

(MWL) (CEL)

سید احمد میرشکرای^۱، علی عبدالخانی^{۲*} و علی نقی کریمی^۳

۱- استاد شیمی دانشگاه پیام نور، جاده لشکرک، سه راه ازگل، سازمان مرکزی پیام نور

۲- *مسئول مکاتبات، دانشجوی دکتری رشته علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران Abdolkhani@ut.ac.ir

۳- دانشیار رشته علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۶

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۶

چکیده

در این مطالعه از یک روش جدید برای جداسازی و تخلیص لیگنین چوب صنوبر بوسیله آنزیم استفاده شد. لیگنین آنزیمی بدست آمده با روش متداول جداسازی لیگنین یعنی روش یورکمن (MWL) از لحاظ ساختار شیمیایی مورد مقایسه قرار گرفت. مطالعه شیمیایی لیگنین‌ها با استفاده از فنون طیف سنجی FT-IR و NMR کمی به همراه آنالیز اولیه مولکولی و توزیع وزن مولکولی انجام گرفت. بررسی‌ها نشان داد که لیگنین آنزیمی بدست آمده ساختار بسیار سالم‌تری نسبت به لیگنین MWL دارد. در مقایسه با روشهای متداول آنزیمی استخراج لیگنین استفاده از توالی آنزیمی به همراه کاهش زمان آسیاب کردن سبب جداسازی لیگنین بطور ملایم با تغییرات ساختاری اندک می شود.

واژه‌های کلیدی: لیگنین، لیگنین چوب آسیاب شده، لیگنین آنزیمی، استخراج، توالی آنزیمی

مقدمه

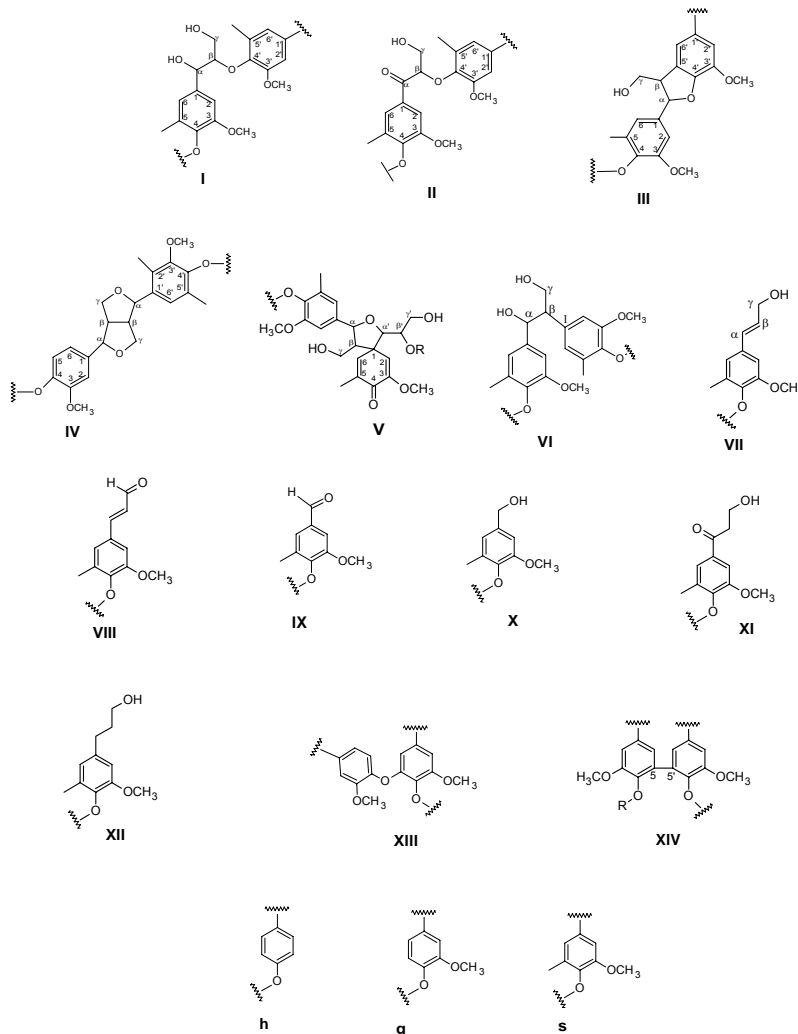
واحدهای سیرینجیل (s) و گویاسیل (g) می باشد (شکل ۱). اتصال فیزیکی و شیمیایی بین لیگنین و پلی ساکاریدهای دیواره سلول، جداسازی آن را بطور سالم عملاً غیر ممکن می سازد. این مساله، استفاده از روش‌های تخریبی یا غیر تخریبی را برای جداسازی و بررسی‌های ساختاری لیگنین بسیار مشکل کرده است. در نتیجه، داشته‌های ما در مورد ساختار لیگنین به اطلاعات بدست آمده از مطالعات ساختاری شامل ارزیابی مکانیسم‌های بیوسنتز لیگنین (Sederoff and Chang 1991) و داده‌های مربوط به تحلیل لیگنین جدا سازی شده محدود می شود (Adler and Hernestam 1955; Lapierre et al. 1985; Furuno et al. 2004)

لیگنین به عنوان فراواترین پلیمر طبیعی دنیا پس از سلولز، ساختار فوق العاده پیچیده ای دارد و هنوز به طور کامل مورد بررسی و ارزیابی قرار نگرفته است (Puls and Schuseil 1993; Ikeda et al. 2002).

برخلاف بعضی از پلیمرهای طبیعی، از قبیل سلولز و نشاسته، که از واحدهای سازنده و پیوندهای بین مونومری یکسانی تشکیل شده اند، لیگنین پلیمری شبکه ای است که از جفت شدن اکسایشی واحدهای ۴- هیدروکسی فنیل پروپان (سینامیل) تشکیل شده است. لیگنین چوب سوزنی برگان عملاً از واحدهای گویاسیل (g) تشکیل شده است در حالیکه لیگنین پهن برگان عمداً از

به کمک دیوکسان استخراج گردید. این لیگنین که به آن نام لیگنین چوب آسیاب شده (MWL) (Milled Wood Lignin) داده شد، به عنوان نمایاننده لیگنین واقعی چوب معروف شد.

مشکل اصلی در ارزیابی ساختار لیگنین، عدم توانایی در جدا سازی آن بدون تغییر یا تخریب شیمیایی آن است. اولین تلاش برای تفکیک لیگنین بدون تغییر شیمیایی توسط یورکمن در سال ۱۹۵۴ انجام گرفت که در طی آن لیگنین از چوب به شدت آسیاب شده



شکل ۱. ساختارهای مختلف بررسی شده در لیگنین های تهیه شده.

(2005). از سوی دیگر، مطالعات نشان می دهد که آسیاب کردن سبب کاهش درجه پلیمریزاسیون و تشکیل گروههای هیدروکسیل فنولی آزاد، از طریق گسست

مطالعات مفصل در مورد MWL نشان می دهد که بازده استخراج لیگنین به میزان زیادی تحت تاثیر زمان آسیاب کردن است (Ikeda et al. 2002; Fujimoto et al.)

سلوبیوهیدرولازها بخش کریستالی سلولز را هیدرولیز می‌کنند (Esterbauer et al. 1991; Goyal et al. 1991; Rabinovich et al. 2002a). نمودار فعالیت آنزیم های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است.

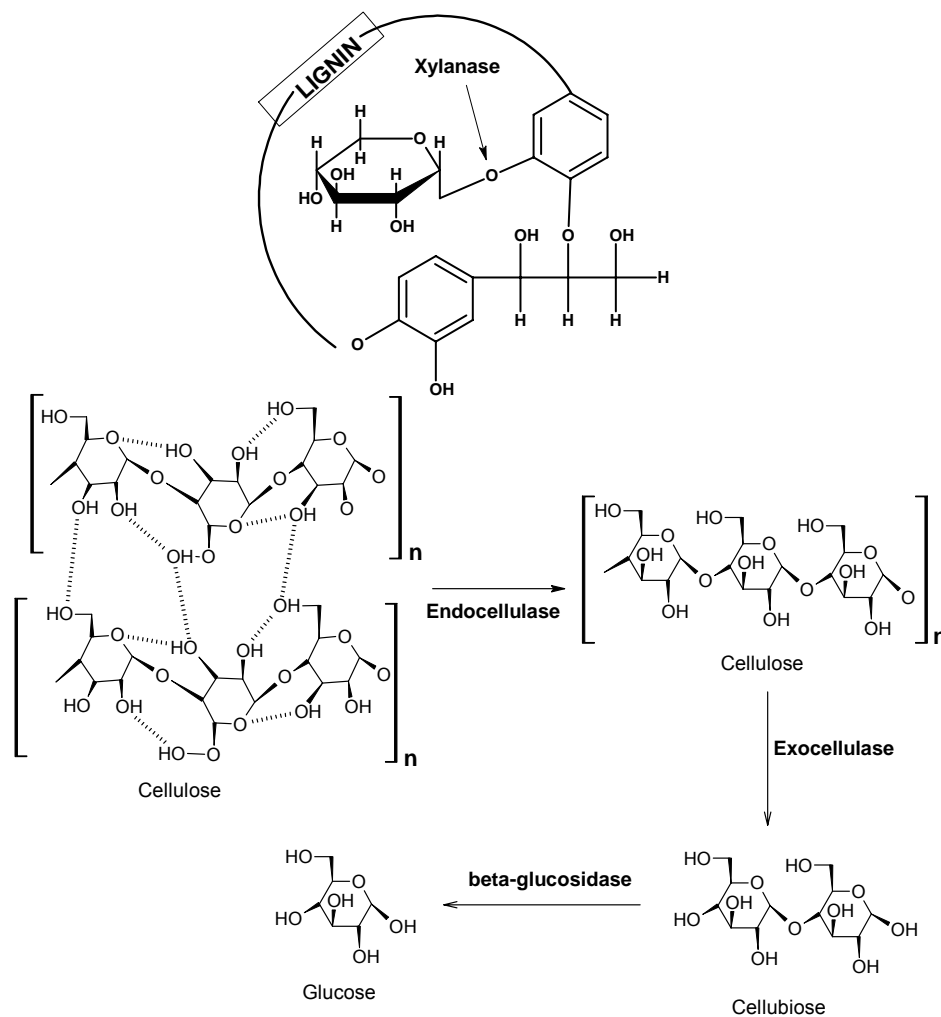
در حال حاضر لیگنین CEL بوسیله آنزیمهای تجاری اندوسلولاز (EC: 3.2.1.4) تهیه می‌گردد (Ikeda et al. 2002; Wu and Argyropoulos 2003; Holtman et al. 2004; Hu et al. 2006). فعالیت عمده اندوسلولاز در بخش آمورف سلولز است، و بخش کریستالی تا حدودی در برابر آن پایدار می‌باشد (Wood 1991). بنابراین می‌توان انتظار داشت که لیگنین تهیه شده با این آنزیم دارای ناخالصی از نوع کربوهیدرات باشد (Holtman et al. 2004). به نظر می‌رسد که کاهش زمان آسیاب کردن و استفاده از یک توالی آنزیمی با عملکرد تجزیه تدریجی بخشهای مختلف زنجیر پلی ساکارییدی، می‌تواند ضمن افزایش بازده استخراج، خلوص لیگنین را بالا ببرد و سبب تهیه یک لیگنین عاری از کربوهیدرات گردد. بکارگیری چنین شیوه ای می‌تواند ضامن آزاد سازی لیگنینی شود که از نظر ساختاری، بیشتر شبیه لیگنین موجود در چوب است. اما این خطر وجود دارد که لیگنین بدست آمده به پروتئین آلوده گردد. به همین منظور استفاده از یک روش تخلیص آنزیمی به همراه یک روش شیمیایی ملایم می‌تواند آلودگی حاصل را به حداقل برساند.

هدف از این مطالعه تهیه لیگنین MWL و بهینه سازی یک روش آنزیمی برای جداسازی لیگنین با بازده و خلوص بالا از چوب صنوبر با تغییرات ساختاری اندک برای ارزیابی‌های شیمیایی است.

آنالیز ساختاری لیگنین های بدست آمده و مقایسه نتایج آن با نتایج حاصل از روشهای متداول تهیه MWL و CEL بطور مفصل انجام خواهد شد.

واحدهای β -آریل اتر و افزایش گروههای α -کربونیل از طریق اکسیداسیون زنجیر جانبی می‌شود (Ikeda et al. 2002). اگر چه بازده استخراج تا ۵۰ درصد با افزایش زمان آسیاب کردن قابل دستیابی است (Lai and Sarkanen 1971)، اما MWL بدست آمده تا حدود زیادی تخریب شده است و نمی‌تواند نمایاننده لیگنین واقعی باشد (Gellerstedt and Northey 1989; Chang et al. 1975; Hon and Glasser 1979; Holtman et al. 2004). در حقیقت، افزایش مقدار گروههای کربونیل (Bjorkman 1954, Chang et al. 1975) و گروه های هیدروکسیل فنولی به همراه کاهش وزن مولکولی (Chang et al. 1975) و گسست واحد های β -آریل اتر (Gellerstedt and Northey 1989) بر اثر آسیاب کردن شدید چوب حاصل می‌شوند. تلاشهای دیگر برای بهبود فرایند جداسازی لیگنین بدون تغییر ساختار آن، به تخریب گزیننده پلی ساکاریدها بوسیله آنزیم های سلولاز و تهیه لیگنین سلولیتیک (CEL) (Cellulytic Lignin) منجر گردید. اما این لیگنین حاوی مقدار قابل ملاحظه ای کربوهیدرات بصورت ناخالصی است (Chang et al. 1975). سلولز، ترکیب عمده پلی ساکارییدی چوب، از بخش های کریستالی و آمورف تشکیل شده و تا حدودی در برابر تخریب آنزیمی (بخصوص بخش کریستالی) مقاوم است (Walker and Wilson 1991). آنزیمهای مخرب سلولز یا سلولازها، دارای مجموعه ای پیچیده از پروتئین هایی هستند که توانایی تخریب بخش خاصی از پیوندهای گلیکوزیدی را دارا هستند. سلولاز ها به سه دسته عمده تقسیم می‌شوند:

اندوگلوکانازها یا اندو-۱، β -گلوکاناز (EC: 3.2.1.4)، سلوبیوهیدرولازها (EC: 3.2.1.91) و β -گلوکوزیدازها (EC: 3.2.1.21). اندوگلوکانازها سبب تخریب بخش آمورف زنجیر سلولزی می‌شوند و



شکل ۲. فعالیت اختصاصی آنزیم های سلولاز مورد استفاده در تحقیق

آنزیمهای تجاری با توانایی هیدرولیز سلولز برای تفکیک و خالص سازی لیگنین مورد استفاده قرار می گیرد (Esterbauer et al. 1991; Higuchi et al. 1985; Chang et al. 1975; Ibarra et al. 2004).

برای این منظور از آنزیم های زیر استفاده می گردد:

(۱) زایلاناز خالص بعنوان β -۱،۴-زایلاناز (EC: 3.2.1.8)

(۲) سلولاز بعنوان اندوگلوکاناز (EC: 3.2.1.4)

(۳) سلولاز بعنوان آگزوسلولاز (EC: 3.2.1.91)

مواد و روشها

مواد

ماده اولیه چوبی

برای جداسازی و تهیه لیگنین از چوب صنوبر (*Populus nigra*) (با سن ۱۰-۱۵ سال) به دلیل اهمیت آن در فرایندهای کاغذسازی و غالب بودن این گونه در ایران استفاده می شود.

۱-۲- آنزیم ها

۴) β - گلوکوزیداز بعنوان گلوکوزیداز (EC: 3.2.1.21)
 ۵) پروتئاز قلیایی Sabistilin

روشها

جدا سازی لیگنین

در حال حاضر لیگنین های MWL (Bjorkman 1954) و CEL (Chang et al. 1975) متداولترین لیگنین ها برای مطالعات ساختاری هستند. در این مطالعه علاوه بر روشهای موجود، از یک روش اصلاح شده آنزیمی برای استخراج لیگنین استفاده می شود. روش های دیگری برای استخراج لیگنین مانند روش EAL (Enzymatic Acidolysis Lignin) (Wu and Argyropoulos 2003) نیز معرفی شده است ولی عمومیت کمتری دارد.

تهیه MWL

MWL بر اساس روش ارائه شده توسط Lawther و همکاران (1996) جدا سازی می شود. در این روش چوب صنوبر بوسیله آسیاب معمولی خرد و از الک ۲۰ مش عبور داده می شود. سپس بوسیله استون به مدت ۴۸ ساعت استخراج می گردد. آرد چوب بوسیله آسیاب توپی به مدت یک هفته در یک مخزن ۵ لیتری به همراه گلوله هایی از جنس آلومینا آسیاب می گردد. چوب خرد شده در مرحله بعد توسط محلول دیوکسان: آب (4:96) 10ml/g طی ۲ مرحله ۲×۲۴ ساعت استخراج می شود. پس از تفکیک محلول بوسیله سانتریفوژ، آنرا تغلیظ و بوسیله خشک کن انجمادی خشک می شود تا لیگنین خام بدست آید (شکل ۳).

تهیه لیگنین CEL

چوب آسیاب شده بوسیله آسیاب توپی (۴۸ ساعت) بوسیله توالی آنزیم های زیر تیمار می شود (شکل ۳):

زایلاناز:

۴۰ گرم چوب در بافر استات (pH: 5.5, 800 ml, 50mM) تیمار می شود و سپس مقدار ۴ گرم آنزیم زایلاناز (2500 U/g) به آن اضافه می شود و تحت شرایط زیر در انکوباتور گذاشته می شود:
 48 h, 50 °C, 150 rpm
اندوگلوکاناز:

پس از سانتریفوژ کردن ماده محلول مرحله قبل، ماده جامد باقیمانده توسط آنزیم اندوگلوکاناز تحت شرایط زیر تیمار می شود:
 pH: 4.9, 50 mM, 48 h, 50 °C
تیمار آگزوسلولاز:

پس از سانتریفوژ، ماده جامد از مرحله قبل تحت شرایط زیر بوسیله آنزیم آگزوسلولاز تحت شرایط زیر تیمار می شود:
 pH: 5, 48 h, 50mM, 50 °C
تیمار گلوکوزیداز:

به ترتیب فوق عمل کرده و عملیات تیمار تحت شرایط زیر انجام می گیرد:
 pH: 5, 50mM, 48 h, 37 °C

خالص سازی لیگنین

روش های خالص سازی لیگنین عمدتاً بر اساس روش ارائه شده توسط Bjorkman (1954) انجام می شود. در این مطالعه علاوه بر روش فوق از یک روش اصلاح شده نیز برای تخلیص لیگنین استفاده می شود (شکل ۳).

MWL

برای خالص سازی لیگنین MWL، لیگنین خام در اسید استیک ۹۰ درصد حل می شود و سپس محلول حاصل به اتر اضافه می گردد تا MWL خالص رسوب کند.

تیمار شیمیایی ملایم: لیگنین بدست آمده از مرحله قبل بوسیله دی متیل استامید (DMAc) و NaOH تیمار می شود تا ناخالصی کربوهیدرات از آن تفکیک شود. نمونه لیگنین در دی متیل استامید در دمای 60°C به مدت ۱ ساعت همزده می شود. سپس محلول DMAc درون دی اتیل اتر رسوب داده می شود و سانتریفوژ می گردد.

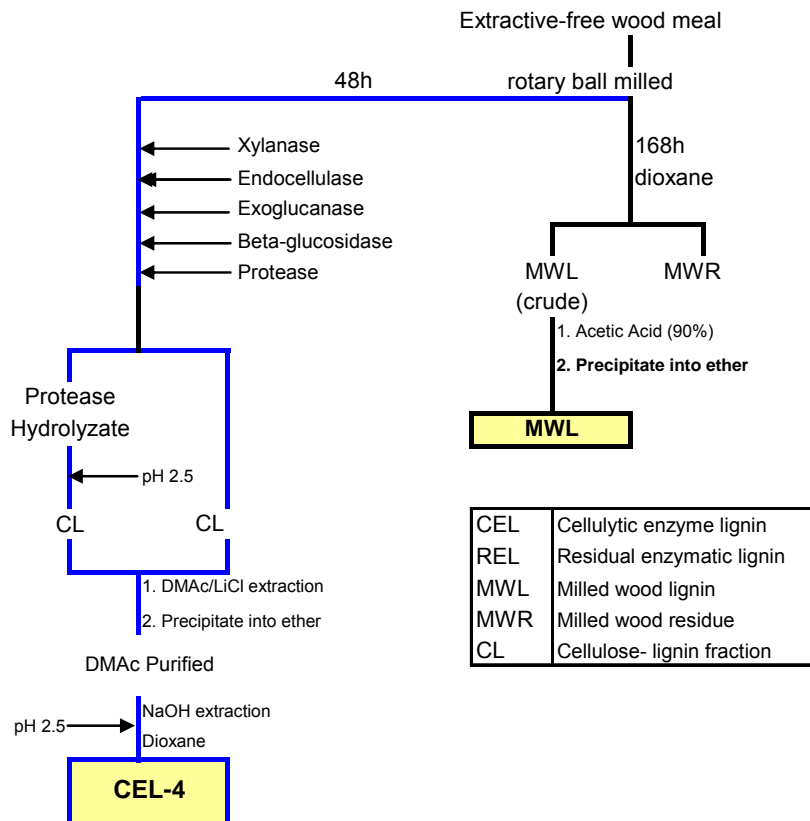
پس از سانتریفوژ کردن، لیگنین دوباره در محلول M ۰/۵ سود در دمای محیط به مدت یک ساعت تیمار می شود. محلول حاصل اسیدی می گردد تا لیگنین ته نشین شود.

خالص سازی لیگنین های بدست آمده جامد بعد از تیمارهای آنزیمی بوسیله ترکیبی از روش های زیر انجام می شود:

تیمار پروتئاز قلیایی: تیمار با پروتئاز و بافر کربنات تحت شرایط زیر انجام می گیرد:

pH: 9, 37 °C, 24 h

محلول حاصل سانتریفوژ شده و بخش نامحلول بازیابی می شود. محلول بدست آمده پس از سانتریفوژ بوسیله HCl تا pH: 2 اسیدی و بخش جامد ته نشین شده بازیابی می گردد (Cellulytic Lignin).



شکل ۲. مراحل جداسازی و تخلیص لیگنین های MWL و CEL

ترکیب قندی، عناصر پایه و گروه های متوکسیل

آنالیز

گردید. سپس انیدرید اضافی بوسیله اضافه کردن متانول - آب یخ تخریب می شود تا واکنشها متوقف شوند. پس از تبخیر حلال در فشار ۱۰ میلی بار تا حد خشک، جامد باقیمانده در تولوئن حل و مجدد تبخیر گردید. این فرایند ۳ بار تکرار شد. با این روش انیدرید اضافی بوسیله تقطیر آزوتروپیک حذف می شود. تولوئن باقیمانده بوسیله اضافه کردن متانول و تبخیر حذف گردید. این روش امکان بازیابی کامل نمونه را فراهم می آورد.

برای اندازه گیری توزیع وزن مولکولی لیگنین تهیه شده از Gel Permeation Chromatography استفاده شد. برای حل کردن نمونه از حلال THF استفاده گردید. نمونه لیگنین بایستس بطور کامل در THF حل گردد. برای لیگنین های مختلف این شرایط کاملاً مهیا نیست. لذا GPC لیگنین تنها بعد از آماده سازی نمونه بوسیله استیلاسیون یا متیلاسیون نمونه انجام پذیر است. اندازه گیری در دستگاه کروماتوگرافی Agilent 1100 series انجام گردید. ستون از جنس پلی استایرن divinyl benzene بود. دتکتور RID و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آنالیز اولیه لیگنین های تهیه شده در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بازده و خلوص لیگنین آنزیمی بسیار بیشتر از لیگنین چوب آسیاب شده است. پایین بودن مقدار نیتروژن دلیلی بر عدم آلودگی نمونه CEL به پروتئین آنزیم است. بیشتر بودن مقدار هیدروژن نیز نشان دهنده کمتر بودن تراکم در لیگنین آنزیمی نسبت به لیگنین چوب آسیاب شده است.

مقدار ناخالصی قندی نمونه‌ها بر اساس روش Blakeney و همکاران (1983) تعیین می شود. گروههای متوکسیل، کربونیل و هیدروکسیل بوسیله $^{13}\text{C-NMR}$ مشخص و تعیین می گردند.

طیف سنجی FTIR

طیف سنجی FTIR برای تعیین خلوص لیگنین مورد استفاده قرار می گیرد و بوسیله FTIR ناخالصی های قندی و پروتئینی تشخیص داده می شود (Ralph 1991; Faix 1992; Vazquez et al. 1997) در این مورد از روش قرص های KBr استفاده می شود و نمونه های جامد لیگنین برای این منظور پودر گردیدند.

طیف سنجی کمی $^{13}\text{C-NMR}$

از فنون طیف سنجی $^{13}\text{C-NMR}$ و $^1\text{H-NMR}$ برای کمی کردن و تعیین مقدار گروه های عاملی مختلف و مقایسه ساختار لیگنین ها استفاده می شود (Martinez 1999; Holtman et al. 2004).

آنالیز کمی $^{13}\text{C-NMR}$ لیگنین ها بوسیله دستگاه BRUKER 400 MHz انجام گردید. در هر مورد ۰.۳ گرم نمونه لیگنین در ۰.۲۵ میلی لیتر DMSO-d6 حل گردید. عملیات اسکن تحت شرایط دوره ای 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 نمونه ها انجام گردید. در کل نمونه های لیگنین CEL، MWL و نمونه های استیله شده آنها مورد تحلیل قرار گرفتند.

کروماتوگرافی تراوش ژلی (GPC)

قبل از انجام عملیات کروماتوگرافی، به منظور بالا بردن میزان حل شدن نمونه لیگنین در حلال THF) تتارا هیدرو فوران) نمونه ها استیله شدند. در عملیات استیلاسیون مقدار ۰/۳ گرم لیگنین به مدت یک شبانه روز در دمای محیط بوسیله مخلوط انیدرید استیک/پیریدین (۱:۱ v/v) تیمار

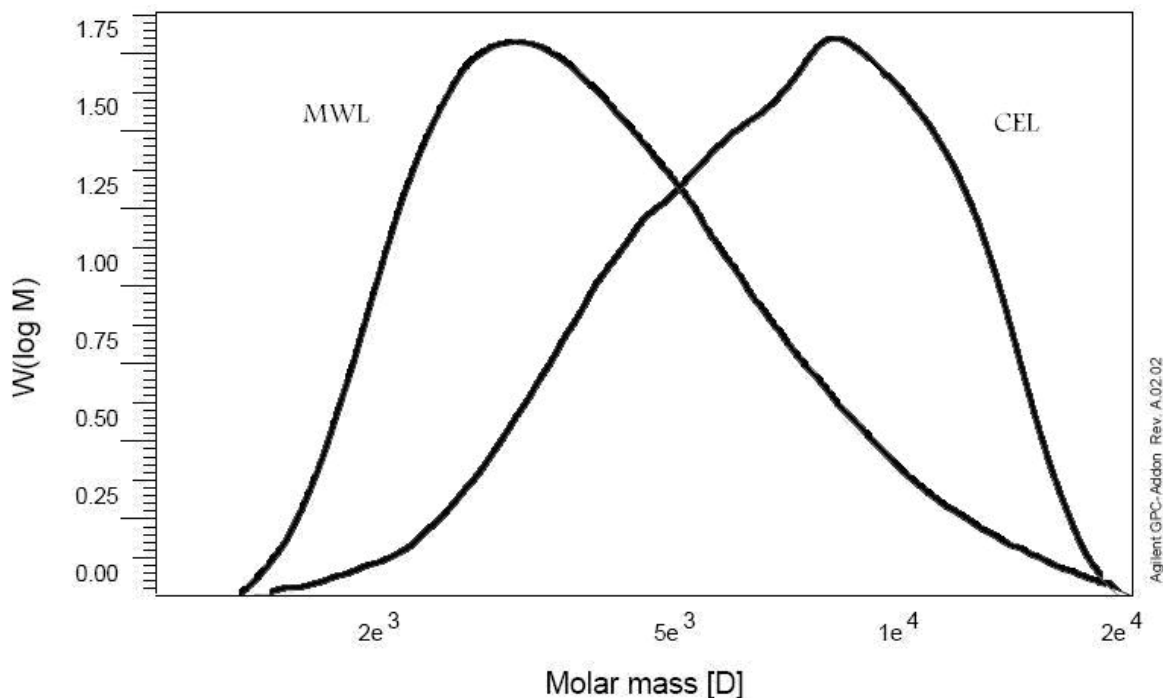
جدول ۱. آنالیز اولیه لیگنین های تهیه شده

MWL	CEL	
26.5	81.8	بازده ()
89	95.4	خلوص (کلازون+لیگنین قابل حل)
8.3	2.9	کربوهیدرات ()
59.1	55.6	کربن ()
6	6.2	هیدروژن ()
34.7	38	اکسیژن ()
<0.5	<0.5	نیتروژن ()
0.26	0.14	هیدروکسیل (فنولی)
1.53	1.5	هیدروکسیل (آلیفاتیک)
0.04	0.06	کربونیل
$C_9H_{8.13}O_{3.08}(OCH_3)_{1.63}$	$C_9H_{8.87}O_{3.78}(OCH_3)_{1.84}$	فرمول مولکولی (C9)
215.9	234.4	وزن مولکولی واحد C9

توزیع وزن مولکولی

توزیع وزن مولکولی لیگنین ها در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج کمی مربوطه در پیک طیف‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می شود لیگنین آنزیمی دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به لیگنین آسیاب شده است. این مسئله می تواند به علت تخریب کمتر در فرایند تهیه لیگنین باشد. در واقع استفاده از یک سیستم تجزیه تدریجی و ملایم سبب تخریب کمتر در لیگنین می شود. در کل هر دو لیگنین دارای جزء های با وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد هستند. وزن مولکولی لیگنین در نقطه حداکثر کروماتوگرام های MWL و CEL بترتیب ۴۹۰۰ و ۹۱۰۰ است. در مورد لیگنین CEL فراوانی بخش های با وزن مولکولی بالا بیشتر از اجزای با وزن مولکولی پایین است در حالیکه در مورد لیگنین MWL فراوانی بخش های با وزن مولکولی پایین بیشتر است. این مسئله از یک طرف هم می تواند نشان دهنده موثر بودن فرایند آنزیمی بکار برده شده در

استخراج لیگنین و از سوی دیگر توانایی آن در حفظ ساختار لیگنین با تخریب کمتر باشد که عمدتاً ناشی از پایین بودن زمان آسیاب کردن چوب باشد. بالا بودن وزن مولکولی لیگنین CEL می تواند دلیلی برای بیشتر بودن واحد ساختاری عمده لیگنین یعنی ۴-O-β باشد. درجه بسپاشیدگی لیگنین CEL بسیار بیشتر از لیگنین MWL است که این مساله نشان دهنده یکنواخت بودن بیشتر لیگنین MWL از لحاظ وزن مولکولی است. بالا بودن درجه بسپارش لیگنین CEL به دلیل دامنه وسیع بخش های مختلف و اختلاف بیشتر وزن مولکولی بخش های سنگین تر نسبت به بخش های سبک باشد. این مساله نشان می دهد که روش خالص سازی بکار برده شده در تهیه لیگنین CEL اثر چندانی در حذف ساختارهای کوچک استخراج شده لیگنین ندارد. البته موثر بودن روش خالص سازی در تخلیص لیگنین از آلودگی های مختلف (فندی، پروتینی) در بخش های بعدی مورد بحث قرار خواهد گرفت.



شکل ۴. کروماتوگرام توزیع وزن مولکولی لیگنین های MWL و CEL

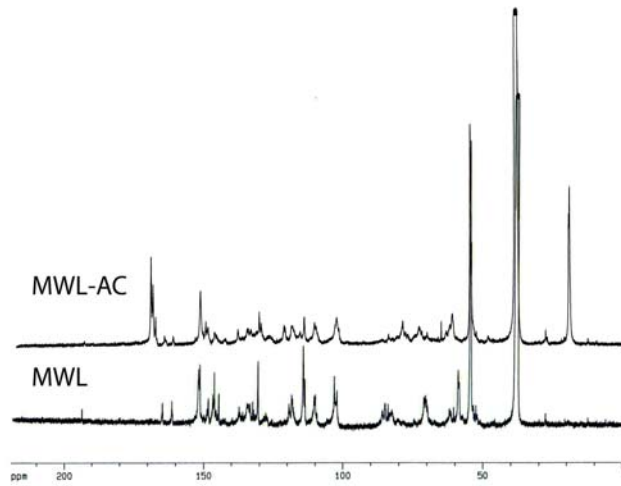
جدول ۲- نتایج مربوط به وزن مولکولی لیگنین MWL و CEL تهیه شده

	MWL	CEL	
g/mol	$3.7860 \cdot 10^3$	$5.106 \cdot 10^3$	Mn
g/mol	$4.9197 \cdot 10^3$	$9.119 \cdot 10^3$	Mw
g/mol	$6.6894 \cdot 10^3$	$1.699 \cdot 10^4$	Mz
	1.3	1.76	D=Mw/Mn

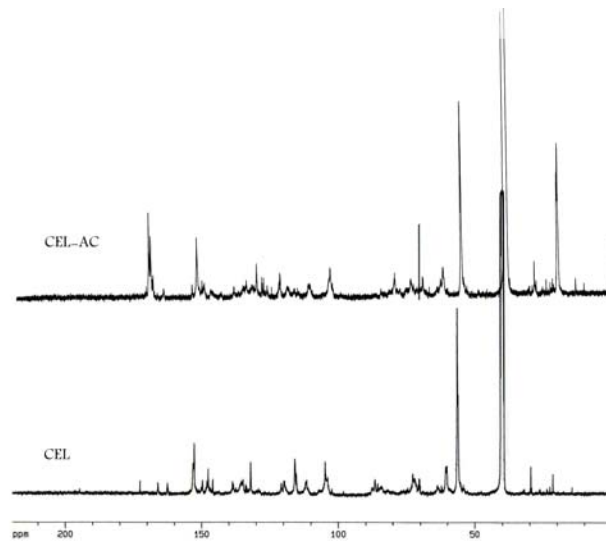
داده شده است. نتایج ارائه شده در تمام جدولها بصورت تعداد واحدها به ازاء هر حلقه آروماتیکی بیان شده است. ساختارهای مورد اشاره در جداول در شکل ۶ نشان داده شده اند. در محاسبه کمی گروههای عاملی و ساختارهای لیگنین انتگرال دامنه ۱۰۲-۱۶۲ ppm بعنوان ناحیه آروماتیکی بعنوان مبنا در نظر گرفته شد.

آنالیز کمی ^{13}C NMR

طیفهای ^{13}C NMR کمی لیگنینهای MWL و CEL در حالت عادی و استیله شده در شکل های ۵ و ۶ نشان داده شده اند. ارزیابی کمی پیکهای مختلف طیفها در جداول ۳ تا ۶ بیان شده است. تحلیل داده ها و محاسبه واحد های ساختاری و گروههای عاملی مختلف لیگنین ها نیز در جدول ۷ نشان



شکل ۵. طیف‌های ¹³C NMR لیگنین چوب آسیاب شده معمولی و استیله شده



شکل ۶- طیف‌های ^{13}C NMR لیگنین آنزیمی معمولی و استیل‌ه شده

no.	spectroscopic range	amount	assignment
1	196-193	0.02	C=O in II and VIII
2	175-168	0.05	aliphatic COOR
3	168-166	0.06	conjugated COOR
			$\text{C}_{3,5}$ in etherified s units
			$\text{C}_{3,5}$ in etherified XIII
4	157-151	0.69	C_3 in etherified XIV
			C_α in VIII, C_4 in conjugated CO/COOR g units
			$\text{C}_{3,6}$ in V of g units, $\text{C}_{3,5}$ in V of s units
5	150.5-149.5	0.15	C_3 in noncondensed g units
6	113-110	0.34	C_2 in g units
7	110-101	0.49	$\text{C}_{2,6}$ in s units
			$\text{C}_{2,6}$ in XIII
			C_β in I and II ($\text{C}\alpha'$ in V with β -O-4)
8	90-83	0.65	$\text{C}\alpha$ in III
			$\text{C}\alpha$ in IV
			$\text{C}\alpha$ in I
9	75-70	0.51	$\text{C}\alpha$ in VI
			$\text{C}\gamma$ in IV, C in carbohydrates
			$\text{C}\gamma$ in V
			$\text{C}\gamma$ in VI
10	66-62	0.22	$\text{C}\gamma$ in III
			$\text{C}\alpha$ in X
11	57-54	1.72	-OCH ₃
12	54-53	0.11	C_β in III
			C_β in IV
13	30-28.5	0.02	C_β in XII
			cluster
1	220-210	0.01	nonconjugated C=O
2	200-190	0.40	conjugated C=O
			C_4 in h units
			$\text{C}_{3,5}$ in s units
3	162-142	1.80	$\text{C}_{3,4}$ in g units (except XIII)
			$\text{C}_{3,5}$ in XIII,
			$\text{C}_{3,6}$ in V of g units,
			C_α in VIII
4	127-103	2.53	$\text{C}_{\text{Ar-H}}$
5	90-58	3.24	Alk-O-, C_β in V
6	90-77	0.50	Alk-O-Ar, α -O-Alk
7	77-65	0.77	γ -O-Alk, OH _{sec}
8	65-58	0.66	OH _{prim} + C_β in V

جدول ۴- داده های ^{13}C NMR کمی شده لیگنین MWL استیل شده

no	spectroscopic range	amount	assignment
1	200-196	0.01	α -C=O except II
2	196-193	0.03	C=O in II and VIII
3	193-190	0.01	C_α in IX
4	182.5-180	0.01	C_4 in V of g units
5	177.5-175	0.02	C_4 in V of s units
7	171.6-170.4	0.83	primary aliphatic OH
8	170.4-169.5	0.70	secondary aliphatic OH
9	169.5-168.5	0.26	phenolic OH, conjugated COOR
12	158-156	0.03	C_4 in etherified h units
17	149-144.5	0.10	C_4 in etherified h units except XIII conjugated g units
18	144.5-142	0.03	C_3 in III, C_4 in conjugated etherified s units C_4 in conjugated XIII
21	114-110	0.34	C_2 in g units
22	110-101	1.00	$C_{2,6}$ in s units, $C_{2,6}$ in XIII
23	87-85.5	0.04	C_α in III
24	60-58	0.01	C_γ in XI
25	57-55	1.69	-OCH ₃
26	54-52.5	0.09	C_β in IV
27	50.5-48	0.05	C_β in VI, C_β in III
clusters			
1	200-210	0.01	nonconjugated C=O
2	200-190	0.40	conjugated C=O
3	162-142	1.62	C_4 in h units $C_{3,5}$ in s units $C_{3,4}$ in g units (except XIII) $C_{3,5}$ in XIII, $C_{3,6}$ in V of g units, C_α in VI
4	127-103	2.53	C_{Ar-H}
5	90-58	2.30	Alk-O-
6	90-77	0.52	Alk-O-Ar, α -O-Alk
7	77-65	0.77	γ -O-Alk, OH _{sec}
8	65-58	1.01	OH _{prim}

جدول ۵- داده های ^{13}C NMR کمی شده لیگنین CEL

no	spectroscopic range	amount	assignment
1	196-194	0.03	C=O in II and VIII
2	175-165	0.09	aliphatic COOR
3	164-162	0.06	conjugated COOR
4	157-151	0.91	C _{3,5} in etherified s units
			C ₃ in etherified XIII
5	151-149	0.18	C ₃ in etherified XIV
			C _α in VIII, C ₄ in conjugated CO/COOR g units
			C _{3,6} in V of g units, C _{3,5} in V of s units
6	112-111	0.23	C ₂ in g units
7	110-101	0.71	C _{2,6} in s units
			C _{2,6} in XIII
8	90-83.5	0.83	C _β in I and II (C _{α'} in V with β -O-4)
			C _α in III
			C _α in IV F _α
9	75-70	0.78	C _α in I
			C _α in VI
10	66-62	0.27	C γ in IV, C in carbohydrates
			C γ in V
			C γ in VI
11	57-55	1.79	C γ in III
			C _α in X
12	54-52	0.1	-OCH ₃
13	30-20	0.12	C _β in III
			C _β in IV
1	220-210	<0.01	-CH ₃ and CH ₂ in saturated aliphatic chain cluster
2	200-190	0.11	nonconjugated C=O
3	162-142	1.89	conjugated C=O
			C ₄ in h units
			C _{3,5} in s units
4	127-103	2.69	C _{3,4} in g units (except XIII)
			C _{3,5} in XIII,
5	90-58	0.47	C _{3,6} in V of g units,
			C _α in VIII
6	90-77	0.82	C _{Ar-H}
7	77-65	1.05	Alk-O-, C _β in V
8	65-58	0.92	Alk-O-Ar, α-O-Alk
			γ -O-Alk, OH _{sec}
			OH _{prim} + C _β in V

جدول ۶- داده های ^{13}C NMR کمی شده لیگنین CEL استیل شده

no.	spectroscopic range	amount	assignment
1	171.6-170.4	0.90	primary aliphatic OH
2	170.4-169.5	0.60	secondary aliphatic OH
3	169.5-168.5	0.20	phenolic OH, conjugated COOR
4	158-156	0.03	C ₄ in etherified h units
5	149-144.5	0.11	C ₄ in etherified h units except XIII conjugated g units
6	144.5-142	0.04	C ₃ in III, C ₄ in conjugated etherified s units C ₄ in conjugated XIII
7	114-110	0.36	C ₂ in g units
8	110-101	0.76	C _{2,6} in s units, C _{2,6} in XIII
9	87-85.5	0.04	C _α in III
10	60-58	0.54	C _γ in XI
11	58-56	1.79	-OCH ₃
12	54-52.5	0.09	C _β in IV
13	50.5-48	0.05	C _β in VI, C _β in III cluster
1	220-210	<0.01	nonconjugated C=O
2	200-190	0.11	conjugated C=O
			C ₄ in h units C _{3,5} in s units
3	162-142	1.65	C _{3,4} in g units (except XIII) C _{3,5} in XIII, C _{3,6} in V of g units C _α in VI
4	127-103	2.69	C _{Ar-H}
5	90-58	4.17	Alk-O-
6	90-77	0.82	Alk-O-Ar, α-O-Alk
7	77-65	1.00	γ -O-Alk, OH _{sec}
8	65-58	0.89	OH _{prim}

جدول ۷- محاسبه کمی واحدهای ساختاری و گروههای عاملی لیگنین های MWL و CEL

		MWL	CEL
α -CO/ β -O-4 (II)	$(1196-193)_{na}$	0.03	0.03
Spirodienone structures (V)	$(1 182.5-180)=V_g$	0.01	0.01
	$(1 177.5-175)=V_s$	0.02	0.02
pino/syringyresinol (IV)	$((1 55-52.5)_{na} - II V)/2$	0.03	0.03
	$(1 55-52.5)_{ac}/2$	0.04	0.04
Phenylcoumaran (II V)	$(1 87-85.5)_{ac}$	0.04	0.04
β -1 (VI)	$(1 50-48)_{ac} - II V$	0.01	0.01
5-5 ⁻ (XIV)	$(1 145-141)_{na} - II V$	0.13	0.08
β -O-4/ α -OH (I)	$(1 74-71)_{na} - VI - IV - 3$ carbohydrates	0.49	0.61
Ar-CH ₂ OH structures (X)	$(1 64.5-62)_{na} - II V - VI - V$	0.14	0.22
β -O-4 total	$(1 90-83.5)_{na} - II V - IV$	0.53	0.72
γ -O-4 total	$(1 77-65) - OH_{sec}$	0.07	0.4
Alk-O-Ar	$(1 90-77) - IV - V (\times 2)$	0.39	0.73
Phenolic OH	$(1 169.5-168.5)_{ac} - COOR conj$	0.26	0.14
total OH	$(1 171.6-168.5)$	1.79	1.64
Side chain	$(1 100-45) - OMe - 5.5(carb\%)+$ $(1 174-165)_{na} + (1 210-190)$	2.32	2.72
s	$(1 106-100)_{ac} : 2 - V_s$	0.59	0.56
g	$(1 113-111)_{ac} + V_s$	0.33	0.36
h:g:s (100% base)	$g=1-s-h$	8:33:59	8:36:56
Degree of condensation	$[3g+2(s+h)] - (1127-103)$	0.43	0.22
etherified total	$1 - OH_{ph} - V$	0.71	0.86
s-etherified	$Total s - PhOHs - V_s$	0.42	0.46
g-etherified	$Total g - PhOH_g - V_g$	0.24	0.27
g-etherified noncondensed	$(1 151-149)_{na}$	0.15	0.18
4-O-5 _{et} (XIII _{et})	$g_{et} - (1 149-143)_{ac}$	0.15	0.13

محاسبات نشان می دهد که لیگنین آنزیمی از لحاظ ساختاری بسیار سالم تر از لیگنین چوب آسیاب شده است. بطور مثال مقدار گروههای β -O-4 که جزء اصلی

تمام ساختارهای مورد اشاره در جدولها در شکل ۱ نمایش داده شده اند.

در MWL و به مقدار ۰/۰۳ مشاهده گردید (جدول ۳). وجود ساختارهای α -کربونیل نشان دهنده احتمال وقوع اکسیداسیون طی فرایند آسیاب کردن است (Holtman et al. 2004). همچنین وجود ساختارهای بنزآلدئیدی نشان می دهد که فرایند آسیاب کردن نه تنها سبب اکسیداسیون زنجیر جانبی می شود بلکه سبب تخریب ساختاری نیز می گردد. اگرچه وجود این ساختارها ناچیز است. تحلیل ناحیه آروماتیک طیف $^{13}\text{C-NMR}$ نیز تفاوت‌های ساختاری MWL و CEL را نشان می دهد. ناحیه آروماتیک را می توان به کربن آروماتیک اکسیژن دار ($\text{C}_{\text{Ar-O}}$)، کربن‌های آروماتیک کندانس شده ($\text{C}_{\text{Ar-C}}$) و کربن‌های آروماتیک پروتون دار (۱۰۳-۱۲۷ ppm) تقسیم بندی نمود (Capanema et al. 2005). دو قسمت آخر می تواند بیانگر یک نوع تخمین از مقدار تراکم (اتصالات C-C) در ساختار درشت مولکول لیگنین باشد. ناحیه آروماتیک کربن-کربن ($\text{C}_{\text{Ar-C}}$) شامل موقعیت C1 زنجیر جانبی و موقعیت C5 اتصالات آروماتیکی کندانس شده شامل ساختارهای فنیل کوماران (E) یا بی فنیل (T) باشد. اما محاسبه در جه کندانس بوسیله انتگرال گیری این ناحیه سبب بروز خطا می گردد زیرا این ناحیه بوسیله کربن‌های ساختارهای بنزآلدئیدی و C_β در سینامیل‌آلدئید همپوشانی دارد (Holtman et al. 2004). استفاده از ناحیه آروماتیکی پروتون دار (۱۰۳-۱۲۷ ppm) برای تعیین درجه کندانس در سوزنی برگان دقت بیشتری دارد. انتگرال این ناحیه برای لیگنین‌های MWL و CEL بترتیب ۲.۵۳ و ۲.۶۹ است. با تفریق این مقادیر از مقدار حداکثر کربن‌های حلقه فنلی در حالت غیر کندانس (۳ موقعیت)، درجه کندانس دو لیگنین بترتیب ۰/۴۷ و ۰/۳۱ بدست می‌آید (جدول ۷). در مورد پهن برگان به دلیل وجود توام ساختارهای سیرینجیل و گویاسیل 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

تشکیل دهنده لیگنین است در لیگنین آنزیمی ۰/۷۲ و در لیگنین چوب آسیاب شده ۰/۵۳ می باشد. (جدول ۷). ساختار آریل-گلیسرول β -آریل اتر واحد عمده تشکیل دهنده لیگنین سوزنی برگان و پهن برگان است. بنابراین بالا بودن مقدار آن دلیلی بر سالم تر بودن لیگنین است. این نتایج با نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی تراوش ژلی سازگار است که در آن لیگنین CEL دارای متوسط وزن مولکولی بیشتری نسبت به MWL است. مقدار کربن‌های زنجیر جانبی واحد ساختاری فنیل پروپان از لحاظ نظری ۳ است. محاسبات کمی نشان می دهد که این مقدار در لیگنین CEL در حدود ۲.۷۲ و در لیگنین MWL در حدود ۲.۳۲ است. ملاحظه می شود که این مقدار در لیگنین آنزیمی مقدار بیشتری نسبت به MWL است. از آنجاییکه آسیاب کردن شدید سبب تخریب ساختار لیگنین و ایجاد واکنشهای تراکمی می گردد، ملاحظه می شود که مقدار تراکم در لیگنین MWL با مقدار ۰.۴۷ بسیار بیشتر از لیگنین CEL (۰.۳۱) است. بنابراین می توان نتیجه گیری نمود که کاهش زمان آسیاب کردن و بکارگیری روشهای گزیننده آنزیمی سبب وارد آمدن تخریب کمتر به ساختار لیگنین در طی استخراج می شود. مقدار گروههای متوکسیل لیگنین MWL در ناحیه ppm ۵۴-۵۷، ۱.۶۹ عدد به ازاء هر حلقه آروماتیک بدست آمد (جدول ۳). این مقدار برای لیگنین CEL، در حدود ۱.۷۹ است که مقدار بسیار بیشتری را نشان می دهد. تحلیل ناحیه گروههای کربونیل (۱۹۰-۲۰۰ ppm) اختلافهای دو نوع روش استخراج را بیشتر نشان می دهد. مقدار کلی این ساختارها برای لیگنین‌های MWL و CEL بترتیب ۰.۴ و ۰.۱۱ بدست آمد. بطور خاص سیگنال ppm ۱۹۳-۱۹۶ متعلق به اتمهای کربن گرو کربونیل در سینامیل آلدئید (L) و α -کربونیل واحدهای β -O-4 (D) در لیگنین‌های MWL و CEL در حد مشابه ۰/۰۳ به ازاء هر حلقه آروماتیک می باشد. همچنین ساختارهای α -آلدئیدی (M) (رنانس C- α در ppm ۱۹۰-۱۹۲) فقط

مناسب C_{β} در پینو-سیرینجورزینول (β - β) نسبت به سیگنال گروههای متوکسیل برخلاف لیگنین سوزنی برگان محاسبه بسیار راحت است که در هر دو لیگنین معادل ۰.۰۴ است.

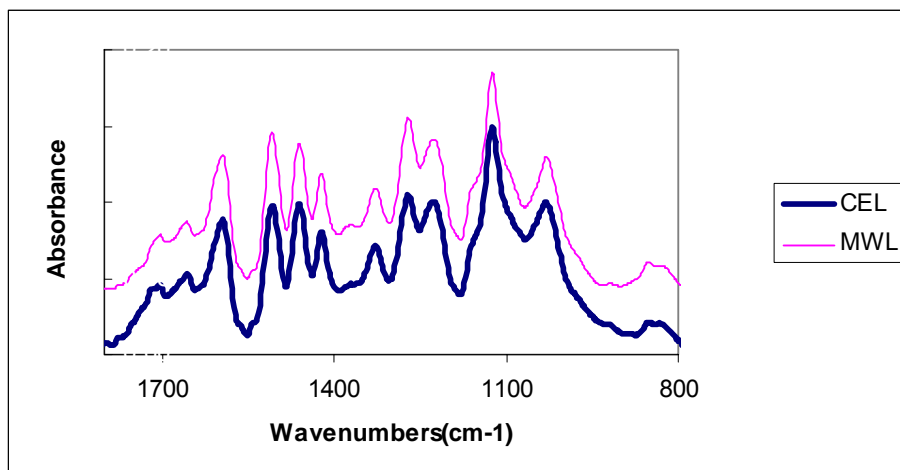
جزئیات مربوط به محاسبه ساختارهای مختلف هر دو لیگنین در جدول ۷ نشان داده شده است. محاسبات مربوط به گروههای عاملی نیز در جدولهای ۳ تا ۷ بیان شده است.

طیف سنجی FT-IR

طیف هر دو نمونه الگوی عمومی یکسانی را نشان می دهد (شکل ۸). این بدان معناست که عموماً لیگنین های بدست آمده از لحاظ ساختاری متعلق به ناحیه مشخصی از ساختار دیواره سلول چوبی هستند. نتایج بدست آمده در نواحی مختلف طیف مویده نتایج بدست آمده از آنالیز کمی با ^{13}C NMR که برخی گروههای عاملی (همانند گروههای هیدروکسیل فنلی) در لیگنین MWL دارای مقدار بیشتری نسبت به CEL هستند که می تواند دلیلی برای تخریب بیشتر ساختار لیگنین در طی استخراج آن باشد (جدول ۸). ولی همانطور که گفته شد الگوی کلی لیگنین های تهیه شده یکسان است.

نظری C_{Ar-H} استفاده می شود. سپس مقدار نظری و مقدار واقعی انتگرال گیری شده در ناحیه C_{Ar-H} (۱۰۳ ppm-۱۲۷) از یکدیگر تفریق می گردند (جدول ۷). مقادیر C_{Ar-C} و O را به دلیل وجود سیگنال های s-4 در ناحیه ۱۳۴-۱۳۸ ppm و همپوشانی با C_{Ar-C} همانند لیگنین سوزنی برگان به راحتی نمی توان محاسبه نمود. انتگرال ناحیه ۱۴۲-۱۶۲ ppm لیگنین استیله شده MWL (۱.۶۲) و CEL (۱.۸۹) به دلیل جابجایی C-4 در گروههای هیدروکسیل واحدهای گویاسیل کاهش می یابد. بدیهی است که اختلاف بین مقدار انتگرال ناحیه ۱۴۲-۱۶۲ ppm در لیگنین های MWL و CEL استیله نشده و استیله شده بترتیب بیانگر گروههای هیدروکسیل واحدهای گویاسیل (g-OH) است. با انتگرال ناحیه ۱۴۴-۱۴۸ ppm در طیف Ac-MWL و Ac-CEL می توان مقدار واحدهای 4-O-5 را محاسبه نمود که برای هر دو لیگنین بترتیب ۰/۱۵ و ۰/۱۳ است (جدول ۷).

مقدار ساختارهای فنیل کوماران (E) بوسیله انتگرال ناحیه ۸۵.۵-۸۷ ppm در لیگنین استیله شده هر دو لیگنین در حد مشابهی (۰/۰۴) است. انتگرال ناحیه ۴۸-۵۰ ppm طیف استیله شده هر دو لیگنین شامل واحدهای فنیل کوماران و β -1 (J) است. در نهایت مقدار β -1 (J) در هر دو لیگنین ۰/۰۱ بدست می آید (جدول ۷). به دلیل وضوح



شکل ۸. طیف های FT-IR لیگنین های آنزیمی (CEL) و چوب آسیاب شده (MWL)

تهیه شده از صنوبر در شکل ۸ آمده است. جدول ۸ منشاء هر یک از نوارهای جذبی و درصد آنها را نسبت به شدیدترین جذب نشان می‌دهد. بر اساس این طیف و نسبت جذب در عددهای موج (cm^{-1}) 1507/1461 و 1270/1226 این لیگنین‌ها در گروه لیگنین‌های GS2 قرار می‌گیرند. طیف این لیگنین‌ها نشان می‌دهد که نمونه استخراج شده و خالص‌سازی شده بخصوص در مورد لیگنین CEL دارای کمترین جذب‌های اضافی مربوط به ناخالصی‌های غیر لیگنینی در باند 1656 cm^{-1} است (جدول ۸). میزان لیگنین کلاسون نمونه خالص سازی شده لیگنین همانطور که در جدول ۱ عنوان گردید به ترتیب برای لیگنین‌های CEL و MWL ۹۵.۴ و ۸۹ درصد تعیین گردید.

بر اساس مطالعات Faix (1991) طیف FT-IR انواع لیگنین را می‌توان به شکل‌های مختلف نشان داد. این مطالعات نشان می‌دهد که تمامی سوزنی برگان طیف مشابهی دارند. اما طیف پهن برگان، بسته به واحدهای گوایاسیل و سیرینجیل در ساختار لیگنین که از طریق شدت جذب بر اساس نسبت‌های جذب در عددهای موج (cm^{-1}) 1507/1461 و 1270/1226 نشان داده می‌شوند، متغیر است. بر اساس این مطالعات، Faix (1991) انواع لیگنین را بر اساس درصد واحدهای سازنده و میزان گروه‌های متوکسیل در یک سیستم سه بعدی نشان داد. با توجه به مطالعات گسترده انجام شده مهمترین جذب‌های انواع پیوندهای شیمیایی در لیگنین در طول موج‌های مختلف تعیین شده است (Duarte 2001; Faix and Beinhoff 1988). طیف FT-IR لیگنین‌های مورد مطالعه

جدول ۸. ارزیابی طیف FT-IR لیگنین MWL و CEL تهیه شده در این آزمایش

MWL	CEL	باند (cm^{-1})	منشا نوار جذبی	شدت جذب	
				CEL	MWL
0.048	0.045	1727	C=O مزدوج نشده	20	16.7
0.058	0.052	1656	C=O مزدوج شده	60	61.1
0.113	0.088	1594	حلقه آروماتیکی	66.7	72.2
0.131	0.097	1507	حلقه آروماتیکی	66.7	66.7
0.098	0.122	1461	C-H گروه‌های متیلنی	53.3	55.6
0.090	0.080	1422	حلقه آروماتیکی	46.7	50
0.096	0.071	1328	حلقه سیرینجیل - ارتعاش خمشی هیدروکسیل فنلی	66.7	77.8
0.143	0.104	1270	حلقه گوایاسیل	66.7	72.2
0.126	0.1	1226	حلقه سیرینجیل - ارتعاش کششی هیدروکسیل فنلی	100	100
0.112	0.1	1030	C-H در الکل‌های نوع دوم و اترهای آلیفاتیک	66.7	61.1
0.025	0.021	851	C-H آروماتیک خارج از صفحه (ارتعاش خمشی)	13.3	16.7

نتیجه گیری

گزیننده استخراج با آنزیم به همراه تیمار خالص سازی شیمیایی ملایم می‌توند سبب بهبود قابل ملاحظه ساختار لیگنین استخراج شده در مقایسه با روش متداول MWL شود. لیگنین آنزیمی تهیه شده با توالی آنزیمی در مقایسه

نتایج بدست آمده از آنالیزهای مختلف نشان داد که کاهش زمان آسیاب کردن چوب و بکارگیری روشهای

- Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Biores. Technol.* 36, 51-6.
- Faix O. (1992) Fourier transforms infrared spectroscopy. In: Lin SY, Dence CW, editors. *Methods in lignin chemistry*. Berlin: Springer-Verlag; . p. 83-109.
- Faix O., Beinhoff O. (1988) FTIR spectra of milled wood lignins and lignin polymer models (DHPs) with enhanced resolution obtained by deconvolution, *J. Wood Chem. Technol.*, 8, 505-522.
- Fujimoto A., Y. Matsumoto, H.M. Chang, G. Meshitsuka (2005) Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin. *J. Wood Sci.* 51:89-91.
- Furuno H., T. Takano, S. Hirosawa, H. Kamitakahara and F. Nakatsubo (2006) Chemical structure elucidation of total lignins in Woods. Part II: Analysis of a fraction of residual wood left after MWL isolation and solubilized in lithium chloride/N,N-dimethylacetamide *Holzforchung*, Vol. 60, pp. 653-658
- Gellerstedt, G.; Northey, R. A. (1989) Analysis of Birch Wood Lignin by Oxidative-Degradation. *Wood Sci. Technol.* 23, 75-83.
- Goyal A, B. Ghosh, D. Eveleigh (1991) Characterisation of Funga Cellulases. *Biores. Technol.* 36:37-50.
- Higuchi T. (1985) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*; Academic Press: Orlando, FL.
- Holtman K.M., H.M. Chang and J.F. Kadla (2004) Solution-State Nuclear Magnetic Resonance Study of the Similarities between Milled Wood Lignin and Cellulolytic Enzyme Lignin, *J. Agric. Food Chem.* 52: 720-726
- Hon, D. N. S.; Glasser, W. G. (1979) Effect of Mechanical Action on Wood and Fiber Components. *Tappi*, 62, 107-110.
- Hu Z., T.F. Yeh, H.M. Chang, Y. Matsumoto and J.F. Kadla (2006) Elucidation of the structure of cellulolytic enzyme lignin, *Holzforchung*, 60, 389-397
- Ibarra D., J. C. del R'io, A. Gutiérrez, I. M. Rodríguez, J. Romeroc, M. J. Martinez, Á.T. Martinez (2004) Isolation of high-purity residual lignins from eucalypt paper pulps by cellulase and proteinase treatments followed by solvent extraction, *Enzyme and Microbial Technology* 35: 173-181
- Ikeda T., K. Holtman, J.F. Kadla, H.M. Chang, H. Jameel (2002) Studies on the effect of ball milling on lignin structure using a modified DFRC method. *J. Agric. Food Chem.* 50:129-

با روشهای معمول دارای ساختار بهتر و وزن مولکولی بیشتری است و مقدار ناخالصی آن بصورت پروتئین و کربوهیدرات نیز در حد بسیار کمی است. بهینه سازی روشهای آسیاب کردن چوب و بکارگیری روش ارائه شده در این تحقیق می تواند در بررسی واکنشهای مختلف لیگنین در فرایندهای مختلف همچون خمیرسازی، رنگبری و فرایند زرد شدن نوری و حرارتی کاغذ بسیار موثر باشد و مشکل عدم وجود یک مدل واقعی لیگنین در این بررسی ها را مرتفع سازد.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور ایران به خاطر حمایت مالی از این تحقیق تقدیر و تشکر بعمل می آید. از خانم مهندس نوری کارشناس بخش طیف سنجی NMR پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی به خاطر زحمات بی دریغ ایشان در ثبت طیف های NMR تقدیر می گردد.

منابع مورد استفاده

- Adler, E. and S. Hernestam (1955) Estimation of phenolic hydroxyl groups in lignin. 1. Periodate oxidation of guaiacol compounds. *Acta Chem. Scand.*, 9, 319-334.
- Bjorkman A. (1954) Isolation Lignin from Finly Divided Wood with Natural Solvent, *Nature* 174:1057-1058
- Blakeney A.B., P.J. Harris, R.J. Henry, B.A. Stone (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* 113:291-299.
- Capanema E. A., M. Y. Balakshin and J. F. Kadla (2005) Quantitative Characterization of a Hardwood Milled Wood Lignin by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 53, 96399649
- Chang H. M., Cowling E. B., Brown W., Adler E., Miksche G. (1975) Comparative Studies on Cellulolytic Enzyme Lignin and Milled Wood Lignin of Sweetgum and Spruce. *Holzforchung*, 29, 153-159.
- Duarte A. (2001) Eucalyptus globules kraft pulping residual lignin, *Holzforchung*, 55, 645-651.
- Esterbauer H, W. Steiner, I. Labudova (1991).

- Microbial cellulases: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 38(4):305-321.
- Ralph J., R.D. Hatfield (1991) Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. *J Agric Food Chem.*; 39:1426-37.
- Sederoff, R. R. and H.M. Chang (1991) Lignin Biosynthesis. In *Wood Structure and Composition*; Lewin, M., Goldstein, I. S., Eds.; M. Dekker: New York, 1991; p 263.
- Vazquez G, G. Antorrena, J.González, S. Freire (1997) FTIR, H-1 and C-13 NMR characterization of acetosolv—solubilized pine and eucalyptus lignins. *Holzforschung*, 51:158-66.
- Walker LP, D. B. Wilson (1991) Enzymatic hydrolysis of cellulose: An Overview. *Biores. Technol.* 36:3-14.
- Wood T. M. (1991). Fungal cellulases. In Haigler et al. (eds) *Biosynthesis and Biodegradation of cellulose*. Macel Dekker Inc., New York, pp 491-534.
- Wu S. and D.S. Argyropoulos (2003) An Improved Method for Isolating Lignin in High Yield and Purity, *JPPS*, 29(7):235-240
- 135.
- Lai, Y. Z. and Sarkanen, K. V. Isolation and structural studies. In *Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions*; Sarkanen, K. V., Ludwig, C. H., Eds.; Wiley-Interscience: New York, 1971; pp xxv, 916.
- Lapierre, C.; B. Monties, C. Rolando (1985) Thioacidolysis of lignin - comparison with acidolysis. *J. Wood Chem. Technol.*, 5, 277-292.
- Lawther J., R. Sun, and W. Banks (1996) Extraction and comparative characterization of ball-milled lignin (LM), enzyme lignin (LE) and alkali lignin (LA) from wheat straw. *Cellul. Chem. Technol.* 30:395-410
- Martinez AT, G. Almendros, F.J. Gonzalez-Vila, R. Fründ (1999) Solid-state spectroscopic analysis of lignins from several Austral hardwoods. *Solid State NMR*; 15:41-8.
- Puls, J.; J. Schuseil (1993) Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In *Hemicellulose and Hemicellulases*; Coughlan, M. P., Hazlewood, G. P., Eds.; Portland Press: Brookfield, VT, 1-27.
- Rabinovich ML, M. S. Melnik, A. V. Bolobova (2002a).

Chemical structure elucidation of milled wood lignin and cellulytic lignin from Poplar

Mirshokraie, S.A.¹, Abdolkhani, A.^{*2} and Karimi, A.³

1-Professor, Dept. of Chemistry, Payame Noor University, Ozgol, Tehran, Iran

2*-Corresponding author, Ph.D student, Dept. of wood and Paper, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran-
Abdolkhani@ut.ac.ir

3-Associate Professor, Dept. of wood and Paper, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Received: Oct. 2007

Accepted: Feb, 2008

Abstract

In this paper, a novel enzymatic method was evaluated for isolation and purification of wood lignin. The chemical structure of enzymatic lignin (Cellulytic lignin) was compared with conventional Bjorkman method (Milled wood lignin). The chemical structure elucidation was performed with FTIR, quantitative ¹³CNMR, basic elemental analysis and Gel Permeation Chromatography (GPC). The results showed that enzymatic lignin preparation has a better chemical structure than MWL. Comparing to conventional isolation methods, application of an enzyme sequence with reduced milling time could lead to a mild extraction with less structural degradation of lignin. Resulting lignin could be more representative for wood lignin than milled wood lignin.

Keywords: Lignin, milled wood lignin, enzymatic lignin, extraction, enzymatic sequence