirshokraie A., Hamzeh Y., Marlin N., Mortha G., *Journal of Applied Polymer Science*, **118**, p. 469 (2010).
- [14] Lu F., Ralph J., Reactions of Lignin Model Beta-Aryl Ethers with Acetyl Bromide, *Holzforchung*, **50**, p. 360 (1996).

- [15] Blakeney A.B., Harris P.J., Henry R.J., Stone B.A., A simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis, *Carbohydr. Res.*, **113**, p. 291(1983).
- [16] Guerra A., Lucia L.A., Argyropoulos D.S., Isolation and Characterization of Lignins from Eucalyptus Grandis Hill ex Maiden and *Eucalyptus globulus Labill.* by Enzymatic Mild Acidolysis (EMAL), *Holzforchung*, **62**(1), p. 24 (2008).
- [17] Hu M., Zhang W., Wu Y., Gao P., Lu X., Characteristics and Function of a Low-Molecular-Weight Compound with Reductive Activity from Phanerochaete chrysosporium in Lignin Biodegradation, *Bioresource Technology*, **100**(6), p. 2077 (2009).
- [18] Faix O., Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy, *Holzforchung*, **45** (Suppl.), p. 21 (1991).
- [19] del Rio J.C., Gutierrez A., Rodriguez I.M., Ibarra D., Martinez A.T., Composition of Non-Woody Plant Lignins and Cinnamic Acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **79**, p. 39 (2007).
- [20] Sarkanen, K.V., "Precursors and Their Polymerization", Wiley-Interscience: New York, (1971).
- [21] Rencoret J., Gutierrez A., Del Rio J.C., Lipid and Lignin Composition of Woods from Different Eucalypt Species, *Holzforchung*, **61**(2), p. 165 (2007).
- [22] Sarkanen K.V., Chang H.M., Allan G.G., Species Variation in Lignins. 2. Conifer Lignins, *Tappi J.*, **50**, p. 583 (1967).