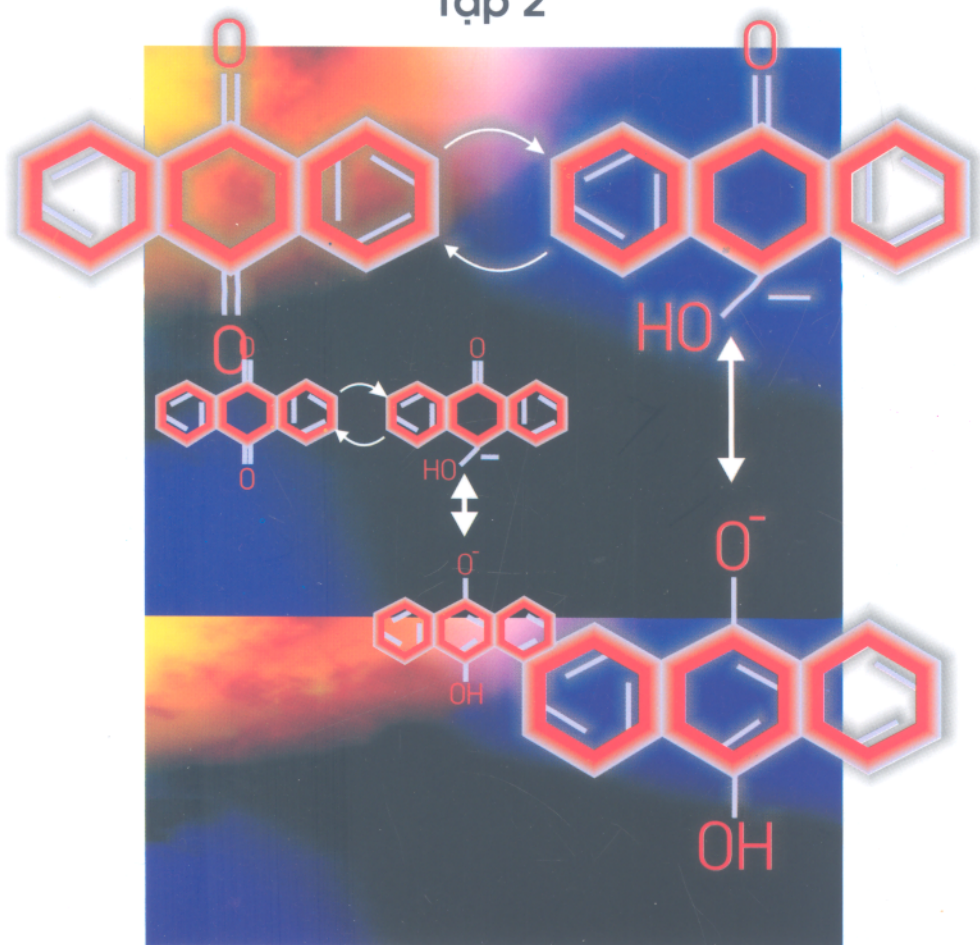


HỒ SĨ TRĂNG

CƠ SỞ HÓA HỌC GỖ VÀ XENLULOZA

Tập 2



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
HỒ SĨ TRÁNG

CƠ SỞ
HOÁ HỌC GỖ VÀ
XENLULOZA

TẬP 2

(In lần thứ hai)



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI

LỜI NÓI ĐẦU

Cuốn “Cơ sở hóa học gỗ và xenluloza” chủ yếu đề cập tới các hợp phần (cấu tử) của gỗ, với tư cách là nguyên liệu đầu cho Công nghệ Hữu cơ - Cao phân tử - Xenluloza Giấy và Vật liệu xơ sợi.

Cuốn sách này gồm hai tập.

*Trong tập 1, sau khi giới thiệu nguyên liệu thực vật, tác giả trình bày những vấn đề cơ bản về **cacbohydrat**, tiếp đó đi sâu nghiên cứu **xenluloza**, một loại polyme phổ biến trong tự nhiên.*

Cấu tạo phân tử, hình thái cấu trúc, hóa lý dung dịch, phản ứng hóa học và quá trình tổng hợp các dẫn xuất ete, este, copolyme ghép... của xenluloza được trình bày thành các chương mục riêng.

*Trong tập 2, tác giả đề cập tới các thành phần phi xenluloza, như **hemixenluloza**, **lignin**, **chất trích ly**.*

*Quá trình phân hủy các cấu tử phi xenluloza – nhất là lignin – khi nấu và tẩy trắng bột xenluloza được giải thích bằng các **cơ chế phản ứng** theo phương pháp luận của hóa học hữu cơ.*

Công nghệ sinh học đã mở ra một thời kỳ mới trong sản xuất, đặc biệt trong công nghiệp xenluloza - giấy và xử lý chất thải, bảo vệ môi trường. Chủ đề hấp dẫn này được giới thiệu ở chương 12.

“Cơ sở hóa học gỗ và xenluloza” là thành quả đúc kết tài liệu – nghiên cứu – giảng dạy – hoạt động thực tiễn của tác giả tại Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, trên lĩnh vực Hữu cơ - Hóa dầu – Cao phân tử – Xenluloza Giấy – Vật liệu sợi.

Hy vọng hai tập sách này giúp ích cho sinh viên đại học, sau đại học, cao đẳng và các bộ kỹ thuật hoạt động ở mọi miền đất nước.

Xin chân thành cảm ơn về sự hỗ trợ của các đồng nghiệp.

TS. Hồ Sĩ Tráng

CÁC TỪ VIẾT TẮT

AOX	Adsorbable organic halogens
BOD	Biological oxygen demand
C	Chlorination
COD	Chemical oxygen demand
CTMP	Chemi - thermomechanical pulp
D	Chlorine dioxide treatment
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
DS	Degree of substitution
DP	Degree of polymerization
E	Alkaline extraction
ECF	Elemental chlorine free
EO	Alkaline extraction in presence of oxygen
EOCl	Extractable organic chlorine
EOP	Alkaline extraction in presence of oxygen and hydrogen peroxide
EOX	Extractable organic halogen
EP	Alkaline extraction in presence of hydrogen peroxide
H	Hypochlorite treatment
ISO	International standards organization
MBC	Modified batch cooking
MCC	Modified continuous cooking
O	Oxygen delignification / bleaching
OKP	Oxygen bleached kraft pulp
P	Hydrogen peroxide treatment

PCB	Polychlorinated biphenyl
PCDD	Polychlorinated dibenzo dioxins
PCP	Polychlorophenol
ppb	Part per billion ($1/10^9$)
ppm	Part per million ($1/10^6$)
ppt	Part per trillion ($1/10^{12}$)
RBC	Rotating biological contactor
TCF	Totally chlorine free
TMP	Thermomechanical pulp
TNT	2,4,6-Trinitrotoluene
TOCl	Total organochlorine
X	Xylanase enzyme treatment
Z	Ozone treatment

Chương 7

HEMIXENLULOZA VÀ POLYURONIT

7.1. GIỚI THIỆU CHUNG

Hemixenluloza bao gồm một số loại polysaccarit. Hemixenluloza cùng với xenluloza và lignin tạo nên thành tế bào thực vật. Trong tự nhiên, hemixenluloza được tạo thành nhờ quá trình sinh tổng hợp, theo cơ chế khác với quá trình tạo thành xenluloza.

Hemixenluloza và xenluloza là phần cacbohydrat tạo nên thành tế bào. Ngoài ra, trong gỗ còn có một số polysaccarit khác không tạo nên thành tế bào, như các chất pectin. Các polysaccarit và dẫn xuất này cũng được đề cập trong chương này.

Hemixenluloza là hỗn hợp của một số loại polysaccarit, khi thủy phân, chủ yếu tạo ra một số đồng phân lập thể thuộc pentoza và một số đồng phân lập thể thuộc hexoza. Theo cách nói giản đơn, phần hemixenluloza khi thủy phân tạo ra pentoza gọi là pentozan, phần hemixenluloza tạo ra hexoza gọi là hexozan. Tuy nhiên, cách gọi đơn giản hoá như trên chưa phản ánh hết bản chất cấu tạo của hemixenluloza.

Hemixenluloza gồm các polysaccarit mà mạch phân tử có thể là homopolyme hoặc copolyme. Hemixenluloza dạng homopolyme, tức là mạch phân tử chỉ tạo thành từ một loại đơn vị mắt xích, tồn tại rất ít trong thực vật.

Dạng hemixenluloza thường gặp hơn cả là copolyme, hay polysaccarit hỗn tạp, mạch phân tử bao gồm các loại đơn vị mắt xích khác nhau.

Các thuật ngữ như xylan hay mannan chỉ là cách gọi đơn giản hoá để chỉ các loại copolyme, trong đó thành phần monome chủ yếu là

xyloza hoặc mannoza.

Các đơn vị mắt xích của các polysaccarit hemixenluloza thường là vòng anhydro của các saccarit như *D*-glucoza, *D*-mannoza, *D*-galactoza (thuộc hexoza), *D*-xyloza, *L*-arabinoza (thuộc pentoza). Hemixenluloza gỗ lá kim bao gồm chủ yếu các đơn vị mắt xích mannoza. Trong khi đó, gỗ lá rộng lại trội hơn về hàm lượng đơn vị mắt xích xyloza trong thành phần hemixenluloza.

Ngoài anhydro của các saccarit thuộc hexoza và pentoza đã kể ở trên, trong thành phần của một số polysaccarit hemixenluloza còn có các đơn vị axit *D*-glucuronic, axit 4-*O*-metyl-*D*-glucuronic và *D*-galacturonic. Thêm nữa, một số polysaccarit hemixenluloza còn liên kết với nhóm axetyl, làm cho thành phần của hemixenluloza trở nên phức tạp hơn. Trong gỗ, hàm lượng đơn vị axit uronic có thể chiếm tới $9 \div 17\%$ hemixenluloza.

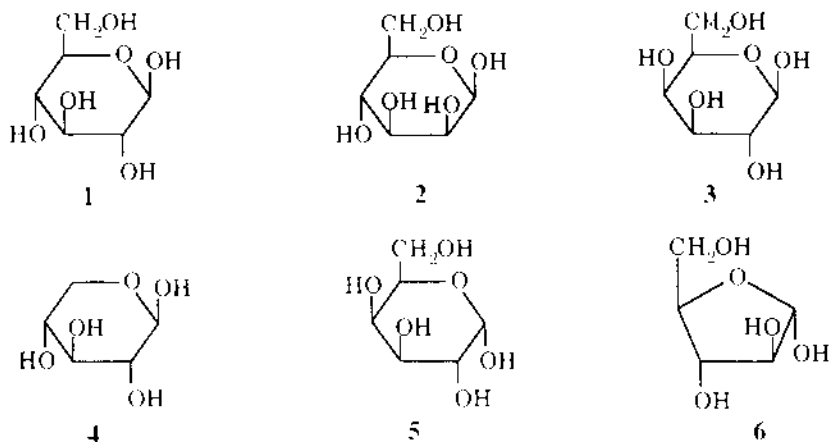
Axit uronic cũng là đơn vị mắt xích của pectin. Pectin không phải là hemixenluloza, đó là dẫn xuất của polysaccarit nên thường được nghiên cứu cùng với polysaccarit. Pectin chủ yếu tồn tại ở phần non của cây. Theo quá trình "hoá gỗ", hàm lượng pectin giảm dần.

7.2. HEMIXENLULOZA

Hemixenluloza thuộc nhóm polysaccarit phi xenluloza. Trong gỗ cũng như trong nhiều loại nguyên liệu thực vật khác, hàm lượng hemixenluloza có thể đạt tới $20 \div 30\%$ so với gỗ khô tuyệt đối.

Hemixenluloza gồm các polysaccarit, khi thủy phân tạo thành monosaccarit và dẫn xuất. Các monosaccarit chủ yếu được trình bày ở sơ đồ 7.1.

Giữa gỗ lá rộng và gỗ lá kim không những có sự khác biệt về hàm lượng hemixenluloza chung mà còn có những đặc điểm riêng về thành phần và cấu tạo của hemixenluloza. Do đó, hemixenluloza của gỗ lá kim và gỗ lá rộng được trình bày theo mục riêng.



Sơ đồ 7.1. Hexoza và pentoza có trong thành phần hemixenluloza:

1. β -D-glucopyranoza; 2. β -D-mannopyranoza;
3. β -D-galactopyranoza; 4. β -D-xylopyranoza;
5. α -D-galactopyranoza; 6. α -L-arabinofuranoza.

7.2.1. Hemixenluloza gỗ lá kim

7.2.1.1. Galactoglucomannan

Galactoglucomannan là thành phần chủ yếu của hemixenluloza gỗ lá kim. Copolyme này có thể chiếm tới 20% so với gỗ khô tuyệt đối.

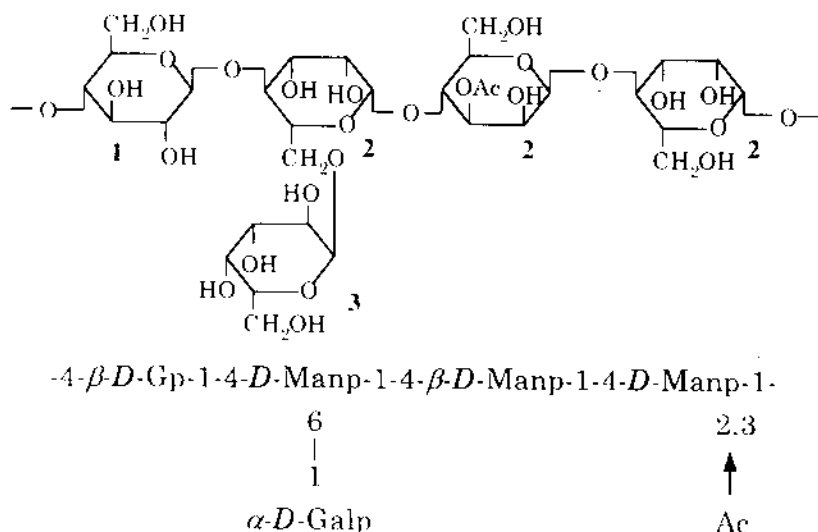
Mạch chính của copolyme này có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Mạch được tạo thành từ các đơn vị mắt xích β -D-mannopyranoza, được nối với nhau nhờ liên kết glycozit 1-4 (sơ đồ 7.2).

Galactoglucomannan được xếp thành hai nhóm, với hàm lượng đơn vị galactoza khác nhau. Nhóm chất có hàm lượng galactopyranoza cao, ứng với tỷ lệ galactoza : glucoza : mannoza $\approx 1 : 1 : 3$. Nhóm chất có hàm lượng galactopyranoza thấp, ứng với tỷ lệ galactoza : glucoza : mannoza $\approx 0,1 : 1 : 4$. Copolyme có hàm lượng galactopyranoza thấp có thể gọi là glucomannan.

Các mạch nhánh được hình thành do một đơn vị α -D-galactopyranoza nối với mạch chính bằng liên kết glycozit 1-6.

Các đơn vị mắt xích mannoza và glucoza có thể liên kết với nhóm axetyl ở C_2 và C_3 (liên kết este). Trung bình, $3 \div 4$ đơn vị mắt xích có một nhóm axetyl.

Galactoglucomannan tạo thành từ các đơn vị mắt xích là các đồng phân lập thể thuộc hexoza. Do đó, copolyme này có thể gọi là hexozan.



Sơ đồ 7.2. Cấu tạo phân tử galactoglucomannan.

Đơn vị mắt xích: 1. β -D-glucopyranoza (Gp); 2. β -D-mannopyranoza (Manp); 3. α -D-galactopyranoza (Galp). Ac là CH_3CO .

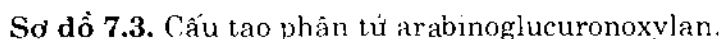
Hexozan này dễ bị thủy phân dưới tác dụng của axit, đặc biệt, liên kết glycosit 1-6 giữa galactopyranoza với mạch chính. Liên kết este của nhóm axetyl với các đơn vị mắt xích cũng dễ bị thủy phân dưới tác dụng của xúc tác bazơ hoặc axit, đặc biệt là xúc tác bazơ. Do đó, trong các quá trình xử lý bằng dung dịch kiềm, như nấu xenluloza phương pháp sulfat, nhóm axetyl bị tách ra khỏi hemixenluloza dưới dạng axetat.

Axit axetic cũng thu được khi thủy phân gỗ hoặc trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfit axit.

7.2.1.2. Arabinoglucuronoxylan

Bên cạnh cấu tử chính là galactoglucomannan, trong hemixenluloza của gỗ lá kim còn có arabinoglucuronoxylan. Loại copolyme này chiếm khoảng 5 ÷ 10% khối lượng gỗ khô.

Ngoài ra, loại copolyme này còn có các nhánh là α -L-arabinofuranoza, nối với mạch chính bằng liên kết glycozit 1 - 3. Trung bình, có 1,3 nhánh arabinofuranoza trên mười đơn vị xyloza của mạch chính (sơ đồ 7.3).

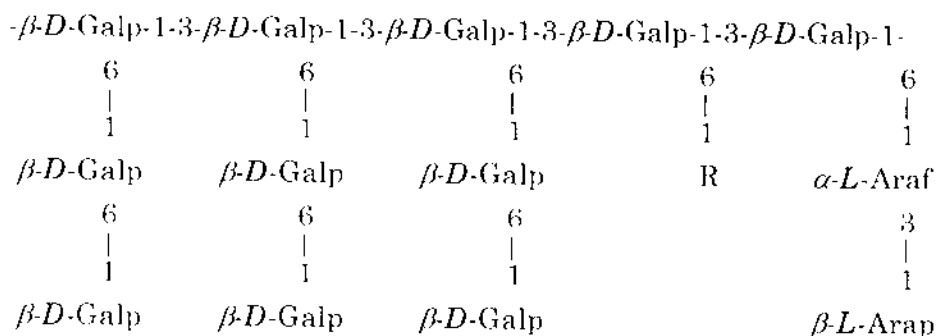
3. α -L-arabinofuranoza (Araf).

11

7.2.1.3. Arabinogalactan

Thông thường loại polysaccarit hỗn tạp này chỉ có một hàm lượng nhỏ trong gỗ. Tuy nhiên, ở một số ít loài gỗ lá kim, hàm lượng arabinogalactan trong gỗ lõi tương đối lớn.

Mạch chính của copolyme này được tạo thành từ các đơn vị β -D-galactopyranoza, nối với nhau nhờ liên kết glycozit 1 - 3 (sơ đồ 7.4).



Sơ đồ 7.4. Cấu tạo phân tử arabinogalactan.

Đơn vị saccarit: β -D-galactopyranoza (Galp):

β -L-arabinopyranoza (Arap), α -L-arabinofuranoza (Araf):

R: β -D-galactopyranoza, α -L-arabinofuranoza, hoặc

β -D-glucopyranozyluronic.

Hầu như mọi đơn vị mắt xích đều có nhánh nối với C₆. Phần lớn, nhánh tạo thành từ một số đơn vị mắt xích β -D-galactopyranoza, nối với nhau nhờ liên kết glycozit 1-6. Các nhánh này cũng dính với mạch chính nhờ liên kết glycozit 1-6. Một phần mạch nhánh khác được tạo thành từ β -L-arabinopyranoza, α -L-arabinofuranoza, liên kết với nhau theo kiểu glycozit 1-3 và nối với mạch chính bằng liên kết glycozit 1-6. Ngoài ra nhánh có thể là một đơn vị, như β -D-galactopyranoza, ở mức độ ít hơn so với α -L-arabinofuranoza hoặc β -D-glucopyranozyluronic, nối với mạch chính bằng liên kết glycozit 1-6.

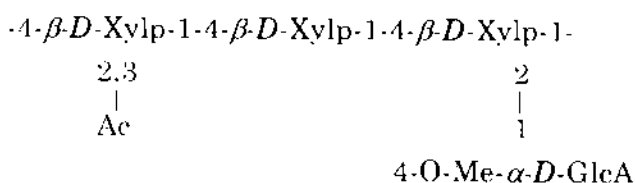
Do độ phân nhánh cao và trong thành phần cấu tạo có axit uronic, nên loại copolyme này dễ tan trong nước.

7.2.2. Hemixenluloza gỗ lá rộng

7.2.2.1. Glucuronoxylan

Glucuronoxylan là polysaccarit hỗn tạp chủ yếu của gỗ lá rộng. Các loại gỗ lá rộng khác nhau có hàm lượng copolyme này khác nhau, dao động trong khoảng 15% đến 30% so với gỗ khô tuyệt đối.

Glucuronoxylan là cách gọi đơn giản để chỉ hợp chất tạo thành từ đơn vị mắt xích xyloza và vòng pyranoza của axit O-axetyl-4-O-metylglucuronic. Các copolyme chứa đơn vị mắt xích xyloza thực tế còn được gọi đơn giản là xylan (sơ đồ 7.5).



Sơ đồ 7.5. Cấu tạo phân tử glucuronoxylan.

Đơn vị saccarit: β -D-xylopyranoza (Xylp):

4-O-metyl- α -D-glucopyranozyluronic (GlcA).

Mạch chính tạo thành từ các đơn vị mắt xích β -D-xylopyranoza. Các đơn vị này nối với nhau bằng liên kết glycozit 1-4.

Từ mạch chính, một số đơn vị mắt xích liên kết với đơn vị axit 4-O-metyl- α -D-glucuronic, tạo thành các nhánh. Các nhánh gồm một đơn vị dẫn xuất glucuronic này nối với mạch chính nhờ liên kết glycozit 1-2. Trung bình, có một nhánh trên mười mắt xích xyloza.

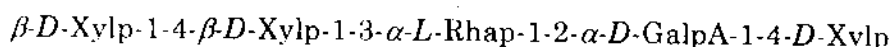
Thành phần hoá học của glucuronoxylan còn phức tạp hơn nữa, do phần lớn các đơn vị xylopyranoza ở mạch chính còn mang các nhóm thế axetyl ở nguyên tử C₂ và C₃, dưới dạng liên kết este. Trung bình, có bảy nhóm axetyl trên mười đơn vị mắt xích xylopyranoza.

Glucuronoxylan có hai loại liên kết glycozit với độ bền khác nhau trong phản ứng thủy phân. Liên kết glycozit giữa các đơn vị xylopyranoza trong mạch chính dễ dàng bị phân huỷ do thủy phân

dưới tác dụng của xúc tác axit, trong khi đó, liên kết glycozit của nhánh với đơn vị mắt xích xyloza thuộc mạch chính lại khá bền trong điều kiện đó.

Nhóm axetyl ở vị trí C₂ và C₃ của xylopyranoza có thể dễ dàng tách ra dưới tác dụng của dung dịch kiềm, ví dụ, trong quá trình nấu xenluloza phương pháp xút hoặc sulfat. Liên kết este này cũng dễ bị phân huỷ dưới tác dụng của môi trường axit. Trong dịch thủy phân gỗ cũng như trong chất thải của quá trình nấu xenluloza phương pháp sulfat, môi trường axit, luôn có một lượng axit axetic, sản phẩm của quá trình thủy phân tách nhóm axetyl từ hemixenluloza.

Một số loài gỗ lá rộng có cấu tạo mạch copolyme của xyloza khá phức tạp. Đơn vị gần cuối mạch là vòng pyranoza của axit α -D-galacturonic, nối với đơn vị xyloza cuối mạch bằng liên kết glycozit 1-4, nhưng lại nối với đơn vị L-rhamnoza đứng trước đó bằng liên kết glycozit 1-2. Đến lượt mình, đơn vị α -L-rhamnoza này lại nối với đơn vị xylopyranoza trước đó bằng liên kết glycozit 1-3 (sơ đồ 7.6).



Sơ đồ 7.6. Cấu trúc xylan gỗ bulô:

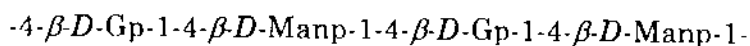
Cấu tạo mạch phức tạp ở đơn vị gần cuối mạch.

Như vậy, cấu tạo của copolyme của xylopyranoza khác nhau, tùy thuộc loài cây. Nhìn chung, loại hemixenluloza này có thành phần cũng như cấu tạo phân tử khá phức tạp.

7.2.2.2. Glucomannan

Bên cạnh xylan, gỗ lá rộng còn chứa 2 ÷ 5% glucomannan.

Mạch copolyme loại này được tạo thành từ các đơn vị β -D-glucopyranoza và β -D-mannopyranoza. Các đơn vị mắt xích được nối với nhau bằng liên kết glycozit 1-4 (sơ đồ 7.7).



Sơ đồ 7.7. Cấu tạo phân tử glucomannan.

Tỷ lệ các đơn vị mắt xích có thể thay đổi tùy thuộc vào loài cây, dao động trong khoảng mannoza : glucoza = 1 : 1 ÷ 2 : 1. Copolyme này tạo thành từ hai đồng phân lập thể thuộc hexoza nên có thể gọi là hexozan.

Cũng như nhiều loại polysaccarit khác của hemixenluloza, glucomannan dễ bị thủy phân dưới tác dụng của xúc tác axit. Thực nghiệm đã cho thấy rằng, liên kết mannozít dễ bị phân huỷ hơn liên kết glucozít (xem mục 2.2.2.2, T1).

Ngoài glucuronoxylan và glucomannan, gỗ lá rộng còn chứa một lượng nhỏ các polysaccarit hỗn tạp như ở gỗ lá kim.

Qua các nghiên cứu về hemixenluloza gỗ lá kim cũng như gỗ lá rộng, ta có thể rút ra một số nhận xét sau:

Về thành phần hoá học, hemixenluloza phức tạp hơn nhiều so với xenluloza. Xenluloza là homopolyme, chỉ tạo thành từ một loại đơn vị mắt xích β -D-glucoza. Trong khi đó, các polysaccarit đã nghiên cứu ở trên đều được tạo thành từ hai hoặc nhiều loại đơn vị mắt xích. Các đơn vị mắt xích là đồng phân lập thể thuộc hexoza hoặc pentoza cũng như dẫn xuất uronic của hexoza. Thành phần của copolyme hay tỷ lệ giữa các loại đơn vị mắt xích phụ thuộc vào loài cây.

Thông thường, loại đơn vị mắt xích nào có hàm lượng lớn hơn thì tên của monome đó được đặt ở vị trí cuối cùng trong danh pháp của copolyme. Nhiều trường hợp, để đơn giản, có thể gọi polysaccarit theo tên của monome có hàm lượng cao nhất, hoặc gọi theo monome nằm trong mạch chính. Theo cách này, có thể nói phần chủ yếu của hemixenluloza gỗ lá kim là mannan, còn ở gỗ lá rộng là xylan.

Cấu tạo đơn vị mắt xích và liên kết giữa chúng trong mạch phân tử polysaccarit của hemixenluloza cũng phức tạp hơn nhiều so với xenluloza.

Ở xenluloza, đơn vị mắt xích chỉ có cấu tạo vòng pyranoza, dạng β , trong khi đó, ở hemixenluloza, đơn vị mắt xích có thể ở dạng vòng pyranoza và furanoza, anome α hoặc β (xem chương 2, T1).

So với xenluloza, liên kết giữa các đơn vị mất xích trong hemixenluloza cũng phức tạp hơn. Ở xenluloza, các đơn vị nối với nhau nhờ liên kết glycozit 1-4, trong khi đó, ở hemixenluloza, liên kết giữa các đơn vị mất xích có thể là glycozit 1-6, 1-4, 1-3 và 1-2.

Do có nhiều loại liên kết và cấu tạo mạch phức tạp, các polysaccarit của hemixenluloza có độ bền khác nhau đối với phản ứng phân huỷ mạch, đồng thời cũng có độ bền khác với xenluloza.

Về hình dạng mạch, xenluloza là polyme mạch thẳng. Ngược lại, hemixenluloza có cả mạch thẳng và mạch phân nhánh. Một số ít polysaccarit có độ phân nhánh cao.

Về trạng thái pha hoặc trạng thái tập hợp trên phân tử, do cấu tạo phân tử phức tạp và không đồng nhất, hemixenluloza phần lớn tồn tại ở trạng thái vô định hình, chỉ một phần nhỏ ở vùng tinh thể. Do đó, đối với hemixenluloza, các tác nhân hoá lý và hoá học dễ tiếp cận hơn so với xenluloza. Hơn nữa, hemixenluloza thường có độ trùng hợp nhỏ ($DP = 100 \div 200$), trong khi đó, độ trùng hợp của xenluloza đạt tới bốn hoặc năm chữ số, nên khả năng hoà tan của hemixenluloza cao hơn so với xenluloza. Chẳng hạn, hemixenluloza hoà tan được trong dung dịch NaOH 16 ÷ 18%, trong khi đó, xenluloza tự nhiên không hoà tan được trong dung dịch này. Chỉ có phần xenluloza mạch ngắn, sản phẩm của quá trình phân huỷ dưới tác động của quá trình nấu, tẩy là hoà tan được trong dung dịch trên. Tất nhiên, khả năng hoà tan của hemixenluloza tốt hơn xenluloza còn do các đặc điểm về cấu tạo và cấu trúc của hemixenluloza: hemixenluloza chứa nhóm uronic, phân tử tồn tại ở vùng vô định hình...

Giữa hemixenluloza và xenluloza có nét tương đồng, đó là khả năng tham gia phản ứng biến đổi tương tự polyme, tức là các quá trình hoá học chỉ dựa trên cơ sở biến đổi nhóm chức hydroxyl.

Tuy vậy, do mạch phân tử quá ngắn, lại dễ bị phân huỷ đứt mạch trong quá trình nấu, tẩy nên hemixenluloza ít được sử dụng dưới dạng dẫn xuất cao phân tử như đối với xenluloza.

7.2.3. Sự phân bố hemixenluloza trong gỗ

Ở gỗ lá kim (vân sam, thông), hàm lượng xylan ở phân lớp giữa (S_2) của lớp thứ cấp là thấp nhất, trong khi đó, ở phân lớp S_1 và S_3 , hàm lượng xylan cao hơn nhiều. Trái lại, ở phân lớp S_2 , hàm lượng galactoglucomannan cao hơn so với phân lớp S_1 và S_3 .

Ở gỗ lá rộng (bulô), hàm lượng xylan cao nhất ở phân lớp S_2 .

Ở tracheit và sợi gỗ, thành phần hemixenluloza khác biệt so với ở tế bào tia. Trong gỗ lá kim cũng như gỗ lá rộng, tế bào tia có hàm lượng xylan cao hơn so với tracheit và sợi gỗ. Ở gỗ vân sam và thông, tế bào tia chứa nhiều xylan hơn so với glucomanan.

Thành phần hemixenluloza cũng phụ thuộc vào tuổi của cây. Gỗ ở cây non chứa nhiều xylan nhưng ít xenluloza và glucomanan so với gỗ trưởng thành.

Ở gỗ lá kim, lớp gỗ sớm chứa nhiều xylan và ít glucomanan so với gỗ muộn.

Như vậy, hàm lượng các cấu tử của hemixenluloza phụ thuộc vào loài cây, phụ thuộc vào vị trí trong cây, phụ thuộc vào từng loại tế bào và vị trí trong tế bào, phụ thuộc vào mức độ trưởng thành của cây...

7.2.4. Phương pháp chiết tách hemixenluloza

Hemixenluloza có thể được trích ly từ gỗ, holoxenluloza hoặc bột xenluloza.

Chỉ một số ít dung môi trung hoà có thể hoà tan được hemixenluloza. Trong số đó, DMSO được dùng để tách chiết xylan từ holoxenluloza (DMSO là dung môi có độ phân cực lớn và có thông số DN lớn). Tuy dung môi này chỉ hoà tan được một phần xylan, nhưng ưu điểm của nó là không làm biến đổi hoá học hemixenluloza.

Dung dịch kiềm mạnh như KOH hoặc NaOH có khả năng hoà tan xylan mạnh hơn DMSO. Thêm natri borat vào dung dịch NaOH có thể làm tăng khả năng hoà tan galactoglucomannan và glucomanan. Tuy vậy, trong môi trường kiềm mạnh liên kết este giữa các nhóm axetyl

với các đơn vị mắt xích của hemixenluloza bị phân huỷ.

Đối với glucomannan, dung dịch NaOH trích ly tốt hơn so với KOH. Bằng cách pha loãng từng nấc dung dịch hemixenluloza trong NaOH, ta có thể kết tủa phân đoạn hemixenluloza.

Đối với các polysaccarit mà đơn vị mắt xích của chúng có các nhóm hydroxyl liền kề ở dạng *cis* (ví dụ mannoza), khả năng hoà tan tăng nhờ tạo phức với borat. Phức này bị phá huỷ khi axit hoá. Do đó, ta có thể kết tủa được hemixenluloza khi thêm axit axetic vào dung dịch hemixenluloza trong kiềm.

Thêm vào dung dịch các chất trích ly (ở trạng thái trung tính) một dung môi hữu cơ trung tính khác, ví dụ rượu etylic, quá trình kết tủa sẽ xảy ra hoàn toàn hơn.

Một số tác nhân gây kết tủa đặc biệt hơn, như bari hydroxyt dùng để kết tủa glucomannan hoặc xetyltrimetylamonium bromua và hydroxyt dùng để kết tủa glucuronoxylan. Dung dịch Fehling cũng có thể sử dụng làm tác nhân gây kết tủa.

Các mẫu hemixenluloza kết tủa từ dung dịch có thể được làm sạch tiếp khi cho qua cột sắc ký.

Sắc ký qua gel có thể sử dụng để phân đoạn hemixenluloza theo khối lượng phân tử (xem mục 3.3.2.3, T1).

Trong phần lớn các trường hợp, quá trình phân riêng các chất có thể dựa trên sự khác biệt về tính chất hoá học, ví dụ, khả năng tạo phức như đã nói ở trên.

Quá trình phân tách hemixenluloza khá hiệu quả khi dùng chất trao đổi ion trên cơ sở xenluloza và các dẫn xuất polysaccarit, như dietylaminoethylxenluloza dưới các dạng ion khác nhau.

Nói chung, nhiều dạng sắc ký có thể được sử dụng để xác định tính chất sản phẩm thuỷ phân trong môi trường axit của hemixenluloza, cả dạng sản phẩm thuỷ phân hoàn toàn là monosaccarit, cả dạng thuỷ phân từng phần là oligome.

Phương pháp chung để xác định vị trí liên kết trong hemixenluloza là metyl hoá hoàn toàn hemixenluloza rồi thuỷ phân chúng và xác định các monosaccarit đã metyl hoá. ví dụ, bằng phương pháp sắc ký khí - lỏng, khối phổ.

Ngoài ra, cần tiến hành các phép xác định riêng để phân tích axit uronic, pentozan, hàm lượng nhóm axetyl, nhóm metyl cũng như xác định khối lượng phân tử và sự phân bố theo khối lượng phân tử (xem mục 3.3, T1).

7.2.5. Phản ứng hoá học của hemixenluloza và vai trò của hemixenluloza trong kỹ thuật

Hemixenluloza có thể chiếm tới $25 \div 40\%$ khối lượng gỗ khô tuyệt đối. Đó là lượng nguyên liệu đáng kể cho công nghệ hữu cơ – cao phân tử – xenluloza giấy và một số lĩnh vực công nghệ khác.

Hemixenluloza, cũng như xenluloza là polysaccarit, trong đó các đơn vị mắt xích chứa các nhóm hydroxyl. Do đó hemixenluloza cũng là polyhydroxyl, có khả năng tham gia phản ứng thế, tạo dẫn xuất ete, este... Tuy nhiên, hemixenluloza cũng có những đặc điểm khác với xenluloza. Vì thế, ta cần căn cứ vào ưu điểm, nhược điểm của hemixenluloza để sử dụng với hiệu quả cao.

** Vai trò của hemixenluloza trong công nghệ giấy:*

Hemixenluloza có ý nghĩa quan trọng đối với quá trình sản xuất giấy từ nguyên liệu xenluloza kỹ thuật.

Sự có mặt của hemixenluloza làm thuận lợi cho quá trình nghiền bột. Mục đích của quá trình nghiền bột giấy là tăng bề mặt riêng của vật liệu xơ xenluloza, tăng mức độ phân tở, chổi hoá, hydrat hoá để tờ giấy ướt và giấy khô sau này có đủ tính năng cơ lý thích hợp. Khi có mặt hemixenluloza với hàm lượng nào đó, các quá trình phân tở chổi hoá, hydrat hoá xảy ra tốt hơn. Vì hemixenluloza tồn tại ở vùng vô định hình, kết cấu trên phân tử ở trạng thái lộn xộn và rời rạc, dễ thấm nước để xúc tiến quá trình nghiền. Hơn nữa, trong hemixenluloza tồn tại một hàm lượng nào đó đơn vị axit uronic, có khả năng

hydrat hoá cao, càng tạo điều kiện tốt cho quá trình nghiền bột.

Sự có mặt của hemixenluloza cũng ảnh hưởng tới nhiều thông số công nghệ của các khâu trong quá trình sản xuất giấy cũng như ảnh hưởng tới tính chất sử dụng của tờ giấy.

Cũng có ý kiến cho rằng hemixenluloza đóng vai trò hoá dẻo cho xenluloza (tất nhiên chỉ xét trường hợp xenluloza gỗ cho sản xuất giấy). Sự có mặt của loại polyme mạch ngắn này tăng thêm độ mềm mại của vật liệu xenluloza vốn có độ trùng hợp lớn.

Như vậy, khi sản xuất bột xenluloza cho làm giấy, cần có biện pháp công nghệ để duy trì một hàm lượng thích hợp hemixenluloza trong sản phẩm. Tất nhiên hàm lượng hemixenluloza chưa phải là yếu tố quyết định tính chất của giấy, mà chỉ là một trong những thông số cần quan tâm. Ví dụ, xơ bông vụn có hàm lượng hemixenluloza thấp, nhưng nếu chọn chế độ nghiền bột thích hợp, ta vẫn có thể tạo ra giấy có độ bền cơ lý cao.

Để giữ lại hemixenluloza trong sản phẩm xenluloza kỹ thuật, trong quá trình nấu xenluloza, cần chọn điều kiện công nghệ thích hợp. Khi nấu xenluloza phương pháp sulfit, nên tiến hành quá trình ở pH gần trung tính để giảm thiểu phản ứng thủy phân hemixenluloza. Khi nấu xenluloza theo phương pháp xút, hemixenluloza bị hao tổn nhiều do phản ứng bào mòn (2.2.2.2. T1). Nên tiến hành nấu sulfat để giảm thời gian hemixenluloza tiếp xúc với dịch nấu ở nhiệt độ cao, hoặc tạo điều kiện để ngăn ngừa bớt phản ứng bào mòn, tăng cường phản ứng ổn định mạch polysaccarit, đặc biệt là hemixenluloza.

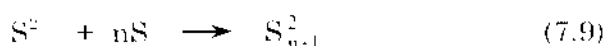
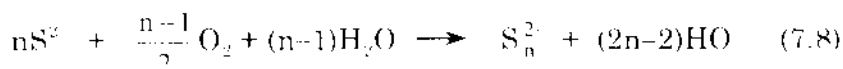
Trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp kiềm, ở giai đoạn tăng nhiệt độ, polysaccarit đã bắt đầu bị phân huỷ theo cơ chế bào mòn. Sự bào mòn trong giai đoạn này gọi là phản ứng sơ cấp. Sau đó, ở giai đoạn nhiệt độ cực đại (thường là $170 \div 175^{\circ}\text{C}$), polysaccarit có thể bị đứt mạch theo phản ứng thủy phân trong môi trường kiềm, tạo thành các mảnh mới, ngắn hơn và có nhóm aldehyd cuối mạch. Đến lượt mình các aldehyd mới xuất hiện lại khởi nguồn cho quá trình bào mòn. Đó là quá trình bào mòn thứ cấp.

Như đã nghiên cứu ở 2.2.2.2, T1, phản ứng bào mòn chỉ xảy ra khi cuối mạch polysaccarit có nhóm aldehyt.

Do đó, quá trình bào mòn có thể hạn chế được khi chuyển nhóm aldehyt thành nhóm khác. Trong thực tế, nhóm cuối mạch có thể được chuyển thành COOH hoặc CH₂OH và SH.

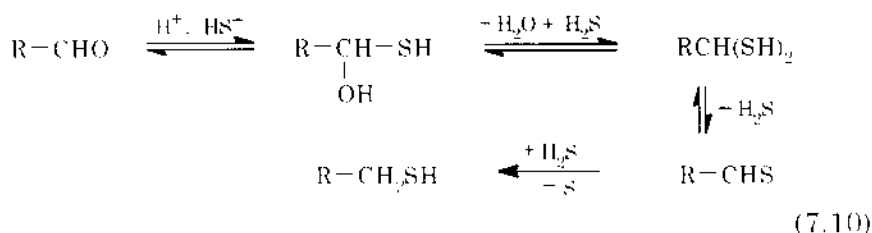
- Để chuyển nhóm aldehyt cuối mạch thành nhóm COOH, ta có thể dùng các chất oxy hoá chọn lọc, ví dụ polysulfua. Polysulfua có tác dụng oxy hoá riêng nhóm aldehyt, nhờ thế, có tác dụng ổn định mạch. Phản ứng oxy hoá này được áp dụng trong thực tế sản xuất.

Polysulfua có thể tạo thành khi oxy hoá (với sự có mặt của xúc tác) sulfua trong dịch trắng sulfat, hoặc nhờ thêm lưu huỳnh nguyên tố vào dịch nấu sulfat theo các sơ đồ sau:



- Phương pháp khử cũng có thể được sử dụng để chuyển nhóm aldehyt cuối mạch polysaccarit thành nhóm khác.

Khí gia công trước dăm gỗ (nguyên liệu nấu xenluloza) bằng H₂S (140°C, pH ≈ 7), nhóm aldehyt bị khử theo sơ đồ 7.10:



Theo phương pháp này, hiệu suất bột xenluloza có thể tăng thêm 3 ÷ 5%.

Tuy nhiên quá trình cần tiến hành ở áp suất cao, với lượng dư H₂S lớn gấp 10 lần so với gỗ, trong khi theo lý thuyết, chỉ cần 1 ÷ 2% so với gỗ. Lượng dư H₂S sau phản ứng được thu hồi để sử dụng lại.

Phương pháp khử khác khá hiệu quả là sử dụng natri borohydrua. Hiệu quả của quá trình này thể hiện rõ qua bảng 7.1.

Bảng 7.1. Hiệu quả ổn định mạch polysaccarit
(tính theo hiệu suất từng cấu tử polysaccarit, %)

	Xenluloza	Glucoman- nan	Glucurono- xylan	Hiệu suất chung
Nấu sulfat bình thường	35	4	5	44
Phương pháp oxy hoá bằng polysulfua	36	9	5	50
Phương pháp khử bằng H_2S	36	9	4	49
Phương pháp khử bằng $NaBH_4$	36	12	4	52

Như đã thấy từ bảng 7.1, khi mạch polysaccarit được ổn định, hiệu suất sản phẩm tăng lên đáng kể. Tác dụng ổn định rõ rệt nhất đối với glucomanan, một thành phần của hemixenluloza.

- Phương pháp dùng antraquinon

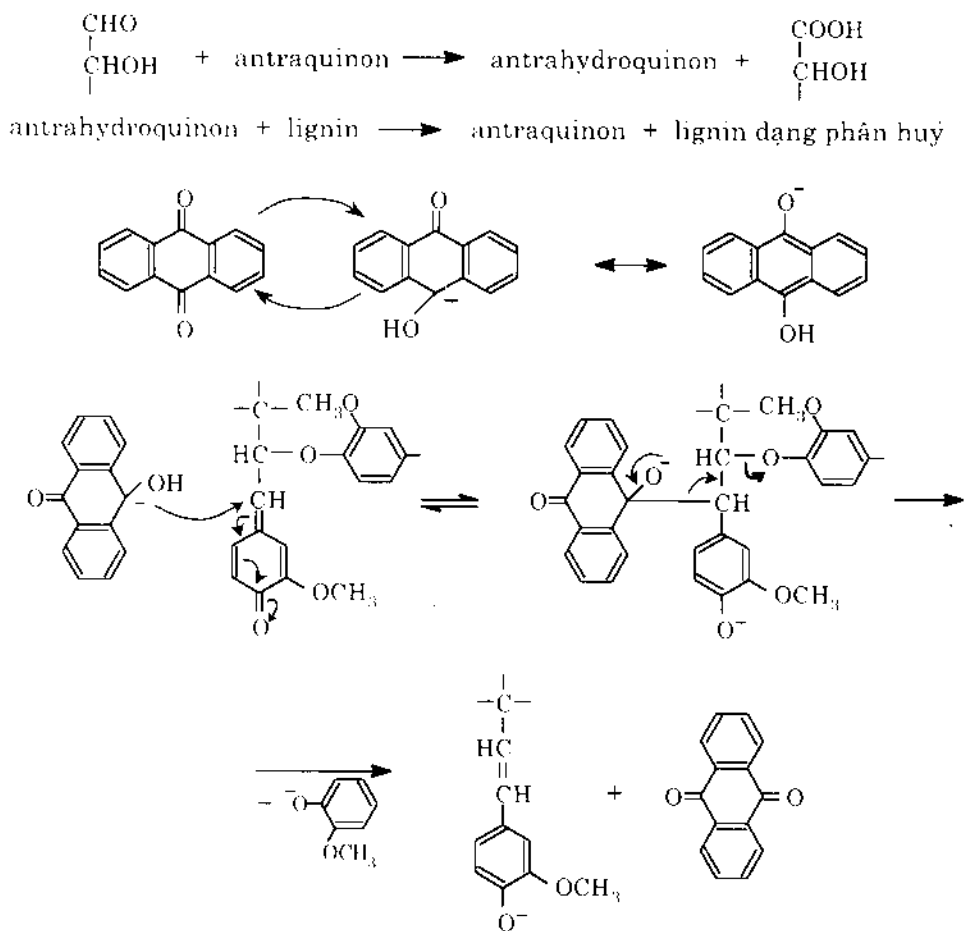
Khi nấu xenluloza phương pháp kiềm, Na_2S được dùng để tăng tốc độ hoà tan lignin, rút ngắn thời gian nấu, góp phần bảo vệ polysaccarit. Cũng có ý kiến cho rằng Na_2S là chất khử, có thể đóng một vai trò nào đó trong việc ổn định mạch polysaccarit.

Hiệu quả tương tự có thể đạt được khi thay thế toàn bộ hoặc một phần Na_2S bằng antraquinon (hoặc chất tương tự), vừa có tác dụng loại bỏ lignin nhanh hơn, vừa bảo vệ polysaccarit, tránh được phản ứng bào mòn.

Trong quá trình nấu xenluloza, khi gia nhiệt đến nhiệt độ đủ cao, antraquinon bị khử thành antrahydroquinon, còn nhóm aldehyt cuối

mạch polysaccarit bị oxy hoá thành nhóm COOH, ổn định trong môi trường kiềm.

Antrahydroquinon, tạo ra do phản ứng oxy hoá khử giữa antraquinon và cacbonyl, lại có tác dụng phân huỷ liên kết ete ở C_β trong cấu trúc lignin có OH phenol tự do. Trong phản ứng với lignin, antrahydroquinon lại chuyển hoá về dạng antraquinon. Chu trình chuyển hoá antraquinon - antrahydroquinon với sự tham gia của polysaccarit và lignin được thể hiện ở sơ đồ 7.11.



Sơ đồ 7.11. Phương pháp ổn định mạch polysaccarit bằng antraquinon, kết hợp với phản ứng phân huỷ lignin.

Dựa vào chu trình oxy hoá khử đã mô tả ở sơ đồ 7.11, ta chỉ cần sử dụng một hàm lượng nhỏ antraquinon cũng có thể đạt được mục tiêu của quá trình nấu xenluloza.

Tuỳ thuộc vào loại nguyên liệu gỗ và đòi hỏi về chất lượng sản phẩm, lượng dùng antraquinon dao động trong khoảng $0.01 \div 0.5\%$ so với gỗ khô tuyệt đối.

Phương pháp nấu xenluloza này được coi là thân thiện với môi trường và đang từng bước được áp dụng trong thực tế.

Như đã đề cập ở trên, hemixenluloza có vai trò quan trọng trong sản xuất giấy và đặc biệt là trong sản xuất cacton. ở đó, tỷ lệ hemixenluloza khá cao. Đó là ví dụ điển hình về ứng dụng hemixenluloza với tư cách là hợp chất cao phân tử.

** Ảnh hưởng của hemixenluloza lên chất lượng xenluloza cho chế biến hoá học:*

Hemixenluloza là yếu tố bất lợi đối với quá trình tổng hợp các dẫn xuất xenluloza (ete hoặc este xenluloza) cũng như trong quá trình sản xuất sợi hoàn nguyên và màng xenlophan.

Trong quá trình sản xuất xenluloza nitrat, nếu nguyên liệu còn chứa hemixenluloza, chúng sẽ bị thủy phân nhanh trong môi trường axit của khối phản ứng, gây nhiều cho quá trình công nghệ và giảm chất lượng sản phẩm.

Xenluloza nitrat và xenluloza axetat thứ cấp thường hoà tan tốt trong một số dung môi không cực, như axeton. Nếu hemixenluloza có mặt trong sản phẩm, các nhóm axit uromic của hemixenluloza sẽ ảnh hưởng đến độ hoà tan cũng như tính chất của dung dịch axetat, như làm đục dung dịch, tạo gel...

Để tổng hợp các dẫn xuất của xenluloza, trước đây thường sử dụng các nguyên liệu xơ có hàm lượng hemixenluloza thấp, như bông xơ ngắn. Gần đây, nhờ tiến bộ về công nghệ, có thể sản xuất được xenluloza chất lượng cao, theo phương pháp sulfít hoặc sulfat, đáp ứng được yêu cầu khắt khe về nguyên liệu xơ cho chế biến hoá học.

Trong quá trình sulfit, hemixenluloza bị thủy phân và hoà tan vào dịch thải. Phần hemixenluloza còn sót lại có thể được tách ra nhờ gia công kiềm với chế độ công nghệ thích hợp.

Trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfat, để giảm thiểu hàm lượng hemixenluloza, có thể tiến hành thủy phân sơ bộ trong môi trường axit vô cơ loãng hoặc trong môi trường nước ở nhiệt độ cao, với xúc tác là các axit hữu cơ xuất phát từ hemixenluloza và polyuronit.

Quá trình thủy phân sơ bộ cũng phân huỷ liên kết hoá học giữa hemixenluloza với lignin, đồng thời làm yếu tương tác hoá lý giữa lignin và xenluloza, tạo thuận lợi cho dịch nấu phân huỷ và hoà tan lignin trong công đoạn nấu sulfat tiếp theo.

** Ứng dụng hemixenluloza dưới dạng monosaccarit và sản phẩm chuyển hoá:*

Các mục vừa thảo luận đã đề cập tới vai trò của hemixenluloza với tư cách là hợp chất cao phân tử.

Hemixenluloza có thể đóng vai trò tích cực trong công nghệ giấy - cacton, hoặc thể hiện ảnh hưởng tiêu cực tới sản phẩm chế biến hoá học xenluloza.

Cũng như xenluloza, hemixenluloza còn được sử dụng dưới dạng monome hoặc các sản phẩm chuyển hoá monosaccarit.

Hemixenluloza, khi bị nhiệt phân cùng các thành phần khác của gỗ, có thể cung cấp nhiều loại sản phẩm quý.

Ngoài ra, hemixenluloza cũng được sử dụng dưới dạng các monosaccarit và sản phẩm phân huỷ tiếp theo của chúng, theo phương pháp truyền thống, đó là phản ứng thủy phân.

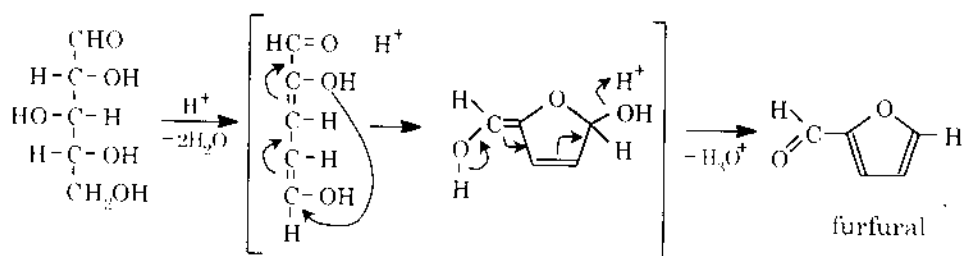
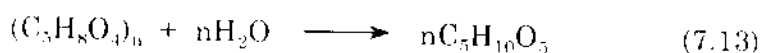
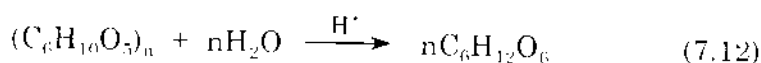
Ứng dụng truyền thống của sản phẩm phân huỷ hemixenluloza là thu dịch thủy phân hoàn toàn nguyên liệu gỗ. Sản phẩm nhận được là lignin dạng rắn và chất lỏng bao gồm các loại monosaccarit, Polysaccarit của gỗ gồm xenluloza và hemixenluloza. Trong công

nghiệp, để thu các loại monosaccarit cũng như các sản phẩm chuyển hoá khác, quá trình thủy phân gỗ thường được tiến hành trong môi trường axit.

Phản ứng thủy phân cũng có thể xảy ra dưới tác dụng của enzym (xem chương 12), nhưng phổ biến nhất vẫn là quá trình thủy phân trong môi trường axit.

Cơ chế phản ứng thủy phân xảy ra theo sơ đồ chung đã nghiên cứu ở chương 2, T1 và chương 4, T1.

Nhìn chung, hemixenluloza dễ bị thủy phân hơn nhiều so với xenluloza. Sản phẩm của quá trình thủy phân hemixenluloza là pentoza, hexoza, axit uronic và một số sản phẩm phân huỷ khác như furfural... (sơ đồ 7.12 ÷ 7.14).



Sơ đồ 7.14. Sự chuyển hoá pentoza trong môi trường axit.

Nếu monosaccarit là hexoza, sản phẩm quá trình chuyển hoá dưới tác dụng của axit sẽ là hydroxymethylfurfural:



Trong điều kiện nhiệt độ cao, môi trường axit, hydroxymethylfurfural biến đổi tiếp thành axit levulinic và axit formic. Axit levulinic

có thể vòng hoá thành lacton dạng α và β .

Quá trình thủy phân có thể tiến hành trong dung dịch axit đậm đặc hoặc axit loãng. Xúc tác thường dùng là axit sulfuric hoặc axit clohydric cũng như HCl ở trạng thái khí. Nhiệt độ tùy thuộc vào nồng độ axit. Khi tiến hành quá trình trong axit đậm đặc, phản ứng thủy phân có thể xảy ra ở nhiệt độ thường. Quá trình thủy phân trong axit loãng thực hiện ở $140 \div 180^\circ\text{C}$. Công nghệ thủy phân trong axit loãng có thể khác nhau, nhưng nguyên tắc chung là phải nhanh chóng đưa sản phẩm ra khỏi vùng phản ứng để tránh chuyển hoá tiếp tục.

Ví dụ, quá trình thủy phân gỗ được thực hiện với xúc tác là H_2SO_4 nồng độ 0,5%, nhiệt độ tăng dần dần đến 180°C . Sản phẩm của quá trình được liên tục tách ra để tránh phân huỷ tiếp. Dung dịch sau thủy phân chứa 4 ÷ 6% đường, được đưa đi trung hoà axit và cô đặc nhờ bốc hơi. Hiệu suất đường thường dao động trong khoảng 50 ÷ 55% so với gỗ khô, tùy thuộc loại nguyên liệu gỗ.

Trong điều kiện trên, hầu hết hemixenluloza bị thủy phân, nhưng một phần khá lớn xenluloza không bị phân huỷ.

Quá trình thủy phân cũng có thể được thực hiện qua hai bước. Bước thứ nhất, dùng dung dịch H_2SO_4 loãng để thủy phân hemixenluloza. Bước tiếp theo, dùng dung dịch H_2SO_4 đậm đặc, ví dụ 80%, để thủy phân phần polysaccarit còn lại (chủ yếu là xenluloza). Sản phẩm quá trình dùng axit đậm đặc là oligome. Để thu nhận monosaccarit, cần tiến hành pha loãng và đun nóng để thủy phân tiếp oligosaccarit.

Quá trình thủy phân cũng được tiến hành với axit clohydric đậm đặc, nồng độ thường dùng trong khoảng 30 ÷ 40%. Quá trình cũng có thể tiến hành theo nhiều giai đoạn, ứng với nồng độ khác nhau.

Công nghiệp thủy phân khá phát triển ở một số nước tiên tiến. Đường hexoza thu được từ quá trình thủy phân gỗ, trong đó một phần từ hemixenluloza, được lên men để sản xuất rượu etylic. Từ etylic, có

thể thu được nhiều sản phẩm khác nhau, như etylen, etylen oxyt, axetaldehyt, axit axetic, butadien...

Rượu etylic hiện còn được dùng để làm nhiên liệu động cơ, dưới dạng hỗn hợp với xăng (gasohol), giảm bớt ô nhiễm môi trường.

Đường pentoza trong dịch thuỷ phân không bị lên men rượu để thành etylic như hexoza. Nhưng từ pentoza, có thể thực hiện nhiều quá trình hoá học để thu nhận nhiều loại sản phẩm khác nhau.

Xyloza là đồng phân quan trọng nhất của pentoza.

Xyloza bị khử thành rượu năm chức hydroxyl là xylitol (hoặc xylit). Trong công nghiệp, để sản xuất xylitol, thường tiến hành hydro hoá xyloza, dưới tác dụng của xúc tác niken.

Nguyên liệu cho hydro hoá có thể là xyloza nguyên chất hoặc dưới dạng hỗn hợp với *D*-glucoza trong dịch thuỷ phân. Khi dùng hỗn hợp để làm nguyên liệu, xyloza bị hydro hoá thành xylitol, còn glucoza bị hydro hoá thành *D*-sorbitol (*D*-sorbit). Xylitol và sorbitol có thể phân riêng nhờ kết tinh chọn lọc.

Xylitol là chất ngọt nhưng không gây sâu răng như saccaroza. Xylitol được dùng trong truyền máu để tránh sốc sau phẫu thuật, dùng làm chất lợi tiểu, dùng làm chất hoá dẻo, sản xuất este, dùng trong hoá mỹ phẩm...

Sorbitol cũng có nhiều ứng dụng thực tế. Sorbitol là hợp chất có trong tự nhiên, như trong quả anh đào, quả đào, đồng thời cũng là sản phẩm của quá trình hydro hoá như đã trình bày ở trên. Sorbitol dùng để sản xuất axit ascorbic (vitamin C). Sorbitol là chất ngọt dùng cho người không đường. Sorbitol cũng dùng làm chất hoá dẻo, dùng trong mỹ phẩm, chất hoạt động bề mặt...

** Xu hướng sử dụng hiệu quả hemixenluloza:*

Xu hướng đáng lưu ý của hoá học hemixenluloza hiện đại là nghiên cứu sử dụng hemixenluloza một cách hiệu quả nhất, trên cơ sở sử dụng tổng hợp nguyên liệu gỗ.

Trong quá trình sản xuất xenluloza theo phương pháp sulfat, hemixenluloza cùng với lignin bị phân huỷ và hoà tan vào dịch nấu, sau đó được đưa sang công đoạn thu hồi kiềm. Vai trò của hemixenluloza cũng như của lignin là cung cấp nguồn cacbon cho phản ứng khử Na_2SO_4 thành Na_2S và cung cấp năng lượng khi cháy. Tuy nhiên, nhiệt trị của hemixenluloza thấp hơn so với lignin. Do đó, việc tận dụng hemixenluloza để sinh nhiệt là kém hiệu quả kinh tế. Để nâng cao hiệu quả sử dụng hemixenluloza, một số nhà nghiên cứu cho rằng, nên chuyển hemixenluloza thành các sản phẩm hữu ích hơn, thay vì đốt cháy để cấp năng lượng.

Biện pháp đơn giản là tiến hành thủy phân hemixenluloza trước khi nấu xenluloza theo phương pháp thông thường. Mức độ thủy phân có thể điều chỉnh để giữ lại một phần hemixenluloza trong sản phẩm xơ, nếu cần. Phần gỗ còn lại chủ yếu gồm lignin và xenluloza được đưa vào nấu theo phương pháp sulfat thông thường để loại bỏ lignin, thu được sản phẩm xenluloza chất lượng cao.

Để quá trình thủy phân trong môi trường axit mạnh không ảnh hưởng tới chất lượng xenluloza sau nấu chính thức, công đoạn thủy phân được tiến hành ở nhiệt độ vừa phải (nhỏ hơn 135°C).

Khi sản xuất xenluloza cho chế biến hoá học, quá trình thủy phân được tiến hành trong môi trường axit loãng hoặc nước đơn thuần, ở nhiệt độ cao hơn, để loại bỏ triệt để hemixenluloza. Ở trường hợp thủy phân trong môi trường nước, quá trình hoá học thực tế vẫn diễn ra dưới tác dụng của xúc tác hữu cơ. Các axit này tách ra dần từ hemixenluloza do thủy phân este. Công đoạn xử lý này được gọi là thủy phân sơ bộ, nhiệm vụ chính là tăng hàm lượng α -xenluloza.

7.3. PECTIN VÀ CÁC CHẤT PECTIN

Một trong những hợp chất cao phân tử phi xenluloza có trong thực vật là pectin.

Pectin là dẫn xuất polysaccarit, phân tử của chúng bao gồm các đơn vị mắt xích axit α -*D*-galacturomic. Các đơn vị này nối với nhau nhờ liên kết glycozit 1-4.

Mỗi đơn vị mắt xích chứa một nhóm cacboxyl ở vị trí C_6 . Các nhóm axit này tồn tại ở trạng thái tự do hoặc dưới dạng liên kết este (metyl este). Trong pectin tự nhiên thường có khoảng 3/4 số nhóm axit bị metyl hoá.

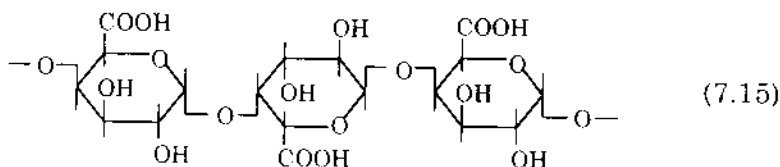
Pectin thương mại được phân thành hai loại với mức độ thế DS khác nhau. Loại pectin mức độ este hoá thấp có $DS < 0.5$, loại pectin với mức độ thế cao có $DS > 0.5$. Tùy theo mục đích sử dụng, ta có thể lựa chọn loại pectin với mức độ este hoá thích hợp.

Ở pectin tự nhiên, các nhóm hydroxyl ở C_2 và C_3 của mỗi đơn vị mắt xích có thể bị este hoá một phần bởi axit axetic hoặc axit phosphoric.

Một phần nhóm axit không este hoá tham gia tạo liên kết ngang với ion canxi và magie.

Dưới tác dụng của xúc tác axit hoặc xúc tác sinh học pectinaza, pectin bị thủy phân thành axit *D*-galacturonic, trong đó, metyl este cũng bị phân huỷ (xem chương 12).

Pectin dạng polyme, trong đó nhóm cacboxyl hoàn toàn tự do, gọi là axit pectinic (sơ đồ 7.15).



Trong tự nhiên, pectin không tồn tại độc lập mà thường đi kèm với polysaccarit khác, khi thủy phân tạo ra *L*-arabinoza và *D*-galactoza. Pectin cùng với các polysaccarit này gọi là các chất pectin. Tỷ lệ giữa các đơn vị monosaccarit và dẫn xuất thay đổi trong khoảng

rộng. Các chất pectin thuộc nhóm polyuronit vì có nhóm monome uronic.

Các nhà khoa học cho rằng, trong thực vật, các thành phần trong các chất pectin không chỉ tương tác hoá lý mà còn có liên kết hoá học. Có tác giả cho rằng, các chất pectin có mạch chính là polyme tạo thành từ các đơn vị mắt xích *D*-galacturonic, với các nhánh gồm các đơn vị mắt xích *D*-galactopyranoza và *L*-arabinofuranoza, liên kết 1-2 và 1-3.

Khối lượng phân tử của pectin dao động trong khoảng $3.000 \div 280.000$, tùy thuộc nguồn gốc thực vật.

Dung dịch pectin có độ nhớt cao và có khả năng gelatin hoá. Khả năng này xuất hiện ở pectin có khối lượng phân tử cao hơn 20.000.

Độ hoà tan của pectin trong nước phụ thuộc vào mức độ este hoá nhóm cacboxyl. Mức este hoá càng cao, độ hoà tan càng cao, nhưng khả năng gelatin hoá lại giảm.

Các chất pectin được tách từ thực vật bằng nước nóng, nhưng tốt hơn là dung dịch 0,5% amoni oxalat. Khi đun nóng, các cầu nối Ca^{2+} , Mg^{2+} giữa các mạch pectin chuyển thành dạng muối amoni hoà tan trong nước.

Từ dung dịch nước, pectin được kết tủa bằng rượu dưới dạng bông xốp. Để làm sạch, ta có thể hoà tan rồi kết tủa chúng nhiều lần, sau đó kết tủa lại bằng muối canxi.

Hàm lượng axit galacturonic có thể xác định bằng sắc ký hoặc dựa vào lượng CO_2 thoát ra khi đun nóng với HCl 12%.

Hàm lượng nhóm metoxyl được xác định bằng cách thủy phân trong dung dịch NaOH 1% rồi xác định lượng metylic thoát ra nhờ phương pháp vật lý...

Ở các loài thực vật khác nhau, các chất pectin có thể tồn tại ở quả, lá hay ở thân gỗ hoặc vỏ cây.

Trong cây lanh, rơm rạ có khoảng $0,5 \div 2\%$ pectin. Trong gỗ, hàm lượng pectin dao động trong khoảng $0,5 \div 1\%$, thường ở gỗ lá rộng hàm lượng pectin nhiều hơn ở gỗ lá kim. Chất pectin có nhiều trong tế bào libe, ví dụ, trong libe của thông có 10%, bạch dương 11% so với khối lượng tế bào.

Pectin có nhiều trong tầng phát sinh của gỗ.

Pectin cũng có ở lớp liên kết các tế bào. Trong thời kỳ sinh trưởng, pectin ở lớp này liên tục biến đổi. Có lẽ pectin đảm bảo độ bền và độ dẻo của phần cây non. Sau đó, chất pectin chuyển hoá và hàm lượng của chúng giảm đi.

Chất pectin trương mạnh trong nước. Nước được giữ bởi các chất pectin rất khó bay hơi, do đó, thực vật có nhiều pectin có thể chịu được điều kiện khí hậu khắc nghiệt. Có lẽ pectin cũng đóng vai trò trao đổi nước trong thời kỳ sinh trưởng của cây.

Các chất pectin không phải là cấu tử của thành tế bào, vì thế có trường hợp các chất pectin được xếp vào nhóm chất trích ly.

Tuy vậy, về cấu tạo hoá học, các chất pectin rất gần với hemixenluloza, nên trong giáo trình này, pectin được thảo luận cùng với hemixenluloza.

Pectin có nhiều ứng dụng trong công nghiệp và đời sống. Các nhà công nghệ thực phẩm dùng pectin làm chất tạo gel, như dùng trong sản xuất mứt quả. Pectin cũng được dùng trong y dược, hoá mỹ phẩm...

Chương 8

LIGNIN – KHÁI NIỆM CHUNG

Hóa học lignin là bộ phận quan trọng của hoá học gỗ. Một số vấn đề mấu chốt đã được làm sáng tỏ. Tuy nhiên, các nhà nghiên cứu đang sử dụng các phương pháp hiện đại để hiểu sâu hơn về cấu tạo hoá học và cấu trúc của lignin. Nhiều thành tựu mới vẫn tiếp tục được công bố.

Sự phân huỷ lignin dưới tác dụng của xúc tác enzym, cũng là chủ đề hấp dẫn các nhà khoa học và công nghệ. Vấn đề này sẽ được đề cập ở chương 12.

Lignin là một trong những polyme có nguồn gốc sinh học phổ biến nhất trong tự nhiên.

Lignin chiếm khoảng 30% khối lượng gỗ khô ở cây lá kim, khoảng 20% ở cây lá rộng.

Lignin không tồn tại trong thực vật bậc thấp, như rong tảo, nấm.

Lignin cùng với hemixenluloza và xenluloza tạo nên thành tế bào gỗ. Khối vật liệu composit nguồn gốc tự nhiên này làm cho gỗ có độ bền cơ cao và bảo đảm cho cây cứng cáp.

Trong công nghiệp, quá trình biến đổi hoá học thường gặp nhất là delignin hoá. Delignin hoá là phân huỷ và hoà tan lignin từ nguyên liệu gỗ và một số loại thực vật khác để thu sản phẩm xơ sợi.

Lignin thu được dưới dạng sản phẩm phụ của quá trình thủy phân gỗ hoặc quá trình nấu xenluloza là nguồn nguyên liệu quan trọng để sản xuất một số hoá chất có đặc trưng phenol.

Trong chương này, chúng ta sẽ thảo luận về sự hình thành lignin trong tự nhiên, cấu tạo hoá học, cấu trúc của lignin và tính chất hoá lý và hoá học chung của lignin.

8.1. CẤU TẠO PHÂN TỬ LIGNIN

Lignin là hợp chất cao phân tử có đặc tính thơm. Bộ khung của đơn vị mắt xích lignin là phenyl propan (sơ đồ 8.1). Thành phần hoá học của lignin thay đổi tùy theo loài thực vật. Lignin của thực vật được chia thành ba loại:

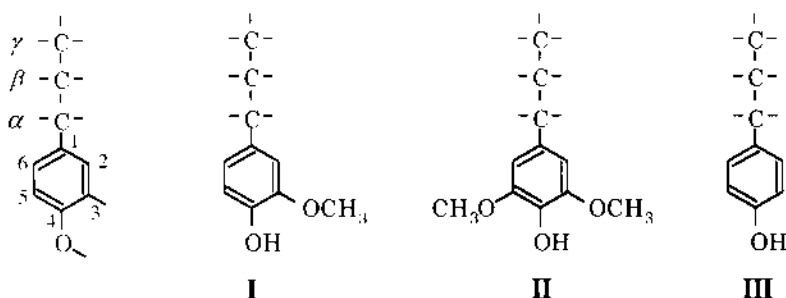
1. Lignin gỗ lá kim.
2. Lignin gỗ lá rộng.
3. Lignin cây thân thảo và cây hàng năm.

Lignin gỗ lá kim gồm các đơn vị mắt xích guaiacylpropan (I) (4-hydroxy-3-metoxy phenylpropan)

Lignin gỗ lá rộng, ngoài guaiacylpropan, còn chứa các đơn vị mắt xích 3,5-dimetoxy-4-hydroxy phenylpropan (II).

Lignin các loài thân thảo, ngoài các đơn vị mắt xích trên, còn có 4-hydroxy phenylpropan (III).

Lignin họ tre và họ cọ có thể xếp vào nhóm III.

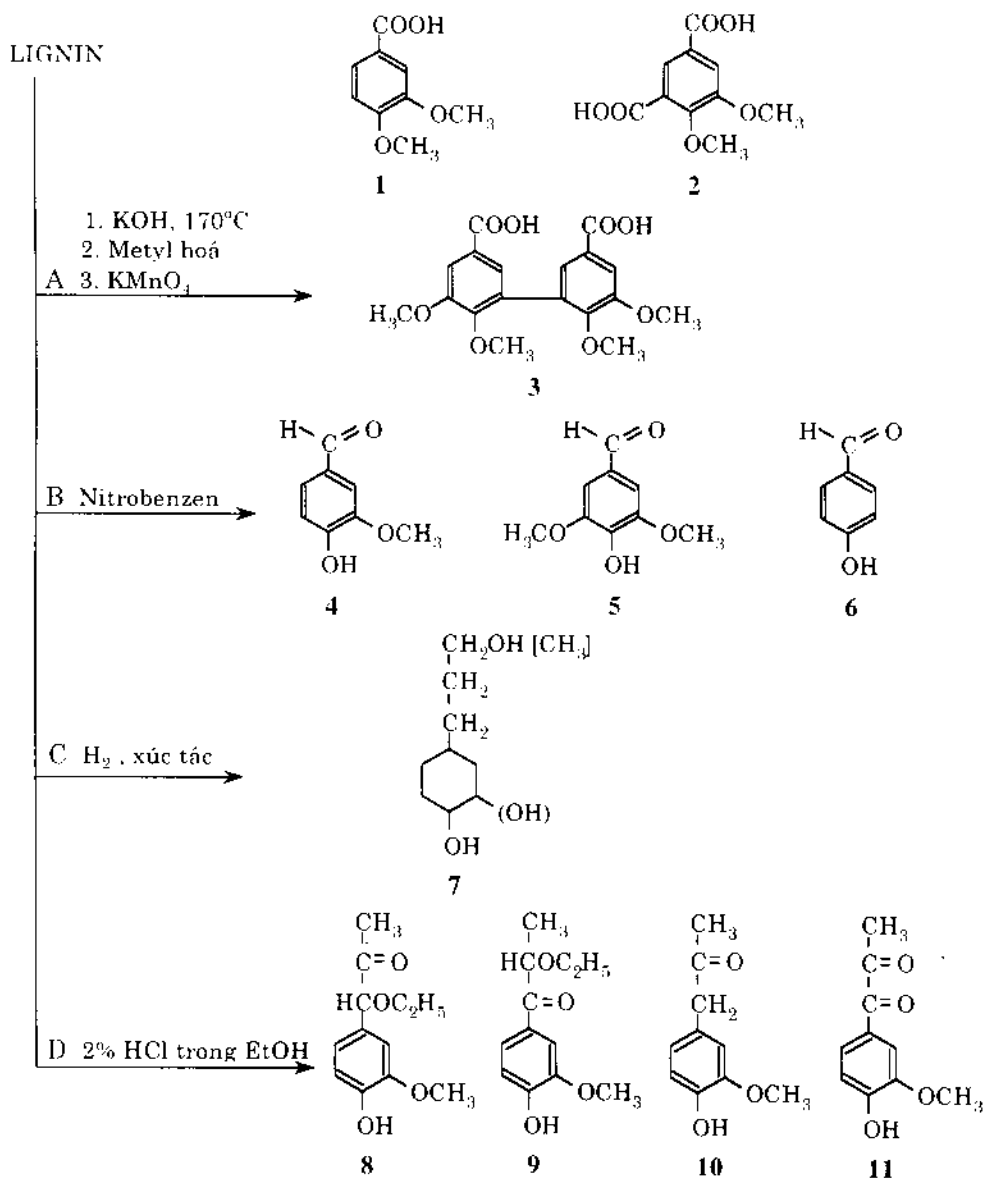


Sơ đồ 8.1. Đơn vị cấu tạo cơ bản của lignin.

Các vị trí của C ở nhánh propan được ký hiệu bằng α , β , γ . Các vị trí C trong nhân thơm được đánh số 1, 2, 3, 4, 5, 6 như ở sơ đồ 8.1.

8.1.1. Nghiên cứu lignin qua phản ứng phân huỷ

Trước đây, để nghiên cứu cấu tạo của lignin, các nhà khoa học đã áp dụng nhiều phương pháp dựa trên hoá học hữu cơ cổ điển, đó là khảo sát các sản phẩm của quá trình chuyển hoá (sơ đồ 8.2).



Sơ đồ 8.2. Các sản phẩm từ lignin:

1. axit veratric (axit 3.4-dimetoxybenzoic); 2. axit isohemipinic (axit 4.5-dimetoxy isophtalic); 3. axit dehydrodiveratric; 4. vanilin (4-hydroxy-3-metoxybenzaldehyt); 5. syringaldehyt (3.5-dimetoxy-4-hydroxybenzaldehyt); 6. *p*-hydroxybenzaldehyt; 7. dẫn xuất của propylxyclohexan; 8. 9. 10. 11. các hợp chất chứa nhóm xeton.

Khi phân huỷ lignin bằng dung dịch kali hydroxit ở 170°C, tiếp đó metyl hoá rồi oxy hoá bằng permanganat, các tác giả thu được axit veratric (1), với hiệu suất 8%, một lượng nhỏ axit isohemipinic (2) và dehydrodiveratric (3).

Sự có mặt của axit isohemipinic chứng tỏ trong lignin có liên kết hoá học qua vị trí C₅.

Oxy hoá lignin gỗ lá kim bằng nitrobenzen trong môi trường kiềm, ta thu được vanilin (4) với hiệu suất 25%.

Khi oxy hoá lignin gỗ lá rộng, các nhà nghiên cứu thu được syringaldehyt (5); với nguyên liệu đầu là lignin loài thân thảo, sản phẩm là *p*-hydroxybenzaldehyt (6).

Hydro hoá lignin dưới tác dụng của xúc tác đưa tới các dẫn xuất của propylxyclohexan (7).

Dưới tác dụng của hỗn hợp gồm 2% HCl trong etanol, lignin bị phân huỷ thành các hợp chất chứa nhóm xeton 8, 9, 10, 11 (sơ đồ 8.2).

8.1.2. Nghiên cứu lignin qua quá trình sinh tổng hợp

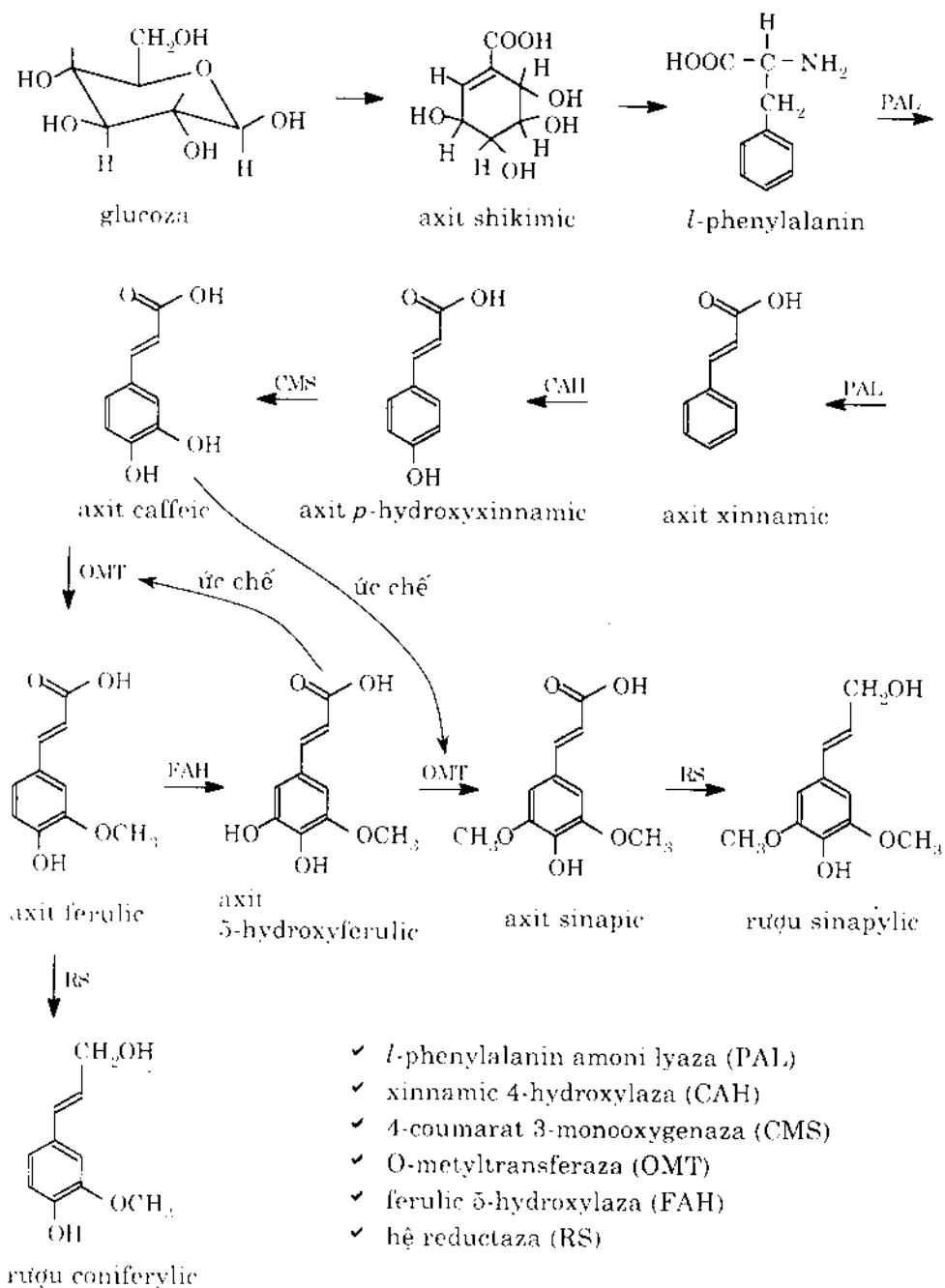
Vào 1930, Erdtman đã nghiên cứu dime hoá - oxy hoá một số hợp chất phenol tự nhiên và cho rằng lignin tạo thành từ cấu tử có mạch cacbon C₆C₃, với liên kết đôi ở C_α và C_β, qua phản ứng dehydro hoá dưới tác dụng của xúc tác enzym. Sau đó, nhiều tác giả khác cũng nghiên cứu chủ đề này.

8.1.2.1. Sinh tổng hợp tiền chất của lignin

Vào 1971, Higuchi công bố kết quả tổng hợp lignin từ *l*-phenylalanin và axit xinnamic. Các axit này hình thành từ cacbohydrat, qua giai đoạn trung gian là axit shikimic.

Trước đó, từ glucoza đánh dấu và đưa vào thực vật, một số tác giả đã thu được axit shikimic và lignin hoạt động phóng xạ.

Quá trình lignin hoá xảy ra với sự chuyển hoá *l*-phenylalanin thành *trans*-xinnamic theo sơ đồ 8.3.



Sơ đồ 8.3. Chuyển hoá *l*-phenylalanin thành tiền chất của lignin.

Phản ứng tách nhóm amin xảy ra dưới tác dụng của xúc tác *l*-phenylalanin amoni lyaza (PAL), một loại enzym quan trọng trong thực vật, có tác dụng tổng hợp lignin cũng như một số dẫn xuất xinnamic.

Axit xinnamic chuyển hoá thành dạng phenol, như axit *p*-coumaric và caffeic, nhờ enzym hydroxylaza (CAH). Sau đó, axit caffeic bị metyl hoá thành axit ferulic, dưới tác dụng của xúc tác O-metyltransferaza (OMT).

Từ đây, quá trình đi theo hai hướng, tuỳ thuộc chức năng hoạt động của hai dạng OMT và tác dụng-ức chế của một số chất trong hệ phản ứng đối với OMT, dẫn tới hai loại tiền chất khác nhau của lignin là coniferylic và sinapylic, xây dựng nên lignin gỗ lá kim và gỗ lá rộng.

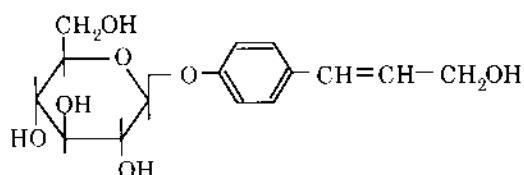
Một loại enzym quan trọng nữa là ferulic 5-hydroxylaza. Enzym này xúc tiến quá trình tạo ra axit 5-hydroxyferulic.

Do enzym này không có mặt trong gỗ lá kim nên đơn vị mắt xích của lignin chỉ chứa một nhóm metoxy.

Đối với quá trình tạo axit sinapic, enzym OMT hai chức cũng bị ức chế một phần, theo cơ chế chuyển hoá ngược 5-hydroxyferulic thành axit ferulic. Do đó, ở gỗ lá rộng tồn tại hai loại đơn vị mắt xích, một loại có một nhóm metoxy, loại khác có hai nhóm.

Bước cuối cùng hoàn thành quá trình tổng hợp tiền chất của lignin là phản ứng khử, dưới tác động của hệ enzym reductaza (RS), chuyển axit sinapic thành rượu sinapylic và axit ferulic thành coniferylic.

Các tiền chất của lignin dễ bị oxy hoá. Trong thành tế bào thực vật, chúng ở dưới dạng hợp chất glycozit ổn định hơn, ví dụ, coniferin (sơ đồ 8.4) (xem khái niệm glycozit ở chương 2, tập 1).

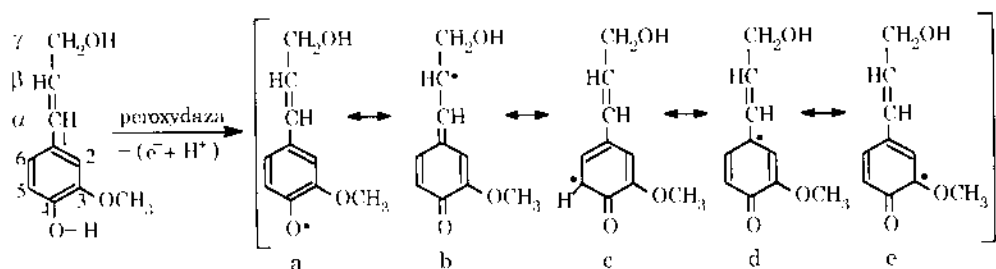


Sơ đồ 8.4. Coniferin – hợp chất glycozit của rượu coniferylic.

8.1.2.2. Quá trình dehydro hoá tiền chất của lignin

Các nghiên cứu của Higuchi, Harkin và Obst chứng tỏ rằng trong thực vật, quá trình dehydro hoá - polyme hoá các monome – tiền chất của lignin – xảy ra dưới tác dụng của enzym peroxidaza, hoặc hệ peroxidaza – H_2O_2 (xem thêm chương 12).

Các enzym này có khả năng tách proton từ nhóm hydroxyl phenol của tiền chất phenylpropan, tạo ra các gốc tự do cộng hưởng (sơ đồ 8.5).



Sơ đồ 8.5. Sự hình thành gốc tự do ổn định cộng hưởng từ coniferyl alcol.

Sau khi xuất hiện các gốc tự do phenoxy, quá trình hình thành lignin diễn ra với tốc độ rất lớn. Lúc này phản ứng không chịu sự chi phối của enzym mà xảy ra theo cơ chế trùng hợp và cộng hợp.

Freudenberg đã tạo bước ngoặt lớn trong hoá học lignin. Tác giả đã tiến hành thực nghiệm để chứng minh cho thuyết dehydro hoá - polyme hoá dưới tác động khởi nguồn của enzym.

Laccaza và enzym oxy hoá khác lấy từ nước ép của nấm *Psalliotia campestris* xúc tiến quá trình dehydro hoá rượu coniferylic dẫn tới trùng hợp, tạo thành chất tương tự lignin.

Khi sử dụng hệ peroxidaza – H_2O_2 , Freudenberg và một số tác giả khác cũng thu được polyme giống lignin.

Với nguyên liệu đầu là rượu sinapylic, quá trình trùng hợp cũng xảy ra tương tự.

Từ sơ đồ 8.5 ta thấy, các gốc tự do về nguyên tắc đều có thể tham gia phản ứng. Tuy nhiên, hoạt tính và khả năng tạo thành liên kết của các dạng cộng hưởng phụ thuộc vào mật độ điện tử và yếu tố không gian.

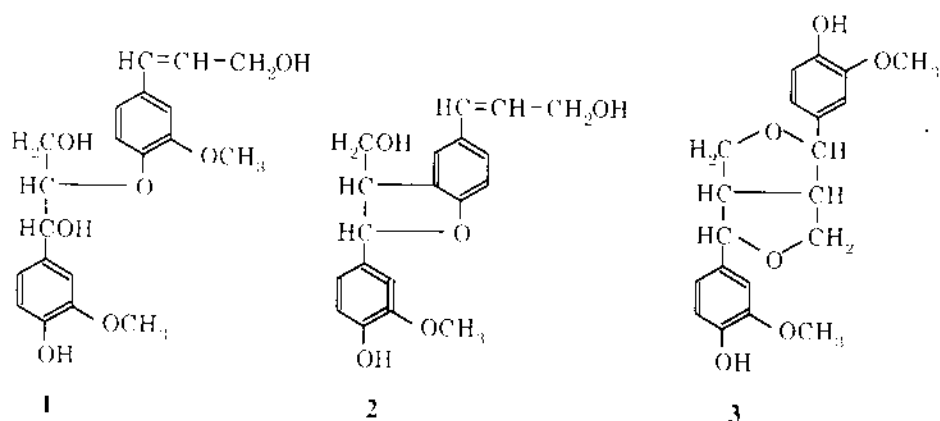
Tính toán về hoá lượng tử đối với chất mô phỏng lignin đã chỉ ra rằng mật độ spin điện tử tự do cao nhất ở các vị trí nhất định trong đơn vị phenylpropan.

Các vị trí có khả năng phản ứng là C_1 và C_5 của phenylpropan, hydro của OH phenol và C_{β} .

Tuy nhiên, vị trí mang nhóm thế như C_1 và C_3 trong rượu coniferyllic và C_1 , C_3 , C_5 trong rượu sinapyllic ít hoạt động hơn.

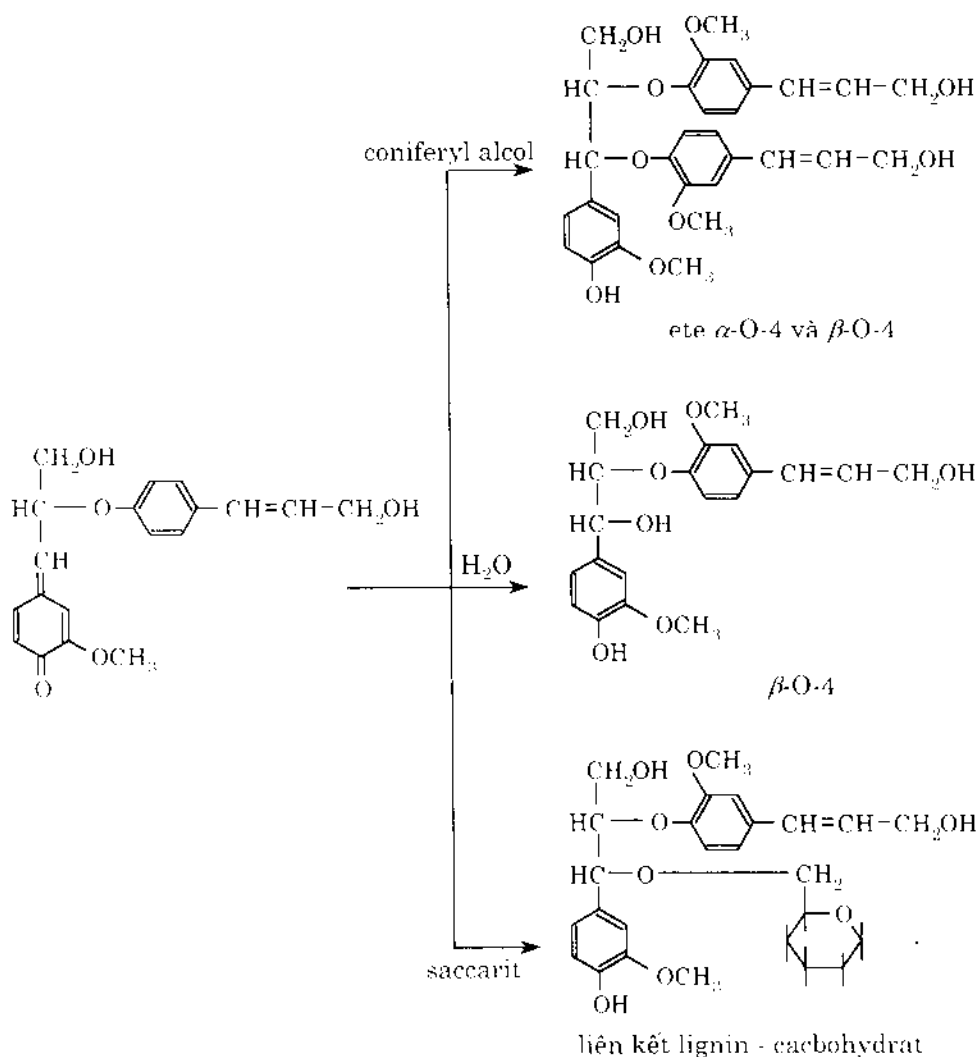
Như vậy, oxy của nhóm phenoxy và vị trí C_{β} là các trung tâm hoạt động mạnh nhất, dễ dàng liên kết tạo thành ete. Do đó, loại liên kết ete β -O-4 chiếm tỷ lệ cao nhất, 48% ở gỗ lá kim và 60% ở gỗ lá rộng (bảng 8.1).

Tuỳ theo khả năng phản ứng, các gốc tự do kết hợp với nhau, tạo thành các loại dime khác nhau (sơ đồ 8.6).



Sơ đồ 8.6. Các dạng dime tạo thành từ gốc tự do phenoxy.

Trong số các sản phẩm dime, dạng quinon metit (metylenquinon) có hoạt tính cao, dễ dàng kết hợp với tác nhân nucleophil (sơ đồ 8.7).



Sơ đồ 8.7. Phản ứng kết hợp tác nhân nucleophil với dime dạng quinon metit.

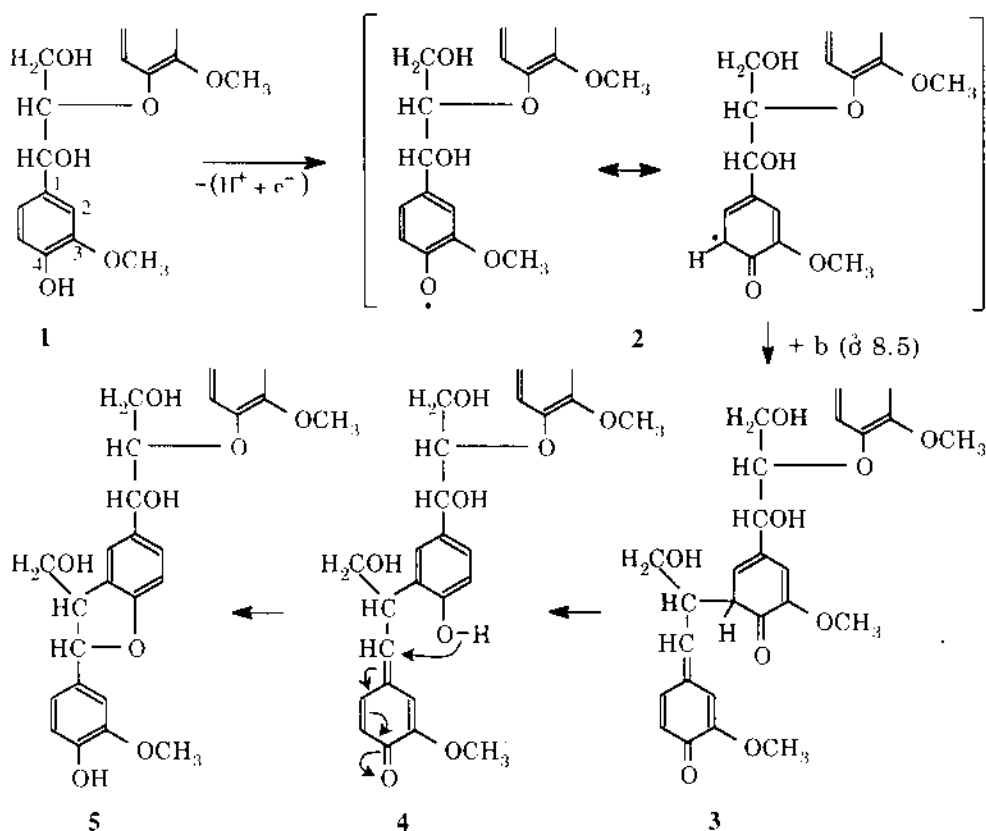
Trong hệ phản ứng cũng diễn ra quá trình chuyển mạnh, khi gốc tự do tách một nguyên tử hydro nào đó khỏi dime (hoặc phân tử có cấu trúc lớn hơn) tạo thành gốc tự do mới.

Gốc mới lại tồn tại dưới nhiều dạng cộng hưởng và tham gia phản ứng với mức độ khác nhau (sơ đồ 8.8).

Các gốc oligome có thể phản ứng với nhau theo kiểu “trùng hợp khối”, tạo thành lignin cao phân tử.

Các monome cũng trực tiếp kết hợp với oligome, làm giảm số lượng nối đôi ở phần mạch propan của đơn vị mất xích phenylpropan.

Sản phẩm chung của phản ứng sẽ là các phân tử lignin có cấu trúc phức tạp.

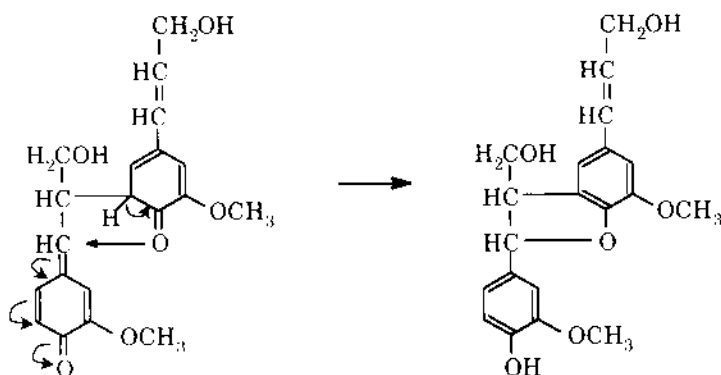


Sơ đồ 8.8. Phản ứng trùng hợp – cộng hợp vào cuối mạch dime (hoặc cấu trúc lớn hơn):

Dạng phenol của dime (1) chuyển thành dạng gốc tự do cộng hưởng (2). Dạng (2) phản ứng với dạng (b) trong sơ đồ (8.5), tạo thành dạng trung gian (3). Dạng (3) tautome hoá thành dạng phenol và quinon metit (4). Tiếp đó dạng (4) chuyển thành dạng vòng phenylcoumaran (5).

8.1.3. Các loại liên kết giữa các đơn vị phenylpropan

Dime đầu tiên được tách ra và nghiên cứu là cấu trúc coumaran, tạo thành nhờ kết hợp hai gốc tự do cộng hưởng dạng b và c trong sơ đồ 8.5. Hiệu ứng điện tử và phản ứng diễn ra theo sơ đồ 8.9.



Sơ đồ 8.9. Sự hình thành cấu trúc phenylcoumaran.

Loại cấu trúc này chiếm khoảng 6% số đơn vị phenylpropan của lignin gỗ vân sam.

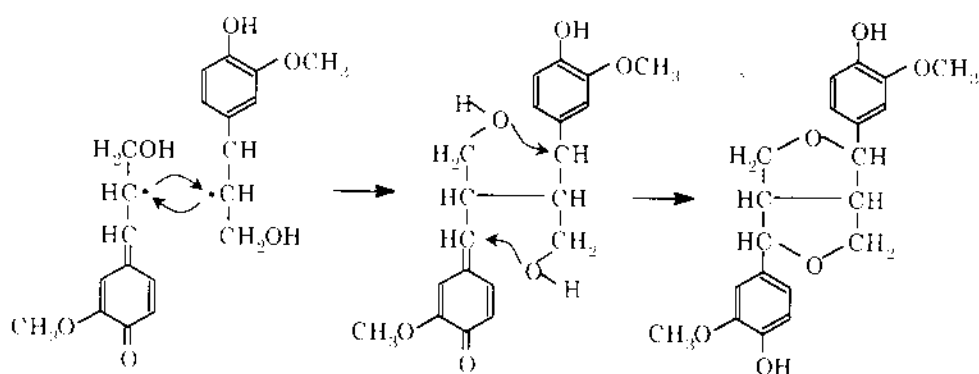
Cấu trúc ete benzyl – alkyl tồn tại với lượng nhỏ, khoảng 2 – 3%. Tuy nhiên, bằng kỹ thuật NMR hiện đại (1995), Ede và Kilpeläinen không tìm thấy cấu trúc này trong lignin bột gỗ.

Liên kết ete β -O-4 giữa các đơn vị mất xích là dạng tổ hợp phổ biến của dime, chiếm tới 45 – 60%, trong khi đó, liên kết ete α , β ít hơn 1%. Tuy nhiên, các phân tích NMR hiện đại đã được tiến hành để xem xét lại số liệu này (Crestini và Argyropoulos 1997).

Một cấu trúc dime khác của lignin chứa hai liên kết ete là pinoresinol, với tỷ lệ ít hơn 5%.

Cấu trúc này hình thành khi hai đơn vị có gốc tự do ở C_β tác dụng với nhau, tạo thành liên kết β - β , sau đó đóng vòng theo sơ đồ 8.10.

Cấu trúc benzylic cũng là dạng thường gặp trong lignin, chiếm hơn 30% số đơn vị phenylpropan. Nhóm hydroxyl ở C_α xuất hiện khi dạng quinon metit tác dụng với nước (sơ đồ 8.7).



Sơ đồ 8.10. Sự hình thành cấu trúc dime pinoresinol trong lignin.

Cấu trúc benzylic tạo thuận lợi cho quá trình phân huỷ liên kết ete arylglyxerol- β -aryl (thường gọi tắt là liên kết ete β -aryl) khi nấu xenluloza theo phương pháp xút và sulfat, nhờ tạo thành cấu trúc epoxit hoặc episulfua (xem chương 9).

Cấu trúc 5-5'-biphenyl (liên kết C_5-C_5) và cấu trúc diarylmetan (liên kết C_6-C_7), là các dime chứa liên kết cacbon – cacbon, bên trong điều kiện nấu xenluloza theo phương pháp sulfit hoặc sulfat.

Dime 5-5'-biphenyl tồn tại trong lignin tự nhiên. Ngược lại, cấu trúc diarylmetan xuất hiện do phản ứng ngưng tụ lignin trong môi trường kiềm (xem chương 9).

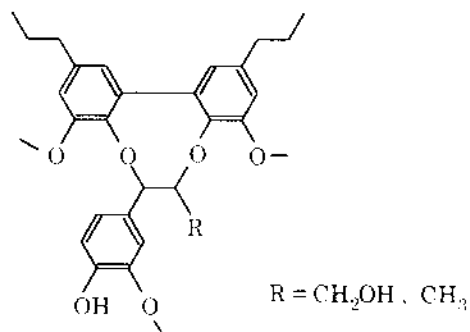
Ở gỗ lá kim, vị trí C_5 không có nhóm metoxy. Do đó, khả năng xuất hiện liên kết dime với sự tham gia của C_5 nhiều hơn so với gỗ lá rộng.

Một loại liên kết khác giữa các đơn vị phenylpropan được nhóm Brunow phát hiện 1995, đó là cấu trúc dibenzodioxoxin (sơ đồ 8.11).

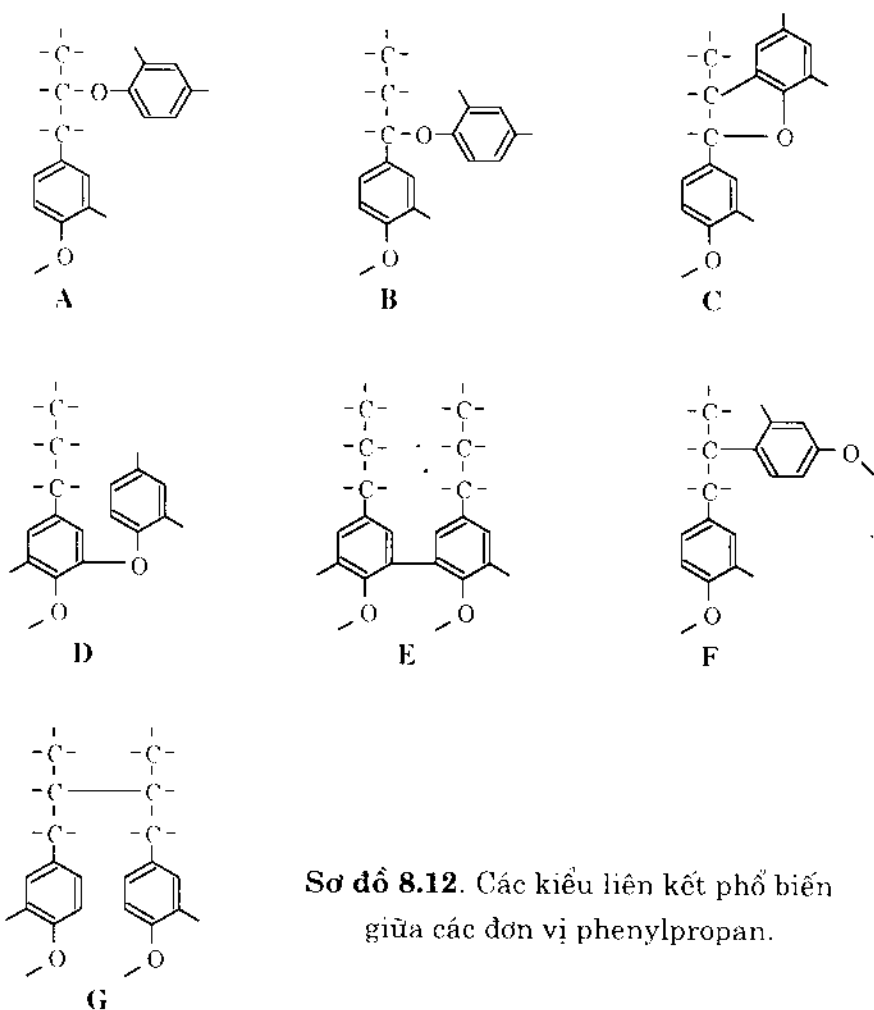
Trong nhóm cấu trúc này có ba kiểu liên kết dime: ete α -O-4, ete β -O-4 và C_5-C_5 .

Các kiểu liên kết cơ bản của lignin được thể hiện ở sơ đồ 8.12.

Tỷ lệ các loại liên kết giữa các đơn vị phenylpropan được liệt kê ở bảng 8.1.



Sơ đồ 8.11. Cấu trúc dibenzodioxoxin trong lignin gỗ lá kim.



Sơ đồ 8.12. Các kiểu liên kết phổ biến giữa các đơn vị phenylpropan.

Bảng 8.1. Tỷ lệ các loại liên kết dime của lignin
(% so với tổng số đơn vị phenylpropan)

Kiểu liên kết	Gỗ lá kim	Gỗ lá rộng
A. ete β -aryl (β -O-4)	45 ÷ 48	60
B. ete α -aryl (α -O-4)	6 ÷ 8	6 ÷ 8
C. phenylcoumaran (β -5, α -O-4)	9 ÷ 12	6
D. ete diphenyl (5-O-4)	3.5 ÷ 8	6.5
E. biphenyl (5-5')	9.5 ÷ 17	4.5
F. diarylpropan (β -1)	7 ÷ 10	8
G. pinoresinol (β - β)	3	—
H. ete α -alkyl (α -O- γ)	ít	ít
I. dibenzodioxin	chưa xác định	chưa xác định
K. lignin - cacbohydorat	chưa xác định	chưa xác định

Từ bảng 8.1 ta thấy hơn 2/3 số đơn vị phenylpropan nối với nhau qua liên kết ete, chủ yếu là liên kết β -aryl. Phần còn lại là liên kết C-C giữa các đơn vị mất xích.

8.1.4. Các nhóm chức trong lignin

Các nhóm chức có ảnh hưởng lớn nhất đến tính chất của lignin là nhóm hydroxyl phenol, nhóm hydroxyl rượu benzylic và nhóm cacbonyl.

Hàm lượng của các nhóm chức thay đổi tùy theo loài thực vật và tùy thuộc vị trí của lignin ở lớp liên kết (lớp giữa), lớp sơ cấp hay thứ cấp của tế bào thực vật. Hàm lượng nhóm chức của lignin gỗ lá kim và gỗ lá rộng được trình bày ở bảng 8.2.

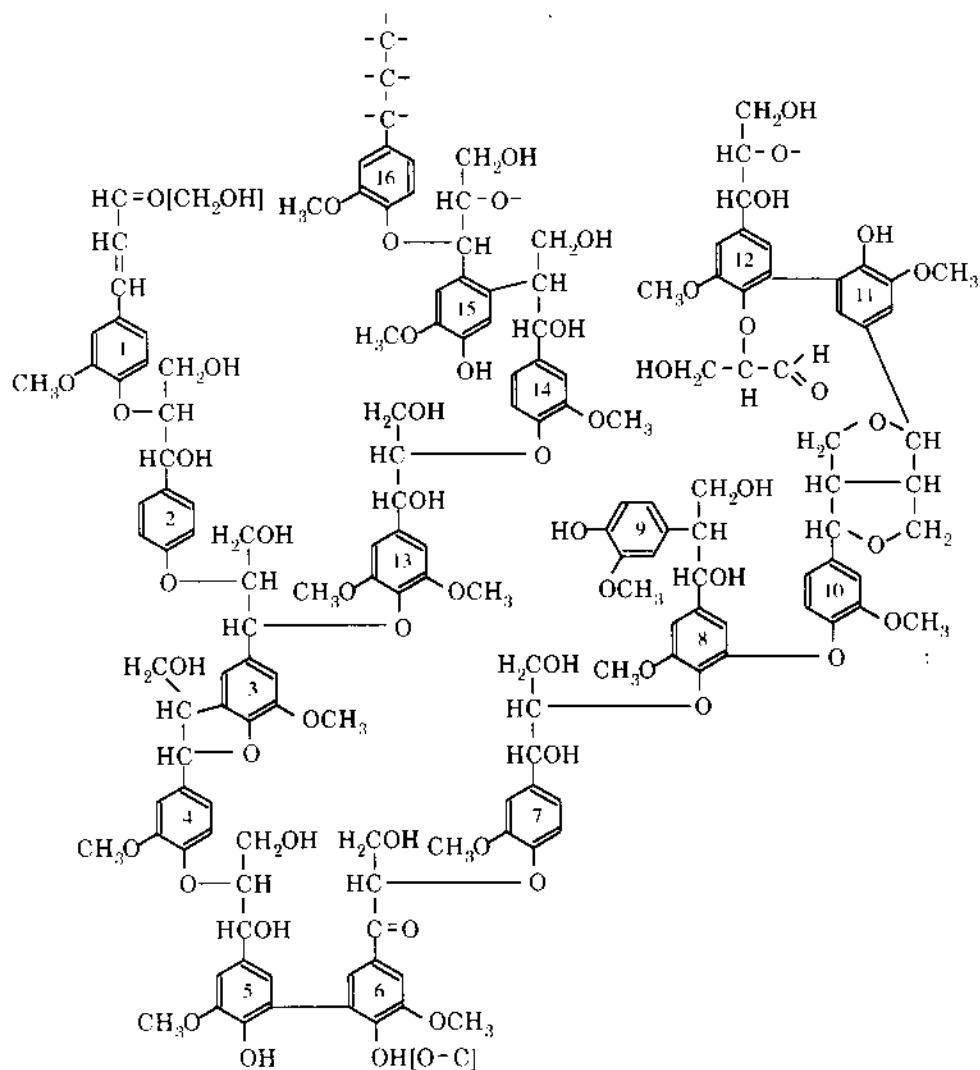
Bảng 8.2. Số lượng các nhóm chức của lignin
(tính theo 100 đơn vị phenylpropan)

Nhóm chức	Gỗ lá kim	Gỗ lá rộng
metoxyl	92 ÷ 96	139 ÷ 158
hydroxyl phenol (tự do)	15 ÷ 30	9 ÷ 13
hydroxyl benzylic	15 ÷ 20	
ete benzylic dạng mở	7 ÷ 9	
cacbonyl	20	

8.1.5. Hình dung về cấu tạo phân tử lignin

Nhiều tác giả đã nghiên cứu và đưa ra sơ đồ về cấu tạo của lignin, như sơ đồ của Freudenberg, Brauns, Erdtman, Adler, Forss, Glasser...

Ở đây xin nêu ra sơ đồ mà Adler, 1977, đã hình dung về cấu tạo của lignin, với các loại liên kết thường gặp nhất (sơ đồ 8.13).



Sơ đồ 8.13. Cấu trúc chủ yếu của lignin gỗ lá kim.

Ở sơ đồ trên, tác giả chỉ đưa ra một số dạng liên kết có mặt với tần suất cao trong lignin, chưa phản ánh hết cấu tạo thực sự của phân tử lignin. Rõ ràng là ở sơ đồ chỉ có lignin với cấu tạo mạch nhánh, chưa có liên kết thể hiện rõ nét cấu tạo không gian ba chiều của lignin.

8.2. TƯƠNG TÁC HOÁ LÝ VÀ LIÊN KẾT HOÁ HỌC GIỮA LIGNIN VÀ CACBOHYDRAT

Trong gỗ, các cấu tử chính của thành tế bào không nằm riêng rẽ mà tồn tại dưới dạng một tổ hợp chất phức tạp, trong đó lignin, hemixenluloza và xenluloza xâm nhập vào nhau, dường như tạo thành một dung dịch rắn. Trong dung dịch rắn đó có thể tồn tại liên kết hoá học và liên kết hydro giữa các hợp phần.

Lignin tham gia liên kết hydro với xenluloza và hemixenluloza với năng lượng liên kết khá lớn.

Lực liên kết hydro trong polysaccarit có độ lớn khoảng $21 \div 25$ kJ/mol, ở lignin, năng lượng liên kết hydro khoảng $8,5 \div 21$ kJ/mol.

Do có nhiều nhóm chức trong một phân tử và do lignin tiếp cận tốt với polysaccarit, lực tương tác giữa lignin với các cấu tử khác của thành tế bào trở nên rất lớn. Giá trị năng lượng tương tác hydro tính theo mol lignin có thể lớn gấp nhiều lần so với các giá trị đã nêu ở trên.

Bên cạnh liên kết hydro, giữa các hợp chất cao phân tử của thành tế bào còn có tương tác van der Waals. Loại tương tác vật lý này cũng góp phần cản trở quá trình hoà tan lignin dưới tác dụng của dung môi hoặc khi nấu xenluloza.

Như đã nói ở trên, lignin không tan trong các dung môi thông thường ở điều kiện thường. Để phân chia các đại phân tử lignin thành các phần nhỏ hơn, hoà tan được vào dung dịch, cần phải dùng các hoá chất có tác dụng mạnh. Ngay cả trong các trường hợp đó, ta cũng không thể tách hoàn toàn lignin khỏi nguyên liệu thực vật.

Từ thực tế đó, các nhà khoa học cho rằng giữa lignin và polysaccarit của thực vật tồn tại liên kết hoá học.

Nhiều công trình nghiên cứu đã được tiến hành từ những năm 1950 đến nay, nhằm xác định các kiểu liên kết trên.

Một số tác giả cho rằng giữa lignin và hemixenluloza có liên kết ete và liên kết este.

Liên kết ete giữa lignin và cacbohydrat có thể xuất hiện tại nhiều vị trí của phenylpropan và của đơn vị saccarit.

Tuy nhiên, nhiều tác giả, qua thực nghiệm và suy luận lý thuyết, cho rằng liên kết giữa lignin với cacbohydrat chủ yếu tạo ra khi C_{α} của dạng quinon metit của lignin tác dụng với nhóm hydroxyl của cacbohydrat, đặc biệt là nhóm rượu bậc một.

Trong môi trường kiềm, liên kết ete này bền hơn so với môi trường axit.

Giữa cacbohydrat hoặc polyuronit và lignin cũng tồn tại liên kết este. Liên kết này có thể được tạo ra khi nhóm cacboxyl của hemixenluloza hoặc của axit uronic trong polyuronit tác dụng với dạng quinon metit xuất hiện trong quá trình hình thành lignin.

Một số tác giả cho rằng, liên kết este ở gỗ lá rộng có nhiều khả năng xuất hiện vì gỗ lá rộng chứa nhiều tổ hợp xylan có đơn vị mắt xích axit uronic. Các nhóm axit này phản ứng với dạng quinon metit, tạo thành liên kết este.

Khả năng tồn tại liên kết este giữa lignin và cacbohydrat trong gỗ lá rộng xuất phát từ thực tế là có tới 90% xylan bị tách ra khi nguyên liệu gỗ lá rộng được gia công bằng dung dịch kiềm ở điều kiện êm dẽm. Chỉ có loại liên kết este mới dễ dàng bị phân huỷ trong điều kiện như vậy.

Một số kiểu liên kết khác cũng có thể có giữa lignin và cacbohydrat, như liên kết C-C, xuất hiện khi gốc tự do ở nguyên tử C của lignin tác dụng với gốc tự do ở nguyên tử C của cacbohydrat.

Đặc biệt, theo một số tác giả, liên kết glycozit giữa lignin và cacbohydrat là loại liên kết khá phổ biến trong thực vật.

Nói chung, liên kết giữa lignin và cacbohydrat là vấn đề còn được tranh luận.

Hiện nay, nhiều tác giả cho rằng, chỉ có hemixenluloza liên kết hoá học với lignin.

Tại sao xenluloza không liên kết hoá học với lignin, mặc dù một phần xenluloza tồn tại ở vùng vô định hình cùng với hemixenluloza, dễ tiếp cận với lignin?

Nhiều phương pháp vật lý hiện đại đã và đang được áp dụng vào lĩnh vực nghiên cứu này, trong tương lai gần, vấn đề này sẽ được sáng tỏ hơn.

8.3. VẤN ĐỀ TRẬT TỰ SẮP XẾP – TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ DUNG DỊCH LIGNIN

8.3.1. Trật tự sắp xếp các phân tử lignin

Trong một thời gian dài, chúng ta vẫn quan niệm lignin là hợp chất cao phân tử có cấu tạo không gian ba chiều, ở trạng thái vô định hình, được tạo ra qua quá trình polyme hoá cơ chế gốc.

Tuy nhiên, những thực nghiệm gần đây đã cung cấp những thông tin mới về “hình thái cấu trúc” của lignin, khác với những hiểu biết truyền thống của các nhà hoá học.

Khi tổng hợp lignin một cách riêng rẽ từ các tiền chất, ta thường thu được hợp chất giống như lignin, ở dạng vô định hình.

Song khi tổng hợp lignin với sự có mặt của cacbohydrat mô phỏng điều kiện phản ứng ở thành tế bào, ta thu được lignin giống như trong tự nhiên.

Các quan sát này kết hợp với các nghiên cứu về sự bố trí của lignin trong tế bào gỗ cho thấy sự sắp xếp các chất trong thành tế bào có ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp lignin và “hình thái cấu trúc” của lignin trong thành tế bào.

Dạng cấu trúc ưu tiên của lignin trong quá trình sinh tổng hợp xuất phát từ tương tác mạnh giữa các phân tử tiền chất của lignin với chất nền polysaccarit có trật tự cao.

Các bằng chứng về kiểu tương tác này cũng có thể rút ra khi nghiên cứu quá trình hấp phụ một số oligolignol lên xenluloza cũng như kết quả do độ dẫn quang của gỗ.

Xét về thành phần hoá học, các nhóm hydroxyl và các nguyên tử oxy dễ tạo liên kết hydro với cacbohydrat, nên các tiền chất hoặc oligome của lignin có thể được sắp xếp định hướng theo trật tự nào đó trên nền polysaccarit.

Khi tham gia phản ứng trùng hợp hoặc cộng hợp, sự sắp xếp trật tự này sẽ dẫn tới lignin cao phân tử có cấu trúc ưu tiên ở mức độ nào đó.

Sự định hướng của các phân tử trên nền xúc tác hoặc trên nền chất mang là hiện tượng thường thấy trong hoá học hữu cơ - cao phân tử.

Ngay cả trong quá trình đồng trùng hợp ghép lên xenluloza, mức độ kết tinh của xenluloza nguyên liệu cũng ảnh hưởng tới cấu trúc định hướng của mạch ghép.

Do đó, quan điểm trên đây về sự hình thành lignin có cấu tạo định hướng cũng không phải là điều gì quá xa lạ.

Qua tính toán nhằm đưa ra mô hình cấu tạo lignin, Jurasek (1995) đã chỉ ra rằng sự trái rộng trong không gian của thành tế bào có thể làm cho lignin có cấu trúc điều hoà không gian ở mức độ nào đó.

Gravitis và Erins (1981) đã nghiên cứu lignin với các mô hình có cấu hình khác nhau và đưa tới kết luận: Trong một số điều kiện, một phân lignin có thể có cấu trúc gần như trật tự.

Hơn nữa, Atalla nhận thấy vòng thơm của lignin nằm theo hướng tiếp tuyến với lớp thứ cấp của tế bào. Trên cơ sở đó, vào năm 1995, tác giả đưa ra mô hình mới về sự tổ hợp của lignin.

Theo mô hình này, các dạng cấu trúc khác nhau của hemixenluloza có thể dẫn tới sự thay đổi tương ứng về cấu trúc của lignin.

Trong khi xenluloza làm thành bộ khung sườn cho tế bào, hemixenluloza tự tạo ra mạch nhánh để liên kết với các tiền chất xác

định của lignin.

Tác giả cho rằng các nhánh monosaccarit của hemixenluloza dùng để định vị monolignol, trong khi đó, mạch nhánh disaccarit và trisaccarit sinh ra để liên kết một cách chọn lọc với di- và trilignol.

Như vậy, các tiền chất lignin có thể chịu sự chi phối của một cơ chế điều hoà nào đó, liên quan tới yếu tố không gian và các đặc trưng liên kết với cacbohydrat.

Tính hấp dẫn của mô hình là ở chỗ để cập tới sự kiểm soát theo trình tự và liên tục, xảy ra ở nhiều cấp độ, trong các giai đoạn khác nhau và tại các vị trí khác nhau trong suốt quá trình sinh tổng hợp.

Mô hình này khác với mô hình truyền thống, nhấn mạnh tính riêng biệt của các quá trình liên quan tới các enzym khác nhau.

Một bằng chứng khác chứng tỏ lignin sắp xếp định hướng với mức độ nào đó so với thành tế bào, đó là khả năng truyền dẫn điện tích, nhận biết bằng cách đo độ dẫn quang của gỗ.

Như đã biết, khả năng truyền dẫn của vật liệu phụ thuộc nhiều vào sự định hướng của các dạng cấu trúc có khả năng truyền dẫn.

Lignin cũng mang điện tích ion. Tính chất này có thể là bằng chứng về sự tồn tại một trật tự nào đó của các nhóm chức trong phân tử lignin, giúp cho vật liệu này trở thành môi trường truyền dẫn tín hiệu điện.

Lời giải thích hợp lý cho khả năng dẫn quang của gỗ có thể đưa ra như sau: Mức độ điều hoà bề mặt của bộ khung sườn polysaccarit có thể làm cho lignin gắn kết thành khối với trật tự không gian nào đó, đủ tạo thuận lợi cho sự tương tác hoặc kết nối giữa các orbital phân tử ở mức thấp chưa bị chiếm, hình thành con đường truyền dẫn.

Vào 1994, có một báo cáo khoa học đề cập tới trật tự sắp xếp trong lignin. Bằng cách sử dụng hiển vi điện tử quét đường hầm STM, Radotic và các đồng tác giả đã ghi được hình ảnh của các đơn vị cấu tạo hoặc modul của lignin nằm trong các tổ hợp lớn hơn.

Cũng trong thời gian đó, Faulon và Hatcher đã trình bày các phép

tính toán cho giả thuyết của họ về polyme nguồn gốc sinh học có cấu trúc xoắn, đặc trưng cho nhiều hợp chất cao phân tử tự nhiên.

Lignin cũng là cao phân tử tự nhiên. Như vậy, lignin cũng có thể tồn tại dưới dạng cấu trúc ưu tiên nào đó chăng?

Xem xét các bằng chứng đã nêu ở trên, rõ ràng là ta cần đưa ra một mô hình khác, phù hợp hơn so với mô hình truyền thống về lignin.

Cần phải phân biệt lignin ở lớp liên kết giữa các tế bào với lignin ở lớp thứ cấp của thành tế bào, nơi có nhiều xenluloza cấu trúc tinh thể.

Mô hình hiện tại cho rằng lignin là đồng nhất, vô định hình, có cấu tạo không gian ba chiều, có lẽ là quá đơn giản, không phù hợp với kết quả của nhiều công trình nghiên cứu gần đây về lignin.

8.3.2. Dung dịch lignin và tính chất vật lý của lignin

Lignin tự nhiên là hợp chất cao phân tử có cấu tạo không gian ba chiều, do đó, không hoà tan trong dung môi ở điều kiện thường.

Các nghiên cứu về lignin thường được tiến hành với chất mô phỏng, hoặc dựa trên các sản phẩm phân huỷ bằng phương pháp cơ lý, hoá học.

Vào 1956, Bjorkman phát hiện rằng, khi gỗ được nghiền kỹ, khoảng 50% lignin có thể hoà tan vào dung dịch nước dioxan.

Hiện tượng hoà tan xảy ra, vì trong quá trình nghiền, một phần liên kết đồng hoá trị bị đứt, phần lignin có khối lượng phân tử thấp trở thành chất có thể trích ly được.

Tính chất đặc trưng của lignin thể hiện rất rõ qua nghiên cứu dung dịch.

Nhiều tác giả đã xác định độ nhớt đặc trưng $[\eta]$, thông số phân nhánh và mức độ đa phân tán. Các công trình này đã cung cấp nhiều thông tin hữu ích về cấu tạo và cấu trúc của lignin tự nhiên.

Tuy nhiên, đây cũng chỉ là những nhận xét tương đối, vì dưới tác dụng cơ lý, một số liên kết bị đứt và cũng có thể xảy ra hiện tượng kết hợp lại, khác với liên kết vốn có ban đầu.

Độ nhớt đặc trưng của lignin thấp, chỉ bằng 1/40 so với độ nhớt của xenluloza (tham khảo các bảng về $[\eta]$ và các hệ số khác ở chương 3, T.1).

Trên cơ sở độ nhớt đặc trưng thấp của các mẫu lignin dioxan, lignosulfonat và lignin kiềm trong nhiều dung môi khác nhau, Goring (1971) cho rằng trong dung dịch, các phân tử lignin tồn tại dưới dạng các hạt gel hình cầu, kết cấu chặt. Tác giả đã xác định giá trị số mũ a trong phương trình Mark-Houwink dao động trong khoảng $0 \div 0.5$. Nhiều công trình của các tác giả khác đã xác nhận điều này.

Nói chung, trong dung dịch, mạch phân tử lignin cuộn lại chặt hơn so với polyme thơm loại mạch thẳng như polystyren.

Thông số phân nhánh hoặc thông số thu nhỏ giảm khi khối lượng phân tử tăng, đúng như dự kiến đối với các phân tử có hình dạng như vậy.

Alekseev (1971) cũng đã tính giá trị số mũ a của phương trình Mark-Houwink đối với dung dịch lignin từ các số liệu độ nhớt, sa lắng và khuếch tán.

Các tính toán này củng cố thêm quan niệm của Goring (1971) và Pla (1984) về dạng hình cầu cứng nhắc của phân tử lignin trong dung dịch.

Số mũ a của lignin thấp cũng không phải là điều bất thường.

Tại nhiệt độ cao hơn nhiệt độ gel, phần polyeste trích ly được từ polyeste cấu tạo mạng, theo Argyropoulos và Bolker (1986), a chỉ bằng 0,15.

Một tính chất quan trọng khác của dung dịch lignin là sự liên hợp giữa các phân tử trong dung dịch.

Một số nhà nghiên cứu cho rằng, lignin tự nhiên vốn có khối lượng phân tử không lớn. Nhưng khi hoà tan vào dung dịch, các phân tử có xu hướng liên hợp lại với nhau, tạo thành các tổ hợp phức có khối lượng phân tử lớn hơn.

Sarkanen cho rằng đây là quá trình thuận nghịch và phụ thuộc vào bản chất của dung môi.

Các phân đoạn lignin sulfat có khối lượng phân tử thấp có thể tạo ra các tổ hợp phức trong một số dung môi.

Tương tác liên hợp giữa các phân tử lignin cũng xảy ra trong quá trình sắc ký qua gel (GPC) với một số pha lỏng động khác nhau. (Xem phương pháp GPC ở mục 3.3.2.3. T1).

Connors và đồng tác giả (1980) phát hiện ra rằng, trong dung môi không nước dùng cho GPC, sự liên hợp tạo phức đã làm tăng khối lượng phân tử biểu kiến của lignin gấp ba lần so với giá trị vốn có.

Hiện tượng này có thể loại trừ khi thêm LiCl vào DMF dùng làm pha lỏng động.

Sự liên hợp do tạo liên kết hydro giữa các phân tử lignin tách bằng dioxan cũng được ghi nhận bởi Hatakeyama (1983).

Như vậy, lignin là chất dễ tham gia vào quá trình liên hợp, do đó, để có giá trị chính xác hơn về khối lượng phân tử, ta cần tìm được dung môi thích hợp.

Liên hợp phân tử là hiện tượng hoá lý thường xảy ra đối với hệ chất thơm, kể cả chất thơm phân tử thấp. Chủ đề này cũng là một phần của nội dung luận án mà chúng tôi đã công bố 1979 - 1980, trong đó có hệ chất thơm/DMF.

Khối lượng phân tử và độ đa phân tán của lignin cũng là thông số quan trọng cần xác định khi nghiên cứu lignin.

Các thông tin về khối lượng phân tử và độ đa phân tán của lignin thường khác nhau, phụ thuộc vào nguồn gốc mẫu lignin cũng như phương pháp thực nghiệm.

Với gỗ lá kim, khối lượng phân tử trung bình khối khoảng 20.000. Khối lượng phân tử trung bình của lignin gỗ lá rộng thường thấp hơn.

Nhiều công trình nghiên cứu đã chỉ ra rằng lignin và các dẫn xuất có độ đa phân tán khá cao (Lin SY 1990).

Nhìn chung, độ đa phân tán của lignin cao hơn so với xenluloza. Như đã biết từ chương 3, T1, tỷ lệ M_w/M_n là số đo độ đa phân tán. Đại

lượng này ở xenluloza dao động trong khoảng $1,5 \div 2,0$. Trong khi đó, ở lignin, theo những công bố gần đây, tỷ lệ M_w/M_n có thể dao động trong khoảng $3 \div 11$ hoặc cao hơn (Glasser 1996).

8.4. PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ MẪU LIGNIN

Lignin bột gỗ mài và lignin thu được sau khi enzym phân huỷ polysaccarit là các mẫu gần với tự nhiên.

Song, các mẫu lignin này ít nhiều đều trải qua quá trình chuyển hoá. Ví dụ, khi nghiền, một số liên kết trong lignin bị đứt, hình thành các gốc tự do. Các gốc tự do có thể tác dụng với nhau, tạo ra các liên kết mới, khác với ban đầu.

Lignin thu được nhờ phản ứng xúc tác enzym cũng chứa tạp chất protein tạo ra trong quá trình sinh học.

Mặc dù vậy, các mẫu lignin thu được theo các phương pháp trên rất cần thiết cho công tác nghiên cứu.

Khối lượng phân tử các mẫu lignin này biến đổi trong khoảng $15.000 \div 20.000$.

Liên kết chủ yếu giữa các đơn vị phenylpropan như đã biết là ete alkyl – aryl.

Phương pháp khác để tách lignin từ gỗ là xử lý bằng dung môi hữu cơ, như dioxan, etanol, có thể có mặt xúc tác axit vô cơ (H_2SO_4) hoặc axit Lewis ở nhiệt độ cao.

Dưới tác dụng của xúc tác và chất hữu cơ, liên kết ete trong lignin và liên kết giữa lignin với cacbohydrat bị phân huỷ, lignin dễ hoà tan vào dung dịch.

Phần lignin hoà tan này có khối lượng phân tử thấp và ít tạp chất cacbohydrat.

Mẫu lignin cũng có thể thu được khi phân huỷ cacbohydrat hoặc hoà tan chúng trong dung dịch phức, như phức đồng amoniac (lignin cuoxam) (tham khảo thêm chương 3, T1). Mẫu lignin thu được theo phương pháp này vẫn giữ được đặc tính về hình thái cấu trúc như ở trong gỗ.

Loại lignin này không hoà tan trong dung môi hữu cơ và là mô hình thích hợp để nghiên cứu quá trình phân huỷ lignin.

8.5. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH LIGNIN

8.5.1. Phương pháp phân huỷ mẫu

Theo phương pháp này, lignin tiếp xúc với hoá chất và bị phân huỷ do các phản ứng hoá học. Sau đó, sản phẩm được phân tích định lượng bằng sắc ký. Qua đó, ta biết thông tin về liên kết hoá học của lignin.

Phương pháp này cần nhiều thời gian, trải qua nhiều bước nên thông tin dễ sai lạc.

Mặc dù có nhiều hạn chế, phương pháp phân huỷ mẫu đã giúp các nhà khoa học hiểu được cấu trúc và khả năng phản ứng của lignin trong thời kỳ chưa xuất hiện các phương pháp vật lý hiện đại.

Nitrobenzen oxy hoá lignin khá chọn lọc trong môi trường kiềm.

Lignin cũng tác dụng với dung dịch permanganat, tác nhân oxy hoá quen thuộc.

Phản ứng oxy hoá lignin bằng nitrobenzen đầu tiên được Freudenberg và cộng tác viên nghiên cứu vào 1939. Sau đó, Leopold hoàn thiện thêm vào 1952.

Từ lâu, phản ứng oxy hoá bằng nitrobenzen được sử dụng để phân loại gỗ hoặc mô thực vật và phân loại lignin theo nguồn gốc thực vật.

Theo phương pháp này, lignin hoặc xơ thực vật phản ứng với nitrobenzen trong dung dịch NaOH 2N, ở $170 \div 180^{\circ}\text{C}$, trong $3 \div 4$ h. Sản phẩm chủ yếu là aldehyt, xuất phát từ nhóm cấu trúc guaiacyl, syringyl và *p*-hydroxyphenyl trong lignin.

Oxy hoá lượng lignin còn sót lại trong xơ xenluloza kỹ thuật bằng dung dịch permanganat tiêu chuẩn là cơ sở của phép xác định trị số kappa. Phương pháp này được áp dụng rộng rãi trong công nghiệp xenluloza – giấy để xác định nhanh hàm lượng lignin trong bột giấy.

Phương pháp này dựa trên khả năng oxy hoá chọn lọc lignin, ngay cả khi có mặt cacbohydrat.

Theo quy ước, hàm lượng lignin được tính toán dựa trên số mililit KMnO_4 0.1N tiêu hao cho 1 gam bột khô tuyệt đối (khô kiệt).

Tuy nhiên, độ lớn của mẫu và lượng permanganat ảnh hưởng đến kết quả phân tích nên Tasman và Berzin (1958) đề xuất sử dụng trị số kappa. Độ lớn của mẫu được điều chỉnh sao cho khoảng một nửa lượng permanganat tiêu hao do phản ứng.

Phương pháp này có ý nghĩa rất lớn trong công nghệ xenluloza giấy.

Song, vào 1994, Gellerstedt và đồng tác giả nhận thấy axit hexenuroic (tạo ra trong quá trình nấu xenluloza) cũng tác dụng với permanganat, dẫn tới sai số lớn về trị số kappa, nhất là đối với xơ sợi đi từ gỗ lá rộng.

Mặc dù phải tiến hành qua nhiều bước và thực tế phản ứng chỉ giới hạn ở các đơn vị phenylpropan mang nhóm hydroxyl phenol tự do, phương pháp oxy hoá bằng permanganat vẫn có ý nghĩa rất lớn đối với hoá học lignin.

Một số tác giả đã đề xuất sử dụng phương pháp bốn bước chuẩn hoá.

Bước đầu tiên là phân huỷ sơ bộ mẫu bằng CuO trong môi trường kiềm, tiếp đó là metyl hoá và cuối cùng là hai giai đoạn oxy hoá bằng permanganat và hydro peroxit. Theo phương pháp này, cấu trúc của lignin trong bột xenluloza sulfít và sulfat đã được làm sáng tỏ.

Lignin cũng có thể tách khỏi gỗ nhờ hỗn hợp axit và dung môi hữu cơ. Hỗn hợp đioxan – nước (tỷ lệ 9 : 1) chứa HCl 0.2N có thể phân huỷ liên kết ete α - hoặc β -aryl trong lignin. Tuy nhiên, khả năng tách lignin không cao, vì có hiện tượng ngưng tụ lignin trong môi trường axit.

Ngoài ra, nhiều phương pháp khác cũng được đề xuất để phát hiện các loại liên kết hoá học trong lignin.

Trong phòng thí nghiệm, lignin được định lượng theo phương pháp H_2SO_4 72%. Dưới tác dụng của dung dịch axit có nồng độ trên, các

polysaccharit bị phân huỷ và hoà tan vào dung dịch, phần chất rắn còn lại được coi là lignin.

8.5.2. Phương pháp không phá huỷ mẫu

Phần lớn các phương pháp phân tích không phá huỷ mẫu dựa trên các thiết bị hiện đại.

Trạng thái chuyển tiếp $\pi-\pi^*$ đặc trưng của nhân thơm trong lignin làm cho hợp chất này hấp thụ mạnh tia UV.

Lignin hấp thụ mạnh hơn cacbohydrat ở khoảng cực đại 280 nm.

Dựa trên phổ hấp thụ UV của chất mô phỏng có nhóm guaiacyl và syringyl, ta có thể áp dụng phương pháp này để nghiên cứu sự phân bố lignin trên thành tế bào gỗ cũng như sự phân huỷ lignin trong quá trình nấu bột xenluloza.

Phương pháp phổ UV cũng được áp dụng để xác định hàm lượng nhóm hydroxyl phenol tự do. Phương pháp này dựa trên thực tế là nhóm hydroxyl phenol trong lignin ion hoá hấp thụ ở 300 nm hoàn toàn theo định luật Lambert – Beer.

Theo phương pháp UV, một số tác giả đã xác định hàm lượng nhóm hydroxyl phenol tự do ở lớp thứ cấp của tế bào lớn gấp 1,5 lần so với hàm lượng nhóm này ở lớp liên kết giữa các tế bào.

Phổ UV đặc trưng của lignin cũng được sử dụng để phân tích định tính, định lượng lignin tự nhiên và nghiên cứu quá trình delignin hoá khi nấu xenluloza.

Tuy có nhiều ưu điểm nhưng phương pháp này cũng dễ phạm sai số khi có mặt các tạp chất hấp thụ UV mạnh.

Trong mấy thập kỷ gần đây, phương pháp NMR được áp dụng khá rộng rãi để nghiên cứu cấu trúc lignin.

^1H -NMR được sử dụng cho lignin axetyl hoá, vì tín hiệu dễ phân giải hơn so với lignin thông thường.

Song, có một số hạn chế đối với lignin khi dùng phương pháp ^1H -NMR. Do đó, phương pháp này chỉ thích hợp cho phân tích định tính

sự phân bố proton trong lignin, trong khi đó không xử lý được các nhóm chứa cacbon và nhóm chức có proton linh động, như OH, COOH, SH.

Vào 1994 một số tác giả đã hoàn thiện phương pháp xử lý và xác định được nhóm hydroxyl phenol trong lignin.

Phương pháp ^{13}C -NMR đầu tiên được Ludemann và Nimz sử dụng thành công. Hiện nay phương pháp này đã trở thành công cụ không thể thiếu khi nghiên cứu cấu tạo phân tử lignin.

So với cộng hưởng từ proton, phổ ^{13}C -NMR phân giải tốt hơn nhiều, trong khoảng chuyển dịch rộng hơn (200 ppm so với 12 ppm).

Tuy vậy, các phương pháp cộng hưởng từ trên đây vẫn còn một số hạn chế. Do đó, các nhà nghiên cứu đã sử dụng thêm các dạng cộng hưởng từ khác để đạt kết quả tốt hơn trong nghiên cứu lignin.

8.6. TÍNH CHẤT HOÁ HỌC CỦA LIGNIN

Lignin là hợp chất cao phân tử có đặc tính thơm. Lignin có cấu tạo phân tử rất phức tạp, với nhiều kiểu liên kết dime. Hơn nữa, các đơn vị mất xích phenylpropan lại có nhiều loại nhóm chức cũng như nhiều đặc trưng về cấu tạo.

Do đó, lignin có thể tham gia hàng loạt phản ứng hoá học, như phản ứng thế, phản ứng cộng, phản ứng oxy hoá, phản ứng trùng ngưng, trùng hợp...

Quá trình hoá học diễn ra khi nấu xenluloza sulfat và sulfit được trình bày ở chương 9. Các phản ứng diễn ra khi tẩy trắng xenluloza được thảo luận ở chương 11.

Lignin bị phân huỷ dưới tác dụng của các tác nhân hoá học và sinh học. Sự chuyển hoá của lignin dưới tác dụng của nấm, vi khuẩn và các enzym sẽ được trình bày ở chương 12.

Chương 9

PHẢN ỨNG CỦA LIGNIN TRONG QUÁ TRÌNH NẤU XENLULOZA THEO PHƯƠNG PHÁP SULFAT VÀ SULFIT

9.1. PHẢN ỨNG CỦA LIGNIN KHI NẤU XENLULOZA THEO PHƯƠNG PHÁP XUT VÀ SULFAT

Trong quá trình nấu xenluloza, lignin hoà tan vào dung dịch nhờ phản ứng phân huỷ liên kết giữa các đơn vị mắt xích, chủ yếu là liên kết ete và một phần liên kết C-C.

Theo phương pháp xút (hoặc phương pháp xoda), lignin hoà tan chậm, do đó, phải tiến hành trong thời gian dài.

Khi thêm Na_2S vào dịch nấu, sự phân huỷ lignin được xúc tiến, nhờ đó rút ngắn thời gian phản ứng, giảm bớt hiện tượng phân huỷ polysaccarit, tăng hiệu suất và chất lượng xenluloza.

Phương pháp nấu xenluloza bằng dung dịch $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{S}$ gọi là phương pháp sulfat (theo tên của hoá chất Na_2SO_4 bổ sung vào công đoạn thu hồi kiềm).

Để thu sản phẩm bột xenluloza theo phương pháp kiềm, dăm gỗ nguyên liệu được xử lý theo các điều kiện sau:

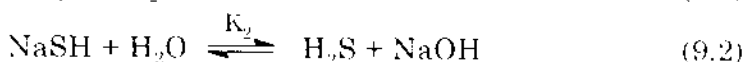
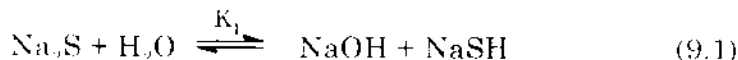
- Dung dịch NaOH với $\text{pH} = 13 \div 14$, $t_{\text{max}}^{\circ} = 155 \div 175^{\circ}\text{C}$, thời gian $2 \div 5$ h.

- Dung dịch $\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{S}$ với $\text{pH} = 13 \div 14$, $t_{\text{max}}^{\circ} = 155 \div 175^{\circ}\text{C}$, thời gian $1 \div 3$ h.

Trong điều kiện đó, hầu hết lignin và một phần hemixenluloza bị phân huỷ và hoà tan vào dung dịch nấu, sản phẩm thu được là xenluloza dưới dạng chất xơ.

Theo phương pháp sulfat, do có thêm cấu tử thứ hai là Na_2S , thành phần tác nhân phản ứng trở nên phức tạp hơn.

Cân bằng của quá trình chuyển hoá trong dung dịch được thể hiện ở các sơ đồ sau:



Hằng số cân bằng của các phản ứng này là:

$$K_1 = [\text{HS}^-][\text{OH}^-]/[\text{S}^{2-}]$$

$$K_2 = [\text{H}_2\text{S}][\text{OH}^-]/[\text{HS}^-]$$

trong đó $K_1 \approx 10$ và $K_2 \approx 10^{-7}$.

Vì $K_2 \ll K_1$ nên cân bằng ở sơ đồ 9.1 quyết định nồng độ ion HS^- trong hệ phản ứng.

Như vậy, trong phương pháp xút, tác nhân tấn công là HO^- ; trong phương pháp sulfat, xét về phương diện nồng độ cấu tử, tác nhân tấn công chủ yếu là HO^- và HS^- .

Xét về khả năng nucleophil của các cấu tử chứa lưu huỳnh trong dung dịch, ta có dãy so sánh sau:



Dưới tác dụng của môi trường kiềm mạnh, ở nhiệt độ cao, áp suất cao, các mảnh gỗ nguyên liệu được thấm dần hoá chất. Một loạt quá trình hoá lý và hoá học xảy ra.

Các quá trình hoá học chủ yếu gồm:

- Phân huỷ liên kết ete, este, glycozit... giữa lignin và hemixenluloza, đồng thời phá huỷ liên kết hydro giữa lignin và polysaccarit.

- Phân huỷ liên kết hoá học giữa các đơn vị mắt xích của lignin, như liên kết ete, và một phần nhỏ liên kết C-C...

Phân tử lignin bao gồm nhiều loại liên kết ete.

Đơn giản nhất là liên kết ete ArOCH_3 , tồn tại trong phạm vi đơn vị mắt xích phenylpropan. Khi liên kết loại này bị bẻ gãy, chỉ có nhóm chức của lignin thay đổi, không có sự thay đổi lớn về khối lượng

phân tử. Tuy nhiên, nhờ xuất hiện thêm nhóm phenolat, khả năng hoà tan của lignin cũng được nâng lên.

Liên kết ete giữa các đơn vị cấu trúc cơ bản của lignin, như đã thấy từ bảng 8.1, là các dạng liên kết phổ biến nhất trong lignin. Đặc biệt, ở gỗ lá kim cũng như ở gỗ lá rộng, kiểu cấu trúc ete β -aryl chiếm tỷ lệ lớn nhất. Do đó, phản ứng phân huỷ loại liên kết này đóng vai trò quan trọng đối với quá trình hoà tan lignin.

9.1.1. Phản ứng của lignin khi nấu xenluloza theo phương pháp xút

Các nghiên cứu về phản ứng của lignin thường dựa trên các chất mô phỏng. Nhiều công trình khoa học với mức độ tin cậy cao đã được công bố, đặc biệt là các công trình xuất hiện sau 1970.

Để giúp người đọc dễ dàng nắm bắt thông tin, tác giả chỉ đề cập những vấn đề mấu chốt nhất.

9.1.1.1. Khả năng phân huỷ liên kết ete ở nhóm metoxy

Ở phân tử lignin gỗ lá kim, hầu như mọi mắt xích phenylpropan đều chứa một nhóm metoxy ở vị trí C_3 . Trong khi đó, lignin gỗ lá rộng còn có thêm loại đơn vị chứa hai nhóm metoxy (đỉnh với C_3 và C_5), nên hàm lượng metoxy lớn hơn (xem bảng 8.2).

Liên kết ete metylaryl khá bền. Trong môi trường kiềm ở điều kiện nấu xenluloza theo phương pháp xút, nhiệt độ khoảng 175°C , chỉ một phần nhỏ liên kết ete này bị phân huỷ. Quá trình đứt liên kết này chỉ xảy ra đáng kể ở nhiệt độ 200°C . Nhưng các quá trình nấu xenluloza thường không thực hiện ở nhiệt độ cao như vậy.

Cấu trúc ete metylaryl đặc biệt bị phá huỷ mạnh trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfat (trình bày ở phần sau).

9.1.1.2. Phản ứng của cấu trúc ete ở C_{α}

Liên kết ete ở C_{α} có thể tồn tại trong cấu trúc mạch hở hoặc cấu trúc vòng, như coumaran và pinosresinol.

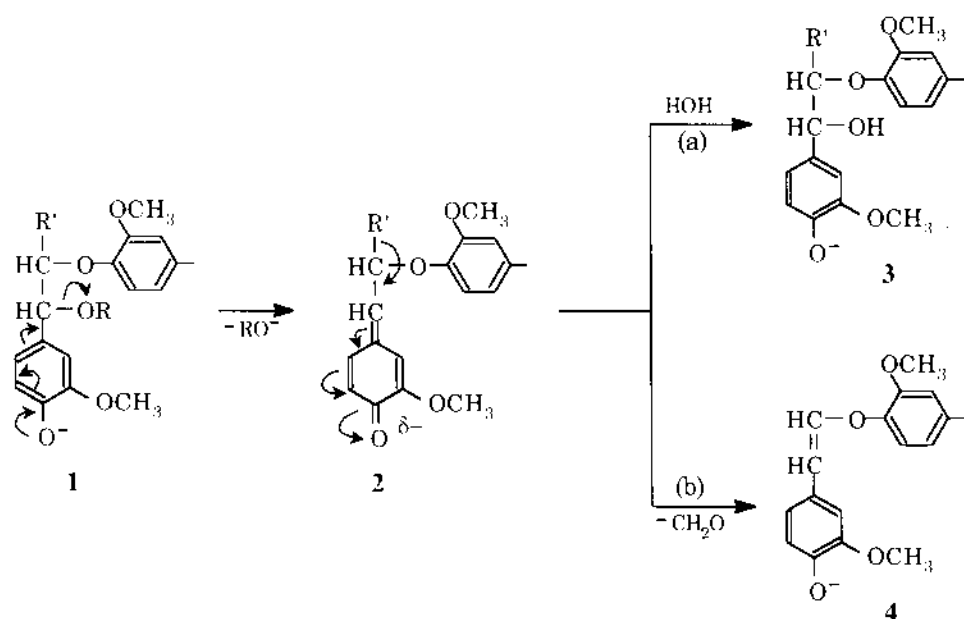
a. Phản ứng ở cấu trúc ete mạch hở

Nhiều tác giả đã thực nghiệm với các chất mô phỏng và nhận thấy:

– Khi H của OH phenol bị thế (cấu trúc phenol bị ete hoá). liên kết ete ở C_α bền trong môi trường kiềm.

– Liên kết ete ở C_α chỉ bị phân huỷ khi OH phenol tự do (không bị ete hoá).

Phản ứng ở nhóm cấu trúc ete C_α cũng phụ thuộc vào cấu tạo hoá học ở mạch propan. Khi ở vị trí γ là nhóm metylol, hướng phản ứng sẽ khác với trường hợp không có nhóm metylol (sơ đồ 9.3).



Sơ đồ 9.3. Phản ứng phân huỷ ete ở C_α

R' : phần còn lại của mạch phenylpropan

Trường hợp (b): $R' = CH_2OH$; R : alkyl hoặc aryl.

Trong cấu trúc phenol tự do, dưới tác dụng của $NaOH$, nhóm phenol biến thành phenolat. Nhờ hiệu ứng điện tử, liên kết ete C_α bị phân huỷ theo kiểu tách loại β -alkoxy, chuyển dạng (1) thành dạng trung gian quinon metit (metylenquinon) (2).

Dạng quinon metit có thể phản ứng theo hai hướng, tùy thuộc cấu tạo hoá học của mạch propan.

Khi tác dụng với nước (hoặc OH^-), xuất hiện dạng rượu benzylic với nhóm hydroxyl ở C_α (hướng a).

Khi $\text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$, với cấu trúc phenol tự do, phản ứng tách loại metylol xảy ra, tạo thành formaldehyt và cấu trúc ete styrylaryl (4) (hướng phản ứng b).

Phản ứng tách loại diễn ra với tốc độ lớn hơn nhiều so với phản ứng của dạng quinon metit với OH^- . Vì vậy, cấu trúc styrylaryl (4) luôn được hình thành.

Cấu trúc styrylaryl khá bền, nên thực tế liên kết ete ở C_β trong trường hợp này không bị phân huỷ (sẽ thảo luận kỹ hơn ở phần sau).

Tuy nhiên, xét về cấu trúc ete C_α thì trong cả hai trường hợp (a) và (b), liên kết ete C_α đều bị phân huỷ.

b. Phản ứng ở cấu trúc mạch vòng

Dưới tác dụng của dung dịch kiềm, ete C_α mạch vòng cũng bị phân huỷ.

Qua thực nghiệm với các chất mô phỏng, các nhà nghiên cứu nhận thấy, ở dạng vòng phenylcoumaran và pinorexinol, liên kết ete ở C_α đều bị phân huỷ. Nhưng ở các dạng vòng khác nhau, quá trình biến đổi hoá học khác nhau.

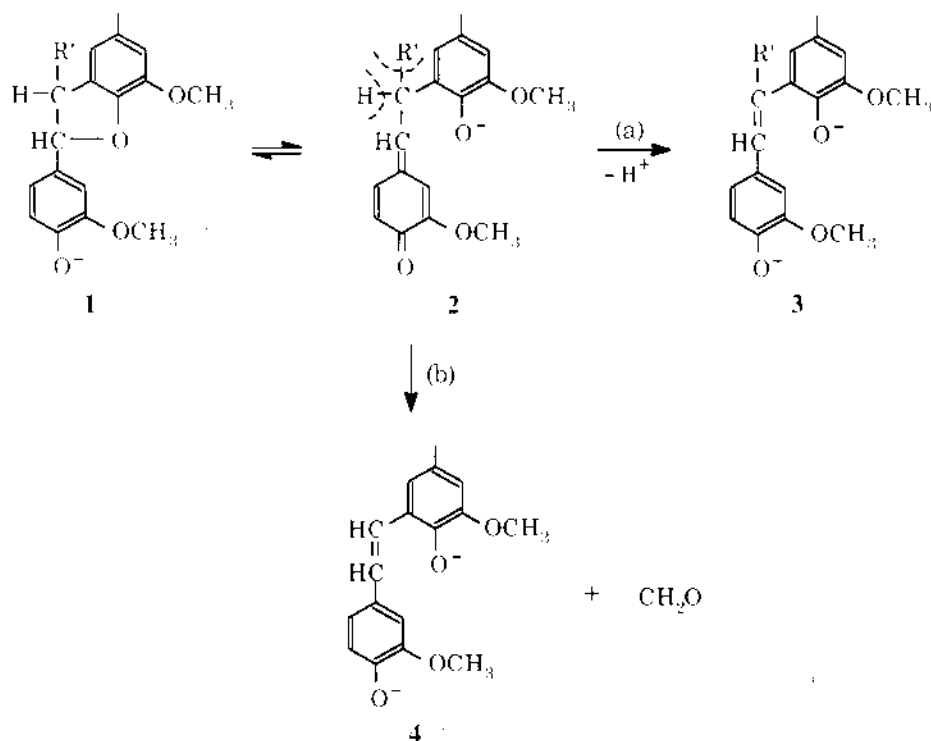
• Vòng phenylcoumaran:

Tương tự như dạng mạch hở, ở dạng vòng phenylcoumaran cũng xuất hiện hiệu ứng điện tử, phản ứng tách loại kiểu β -alkoxy xảy ra, đứt liên kết ete C_α , đồng thời hình thành quinon metit (2) (sơ đồ 9.4).

Từ dạng quinon metit, quá trình chuyển hoá có thể theo hai hướng, tùy theo cấu tạo hoá học ở mạch propan của đơn vị phenylpropan.

Khi ở vị trí γ là nhóm metylol, tức $\text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$, phản ứng tách loại formaldehyt (hay tách loại metylol) xảy ra với tốc độ lớn hơn phản ứng phân huỷ ete và mở vòng (hướng b trên sơ đồ 9.4).

Khi ở vị trí γ không có nhóm CH_2OH , phản ứng phân huỷ ete và mở vòng xảy ra với tốc độ lớn hơn so với tách loại H ở vị trí C_β (hướng a ở sơ đồ 9.4).



Sơ đồ 9.4. Phản ứng phân huỷ ete ở C_α trong cấu trúc phenylcoumaran, với OH phenol tự do:

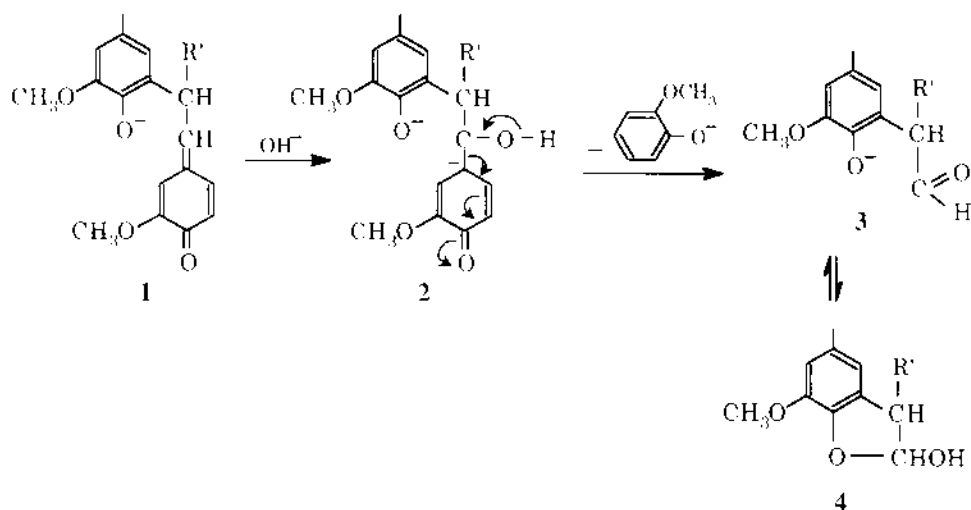
a) $\text{R}' \neq \text{CH}_2\text{OH}$; b) $\text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$.

Gierer cũng nhận thấy, khi mở vòng phenylcoumaran, có thể có quá trình phân huỷ liên kết C-C của dime (sơ đồ 9.5).

Dạng quinon metit (1), xuất hiện sau khi mở vòng, tác dụng với OH^- (hoặc nước), tạo thành nhóm hydroxyl ở C_α và tạo ra cacbanion ở C_1 (2). Liên kết $\text{C}_\alpha\text{-C}_1$ bị đứt, xuất hiện nhóm aldehyt ở C_α (3). Dạng hợp chất chứa nhóm cacbonyl này có thể chuyển hoá thành dạng vòng hemiacetal (4).

Như vậy, phản ứng đứt liên kết $C_\alpha-C_1$ khi mở vòng phenylcoumaran cũng góp phần phân chia lignin thành các mảnh nhỏ hơn.

Tương tự như đối với cấu trúc ete ở C_α dạng mạch hở, khi OH phenol bị thế, phản ứng đứt liên kết ete ở vòng cũng không thể xảy ra.



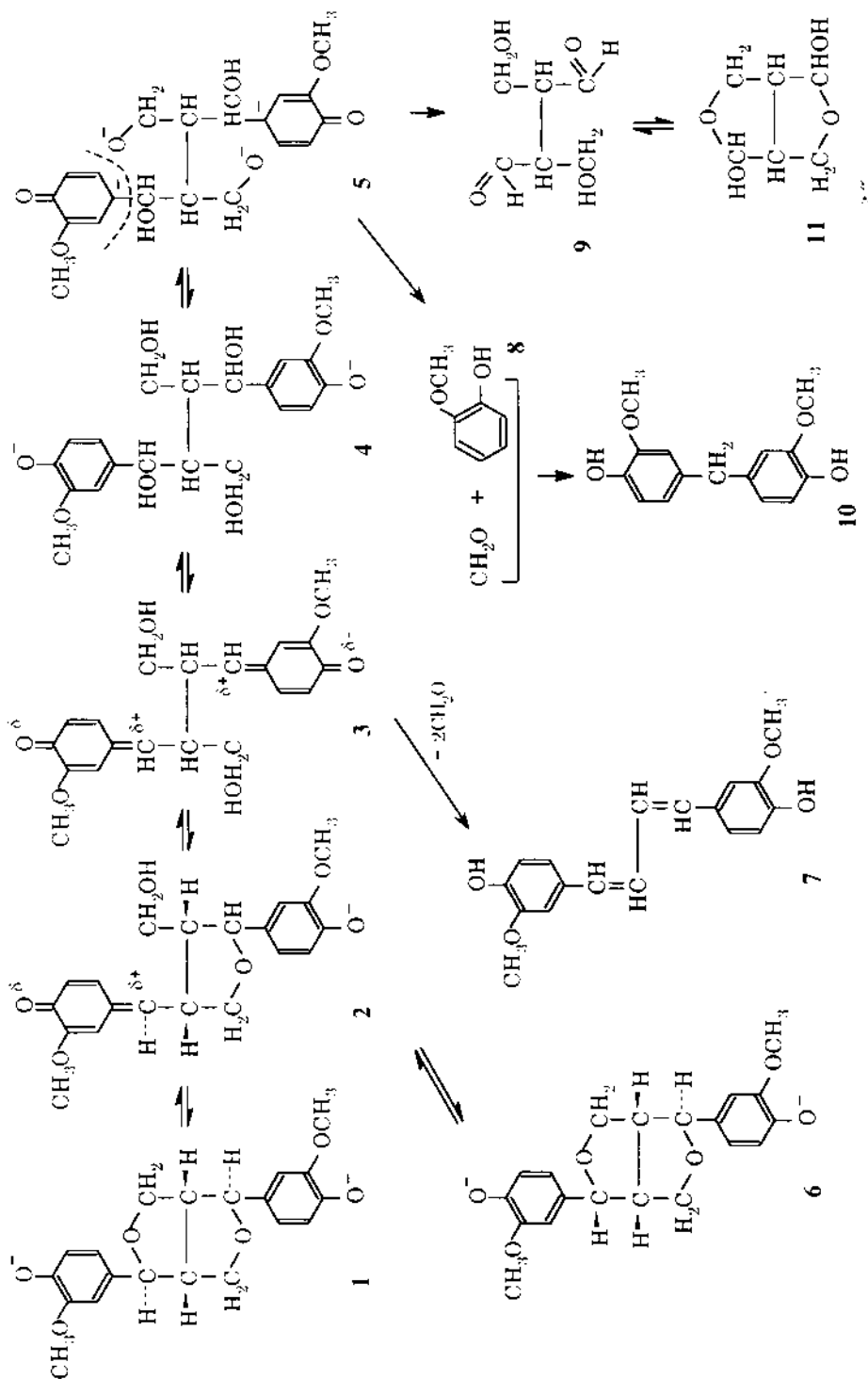
Sơ đồ 9.5. Phản ứng phân huỷ liên kết C-C khi mở vòng phenylcoumaran.

- Vòng pinoresinol

Gierer dùng pinoresinol làm chất mô phỏng để nghiên cứu quá trình phân huỷ liên kết ete ở C_α .

Sau khi axetyl hoá sản phẩm và xác định các chất sau phản ứng bằng phương pháp NMR, IR và khối phổ, tác giả đã đưa ra sơ đồ 9.6 cho quá trình phân huỷ vòng pinoresinol trong lignin.

Trước hết, pinoresinol chuyển thành dạng quinon metit (2), trong đó một vòng tetrahydrofuran bị mở, dẫn tới sự biến đổi cấu hình từ dạng hướng ngoại thành hướng trục (khái niệm tương tự như đã sử dụng ở chương 2, T1). Vòng có thể được đóng trở lại với cấu hình đã thay đổi (epipinoresinol) (6) hoặc mở tiếp vòng thứ hai, dẫn tới dạng quinon metit (3). Dạng này có thể biến đổi theo hai hướng:



Sơ đồ 9.6. Phân hủy cấu trúc ete vòng pinocresinol.

– Mất hai nhóm hydroxymetyl ở C_γ , chuyển thành dạng butadien (7).

– Kết hợp ion hydroxyl thành rượu bốn chức rượu (4), sau đó tạo thành cacbanion ở vị trí C_1 (5). Cuối cùng, cacbanion bị phân huỷ, tạo ra hai phân tử guaiacol (8) và hợp chất dihydroxy dialdehyt (9). Dạng này không bền, chuyển thành dạng vòng furan (11). Guaiacol có thể tác dụng với formaldehyt (sản phẩm phân huỷ C_β - C_γ), tạo thành diguaiacylmetan (10).

9.1.1.3. Phản ứng của cấu trúc ete C_β

Liên kết ete ở C_β khá bền trong môi trường kiềm. Liên kết này chỉ bị phân huỷ ở nhiệt độ tương đối cao.

Nhận xét này được rút ra từ thực nghiệm. Ở nhiệt độ 140°C , liên kết này bắt đầu bị phân huỷ, nhưng tốc độ chậm. Quá trình phân huỷ xảy ra đáng kể ở 160°C , nồng độ NaOH 2N.

Do đó, trong thực tế sản xuất xenluloza phương pháp kiềm, nhiệt độ quá trình thường là 175°C .

a. Phân huỷ liên kết ete β -aryl trong cấu trúc phenol thế

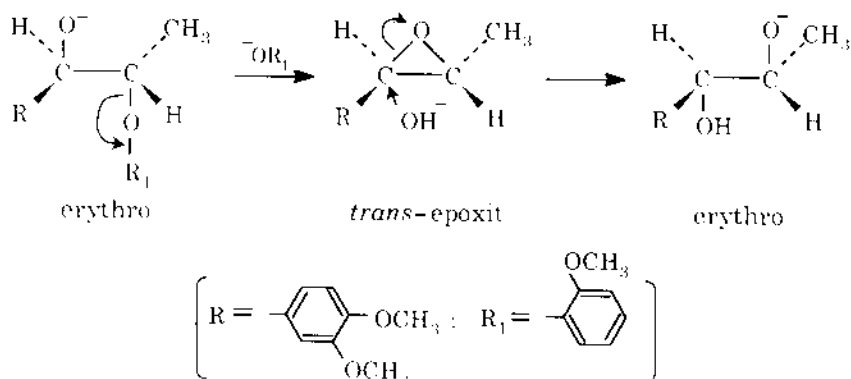
Khác với trường hợp ete ở C_α , liên kết ete ở vị trí C_β vẫn bị phân huỷ ngay cả khi OH phenol bị ete hoá, đặc biệt khi các vị trí α và γ có nhóm OH.

Khi sử dụng các chất mô phỏng với các nhóm hydroxyl ở C_α và C_γ , sau 2 h phản ứng trong dung dịch NaOH 2N ở 170°C , có tới 90% liên kết ete ở C_β bị phân huỷ.

Ngược lại, khi OH ở các vị trí α và γ bị alkyl hoá, chỉ có 9% liên kết ete này bị phân huỷ.

Trên cơ sở đó, các nhà khoa học cho rằng, phản ứng thế nucleophil xảy ra ở đây là quá trình nội phân tử.

Cơ chế này cũng được xác nhận khi nghiên cứu hoá lập thể của phản ứng (sơ đồ 9.7).



Sơ đồ 9.7. Nghiên cứu hoá lập thể phản ứng thuỷ phân liên kết ete β -alkylaryl với chất mô phỏng không có OH phenol tự do.

Các tác giả nhận thấy, sau khi thuỷ phân liên kết ete ở C_{β} , cấu hình *trans* vẫn được giữ nguyên sau hai lần chuyển hoá. Điều đó chứng tỏ phản ứng xảy ra trong phạm vi từng phân tử chất mô phỏng.

Trường hợp cả vị trí α và γ đều chứa nhóm hydroxyl, sẽ có hai khả năng tạo vòng epoxit, đó là α,β - và γ,β -epoxit.

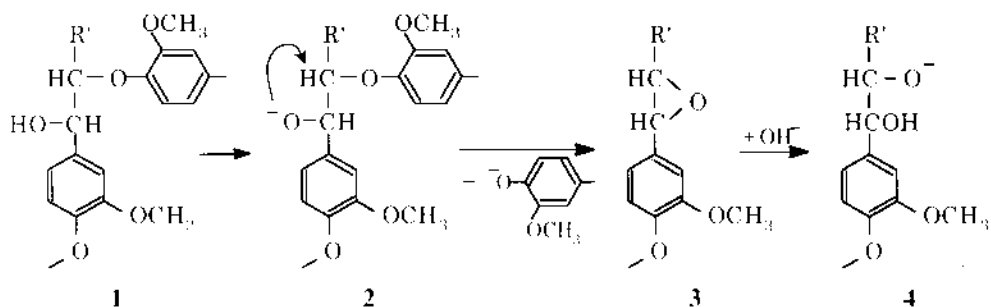
Để xác định hướng ưu tiên của phản ứng, các tác giả đã sử dụng các chất mô phỏng chỉ chứa một nhóm hydroxyl, hoặc ở vị trí α hoặc ở vị trí γ .

Thực nghiệm đã chỉ ra rằng phản ứng tạo α,β -epoxit diễn ra với tốc độ lớn hơn ba lần so với γ,β -epoxit.

Từ đó các nhà nghiên cứu đã đưa ra cơ chế phản ứng phân huỷ liên kết ete β -aryl của lignin qua giai đoạn trung gian tạo α,β -epoxit, thể hiện ở sơ đồ 9.8.

Dưới tác dụng của OH^- , xảy ra quá trình ion hoá nhóm hydroxyl ở C_{α} . Do thuận lợi về hiệu ứng điện tử, vòng epoxit hình thành và đứt liên kết β -aryl. Dạng trung gian epoxit (3) trong điều kiện phản ứng lại tiếp tục biến đổi thành α,β -glycol (4)...

Cần lưu ý rằng, trong cấu trúc phenol thế, không xảy ra phản ứng tách loại metylol (khi $\text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$), vì không tạo thành dạng quinon metit hoạt động.



Sơ đồ 9.8. Phân huỷ liên kết ete β -aryl trong cấu trúc phenol thế dưới tác dụng của môi trường kiềm trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp xút.

b. Phân huỷ liên kết ete β -aryl trong cấu trúc phenol tự do

Dưới tác dụng của dung dịch NaOH , liên kết β -aryl trong cấu trúc phenol tự do có thể phản ứng theo hai hướng, tùy theo cấu tạo hoá học của mạch propan (sơ đồ 9.9).

- Hướng (a): Khi $\text{R}' \neq \text{CH}_2\text{OH}$, phản ứng xảy ra theo hướng tạo thành epoxit trung gian.

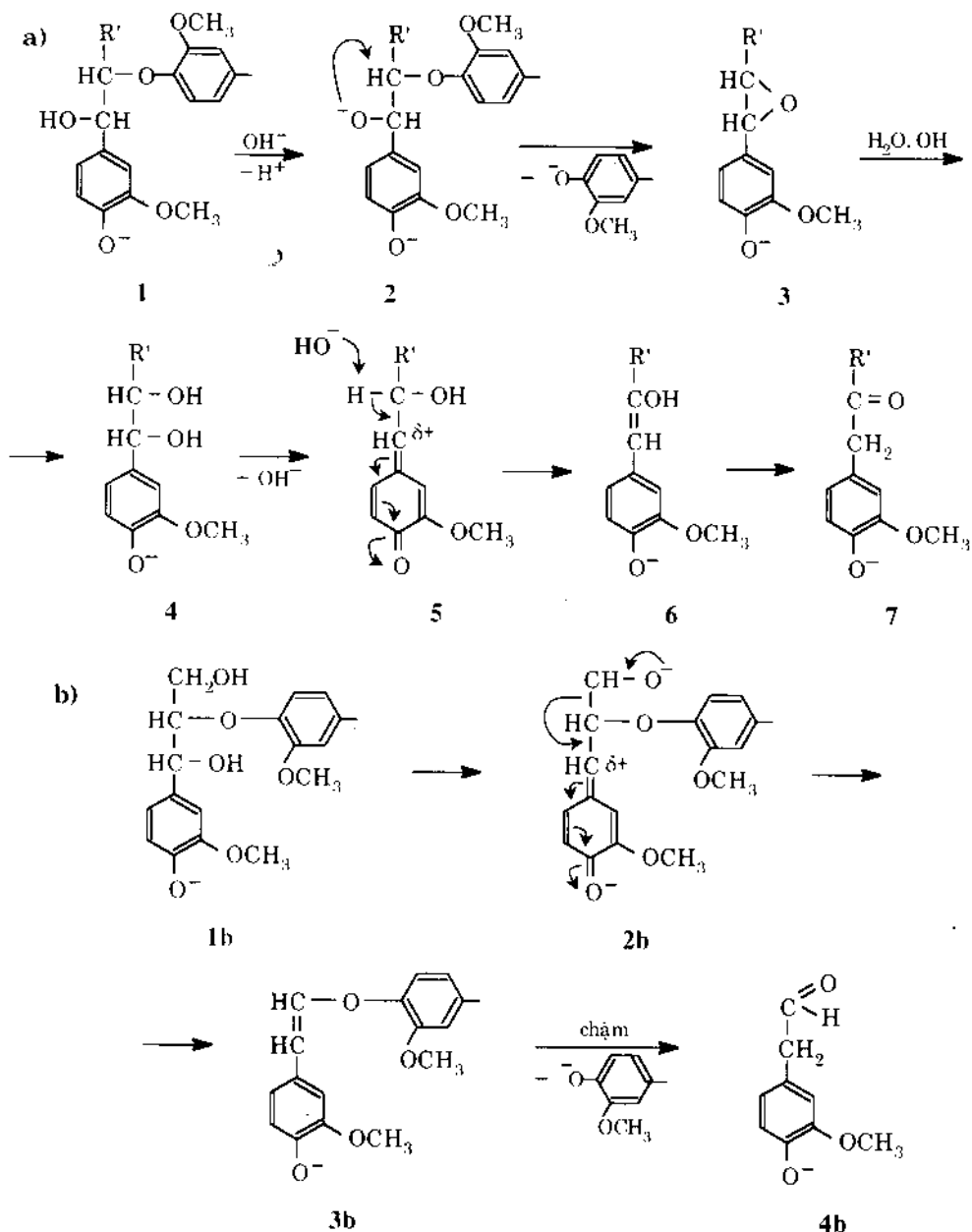
Dạng rượu benzylic (1) ion hoá dưới tác dụng của OH^- , thành anion O^- ở C_α (2), tạo điều kiện chuyển dịch điện tử thuận lợi cho quá trình tách loại kiểu alkoxy, phân huỷ liên kết ete β -aryl, đồng thời hình thành vòng epoxit theo cách đã mô tả ở sơ đồ 9.7.

Trong môi trường kiềm, dạng epoxit (3) biến đổi thành diol (4). Dưới tác dụng của kiềm, dạng diol chuyển hoá thành quinon metit (metylenquinon) (5), tiếp đó dẫn tới dạng guaicylaxeton (7).

Theo hướng (a), quá trình cũng có thể xảy ra tương tự đối với cấu trúc ete β -aryl với $\text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$. Tuy nhiên cấu trúc này chủ yếu phản ứng theo hướng (b).

- Hướng (b): Với $\text{R}' = \text{CH}_2\text{OH}$, phản ứng chủ yếu tiến hành theo hướng tách loại metylol ở C_γ .

Nhờ hiệu ứng điện tử ở (1b), xảy ra phản ứng tách loại hydroxy (hoặc tách loại alkoxy RO^- , nếu ở C_α có liên kết ete), hình thành dạng quinon metit (2b).



Sơ đồ 9.9. Phản ứng ở cấu trúc β -aryl:

hướng (a): qua giai đoạn trung gian tạo epoxit đồng thời phân huỷ ete β -aryl;

hướng (b): khi $R' = \text{CH}_2\text{OH}$, phản ứng tạo thành ete styrylaryl.

Phản ứng tách loại metylol diễn ra với tốc độ cao, tạo thành formaldehyt và dạng ete styrylaryl (3b). Dạng (3b) tương đối ổn định về hoá học đối với thủy phân, nhờ hệ thống điện tử liên hợp trong toàn bộ dime.

Tuy nhiên, dạng này cũng có thể dần dần chuyển hoá thành homovanilin (4b), sau khi tách loại cấu trúc guaiacyl.

Như vậy, theo cơ chế ở sơ đồ 9.9, sản phẩm cuối cùng của cả hai hướng là cấu trúc guaiacyl và các hợp chất chứa nhóm cacbonyl.

Tuy vậy, trong môi trường kiềm, nhiệt độ cao, các chất dạng ete styrylaryl và các hợp chất cacbonyl có thể tham gia phản ứng trùng hợp, ngưng tụ hoặc trùng ngưng, tạo thành cao phân tử, cản trở quá trình hoà tan lignin.

9.1.1.4. Phản ứng ngưng tụ lignin

Ngược với các phản ứng phân huỷ để phân chia lignin thành các phần nhỏ, hoà tan vào dung dịch, khi nấu xenluloza trong môi trường kiềm còn xảy ra phản ứng ngưng tụ, làm tăng khối lượng phân tử lignin. Hiện tượng này cản trở quá trình hoà tan lignin, đặc biệt là ở giai đoạn cuối của quá trình nấu.

Ngưng tụ là khái niệm rộng, trong đó bao hàm cả quá trình kết hợp các phần rất nhỏ của lignin cũng như quá trình đa tụ (trùng ngưng) tạo thành các đại phân tử lignin.

Một số hướng phản ứng ngưng tụ lignin được thể hiện ở sơ đồ 9.10.

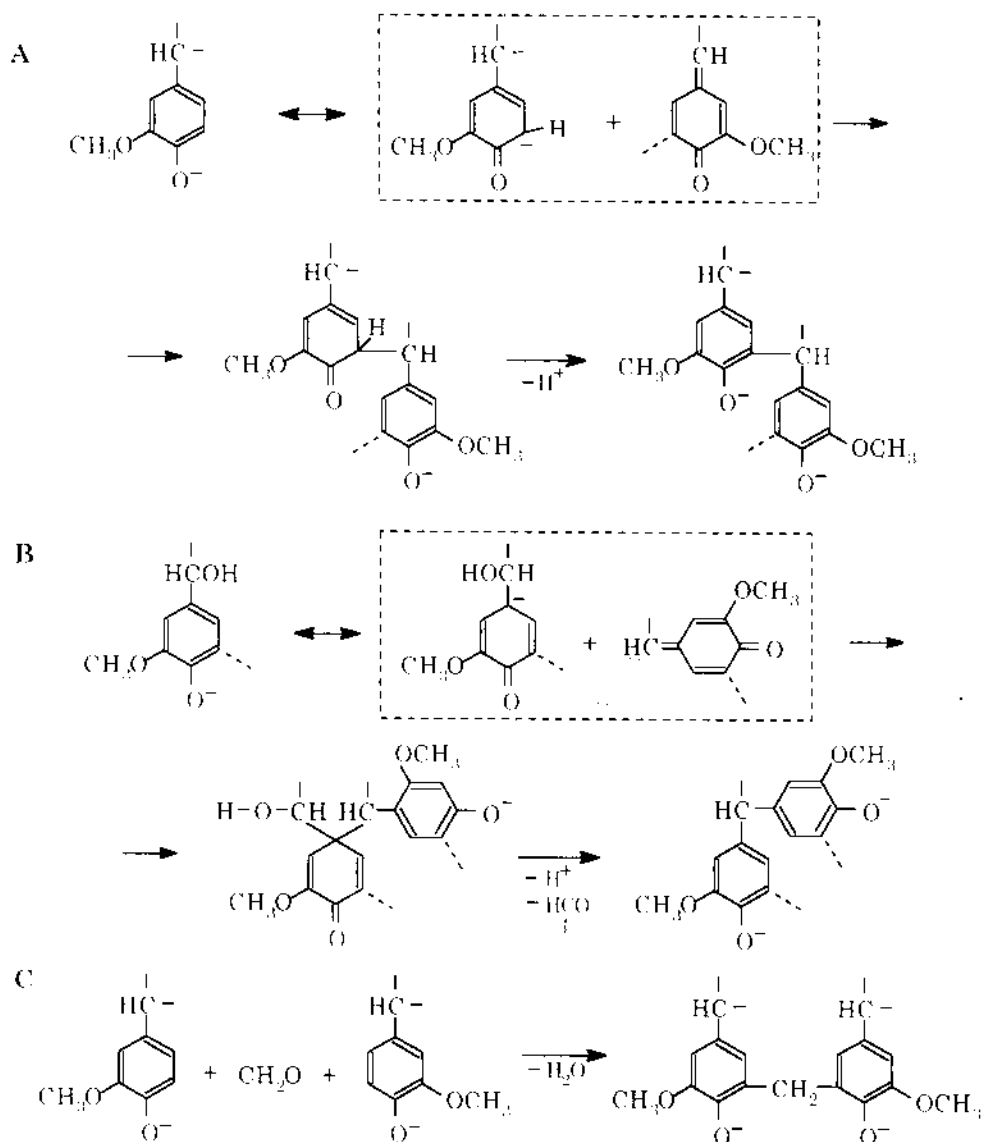
Thực tế là trong phân tử lignin ban đầu có tới một nửa vị trí C_5 không bị thế, sau khi nấu xenluloza trong môi trường kiềm, chỉ còn lại một phần ba số đơn vị C_5 tự do. Từ đó các tác giả cho rằng một trong các vị trí tham gia phản ứng ngưng tụ là C_5 .

Quá trình ngưng tụ ít nhất diễn ra theo ba hướng chính:

A. Phản ứng kết hợp hai đơn vị phenylpropan, với sự tham gia của dạng quinon metit, tạo liên kết C-C ở C_α và C_5 .

B. Kết hợp hai dạng quinon metit, sau phản ứng tách loại ta thu được dime với liên kết C-C ở C_α và C_1 .

C. Phản ứng kết hợp các đơn vị cấu trúc của lignin, với sự tham gia của formaldehyt, sản phẩm tạo ra trong quá trình tách loại metylol. Phản ứng ngưng tụ theo kiểu này dẫn tới sản phẩm diarylmetan, với nhóm CH_2 làm cầu nối giữa đơn vị phenylpropan qua C_α .



Sơ đồ 9.10. Phản ứng ngưng tụ lignin xảy ra trong môi trường kiềm.

Phản ứng dạng này rất giống với quá trình đa tụ hình thành nhựa phenol formaldehyt. Thực tế, các nhà sản xuất cũng sử dụng lignin thay thế một phần phenol để tổng hợp nhựa phenol formaldehyt.

Phản ứng ngưng tụ theo hướng C cũng có thể xảy ra với sự tham gia của đơn vị lignin chứa nhóm cacbonyl, xuất hiện theo sơ đồ 9.9.

Như vậy, các phản ứng ngưng tụ tạo thêm các liên kết C-C trong dime và lignin nói chung, hạn chế quá trình phân huỷ và hoà tan lignin vào dịch nấu.

9.1.2. Vai trò natri sulfua khi nấu xenluloza theo phương pháp sulfat

9.1.2.1. Ngăn ngừa phản ứng ngưng tụ và phân huỷ liên kết ete giữa các monome

Như đã thảo luận ở phần trên, trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp xút, liên kết ete β -aryl có thể chuyển về dạng styrylaryl. Dạng này tương đối dễ hình thành do năng lượng thấp (nhờ hệ thống liên hợp điện tử trong toàn bộ dime).

Hơn nữa, cấu trúc styrylaryl hoặc tương đối ổn định hoặc tham gia vào phản ứng tạo hợp chất cao phân tử.

Như vậy, thực tế là một phần đáng kể liên kết β -aryl trong cấu trúc phenol tự do không bị phân huỷ trong dung dịch NaOH.

Bức tranh có thể khác đi khi có thêm cấu tử Na_2S trong thành phần dịch nấu sulfat. Sự có mặt của ion HS^- , với đặc trưng nucleophil mạnh hơn HO^- , sẽ thúc đẩy quá trình phân huỷ ete β -aryl.

Những công trình thuộc loại đầu tiên nhằm làm sáng tỏ vai trò của Na_2S trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfat là của Hägglund (1941) và Enkvist (1948).

Các tác giả đã sử dụng các chất mô phỏng cấu trúc của lignin để nghiên cứu. Các công trình này đã khơi nguồn cho sự phát triển hoá học lignin trên lĩnh vực này.

Gierer là một trong những tác giả nghiên cứu hệ thống và chi tiết các phản ứng xảy ra khi nấu sulfat.

Hydrosulfua có thể xúc tiến quá trình theo hai hướng chính:

– Hạn chế phản ứng ngưng tụ lignin.

Trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp xút, ít nhất có hai trong số các loại phản ứng ngưng tụ lignin xảy ra tại C_α của cấu trúc quinon metit. Khi có mặt ion hydrosulfua, nhờ mức độ nucleophil cao, ion này phản ứng nhanh với quinon metit tại vị trí α , ngăn ngừa quá trình ngưng tụ lignin.

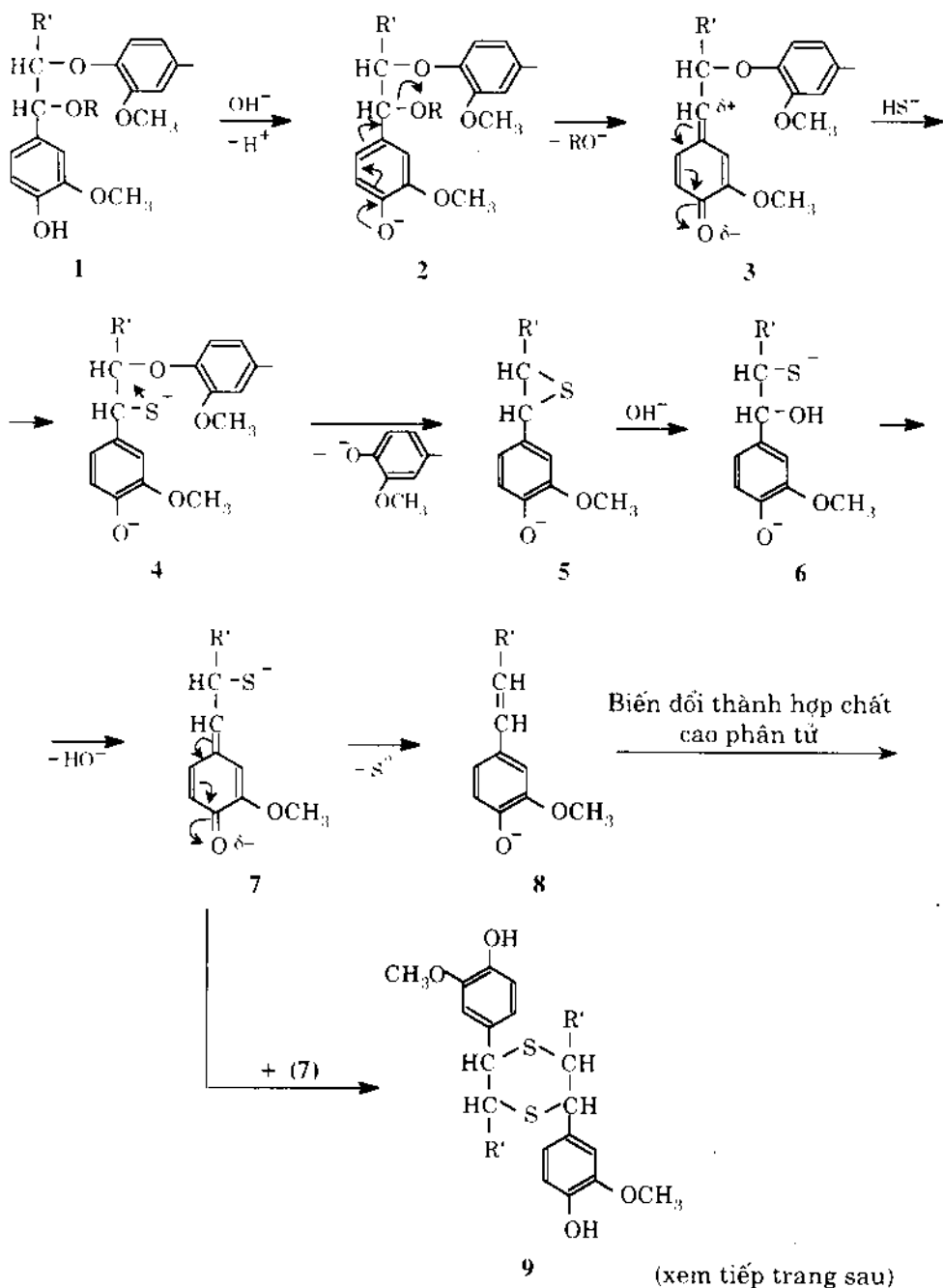
– Phân huỷ mạnh liên kết β -aryl.

Trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp xút, như đã thấy ở sơ đồ 9.9, phản ứng tách loại metylol ở vị trí γ trong cấu trúc quinon metit của ete β -arylglyxerol, giải phóng ra formaldehyt và đưa dime lignin về cấu trúc styrylaryl. Cấu trúc này tương đối ổn định đối với phản ứng thủy phân. Hơn nữa, formaldehyt sinh ra lại tham gia vào quá trình ngưng tụ lignin.

Khi nấu xenluloza theo phương pháp sulfat, hydrosulfua tác dụng nhanh với dạng quinon metit, chuyển hướng phản ứng, ngăn ngừa bớt xu hướng tách loại metylol, nghĩa là giảm khả năng tạo ra formaldehyt cũng như khả năng hình thành dạng styrylaryl, xúc tiến quá trình phân huỷ và hoà tan lignin.

Vai trò của hydrosulfua được thảo luận cụ thể hơn ở các phản ứng phân huỷ lignin theo sơ đồ 9.11.

Dưới tác dụng của OH^- , dạng phenol tự do (1) chuyển về dạng phenolat (2). Do hiệu ứng điện tử diễn ra trong dạng (2), phản ứng tách loại RO^- xảy ra, đưa dime về cấu trúc quinon metit (metylen-quinon) (3). Trong dịch nấu sulfat, ion hydrosulfua HS^- nhanh chóng tấn công vào nguyên tử C_α mang điện tích dương phần (nhờ mức độ nucleophil lớn hơn so với HO^-). Dạng (4) thực hiện quá trình tách loại ArO^- đồng thời tạo vòng episulfua (5). Dưới tác dụng của môi trường kiềm, vòng episulfua bị mở, tạo thành benzyl-mercaptan (6).

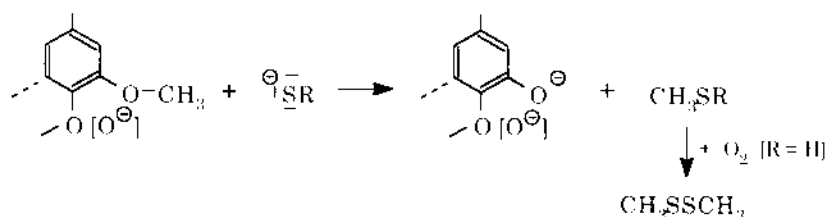


Sơ đồ 9.11. Vai trò của hợp chất lưu huỳnh trong quá trình nấu xenluloza phương pháp sulfat.

9.1.2.2. Phân huỷ liên kết ete metylaryl trong đơn vị phenylpropan

Nhờ mức độ nucleophil cao hơn HO^- nên HS^- có thể phân huỷ liên kết ete của nhóm metoxy, tạo thành phenolat và methylmercaptan. Methylmercaptan chuyển hoá tiếp thành dimetylsulfua và dimetyl-disulfua.

Bản thân hợp chất mercaptan cũng là tác nhân nucleophil, có thể tham gia vào quá trình phân huỷ lignin theo sơ đồ 9.12.



Sơ đồ 9.12. Phản ứng phân huỷ ete metylaryl (nhóm metoxy).

Như vậy, trong quá trình nấu xenluloza xảy ra hai xu hướng trái ngược nhau.

Phản ứng phân huỷ lignin chủ yếu gồm các chuyển hoá làm đứt liên kết ete ở C_α mạch hở và ở C_β , phân chia lignin thành các phần nhỏ hơn. Đây là động lực chính dẫn tới hoà tan lignin.

Trong quá trình nấu xenluloza phương pháp xút hoặc sulfat, liên kết C-C ở vị trí β và γ có thể bị phân huỷ, nếu ở vị trí γ là nhóm metylol. Phản ứng tách loại metylol tạo ra formadehyt thúc đẩy quá trình ngưng tụ lignin. Do đó, phản ứng này không xúc tiến hoà tan lignin.

Liên kết C-C giữa hai đơn vị phenylpropan cũng có thể bị đứt, khi phân huỷ ete dạng vòng phenylcoumaran và pinoresinol. Tuy nhiên đây cũng không phải là động lực chính làm lignin hoà tan.

Tisenco cho rằng, trong quá trình nấu xenluloza phương pháp sulfat, với sự có mặt của chất khử, có thể xảy ra phản ứng đứt liên kết C-C giữa các đơn vị phenylpropan theo cơ chế oxy hoá khử. Tuy

nhiên, cần có thêm nhiều kết quả thực nghiệm trực tiếp để chứng minh cho cơ chế này.

Khi nấu sulfat, ở lignin còn xảy ra quá trình phân huỷ liên kết ete metylaryl. Tuy nhiên phản ứng này chỉ tăng mức độ hydrat hoá của lignin, hỗ trợ quá trình hoà tan, không phải là động lực chính làm lignin chuyển vào dung dịch.

Xu hướng ngược đối với phản ứng phân huỷ lignin là sự ngưng tụ lignin trong điều kiện nấu xenluloza. Phản ứng ngưng tụ xảy ra mạnh vào cuối quá trình nấu, tại đó lignin rất khó tiếp tục hoà tan, trong khi polysaccarit lại bị phân huỷ mạnh.

Vì vậy, quá trình nấu cần kết thúc đúng lúc, chấp nhận sự có mặt một hàm lượng lignin nào đó trong sản phẩm bột xenluloza. Phần lignin còn nằm lại trong bột sẽ được xử lý tiếp ở giai đoạn tẩy trắng xenluloza.

9.2. PHẢN ỨNG CỦA LIGNIN TRONG QUÁ TRÌNH NẤU XENLULOZA THEO PHƯƠNG PHÁP SULFIT

Khi cho nguyên liệu dăm gỗ tác dụng với dung dịch sử dụng để nấu xenluloza theo phương pháp sulfit, trong khoảng nhiệt độ $130 \div 170^{\circ}\text{C}$, lignin chuyển thành sản phẩm phân huỷ là lignosulfonat và hoà tan vào dung dịch.

Dịch nấu sulfit được tạo ra bằng cách cho khí sulfurơ tác dụng với dung dịch nước của các hydroxit kim loại hoặc amoni hydroxit.

Quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfit có thể tiến hành trong môi trường axit với $\text{pH} = 1.5 \div 2$, ở 140°C với việc sử dụng Ca^{2+} để giúp cho lưu huỳnh tồn tại ở dạng muối bisulfit. Phương pháp này cũng có thể thực hiện ở $\text{pH} = 4 \div 5$, khi sử dụng ion Mg^{2+} . Nếu dựa vào ion Na^{+} hoặc NH^{+} , quá trình nấu có thể tiến hành ở các pH cao hơn.

Theo pH của dung dịch, quá trình nấu được phân chia thành sulfit axit, sulfit trung tính hoặc kiềm.

Khi nấu sulfít, chủ yếu xảy ra hai quá trình hoá học, đó là phản ứng thuỷ phân và phản ứng sulfo hoá. Tùy thuộc vào pH của môi trường, các quá trình trên sẽ xảy ra với mức độ khác nhau.

Vì sản phẩm tạo ra khi lignin tác dụng với dung dịch sulfít là axit lignosulfonic, nên quá trình phản ứng được gọi là sulfo hoá. Nhiều tài liệu vẫn dùng thuật ngữ sulfít hoá. Song, gọi như vậy cũng chưa thoả đáng, vì đến nay, tác nhân quá trình là gì vẫn chưa được làm sáng tỏ. (So sánh với quá trình nitrat hoá xenluloza – không phải là nitro hoá).

9.2.1. Tác nhân nucleophil trong quá trình sulfít

Phản ứng sulfo hoá chiếm vị trí quan trọng trong hoá học lignin. Nhiều công trình nghiên cứu được tiến hành và đã đạt một số kết quả về phương diện lý thuyết cũng như thực tiễn.

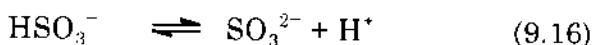
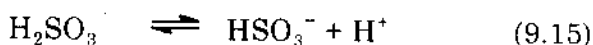
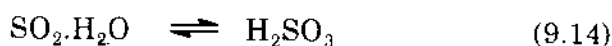
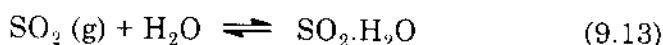
Tuy nhiên, có một vấn đề chưa được sáng tỏ và từ lâu đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học.

Khi cho các chất mô phỏng tác dụng với dung dịch sulfurơ trong nước, với pH = 1,5 ÷ 6, ở nhiệt độ 100 ÷ 150°C, sản phẩm thu được là axit sulfonic.

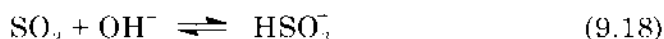
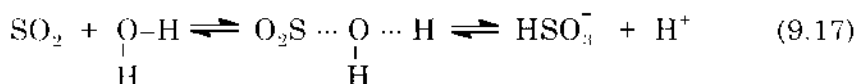
Xét về phương diện hoá trị, lưu huỳnh đã biến đổi từ S⁴⁺ sang S⁶⁺. Qua kết quả phản ứng, dường như đã xảy ra phản ứng oxy hoá khử làm thay đổi hoá trị của lưu huỳnh.

Vậy thực chất vấn đề là thế nào, tác nhân nucleophil là gì? Các nhà khoa học vẫn đang tranh luận để tìm lời giải đáp chính xác cho câu hỏi này.

Theo cách hiểu thông thường, khi SO₂ hoà tan vào nước, một số cân bằng sau được thiết lập:



Song, Ingruber lại cho rằng, trong dung dịch không tồn tại axit sulfuro ở dạng không phân li. Vì vậy, ion bisulfit có thể được tạo thành từ SO_2 theo sơ đồ 9.17 và 9.18.



Hơn nữa, khác với các quan điểm thông thường, tác giả này cho rằng tác nhân sulfo hoá chủ yếu không phải là ion bisulfit mà là lưu huỳnh dioxit ở dạng hydrat hoá $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Song, Lendemann đã xác định thành phần dung dịch nước của SO_2 trong khoảng nhiệt độ $10 \div 35^\circ\text{C}$, với khoảng $\text{pH} = 0.5 \div 4.5$ và nhận thấy, trong dung dịch cùng song song tồn tại các cấu tử SO_2 , H_2SO_3 , HSO_3^- .

Nồng độ của từng cấu tử phụ thuộc vào nhiệt độ và pH của dung dịch. Ví dụ, ở 35°C , với $\text{pH} = 4$, hàm lượng SO_2 và H_2SO_3 rất nhỏ, trong khi đó, hàm lượng HSO_3^- là 98,9%. Ở $\text{pH} = 1.5$, hàm lượng SO_2 là 61,4%, H_2SO_3 là 16,6% và HSO_3^- là 22,0%.

Như vậy axit sulfuro cũng tồn tại trong dung dịch. Tất nhiên, ở khoảng nhiệt độ nấu sulfite $100 \div 150^\circ\text{C}$, tỷ lệ các cấu tử sẽ có nhiều thay đổi.

Dựa trên thành phần dung dịch và khả năng nucleophil của các cấu tử có thể có trong dịch sulfite, một số tác giả cho rằng, tác nhân phản ứng chủ yếu không phải là SO_2 mà là axit sulfuro và các ion dạng muối của chúng. Các cấu tử được sắp xếp theo chiều tăng của mức độ nucleophil:

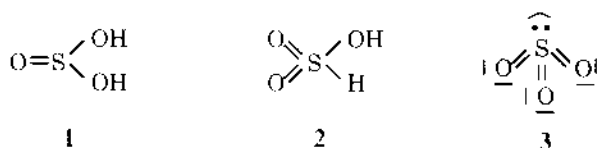


Nếu cấu tạo của axit sulfuro và các ion dạng muối được hiểu theo cách thông thường thì không thể giải quyết được vấn đề thay đổi hoá trị của lưu huỳnh. Do đó, một số nhà nghiên cứu đã hình dung các cấu tử trên có thể có cấu tạo đặc biệt, thể hiện ở sơ đồ 9.20.

Dạng (1) là công thức thường thấy của axit sulfuro. Khi dạng này

phản ứng, sản phẩm sẽ là este, không phải là hợp chất sulfo.

Dạng (2) là sản phẩm tautome của dạng (1). Khi dạng (2) phản ứng, ta sẽ thu được axit sulfonic.



Sơ đồ 9.20. Các dạng cấu tạo của axit sulfuro và ion

Công thức (2) có thể giải đáp được bản chất sản phẩm ligno-sulfonic của phản ứng, nhưng vẫn chưa thể hiện được mức độ nucleophil cao của cấu tử này.

Từ các phân tích trên, tác giả đã đưa ra công thức cấu tạo (3). Ở dạng này, nguyên tử lưu huỳnh có ba orbital phân tử lai tạo tham gia vào liên kết $p.d - \pi$. Cấu trúc như vậy bảo đảm khả năng phân cực mạnh của đám mây điện tử, độ linh động của cặp điện tử tự do (không liên kết) và mức độ nucleophil cao.

Từ cấu tạo trên đây, ta có thể hiểu được chiều tăng của khả năng nucleophil ở sơ đồ 9.19, vì sự hình thành điện tích âm ở nguyên tử oxy nhờ hiệu ứng điện tử +I sẽ làm tăng độ linh động của cặp điện tử không liên kết.

Như vậy, đặc trưng orbital phân tử S-O ở anhydrit sulfuro khác với các cấu trúc trên, nên khả năng phản ứng của nó cũng khác về cơ bản so với axit sulfuro.

Hơn nữa, nếu anhydrit sulfuro phản ứng với lignin với tư cách là tác nhân nucleophil thì không thể tạo thành axit lignosulfonic mà là axit lignosulfinic, mà hợp chất này không được tìm thấy bằng thực nghiệm.

Theo các tác giả này, tác nhân nucleophil của dịch nấu sulfit là axit sulfuro, ion bisulfit và ion sulfit. Nồng độ các ion và axit này được xác định bởi trạng thái cân bằng. Trạng thái cân bằng của chúng phụ thuộc vào pH môi trường, nhiệt độ, áp suất.

Các cấu tử trên đều có thể tham gia phản ứng. Mức độ nucleophil của dung dịch là trung bình các giá trị nucleophil của từng cấu tử.

Trên đây là một số quan điểm khác nhau về tác nhân nucleophil.

Quá trình sulfit đã được áp dụng vào công nghiệp sản xuất bột xenluloza từ hơn một thế kỷ, vậy mà vấn đề lý thuyết cơ bản vẫn chưa được làm sáng tỏ.

9.2.2. Phản ứng hoá học ở các nhóm cấu trúc của lignin trong quá trình sulfit axit

9.2.2.1. Phản ứng ở cấu trúc ete mạch hở

Adler (1952) là một trong những người đầu tiên nghiên cứu quá trình sulfo hoá trên các chất mô phỏng. Tác giả đã cho chất 1a (sơ đồ 9.21) tác dụng với dung dịch sulfit pH = 1.5 + 6.0, ở 135°C trong 7.5 h. Sản phẩm phản ứng kết tủa dưới dạng muối bari.

Trên cơ sở số liệu về phân tích nguyên tố, xác định nhóm chức và phân tích UV, tác giả kết luận rằng sản phẩm (4) vẫn giữ nguyên liên kết ete ở vị trí β và đó là hợp chất có chứa nhóm axit sulfonic ở C_{α} .

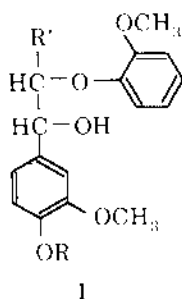
Qua nghiên cứu động học, tác giả nhận thấy, khi pH tăng, tốc độ phản ứng giảm.

Ngoài ra, các nhà nghiên cứu cũng nhận thấy dạng (2b) phản ứng nhanh hơn nhiều so với dạng (1b), vì dạng (1b) có cản trở không gian của nhóm thế lớn ở vị trí β .

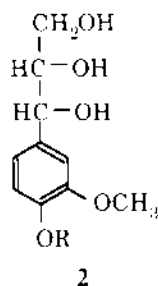
Với pH = 1.5, tốc độ sulfo hoá dạng (3b) và dạng (1b) tương tự nhau. Nhưng khi pH cao hơn, tốc độ phản ứng ở dạng (1b) cao hơn dạng (3b).

Một số tác giả khác đã nghiên cứu tiếp về quá trình biến đổi lignin có cấu trúc kiểu trên. Qua sulfo hoá chất (1a), (1b), (1c), (1d) ở pH = 1.5, nhiệt độ 135°C, trong thời gian 7 giờ, xuất hiện các sản phẩm tương ứng, chứa nhóm axit sulfonic ở C_{α} , với hiệu suất 64 + 97%.

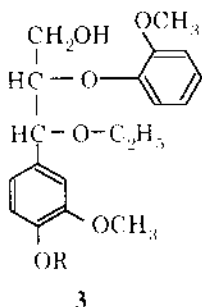
Để xác định sản phẩm, tác giả đã tiến hành metyl hoá rồi axetyl hoá các hợp chất thu được sau sulfo hoá. Các dạng 5a, 5b, 5c, 5d được nghiên cứu bằng NMR và khối phổ.



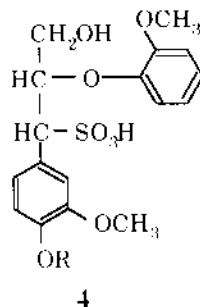
- 1a) R = H; R' = CH₂OH
 1b) R = CH₃; R' = CH₂OH
 1c) R = H; R' = H
 1d) R = CH₃; R' = H



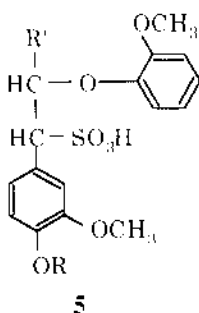
- 2a) R = H
 2b) R = CH₃



- 3a) R = H
 3b) R = CH₃



- 4a) R = H
 4b) R = CH₃



- 5a) R = COCH₃; R' = CH₂OCOCH₃
 5b) R = CH₃; R' = CH₂OCOCH₃
 5c) R = COCH₃; R' = H
 5d) R = CH₃; R' = H

Sơ đồ 9.21. Phản ứng của các chất mô phỏng lignin trong quá trình nấu sulfite

Kết quả thực nghiệm chỉ ra rằng, các chất sau phản ứng còn chứa một lượng chất ban đầu không phản ứng có dấu vết của guaiacol và các hợp chất đặc trưng phenol không xác định rõ cấu trúc.

Ngoài ra, trong quá trình phản ứng, dạng phenol tự do bị ngưng tụ mạnh, tạo thành hợp chất cao phân tử.

Để làm sáng tỏ cơ chế thể nucleophil, các nhà nghiên cứu đã tiến hành sulfo hoá dạng erythro và threo của các hợp chất 1a, 1b, 1c, 1d.

Không phụ thuộc vào cấu tạo lập thể ban đầu của chất mô phỏng, sản phẩm thu được đều chứa hỗn hợp các đồng phân với tỷ lệ hầu như không đổi.

Từ đó, các tác giả cho rằng, không phụ thuộc vào cấu trúc phenol tự do hay phenol thế, các phản ứng đều xảy ra theo cơ chế S_N1 .

Tuy nhiên ở pH cao hơn 2, quá trình diễn ra ở C_α giống như thế nucleophil trong trường hợp có cản trở không gian, theo cơ chế S_N2 .

Nếu như quá trình hoàn toàn theo cơ chế S_N1 , sự chuyển hoá các dạng đồng phân lập thể sẽ đưa tới tỷ lệ erythro : threo = 1 : 1. Sự vượt trội của dạng erythro trong sản phẩm sulfo hoá chứng tỏ quá trình epime hoá xảy ra trước phản ứng thế nucleophil (xem khái niệm epime ở chương 2, T1).

Ở một số dạng cấu trúc của lignin, nhờ hiệu ứng điện tử diễn ra trong nhóm thế tại vị trí α và β , cơ chế S_N1 sẽ ưu tiên hơn.

Trong quá trình sulfo hoá cũng xuất hiện các hợp chất cao phân tử. Điều này chứng tỏ, ở điều kiện nấu sulfite cũng tồn tại phản ứng tách loại và ngưng tụ cạnh tranh với phản ứng sulfo hoá.

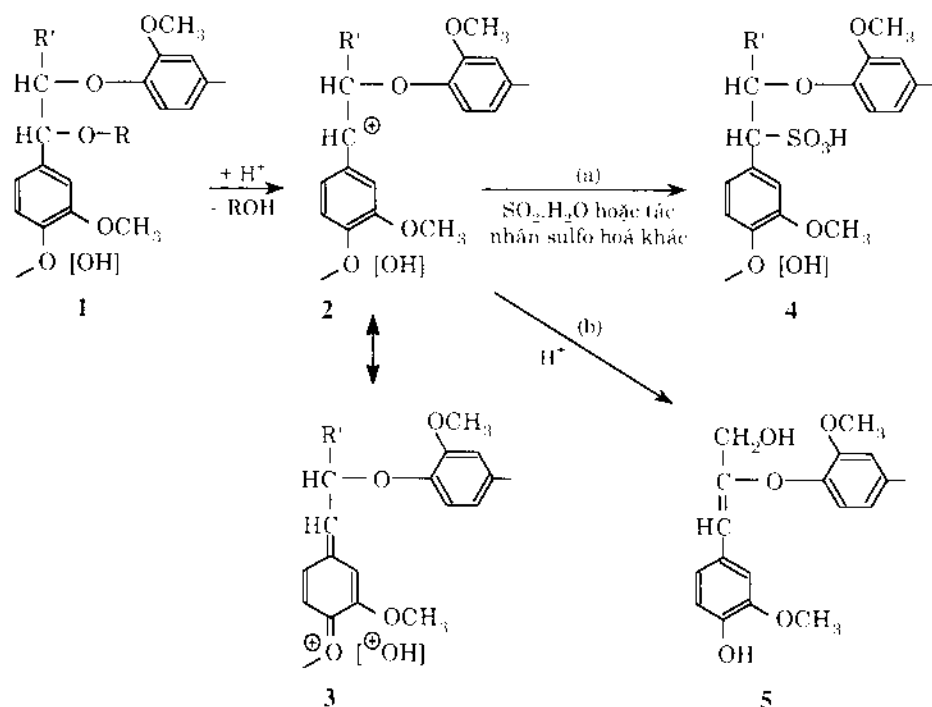
Từ các thực nghiệm và phân tích lý thuyết ở trên, các tác giả cho rằng, quá trình sulfo hoá lignin xảy ra theo sơ đồ 9.22.

Dưới tác dụng của H^+ , liên kết ete ở C_α bị đứt, xuất hiện ion cacboni ở vị trí α (2). Ion benzyl dễ hình thành do tồn tại dạng cộng hưởng.

Tiếp đó, xảy ra quá trình sulfo hoá ở C_α do sự tấn công của ion bisulfite (hoặc SO_2 hydrat hoá), tạo thành axit lignosulfonic (4).

Với điều kiện phản ứng như trên, liên kết ete β -aryl không bị phân huỷ.

Trong nguyên liệu gỗ, ví dụ, gỗ lá kim, dạng liên kết ete mạch hở $C_{\alpha}-OR$ chỉ chiếm 6 ÷ 8%, nhưng sự phân huỷ liên kết này cũng góp phần quan trọng vào quá trình hoà tan lignin.



Sơ đồ 9.22. Phản ứng sulfo hoá lignin dạng phenol và phenol thế (liên kết β -aryl không bị phân huỷ)

$R = H, \text{ alkyl, aryl}$

a) $R' \neq CH_2OH$ và cả $R' = CH_2OH$;

b) $R = CH_2OH$, cấu trúc phenol tự do.

9.2.2.2. Phản ứng ở cấu trúc ete mạch vòng

a) Cấu trúc ete vòng coumaran

Sự biến đổi cấu trúc vòng coumaran trong quá trình sulfit chưa được sáng tỏ hoàn toàn.

Freudenberg cho rằng, dưới tác dụng của dịch sulfit, liên kết ete trong cấu trúc coumaran bị đứt, rồi xuất hiện nhóm sulfo ở C_6 .

Tuy nhiên, một số tác giả khác nhận thấy quá trình hoá học ở cấu trúc vòng này còn diễn ra phức tạp hơn, trong đó xuất hiện thêm những liên kết mới.

b) Cấu trúc ete vòng pinoresinol

Người đầu tiên thực hiện quá trình sulfo hoá hợp chất dạng pinoresinol trong cấu trúc phenol tự do của lignin là Erdtman (1943).

Khi cho các chất dạng này tác dụng với dịch sulfit, $\text{pH} = 1.5 \div 2.0$, nhiệt độ 135°C , các chất phản ứng chuyển thành sản phẩm dạng nhựa.

Sau đó, nhiều công trình khác đã được thực hiện.

Khi sulfo hoá các chất cấu trúc phenol tự do, $\text{pH} = 2.0 \div 11.0$, một số tác giả nhận thấy, ở $\text{pH} = 2.0$, 18% lượng mẫu bị hoà tan. Nhưng với $\text{pH} \geq 6$, có tới 93 ÷ 99% chất ban đầu chuyển vào dung dịch. Ở pH 6.0 và 8.0, sản phẩm vô định hình được tách ra, với hàm lượng lưu huỳnh cao, có giải hấp thụ UV đặc trưng cho nhóm chức rượu guaiacylic.

Với cấu trúc phenol thế, ở $\text{pH} = 2.0 \div 3.0$, một phần chất ban đầu chuyển thành sản phẩm ngưng tụ vô định hình không chứa lưu huỳnh.

Trong khoảng $\text{pH} = 4.0 \div 6.0$, quá trình sulfo hoá diễn ra chậm, chỉ chuyển 8 ÷ 9% chất ban đầu vào dung dịch.

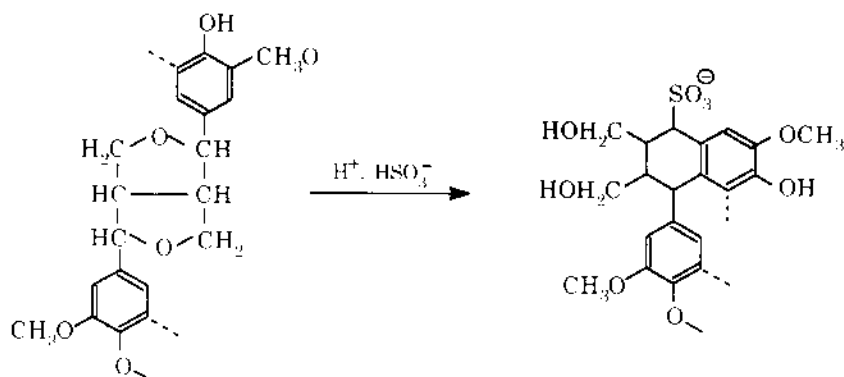
Trong môi trường kiềm, phản ứng xảy ra rất chậm, rất ít sản phẩm chuyển hoá.

Để nghiên cứu cơ chế phản ứng, một số tác giả đã tiến hành quá trình sulfo hoá trong môi trường axit và nghiên cứu sản phẩm bằng phương pháp NMR và khối phổ. Các tác giả đã xác định được là trong sản phẩm có chứa dạng dime với liên kết C-C mới, như ở sơ đồ 9.23.

9.2.2.3. Cấu trúc lignin có liên kết C=C ở α và β

Tỷ lệ dạng cấu trúc này ở lignin không lớn, nhưng trong quá trình nấu xenluloza, loại hợp chất này được tạo ra thêm từ các hướng phản ứng khác. Do đó, đơn vị cấu trúc này cũng đóng vai trò nhất định trong quá trình sulfo hoá.

Đặc điểm lớn của nhóm cấu trúc này là có hệ thống liên hợp điện tử gồm vòng thơm và liên kết kép ở α , β .



Sơ đồ 9.23. Phản ứng ở cấu trúc ete vòng pinoresinol

Khả năng sulfo hoá của rượu coniferylic đã được Klason phát hiện từ 1897. Từ đó, nhiều tác giả đã nghiên cứu về quá trình sulfo hoá nhóm cấu trúc lignin này.

Từ kết quả của nhiều công trình, bức tranh chung về biến đổi hoá học của lignin có cấu trúc coniferylic được thể hiện ở sơ đồ 9.24.

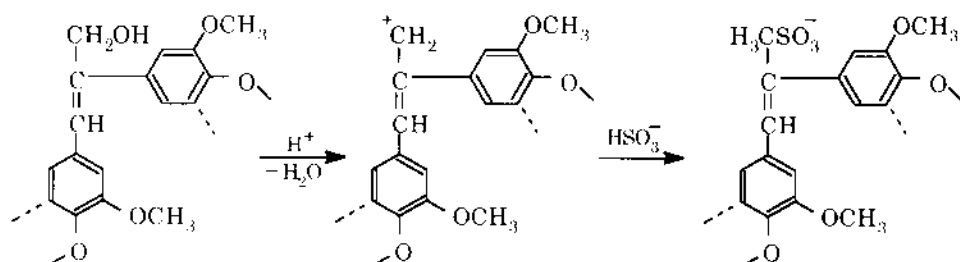
Trước tiên, proton tấn công vào hydroxyl của metylol. Sau đó, xảy ra phản ứng tách nước, hình thành ion cacboni ở γ (3), tồn tại cộng hưởng với dạng cacboni ở α (4). Các dạng cộng hưởng này tham gia phản ứng, tạo ra axit monosulfonic (5) và (6).

Ở giai đoạn tiếp theo, quá trình sulfo hoá tiếp tục diễn ra bằng cách cộng hợp ion bisulfite vào nối đôi, theo cơ chế nucleophil, dưới tác dụng của xúc tác axit. Nhờ hiệu ứng -I, nhóm sulfo ở vị trí β của cả hai loại axit sulfonic có mật độ điện tử cao hơn, trở thành đích tấn công của proton. Nhờ đó, hợp chất disulfonic hình thành, với nhóm sulfo ở α và γ .

Ngoài phản ứng chính, proton cũng làm xúc tác cho quá trình trùng hợp các hợp chất không no (5) theo cơ chế cation, tạo thành dime và có thể tiếp tục phát triển mạch thành polyme.

Cấu trúc lignin kiểu stilben, với liên kết kép ở α và β cũng là sản phẩm trung gian thường được tạo ra trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfit axit.

Tương tự như ở sơ đồ 9.24, cấu trúc stilben với nhóm metylol ở γ có thể tham gia phản ứng sulfo hoá theo sơ đồ 9.25, tạo thành hợp chất chứa nhóm sulfo ở C_γ .



Sơ đồ 9.25. Phản ứng của nhóm cấu trúc stilben trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfit axit.

9.2.2.4. Cấu trúc lignin chứa nhóm cacbonyl

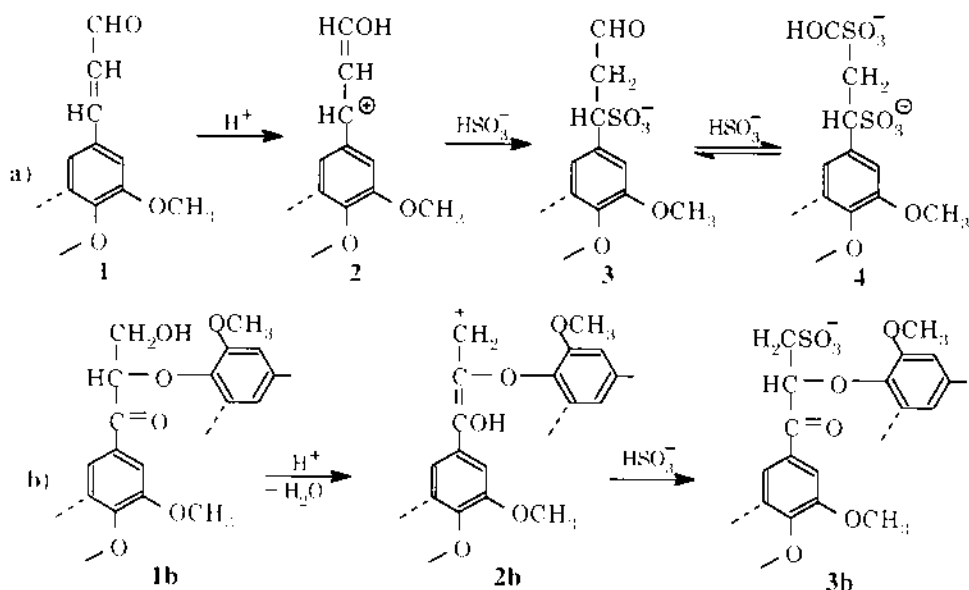
Dưới tác dụng của dịch nấu sulfit axit, nhóm cấu trúc của lignin chứa cacbonyl cũng tham gia phản ứng.

- Cấu trúc dạng coniferaldehyt vừa chứa nhóm aldehyt vừa có nối đôi, phản ứng tạo hợp chất disulfonic theo sơ đồ 9.26a.

Sau khi kết hợp proton vào nhóm cacbonyl, xuất hiện dạng ion cacboni ở α (2). Cacbonyl phản ứng với ion bisulfit tạo thành hợp chất monosulfonic (3). Phản ứng cộng hợp ion bisulfit vào nhóm cacbonyl dẫn tới hợp chất disulfonic (4).

- Trường hợp cấu trúc dạng xeton vừa chứa nhóm xeton vừa có nhóm metylol ở γ , phản ứng dẫn tới sản phẩm monosulfonic, với nhóm sulfo ở γ . Quá trình được mô tả ở sơ đồ 9.26b.

Trước hết, proton tấn công vào hydroxyl của metylol. Sau khi tách nước, xuất hiện ion cacboni ở γ . Ion bisulfit phản ứng với cacboni, tạo thành hợp chất sulfonic. Trong trường hợp này, nhóm xeton không tham gia phản ứng sulfo hoá.

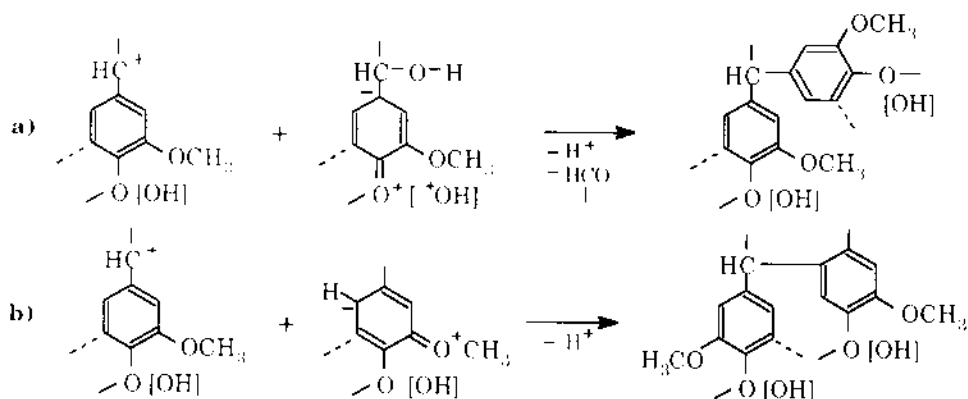


Sơ đồ 9.26. Biến đổi hoá học ở đơn vị cấu trúc chứa nhóm cacbonyl:
a. Cấu trúc aldehyt; b. Cấu trúc xeton có OH ở C_γ.

9.2.2.5. Phản ứng ngưng tụ lignin trong môi trường axit

Song song với quá trình đứt liên kết ete ở C_α và sulfo hoá ở α, γ, lignin còn tham gia phản ứng ngưng tụ, tăng kích thước phân tử, cản trở sự hoà tan lignin vào dịch nấu.

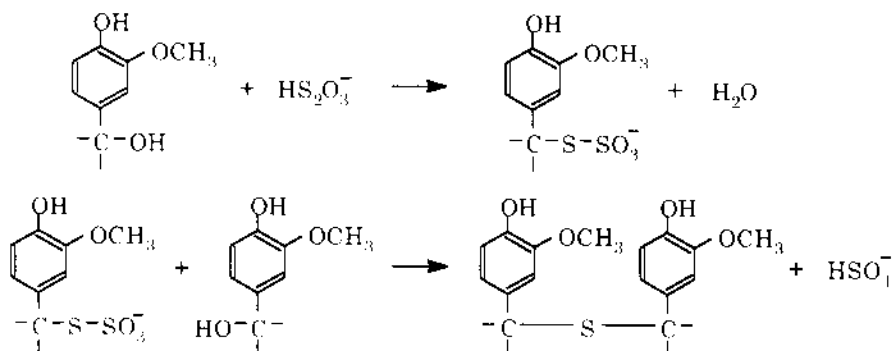
Ion cacboni có thể tham gia phản ứng sulfo hoá, nhưng cũng sẵn sàng kết hợp với đơn vị cấu trúc khác của lignin, tạo ra liên kết C-C. Một số hướng phản ứng ngưng tụ được trình bày ở sơ đồ 9.27a và 9.27b.



Sơ đồ 9.27. Một số hướng phản ứng ngưng tụ lignin.

Theo (a), phản ứng ngưng tụ tạo ra liên kết mới $C_\alpha-C_1$. Ở (b), liên kết mới là $C_\alpha-C_\alpha$.

Lignin cũng có thể ngưng tụ do các biến đổi hoá học với sự tham gia của ion thiosulfat. Ion này xuất hiện trong dịch nấu do chuyển hoá bisulfit. Quá trình ngưng tụ lignin theo hướng này được minh hoạ ở sơ đồ 9.28.



Sơ đồ 9.28. Phản ứng ngưng tụ lignin dưới tác dụng của thiosulfat.

Nói chung, quá trình ngưng tụ làm tăng khối lượng phân tử lignin, giảm khả năng hoà tan của chúng. Song, đối với ete vòng, ví dụ, pinoresinol, quá trình ngưng tụ có thể diễn ra trong phạm vi dime. Trong trường hợp đó, khối lượng phân tử không tăng, nhưng dù sao các liên kết C-C mới cũng làm giảm cơ hội phản ứng phân huỷ để hoà tan lignin.

Trong quá trình sulfit axit, lignin không những ngưng tụ với nhau mà còn có thể ngưng tụ với nhựa cây đặc trưng phenol. Vì vậy, những loại gỗ này không thích hợp với phương pháp nấu sulfit axit.

9.2.3. Phản ứng hoá học ở các nhóm cấu trúc của lignin trong quá trình sulfit trung tính và sulfit môi trường kiềm

9.2.3.1. Quá trình sulfit trung tính

Quá trình sulfit trung tính, trong đó dung dịch nấu xenluloza có pH ban đầu là 7,0. Nhưng thực tế phản ứng cũng xảy ra trong môi

trường kiềm. Vì ở nhiệt độ cao, ion sulfit bị thủy phân, tạo ra môi trường kiềm theo sơ đồ:



Do đó, phản ứng sulfo hoá trong môi trường trung tính cũng tiến hành dưới tác dụng của xúc tác bazơ, trong đó, phần tử động học là ion phenolat.

Tác nhân nucleophil chủ yếu là ion sulfit.

Ở pH = 7.0, trong dung dịch tồn tại tỷ lệ giữa ion sulfit và bisulfit là 1 : 1. Khi pH tăng lên, thành phần ion sulfit cũng tăng lên.

Hơn nữa, như đã phân tích ở phần trước, mức độ nucleophil của ion sulfit cao hơn nhiều so với ion bisulfit.

a. Cấu trúc ete mạch hở

Để nghiên cứu quá trình sulfit các nhà khoa học cũng sử dụng các chất mô phỏng cho các dạng cấu trúc của lignin. Một trong những người đầu tiên dùng các chất mô phỏng để nghiên cứu là Lindgren (1947). Từ đó nhiều công trình khác đã được công bố, dần dần làm sáng tỏ biến đổi hoá học của lignin trong quá trình nấu sulfit trung hoà và kiềm.

Trong quá trình sulfit trung tính, các phần lignin có cấu trúc phenol tự do là cấu tử chủ yếu tham gia phản ứng phân huỷ và sulfo hoá (sơ đồ 9.30).

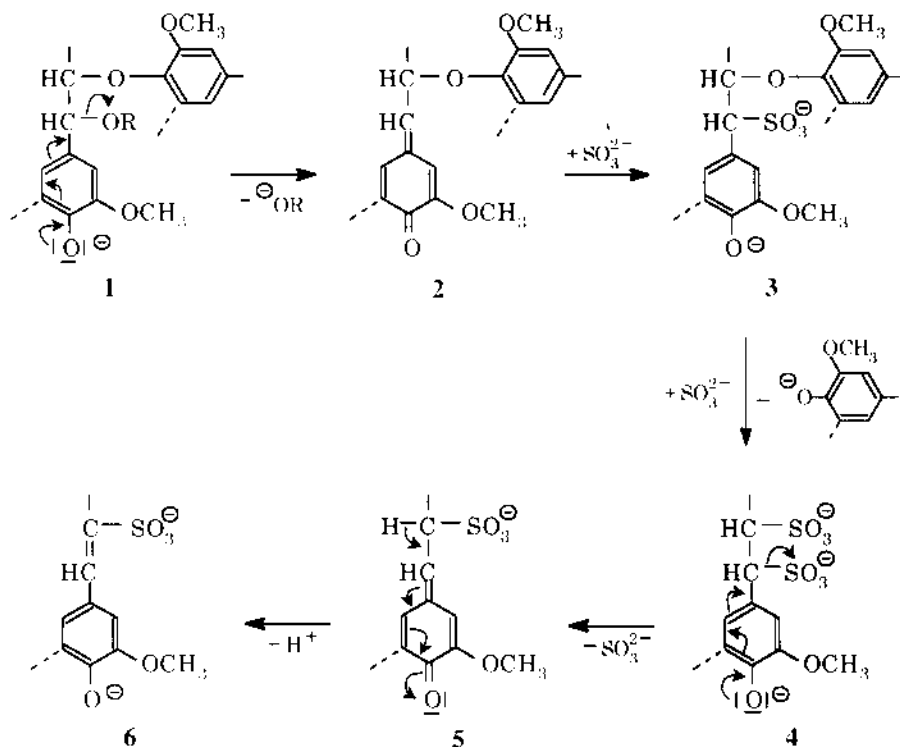
Đầu tiên, đơn vị phenyl propan chuyển về dạng quinon metit (metylenquinon) (2), đồng thời tách loại hydroxy benzylic hoặc RO khỏi C_α.

Dạng quinon metit phản ứng với ion sulfit (hoặc bisulfit) tạo thành hợp chất sulfonat có nhóm sulfo ở vị trí C_α (3). Sự có mặt của nhóm sulfo mang điện tích âm tạo thuận lợi cho phản ứng phân huỷ liên kết ete ở β và đính nhóm sulfo vào vị trí này (4).

Ở hợp chất (4), hiệu ứng điện tử diễn ra, tạo điều kiện tách nhóm thế SO₃⁻ ra khỏi C_α, dẫn tới dạng quinon metit (5). Sau khi tách

hydro khỏi C_β , dạng (5) chuyển thành dạng styren chứa nhóm sulfo ở C_β (6). Quá trình này diễn ra mạnh khi $\text{pH} > 7$.

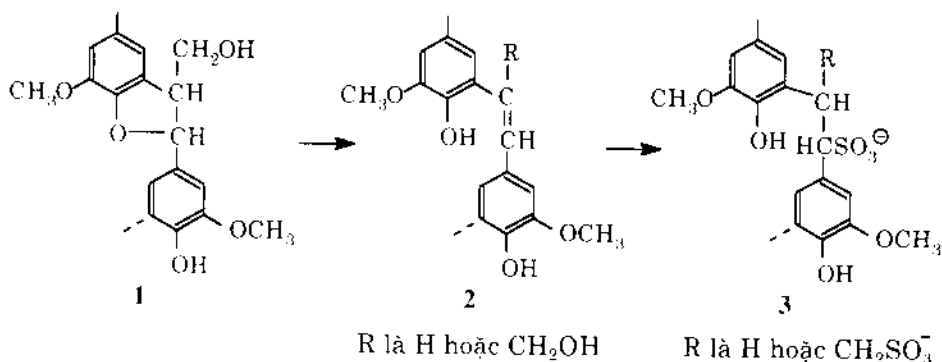
Sự phân huỷ liên kết ete ở α và β tạo thêm các đơn vị cấu trúc phenol tự do, thúc đẩy quá trình phân huỷ và sulfo hoá hoà tan lignin.



Sơ đồ 9.30. Phản ứng ở cấu trúc phenol tự do: phân huỷ liên kết ete ở α và β . $\text{R} = \text{H, alkyl, aryl}$

b. Cấu trúc ete vòng

Vòng phenylcoumaran (cũng như vòng pinoresinol) có thể tham gia phản ứng theo hai hướng: sulfo hoá bình thường, tạo hợp chất sulfo ở α và γ (3), hoặc tách loại metylol, tạo thành các dạng có cấu trúc liên hợp điện tử (2) (sơ đồ 9.31).

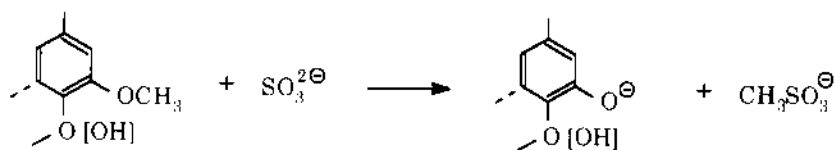


Sơ đồ 9.31. Phản ứng sulfo hoá và phản ứng tách loại metylol ở cấu trúc ete vòng phenylcoumaran.

Các chuyển hoá ở cấu trúc vòng không dẫn tới đứt liên kết C-C giữa các đơn vị cấu trúc phenylpropan. do đó, không làm giảm độ biến về kích thước phân tử lignin.

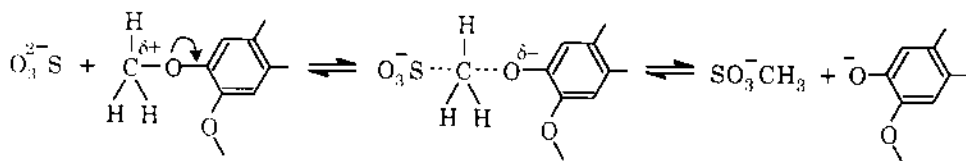
c. Phân huỷ liên kết ete metylaryl

Nhóm metoxy khá bền trong điều kiện nấu sulfít axit. Tuy nhiên, khi nấu xenluloza theo phương pháp sulfít trung tính, liên kết ete metylaryl lại bị phân huỷ, tạo thành phenolat và metansulfonat (sơ đồ 9.32).



Sơ đồ 9.32. Phân huỷ ete metylaryl khi nấu sulfít trung tính.

Phản ứng phân huỷ ete metylaryl theo cơ chế $\text{S}_{\text{N}}2$ (sơ đồ 9.33).



Sơ đồ 9.33. Cơ chế phản ứng phân huỷ liên kết ete metylaryl.

9.2.3.2. Quá trình sulfit môi trường kiềm

Xenluloza cũng được sản xuất theo phương pháp sulfit môi trường kiềm.

Phản ứng của lignin trong quá trình này có nhiều điểm tương đồng với sulfit trung tính cũng như phương pháp nấu xenluloza sulfat.

Trong quá trình sulfit môi trường kiềm, phản ứng phân huỷ ete β -aryl xảy ra ở cả cấu trúc phenol tự do và phenol thế.

Quá trình ngưng tụ lignin diễn ra ít hơn so với phương pháp sulfat.

Chương 10

CÁC CHẤT TRÍCH LY

10.1. KHÁI NIỆM CHUNG VỀ CÁC CHẤT TRÍCH LY

Ngoài các cấu tử chính của thành tế bào là xenluloza, hemi-xenluloza và lignin, gỗ cũng như các thực vật nói chung còn chứa một hàm lượng nào đó các chất trích ly.

Chất trích ly là nhóm các hợp chất có thể hoà tan được trong nước hoặc dung môi trung hoà. Dung môi hữu cơ có thể là etylic, axeton, diclometan hoặc một số hỗn hợp dung môi.

Các chất trích ly bao gồm nhiều loại hợp chất có cấu tạo phân tử khác nhau, với những nhóm chức khác nhau, như các chất mạch béo, hợp chất họ tecpen, các polyphenol, một số cacbohydrat và dẫn xuất cũng như hợp chất chứa nitơ và một số muối khoáng...

Thông thường chất trích ly tập trung ở vỏ nhiều hơn ở phần thân gỗ. Một số loài cây lại có chất trích ly ở rễ, hoa, lá hoặc quả.

Ở các loại cây có họ hàng với nhau, chất trích ly thường tương tự nhau, tuy vậy, cũng có thể có những đặc điểm riêng đối với từng loài.

Các chất trích ly ở cây lá kim và cây lá rộng có nhiều nét khác nhau.

Nhiều cây lá kim có hệ thống kênh dẫn nhựa dọc và ngang thân. Nhựa được sinh ra từ các tế bào bao quanh kênh dẫn nhựa. Loại nhựa này được gọi là nhựa dầu (oleoresin). Ở gỗ lá kim, nhựa dầu chứa nhiều chất họ tecpen và dẫn xuất, đặc biệt là axit nhựa. Ở gỗ thông, hàm lượng axit nhựa trong nhựa dầu có thể chiếm tới 70 ÷ 80%.

Ở gỗ lá kim, ngoài nhựa dầu có trong kênh dẫn nhựa, nhựa cây còn nằm trong tế bào parenchym. Hơn 95% tế bào parenchym nằm ở tia gỗ. Ở phần gỗ giác, các tế bào này là tế bào sống. Ở phần gỗ lõi, các tế bào này ngừng hoạt động. Nhựa trong parenchym bao gồm chủ yếu là este

của axit béo và các hợp chất sterol.

Trong quá trình nấu xenluloza từ dăm gỗ lá kim, nhựa trong kênh dẫn nhựa dễ bị phân tán vào dịch nấu.

Ngược lại, nhựa trong tế bào parenchym thường nằm lại trong đó, đặc biệt khi ruột (khoảng) tế bào nhỏ và thành tế bào chắc.

Đối với những loại nguyên liệu có tế bào parenchym như vậy, để giảm bớt hàm lượng nhựa trong bột xenluloza, cần tiến hành sàng chọn để tách bớt tế bào parenchym chứa nhựa.

Gỗ lõi của cây lá kim thường chứa nhiều chất trích ly. Gỗ lõi bắt đầu hình thành cùng với sự chấm dứt hoạt động sinh học của tế bào parenchym.

Trong quá trình hình thành gỗ lõi, nhiều phản ứng hoá học xảy ra. Một lượng lớn chất trích ly xuất hiện, thấm khắp phần gỗ lõi.

Hàm lượng chất trích ly có thể tăng từ 4% lên 12 ÷ 14% ở các loại gỗ thông.

Chất trích ly của gỗ lõi thường chứa nhiều polyphenol, có tác dụng bảo vệ cây khỏi sự phá hoại của vi sinh vật và côn trùng.

Chất trích ly ở gỗ lá rộng khác với gỗ lá kim.

Gỗ lá rộng không có kênh dẫn nhựa như ở trong gỗ lá kim. Do đó, gỗ lá rộng không có nhựa dầu.

Nhựa ở gỗ lá rộng tập trung ở tế bào parenchym nối với ống dẫn.

Nhựa gỗ lá rộng gồm có chất béo, sáp, hợp chất sterol...

Cũng như ở gỗ lá kim, khả năng thẩm hoá chất để tách nhựa khỏi tế bào parenchym phụ thuộc vào kích thước mao quản cũng như độ bền cơ học của tế bào tia parenchym.

Khả năng tách nhựa khác nhau phụ thuộc vào các loài cây.

Nói chung, những loại gỗ nhiều nhựa không thích hợp với quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfít.

Đối với nguyên liệu gỗ nhiều nhựa, các nhà sản xuất thường dùng phương pháp nấu sulfat.

Tuy vậy, trong nhiều trường hợp, chẳng hạn ở gỗ bạch đàn, sự có mặt của nhựa cũng gây ảnh hưởng xấu ít nhiều tới quá trình nấu sulfat, tẩy, rửa bột xenluloza.

Hàm lượng và thành phần các chất trích ly phụ thuộc vào loài cây, phụ thuộc vào các bộ phận của cây cũng như điều kiện sinh trưởng của chúng.

Tuỳ mục đích sử dụng, ta có thể khai thác chất trích ly ở hoa, lá, quả, vỏ, thân gỗ hoặc rễ cây.

Chất trích ly thường được phân chia thành các nhóm sau:

- Hợp chất mạch béo, như axit béo, chất béo...
- Các hợp chất dây tecpen và dẫn xuất, gọi chung là tecpenoit hoặc đơn giản gọi là các chất tecpen.
- Các hợp chất phenol như flavonoit, lignan, stilben...
- Cacbohydrat như đường, oligosaccarit, một số ít polysaccarit.
- Các hợp chất chứa nitơ.
- Các chất vô cơ...

Về thuật ngữ chỉ các hợp chất trong nhóm chất trích ly, chúng tôi cố gắng giữ nguyên gốc từ tiếng Anh để người đọc dễ tra cứu.

10.2. CÁC LOẠI CHẤT TRÍCH LY

10.2.1. Các hợp chất mạch béo

Ở phần này dễ dō lẫn lộn với các thuật ngữ chất béo, axit béo.... chúng ta có thể dùng thuật ngữ aliphatic để chỉ nhóm chất mạch béo.

Trong các chất trích ly của gỗ có thể có các hợp chất sau: alkan, rượu, axit béo, chất béo (este của glyxerin với axit béo), sáp (este của axit béo với các rượu không phải là glyxerin), polyestolit...

Các hợp chất aliphatic trong chất trích ly của gỗ được trình bày tóm lược ở bảng 10.1.

Các hợp chất alken thường chỉ có ở một số ít loài cây.

Rượu mạch béo cũng tồn tại với hàm lượng nhỏ. Rượu chủ yếu là

arachinol (C_{20}), behenol (C_{22}) và một phần là lignocerol (C_{24}).

Các chất loại này khá bền dưới tác động của hoá chất.

Hợp chất aliphatic chủ yếu của thực vật là axit béo.

Bảng 10.1. Các chất dãy aliphatic trong gỗ và vỏ cây

	alkan và alcol	
<i>n</i> -alkan	$CH_3-(CH_2)_n-CH_3$	$n = 8 \div 30$
Alcol	$CH_3-(CH_2)_n-CH_2OH$	$n = 16 \div 22$
Axit béo	$CH_3-(CH_2)_n-COOH$	$n = 10 \div 24$
Chất béo (este của glycerin)	$\begin{array}{c} CH_2-O-R' \\ \\ CH-O-R'' \\ \\ CH_2-O-R''' \end{array}$	R', R'', R''' là gốc của axit béo hoặc H
Sáp (este của các loại rượu khác)	$\begin{array}{c} R-C-O-(CH_2)_n-CH_3 \\ \\ O \\ R-C-O-sterol \\ \\ O \\ R-C-O-tecpenol \\ \\ O \end{array}$	R: gốc axit béo
Suberin (polyestolit)	Chứa các liên kết đặc trưng như: $\left[O-(CH_2)_n-C \begin{array}{c} \\ O \end{array} \right]$ $\left[O-(CH_2)_n-O-C \begin{array}{c} \\ O \end{array} -(CH_2)_n-C \begin{array}{c} \\ O \end{array} \right]$	$n = 18 \div 28$

Axit béo có thể tồn tại dạng tự do hoặc dưới dạng este của glycerin gọi là chất béo, hoặc este của rượu khác gọi là sáp. Chất béo thường tập trung ở hạt, nhưng cũng có trong phần gỗ, thậm chí một số loại gỗ chứa hàm lượng khá lớn chất béo. Axit béo và chất béo là cấu tử chính của nhựa trong tế bào parenchym của gỗ lá kim và lá rộng. Đó là nguồn dự trữ dinh dưỡng của cây.

Este quan trọng nhất của axit béo là triglyxerit. Ngoài ra cũng có mono và diglyxerit.

Axit béo cũng tạo este với một số rượu có phân tử lượng lớn hơn glyxerin, như dẫn xuất rượu của dãy teepen hoặc rượu sterol. Các este này được gọi là sáp.

Axit béo có thể là no hoặc không no (bảng 10.2).

Axit không no thường gặp là axit oleic, linoleic và linolenic.

Đó là những axit không no có 18 nguyên tử cacbon, tương ứng có một, hai và ba nối đôi trong phân tử.

Do có các nối đôi nên các axit không no thường không bền, dễ tham gia phản ứng cộng hoặc bị oxy hoá, trùng hợp...

Linoleic là loại axit không no, có nhiều trong dầu lạnh, dầu hướng dương.

Trong tự nhiên, axit này chỉ tồn tại dưới dạng *cis-cis*.

Linoleic được dùng để sản xuất xà phòng, chất bảo vệ nhũ tương, hoặc dùng để sản xuất sơn đóng rắn nhanh.

Axit no thường gặp là palmitic (C_{16}); với hàm lượng ít hơn là các axit no từ stearic (C_{18}) đến lignoxeric (C_{24}).

Ngoài ra, gỗ cũng chứa những axit no khác, như axit lauric (C_{12}), myristic (C_{14}) và nhiều axit khác có mạch cacbon tới C_{26} .

Trong gỗ lá rộng, các chất béo tập trung ở tế bào tia gỗ.

Ở một số loại gỗ lá rộng ôn đới, axit tự do chiếm phần lớn trong số các hợp chất aliphatic của tia gỗ và có một ít ở lớp liên kết các tế bào tracheit cũng như trên vách của các ống dẫn.

Ở một số loài thông, axit tự do chủ yếu có trong tế bào xung quanh kênh dẫn nhựa, một ít nằm trong tế bào tia và lớp liên kết giữa các tế bào tracheit.

Nói chung axit tự do phân bố khác nhau đối với các loài cây khác nhau.

Hơn nữa, thành phần các axit cũng thay đổi tùy theo loài cây. Ví

dụ, axit oleic có trong gỗ thông nhiều hơn so với gỗ lá rộng.

Trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfat, dưới tác dụng của kiềm nóng, axit không no có thể bị đồng phân hoá.

Như vậy, trong dầu tall có một phần axit linoleic đã đồng phân hoá thành chất có nối đôi liên hợp.

Ngược lại, các axit no khá bền vững trong quá trình nấu.

Các glyxerit dưới tác dụng của kiềm bị xà phòng hoá, giải phóng ra axit tự do và glyxerin.

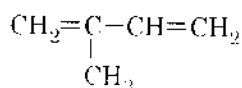
Bảng 10.2. Các axit béo thường có trong chất trích ly của gỗ

Axit no	Công thức ($C_nH_{2n+1}COOH$)	
Lauric	$C_{11}H_{23}COOH$	
Myristic	$C_{13}H_{27}COOH$	
Palmitic	$C_{15}H_{31}COOH$	
Stearic	$C_{17}H_{35}COOH$	
Arachidic	$C_{19}H_{39}COOH$	
Behenic	$C_{21}H_{43}COOH$	
Lignoceric	$C_{23}H_{47}COOH$	
Axit không no		
Palmitoleic	$C_{15}H_{29}COOH$	Δ^9
Oleic	$C_{17}H_{33}COOH$	Δ^9
Linoleic	$C_{17}H_{31}COOH$	$\Delta^{9,12}$
Linolenic	$C_{17}H_{29}COOH$	$\Delta^{9,12,13}$
Elcostearic	$C_{17}H_{29}COOH$	$\Delta^{9,11,13}$
Pinolenic	$C_{17}H_{29}COOH$	$\Delta^{9,9,12}$

10.2.2. Các chất tecpen và tecpenoit

Nhựa dầu trong kênh dẫn nhựa của gỗ lá kim, đặc biệt là thông, chứa nhiều hợp chất tecpen và dẫn xuất của chúng là tecpenoit.

Hydrocacbon dãy tecpen, về hình thức, có thể coi là sản phẩm kết hợp của hai hoặc nhiều phân tử C_5H_8 (2-metylbutadien):



Các hợp chất dãy tecpen gồm:

Monotecpen	$C_{10}H_{16}$	Gồm: 2 đơn vị isopren
Sesquitecpen	$C_{15}H_{24}$	3 đơn vị isopren
Ditecpen	$C_{20}H_{32}$	4 đơn vị isopren
Tritecpen	$C_{30}H_{48}$	6 đơn vị isopren
Tetratecpen	$C_{40}H_{64}$	8 đơn vị isopren
.....		
Polytecpen		n đơn vị isopren

Mặc dầu các hợp chất tecpen không phải được tạo thành trực tiếp từ isopren, nhưng về hình thức, có thể dựa vào isopren để xem xét cấu tạo của các chất tecpen.

Tecpen có thể tồn tại ở dạng vòng và không vòng.

Ở dạng không vòng, khi kết hợp hai phân tử isopren thành một phân tử monotecpen thì một nối đôi giảm đi. Do đó, monotecpen mạch thẳng (ví dụ, ocimen) chỉ có ba nối đôi.

Khi monotecpen mạch thẳng đóng một vòng thì một nối đôi lại giảm đi. Do đó, ở phân tử monotecpen dạng hai vòng chỉ có một nối đôi.

Ứng với vị trí khác nhau của nối đôi, ta có các đồng phân khác nhau. Ví dụ, α -pinen và β -pinen là hai đồng phân của monotecpen vòng, có vị trí nối đôi khác nhau.

Do cấu tạo của hợp chất dãy tecpen có thể phân tích theo quy tắc isopren, các chất tecpen và dẫn xuất tecpenoit của chúng có thể gọi chung là isoprenoit.

Tuy vậy, trong thuật ngữ thông thường, để đơn giản, một số tác giả vẫn gọi là các chất tecpen.

Tecpenoit có thể là rượu, hợp chất chứa nhóm xeton hoặc chứa nhóm cacboxyl.

Các isoprenoit thường tồn tại dưới dạng hỗn hợp của nhiều hợp chất tương tự nhau, rất khó phân riêng.

Một số hợp chất lại dễ dàng đồng phân hoá. Do đó, việc thu nhận và nghiên cứu từng hợp chất riêng biệt không phải là đơn giản.

Vì vậy, trong các công trình khác nhau, số liệu về tính chất vật lý đặc trưng cho từng hợp chất có thể có chênh lệch.

10.2.2.1. Monotecpen và tecpenoit

a) Monotecpen mạch hở và dẫn xuất

Hydrocacbon monotecpen mạch hở ít có mặt trong tự nhiên.

Một số hợp chất loại này là ocimen và myrcen.

Ocimen lần đầu tiên được tách ra từ lá *Ocimum bacilicum*.

Đó là hợp chất có ba nối đôi, dễ bị oxy hoá bởi không khí.

Ocimen cũng có thể đồng phân hoá thành alloocimen.

Dưới tác dụng của axit, ocimen bị hydrat hoá thành rượu ocimenol.

Alloocimen không tồn tại trong tự nhiên. Nó được tạo thành do đồng phân hoá α -pinen hoặc ocimen dưới tác dụng của nhiệt.

Alloocimen có hệ ba nối đôi liên hợp, có hoạt tính cao.

Sản phẩm này được dùng trong công nghiệp hữu cơ cao phân tử.

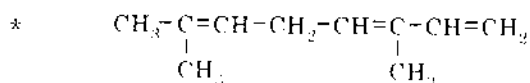
Myrcen có trong chất trích ly của một số thực vật.

Hợp chất này cũng có thể thu được nhờ đồng phân hoá β -pinen dưới tác dụng của nhiệt.

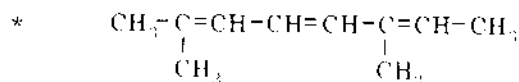
Myrcen cũng chứa ba nối đôi, nên dễ dàng tham gia nhiều phản ứng hoá học.

Các hợp chất hydrocacbon monotecpen mạch hở nói chung ít gặp trong tự nhiên. Phổ biến hơn cả là các dẫn xuất monotecpenoit như rượu, hợp chất cacbonyl hoặc este.

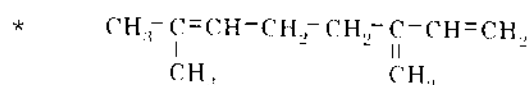
Các rượu thường gặp là geraniol, nerol, linalool... (sơ đồ 10.1).



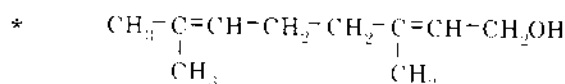
ocimen (2,6-dimetyl octatrien-2,5,7)



alloocimen (2,6-dimetyl octatrien-2,4,6)

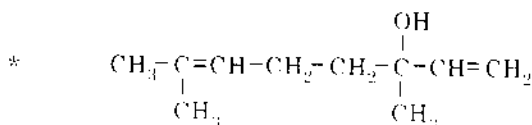


myreen (2-metyl-6-metylen octadien-2,7)



2,6-dimetyl octadien-2,6-ol-8

geraniol (dạng *trans*) và nerol (dạng *cis*)



linalool (2,6-dimetyl octadien-2,7-ol-6)

Sơ đồ 10.1. Monotepen mạch hở và dẫn xuất.

Geraniol là đồng phân *trans* của rượu monotepen.

Hợp chất này có thể tồn tại ở dạng tự do hoặc dưới dạng este.

Khi đun nóng với alcolat, geraniol đồng phân hoá thành nerol (dạng *cis* của rượu monotepen).

Geraniol cũng có thể tạo este với một số axit hữu cơ, cho ta chất có mùi dễ chịu.

Geraniol cũng có thể được tạo ra nhờ đồng phân hoá linalool, bằng cách đun nóng với anhydrit axetic.

Geraniol là chất lỏng không màu, có mùi thơm của hoa hồng, được dùng trong công nghiệp nước hoa.

Nerol là đồng phân *cis* của rượu monotecpen. Về tính chất hoá học, hợp chất này không khác mấy so với geraniol, đồng phân *trans* của nó.

Nerol tồn tại trong tự nhiên và cũng có thể thu được nhờ đồng phân hoá linalool.

Nerol cũng có mùi thơm của hoa hồng và được dùng trong công nghệ nước hoa.

Linalool khá phổ biến trong thực vật. Nó tồn tại ở dạng tự do hoặc dưới dạng este của axit hữu cơ.

Linalool dễ bị đồng phân hoá. Dưới tác dụng của axit hữu cơ, chất này đồng phân hoá thành geraniol và nerol. Dưới tác dụng của axit sulfuric, ở nhiệt độ thấp, linalool đồng phân hoá thành tecpineol (rượu monotecpen một vòng).

Khi có mặt anhydrit axetic, $60 \div 70^{\circ}\text{C}$, linalool bị mất nước, tạo thành dipenten và tecpinen.

Dưới tác dụng của nhôm kim loại, linalool đồng phân hoá thành campha và borneol.

Rượu linalool và dẫn xuất este của nó được dùng trong công nghệ nước hoa, vì linalool và este có mùi tử đinh hương.

b) Monotecpen mạch vòng và dẫn xuất

** Monotecpen mạch vòng:*

Các hợp chất mạch vòng có mặt nhiều trong dầu thông.

Trong số các monotecpen mạch vòng, α -pinen là hợp chất quan trọng nhất. Đó là thành phần chủ yếu của dầu thông thương mại, nó cũng có trong nhiều loại tinh dầu khác. α -Pinen tồn tại cả dạng *d* và dạng *l*.

α -Pinen có thể tham gia nhiều phản ứng hoá học vì có nối đôi và có cấu trúc vòng dễ đồng phân hoá.

Dưới tác dụng của axit vô cơ, α -pinen hợp nước tạo thành rượu

bornylic và fenchylic.

α -Pinen cũng dễ bị oxy hoá bởi không khí.

Khi bị oxy hoá, nó có thể tạo thành hợp chất chứa oxy như sobrenol, verbenol và verbenon.

α -Pinen kết hợp với hydroclorua, đồng phân hoá tạo thành bornyl clorua và một số dihydroclorua của limonen.

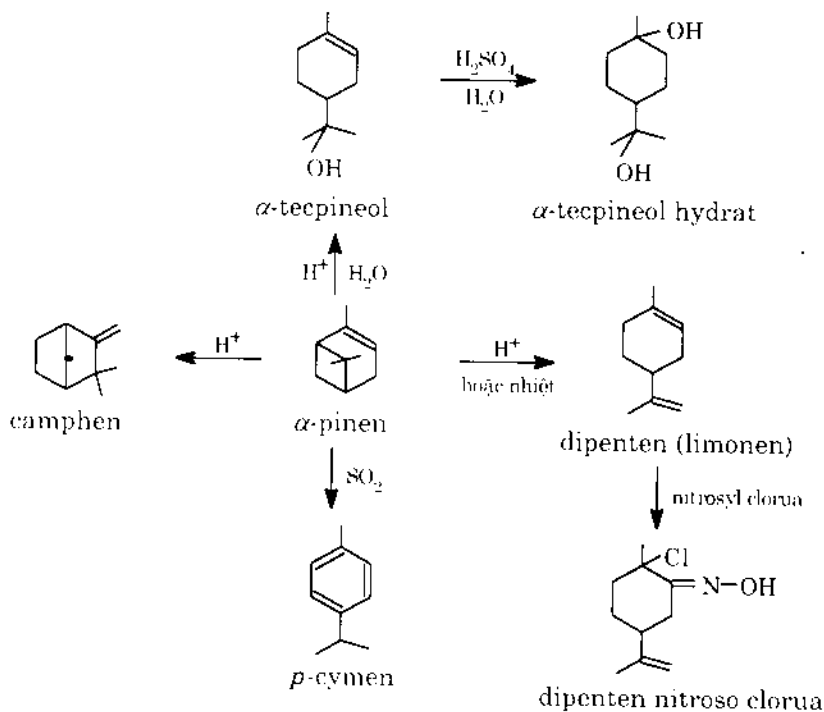
Dưới tác dụng của xúc tác và nhiệt, α -pinen đồng phân hoá thành dipenten, camphen, tecpen mạch hở (alloocimen) và các sản phẩm khác.

Khi kết hợp với nitrosyl clorua, α -pinen cho dẫn xuất ở trạng thái rắn. Phản ứng này được áp dụng để làm sạch và xác định α -pinen.

α -Pinen được dùng làm nguyên liệu đầu cho tổng hợp campho và các hoá chất khác.

α -Pinen cũng được dùng trong công nghệ sơn.

Một số phản ứng điển hình bắt nguồn từ α -pinen được thể hiện ở sơ đồ 10.2.



Sơ đồ 10.2. Một số sản phẩm từ α -pinen.

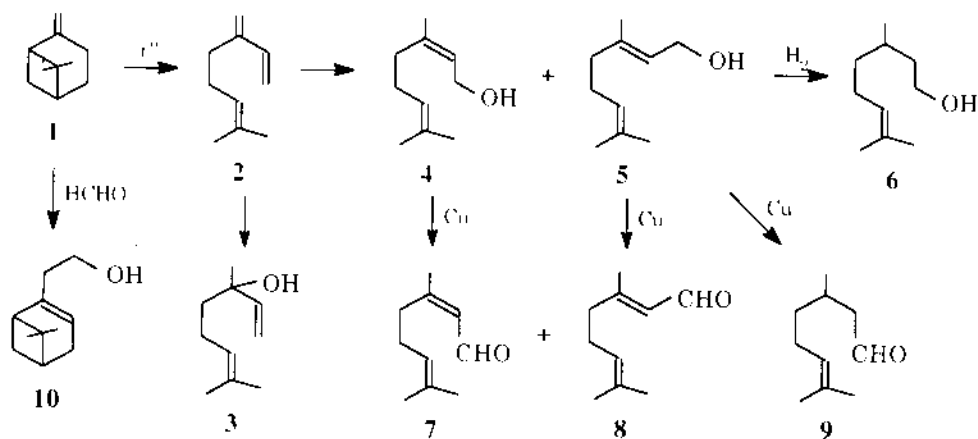
β -Pinen (hoặc nopinen) đi kèm α -pinen trong nhiều nguyên liệu thực vật và thường tồn tại ở dạng l.

Khác với α -pinen, β -pinen không tạo sản phẩm kết tinh khi kết hợp với nitrosyl clorua.

Nó có thể bị oxy hoá thành axit nopinic tinh thể.

β -Pinen dễ isome hoá thành α -pinen.

β -Pinen cũng dễ chuyển hoá thành các chất khác. Dựa vào đặc điểm này, ta có thể tổng hợp hàng loạt hợp chất trên cơ sở β -pinen (sơ đồ 10.3).



Sơ đồ 10.3. Một số ví dụ về chuyển hoá β -pinen:

1. β -pinen; 2. myrcen; 3. linalool; 4. nerol; 5. geraniol;
6. citronellol; 7. neral; 8. geranial; 9. citronellal; 10. nopol.

β -Pinen có thể dùng làm nguyên liệu tổng hợp hương liệu hoặc gia vị. Quá trình phản ứng tiến hành như sau:

β -Pinen bị đồng phân hoá dưới tác dụng của nhiệt thành myrcen.

Sản phẩm kết hợp HCl với myrcen tiếp tục phản ứng với natri axetat tạo thành các axetat của linalool, geraniol và nerol.

Các axetat này thủy phân, tạo thành các rượu tương ứng.

Linalool và este của nó có mùi tử đinh hương.

Geraniol, nerol và các este của chúng có mùi hoa hồng. Sản phẩm hydro hoá là citronellol cũng có mùi tương tự.

Dưới tác dụng của xúc tác đồng, geraniol, nerol chuyển thành citronellal, geranial và neral.

Citronellal có thể làm hương liệu hoặc dùng làm nguyên liệu tổng hợp citronellol nhờ phản ứng khử.

Citronellal cũng được dùng để tổng hợp hydroxy citronellal nhờ phản ứng hydrat hoá, sau khi cộng hợp với bisulfit để ngăn ngừa phản ứng đóng vòng.

Hydroxy citronellal là hợp chất có mùi hoa lan; geranial và neral thì có hương chanh.

Kết hợp axeton với geranial và neral rồi đồng phân hoá, ta thu được hỗn hợp α -ionon, có mùi hoa violet.

Ngoài ra đồng phân β còn được dùng để tổng hợp vitamin A.

β -Pinen phản ứng với formaldehyt tạo thành nopol, hợp chất được dùng trong công nghiệp nước hoa.

Menthol, một loại rượu mạch vòng, có trong bạc hà, được tổng hợp từ β -pinen.

Đồng phân *l* thu được từ *l*- β -pinen, qua một loạt phản ứng, như hydro hoá, chuyển thành pinan rồi thành 2,6-dimetyl-2,7-octadien, *d*-citronellol, *d*-citronellal, isopulegol.

Sau đó, isopulegol được hydro hoá tạo thành *l*-menthol.

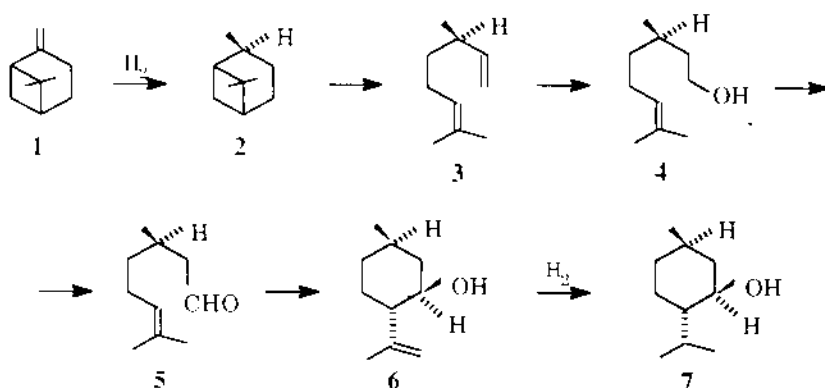
Phương pháp tổng hợp menthol được trình bày ở sơ đồ (10.4).

Menthol racemic cũng có thể thu được từ 3-menthen qua một số giai đoạn phản ứng: oxy hoá menthen thành rượu rồi oxy hoá tiếp thành menthon, sau đó khử thành *d*, *l*-menthol.

Camphen là monotecpen hai vòng, cũng có các đồng phân quang học.

Do dễ kết tinh nên nó có thể tách riêng dưới dạng tinh khiết.

Cấu trúc vòng của camphen kém bền, dễ đồng phân hoá.



Sơ đồ 10.4. Phương pháp tổng hợp *l*-menthol:

1. *l*- β -pinen; 2. pinan; 3. 2,6-dimetyl-2,7-octadien;
4. *d*-citronellol; 5. citronellal; 6. isopulegol; 7. *l*-menthol.

Camphen có thể bị oxy hoá trực tiếp thành campho, hoặc qua giai đoạn hydrat hoá thành isoborneol rồi oxy hoá tiếp thành campho. Trong quá trình đó, xảy ra một loạt phản ứng mở và đóng vòng.

Camphen có thể thu được từ α -pinen, nhờ chuyển hoá trực tiếp hoặc qua giai đoạn tác dụng với hydroclorua tạo thành bornylclorua, sau đó tách loại hydroclorua chuyển thành camphen.

Nhờ có khả năng phản ứng như trên, camphen là chất trung gian quan trọng của quá trình tổng hợp campho và nhiều chất khác từ pinen.

Clo hoá camphen hoặc hỗn hợp camphen- α -pinen, ta thu được toxaphen dùng làm chất diệt sâu bọ, côn trùng.

Toxaphen là hỗn hợp các đồng phân mà thành phần của hỗn hợp gần với công thức thực nghiệm $C_{10}H_{10}Cl_x$.

Camphen cũng có trong bạch đàn, long não, hoặc trong lá cam.

Δ^3 -Caren là cấu tử chính của dầu thông Ấn Độ *Pinus longifolia*. Hợp chất này cũng có trong dầu thông ôn đới.

Δ^3 -Caren có mùi dễ chịu. Trong không khí, nó dễ dàng bị oxy hoá và nhựa hoá.

Δ^3 -Caren đồng phân hoá thành sylvestren. Chất này, đến lượt mình, cũng dễ bị nhựa hoá trong không khí.

Khi tác dụng với hydroclorua, Δ^3 -caren chuyển thành hỗn hợp các hydroclorua của sylvestren và dipenten.

Limonen (1-metyl-4-isopropyl-xyclohexadien-1.8) là một trong những tecpen đơn vòng quan trọng nhất.

Limonen có nhiều trong thông.

Limonen tương đối ổn định, tuy vậy, cũng có thể bị oxy hoá một phần trong không khí.

Limonen có thể bị hydrat hoá, tạo thành rượu α -tecpineol và rượu hai chức tecpin hydrat.

Limonen và một số tecpenoit có thể tham gia quá trình bất đối hoá.

Dưới tác dụng của nhiệt và xúc tác đồng format, limonen chuyển thành hỗn hợp *p*-cymen và *p*-menthan.

β -Phellandren là một trong những cấu tử chính của dầu thông. Nó cũng có trong một số loại tinh dầu khác.

β -Phellandren là monotecpen một vòng.

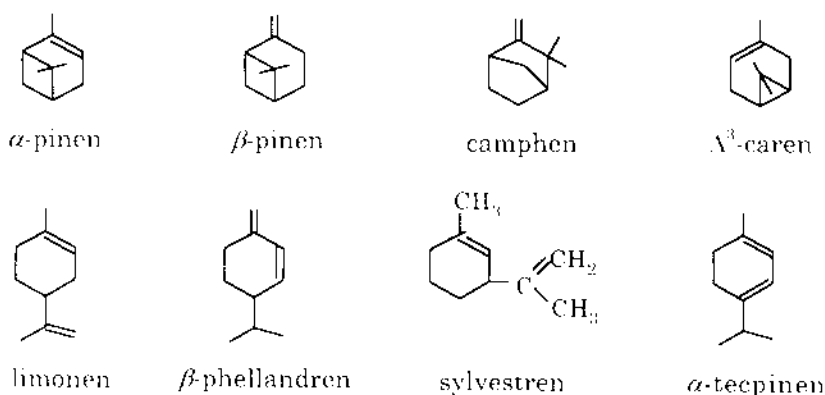
Do có hệ hai nối đôi liên hợp, nó là một trong những hợp chất tecpen kém bền nhất, có xu hướng polyme hoá khi chưng cất ở áp suất thường.

Ngoài các hợp chất kể trên, trong gỗ cũng có các monotecpen khác như:

- Loại 2 vòng: α -thujen, Δ^1 -caren, santen (có trong bạch đàn và cây lá kim).

- Loại 1 vòng: tecpinolen và α -tecpinen.

Một số hợp chất tecpen dạng vòng thường gặp được trình bày ở sơ đồ 10.5.



Sơ đồ 10.5. Một số terpen dạng vòng thường gặp

* Dẫn xuất của monotecpen mạch vòng trong tự nhiên:

Dẫn xuất quan trọng của monotecpen vòng là các hợp chất chứa nhóm hydroxyl hoặc nhóm cacbonyl.

Các dẫn xuất chứa oxy này có nhiều trong tinh dầu một số loại cây lá kim.

Tinh dầu thông lấy từ thân gỗ lâu năm có thể chứa tới 50 ÷ 60% α -tecpineol.

Hợp chất dạng tinh thể trắng campho có nhiều trong cây long não là hợp chất chứa nhóm xeton.

Ngoài ra, một số dẫn xuất khác cũng được khai thác và sử dụng.

• **α -Tecpineol:**

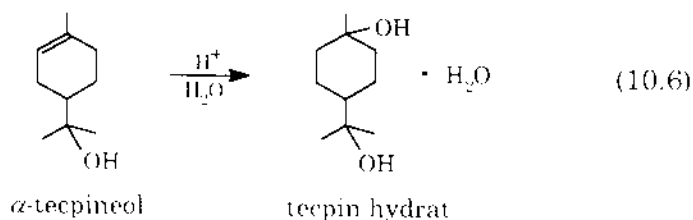
α -Tecpineol là dẫn xuất rượu của monotecpen một vòng.

Đó là cấu tử chủ yếu của tinh dầu thông và cũng có mặt trong tinh dầu long não và một số loại tinh dầu khác.

α -Tecpineol dễ bị dehydrat hoá, hình thành dipenten và các chất terpen khác, tùy thuộc vào điều kiện phản ứng.

α -Tecpineol có thể được tạo thành do dehydrat hoá tecpin hydrat hoặc khi axit sulfuric tác dụng với α -pinen.

Ngược lại, α -tecpineol cũng có thể hydrat hoá, dưới tác dụng của axit, thành tecpin hydrat:



Teepin hydrat được dùng trong y học.

• **Borneol:**

Borneol là rượu teepen hai vòng, ứng với bốn đồng phân quang học.

Đó là cấu tử quan trọng của tinh dầu long não và cũng có mùi như campho.

Borneol tạo thành nhờ hydrat hoá α -pinen.

Borneol có thể bị oxy hoá thành campho.

Este của borneol là bornylaxetat, có trong tinh dầu của một số cây lá kim.

Este có thể thu được khi cho borneol tác dụng với lượng dư axit axetic.

Bornylaxetat thường được dùng để sản xuất xà phòng.

• **Rượu fenchylic:**

Rượu fenchylic cũng là dẫn xuất của monotecpen hai vòng. Hợp chất này có trong dầu thông hoặc được tạo thành từ pinen. Rượu fenchylic, dạng α và β , ứng với bốn đồng phân quang học.

• **Campho:**

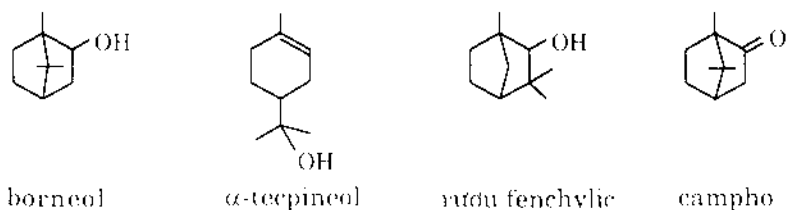
Campho là dẫn xuất chứa nhóm cacbonyl của monotecpen hai vòng. Dầu campho thu được từ gỗ và các bộ phận khác của cây long não *Cinnamomum camphora* (Lauraceae).

Dầu này chứa một lượng lớn các chất dãy teepen và tecpenoit.

Song có thể một số chất được hình thành ngay trong quá trình chưng theo hơi nước.

Campho là sản phẩm được sử dụng từ lâu. Đó là hợp chất khá bền về hoá học.

Một số dẫn xuất của monotecpen được thể hiện ở sơ đồ 10.7.



Sơ đồ 10.7. Dẫn xuất monotecpen.

Nói chung, dẫn xuất monotecpen chứa nhóm hydroxyl hoặc cacbonyl phổ biến hơn trong tự nhiên so với dẫn xuất chứa nhóm cacboxyl.

Một dạng tồn tại khác của monotecpen là *p*-cymen.

Thành phần hoá học của *p*-cymen là $C_{10}H_{14}$, trong khi đó monotecpen có thành phần hoá học là $C_{10}H_{16}$, ứng với hai phân tử isopren C_5H_8 . Do đó, xét về thành phần hoá học, có thể coi *p*-cymen là hợp chất dehydro hoá của monotecpen.

Hợp chất này có đặc tính thơm, trong khi đó, các monotecpen đã nghiên cứu ở phần trước chỉ là các hợp chất hydrocacbon có chứa nối đôi.

Trong gỗ, *p*-cymen chỉ xuất hiện với hàm lượng nhỏ.

Tuy vậy, dầu thông thu được khi ngưng tụ khí thải của quá trình nấu xenluloza sulfít lại chứa một hàm lượng lớn *p*-cymen. Đó là kết quả của quá trình đồng phân hoá - dehydro hoá, chuyển monotecpen khác thành *p*-cymen. Như vậy, ta có thể tổng hợp được *p*-cymen và các dẫn xuất từ α -pinen.

Dẫn xuất của *p*-cymen chứa nhóm hydroxyl cũng tồn tại trong thực vật.

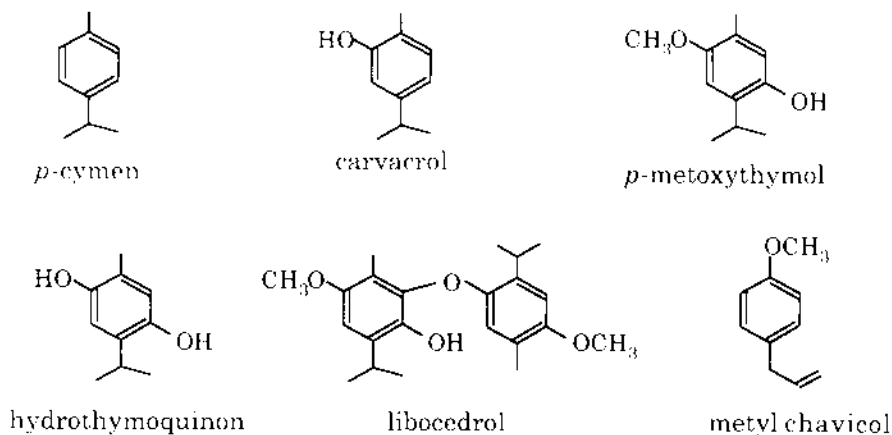
Carvacrol và thymol là các đồng phân của cymen chứa nhóm hydroxyl. Chúng có mặt trong một số loại tinh dầu. Carvacrol tồn tại trong một số loài thuộc họ Cupressaceae.

Carvacrol, *p*-metoxythymol, *p*-metoxycarvacrol, hydrothymoquinon, thymoquinon là các cấu tử dễ bay hơi, có trong tùng hương.

Dehydrodi-*p*-metoxythymol, libocedrol và heyderiol. 6-(*p*-metoxycarvacroxy)-*p*-metoxythymol cũng trích ly được từ gỗ lõi tùng hương.

Metylchavicol hoặc esdragol tồn tại với lượng nhỏ trong một số loại dầu thông và tinh dầu khác.

Một số dẫn xuất của *p*-cymen được trình bày ở sơ đồ 10.8.



Sơ đồ 10.8. Dẫn xuất của *p*-cymen.

10.2.2.2. Sesquiterpen và dẫn xuất

So với monotecpen, các hợp chất sesquiterpen và dẫn xuất của chúng tồn tại trong tự nhiên với lượng ít hơn.

Sesquiterpen có 15 nguyên tử cacbon, về hình thức là sự kết hợp ba phân tử isopren.

Nhiều sesquiterpen và dẫn xuất có mặt trong bạch đàn, tùng...

Các hợp chất hydrocacbon thường gặp là cadinen, longifolen, cedren, muurolen, α - và β -santalen.

Cadinen là hợp chất hai vòng, cấu tạo vòng kiểu naphtalen bị khử một phần, chỉ còn lại hai nối đôi.

Cadinen có năm đồng phân, ứng với vị trí nối đôi khác nhau. Khi tác dụng với HCl, các đồng phân đều cho cùng một loại sản phẩm.

Cedren, longifolen là hợp chất ba vòng.

Dẫn xuất sesquiterpen chứa nhóm hydroxyl, cacbonyl hoặc cacboxyl.

Rượu α - và β -santalol hoặc cadinol có mặt trong gỗ bạch đàn.

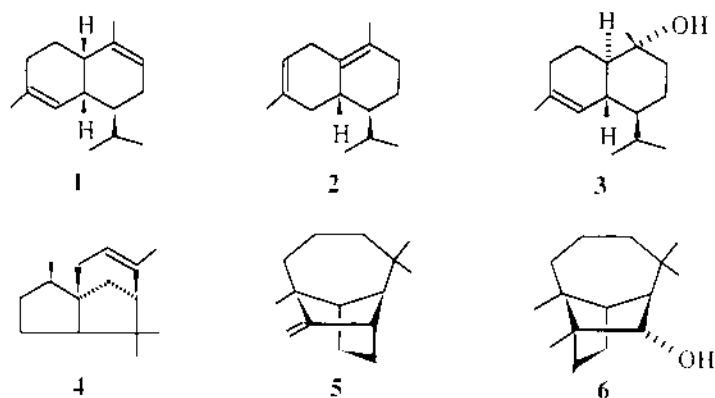
Cedrenol và cedrol có trong tùng.

Lanceol, rượu bậc một một vòng, hoặc guaiol cũng có mặt trong thực vật. Guaiol là hợp chất kiểu azulen bị khử một phần.

Khi hydro hoá, guaiol tạo ra sản phẩm thế của azulen có màu xanh. (Azulen là hợp chất gồm một vòng bảy cạnh, ngưng tụ với vòng năm cạnh, có hệ nối đôi liên hợp. Azulen có số lượng cacbon tương tự naphtalen nhưng cách phân bố cacbon thì khác).

Dẫn xuất chứa nhóm cacbonyl như α - và β -antlanton cũng có trong gỗ lá kim. Một số dẫn xuất sesquiterpen chứa nhóm cacboxyl hoặc vòng lacton cũng được tách ra từ một số loài thuộc Cupressaceae, như axit cuparenic, dẫn xuất axit của chất thơm cuparen.

Một số sesquiterpen và dẫn xuất được trình bày ở sơ đồ 10.9:



Sơ đồ 10.9. Sesquiterpen và dẫn xuất:

1. α -muurolen; 2. δ -cadinen; 3. α -cadinol;
4. α -cedren; 5. longifolen; 6. juniperol.

10.2.2.3. Ditecpen và dẫn xuất

Ditecpen và dẫn xuất có thể là hợp chất mạch hở, một vòng, hai hoặc ba vòng và thường chứa nhiều nối đôi. Ditecpen hydrocacbon ít tồn tại trong tự nhiên.

Camphoren là một ditecpen hydrocacbon, có trong dầu long não.

Thunbergen là hợp chất một vòng.

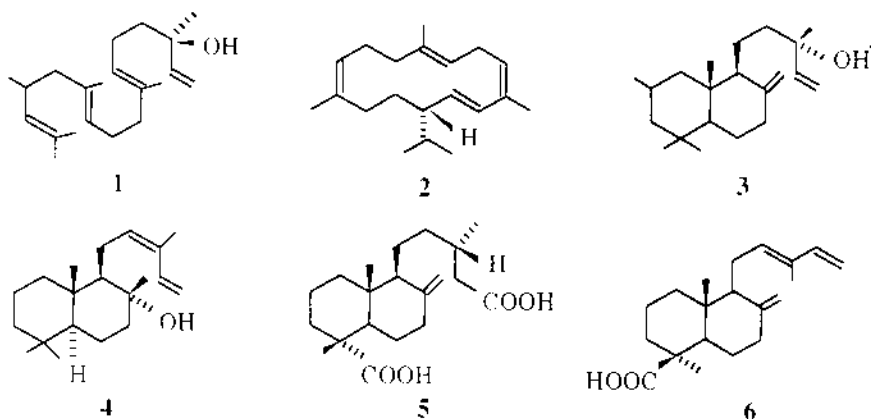
Ditecpenoit chứa nhóm hydroxyl như phytol, rượu mạch hở, có một nối đôi trong phân tử. Phytol có thể thu được khi xà phòng hoá clorophyl.

Dẫn xuất phổ biến nhất của ditecpen là axit nhựa.

Mủ thông sau khi tách phần dễ bay hơi (tinh dầu hay dầu thông mà phần chủ yếu là monotecpen và dẫn xuất cũng như một ít sesquitecpen và dẫn xuất), phần còn lại là colophan, chủ yếu là các axit nhựa.

Axit nhựa thường có hệ thống vòng như phenantren bị khử một phần (sơ đồ 10.10).

Axit nhựa thường có dạng abietic và pimaric. Khi dehydro hoá axit abietic, ta thu được reten (1-metyl-7-isopropylphenantren), trong khi đó, từ axit pimaric ta thu được pimantren (1,7-dimetyl-phenantren).

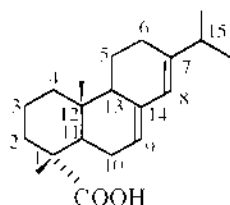


Sơ đồ 10.10. Ditecpen và dẫn xuất:

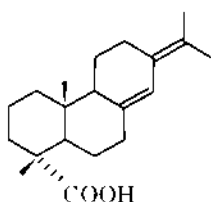
1. geranyl linalool; 2. thunbergen; 3. β -epimanol;
4. abienol; 5. pinifolic axit; 6. elliotionic axit.

Cấu trúc của axit nhựa được thể hiện theo hoá lập thể, ví dụ α -pimaric ứng với nét đậm, còn β -pimaric ứng với nét đứt. Các axit kiểu abietic và pimaric được trình bày ở sơ đồ 10.11.

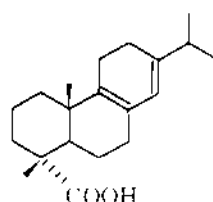
Kiểu abietic



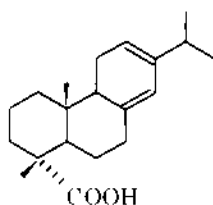
axit abietic



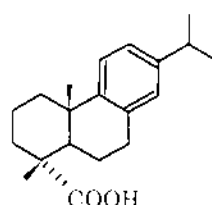
axit neoabietic



axit palustric

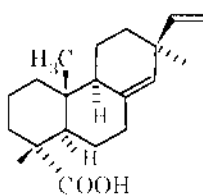


axit levopimaric

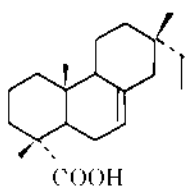


axit dehydro abietic

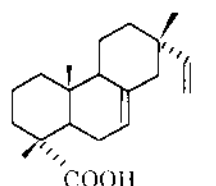
Kiểu pimaric



axit pimaric



axit isopimaric



axit sandaracopimaric

Sơ đồ 10.11. Các axit nhựa kiểu abietic và pimaric.

Các axit kiểu abietic bao gồm axit abietic, neoabietic, palustric, levopimaric... Các hợp chất này khác nhau ở vị trí nối đôi trong phân tử.

Tuy nhiên, một đặc điểm chung quan trọng là chúng có hệ thống nối đôi liên hợp. Do đó, các axit này dễ đồng phân hoá, oxy hoá hoặc trùng hợp.

Axit abietic thường là cấu tử chính của colophan. Các axit khác như neoabietic, khi đun nóng, có thể chuyển một phần thành abietic.

Đặc biệt là levopimaric, mặc dù axit này là cấu tử chính trong nhựa dầu của thông, nhưng hầu như không có mặt trong thành phần của colophan. Vì dưới tác dụng của nhiệt, khi phân đoạn dầu thông và colophan, levopimaric đã đồng phân hoá thành abietic.

Axit levopimaric phản ứng với anhydrit maleic dễ hơn so với axit abietic, neoabietic hoặc palustic. Axit levopimaric có thể phản ứng ở nhiệt độ thường, trong khi đó, các axit khác ở nhiệt độ cao hơn.

Axit kiểu abietic, khi đun nóng, có thể tham gia phản ứng bất đối hoá. Quá trình này phần nào xảy ra trong tự nhiên, nên trong nhựa dầu đồng thời có cả axit dihydro abietic và cả axit dehydro abietic. Tuy nhiên, quá trình bất đối hoá chủ yếu xảy ra dưới tác dụng của nhiệt. Trong điều kiện nhiệt độ cao, một số nguyên tử hydro của phân tử abietic này có thể bật ra và kết hợp vào phân tử khác. Kết quả là ở một phân tử có thể xuất hiện vòng thơm, còn ở phân tử khác thì không còn nối đôi (như tetrahydroabietic có trong colophan là axit không có nối đôi, trong khi đó dehydroabietic lại chứa vòng thơm).

Các axit kiểu pimaric như axit pimaric, axit isopimaric, axit sandaracopimaric không có hệ nối đôi liên hợp như trong axit abietic nên ổn định hơn so với abietic.

Axit pimaric có cấu trúc khác với abietic ở vị trí cacbon 7.

Ở axit pimaric, cả nhóm thế metyl và nhóm thế vinyl đều liên kết với C₇, còn ở abietic chỉ có nhóm thế isopropyl ở vị trí này.

Hơn nữa, cấu hình của axit abietic giống với pimaric ở C₁, C₁₁, C₁₂ và C₁₃, trong khi đó cấu hình của axit levopimaric (thuộc nhóm abietic) lại khác với pimaric ở C₁₃.

Mặc dù cùng một kiểu hợp chất, axit pimaric và isopimaric cũng có sự khác nhau về cấu hình và vị trí nối đôi. Axit isopimaric có cùng cấu hình với pimaric ở C₁, C₁₁ và C₁₂. Nhưng hai axit này lại là các epime xét theo vị trí C₁₃ và C₇.

Axit nhựa thường tồn tại dạng tự do, khó tham gia phản ứng este hoá với rượu.

Dựa vào tính chất này, ta có thể tách axit béo khỏi axit nhựa, vì axit béo dễ tạo este hơn.

Axit nhựa cũng có thể tạo muối không tan trong axeton với một số amin. Ví dụ, xyclohexylamin tạo muối không tan trong axeton với hầu hết các axit nhựa.

Các amin có khả năng tạo kết tủa khác nhau đối với từng axit nhựa.

Axit nhựa tạo hợp chất màu đỏ khi tác dụng với hỗn hợp axit sulfuric và anhydrit axetic. Dựa vào phản ứng này ta có thể phát hiện được axit nhựa.

Tuy vậy, cũng cần kết hợp với những phép phân tích khác, vì trong thực vật cũng có một số hợp chất cho màu tương tự với tác nhân này, như một số sterol hoặc rượu tecpen.

Các axit nhựa khác nhau có thể phân riêng một phần qua sắc ký. Sắc ký khí được dùng để phân riêng metyl este của các axit nhựa.

Tuy vậy một phần axit nhựa có thể đồng phân hoá thành hợp chất khác dưới tác dụng của nhiệt.

10.2.2.4. Triterpen và dẫn xuất

Triterpen và triterpenoit thường có ở mù cây, lá, vỏ và phần gỗ của cây.

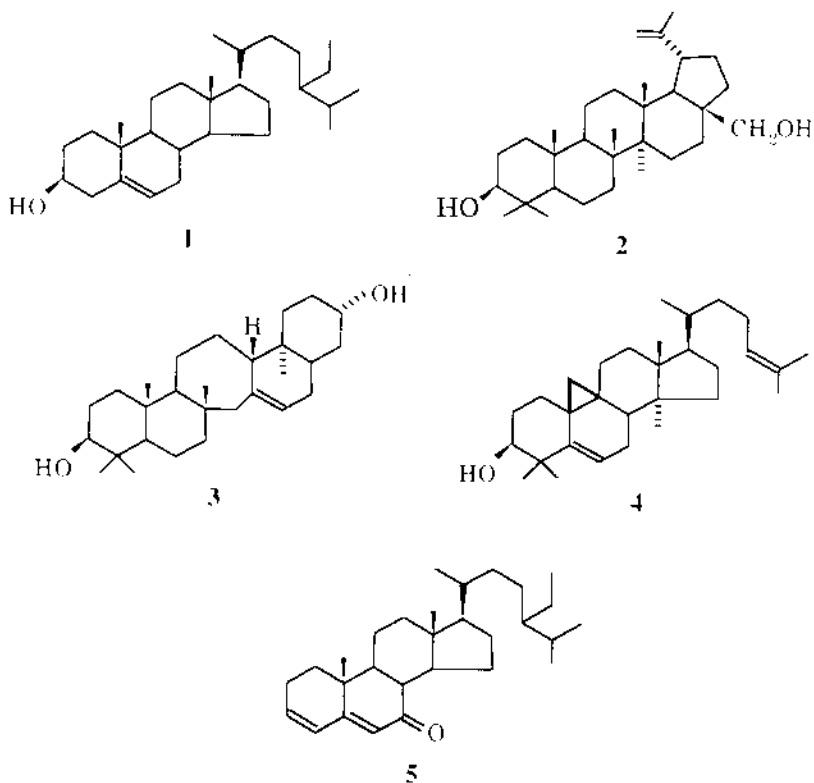
Hydrocacbon tecpen với công thức $C_{30}H_{48}$, triterpen tồn tại rất ít trong tự nhiên.

Squalen là một dihydrotriterpen. Đây là hợp chất mạch hở, chứa 6 đơn vị isopren, có 6 nối đôi tách biệt.

Triterpen này có trong thực vật và động vật.

Do có nhiều nối đôi, squalen dễ bị oxy hoá trong không khí, nhựa hoá và polyme hoá. Hợp chất này cũng có thể bị vòng hoá.

Dẫn xuất của triterpen là triterpenoit. Các dẫn xuất có thể chứa nhóm cacbonyl, hydroxyl hoặc cacboxyl (sơ đồ 10.12).



Sơ đồ 10.12. Triterpenoit (so sánh với dạng sterol):

1. β -sitosterol; 2. betulinol; 3. serratendiol;
4. xycloartenol; 5. tremulon.

Rượu triterpen có thể tồn tại tự do, ở dạng hợp chất axetat hoặc glycozit (saponin).

Saponin được xếp thành các nhóm nhỏ, tùy theo bản chất của aglycon thu được trong quá trình thủy phân.

Một nhóm saponin tạo ra steroid, còn nhóm khác tạo dẫn xuất rượu hoặc hydroxy axit của triterpen.

Saponin có thể phân tán trong nước nhờ chứa đơn vị saccarit liên kết dưới dạng glycozit.

Trong khi đó, rượu triterpen tự do lại kỵ nước. Nhờ tính chất này mà cây bị thương ít bị mất nước.

Một số rượu tritecpen thường gặp là: betulinol, serratendiol, xycloartenol.

Dẫn xuất tritecpen còn tồn tại dưới dạng hợp chất cacbonyl, hydroxydammaranon-II (dipterocarpol), tremulon... (sơ đồ 10.12).

Ngoài ra, dẫn xuất axit của tritecpen cũng tồn tại trong thực vật, như oleanolic (caryophyllin), một loại hydroxy axit đơn chức, công thức $C_{30}H_{48}O_{11}$.

Hợp chất 5 vòng này tồn tại dạng tự do, có trong lá cây oliu và trong một số cây khác.

Tritecpenoit có thể có cấu trúc vòng khác nhau, bốn hoặc năm vòng, thường gặp là năm vòng.

Một số chất có cấu trúc vòng giống nhau nhưng lại khác nhau về sự phân bố nhóm thế metyl...

Nhiều tritecpenoit chứa nối đôi trong vòng nhưng lại không tham gia phản ứng cộng hợp với những tác nhân thông thường.

Các nối đôi kém hoạt động này có thể tham gia phản ứng tạo màu với tetranitrometan.

Một số tritecpenoit có cấu trúc vòng và mạch nhánh tương tự với sterol.

Ví dụ, xycloartenol có khung cacbon gần giống với sterol nên được gọi là metylsterol. Song tính chất quang học cũng như phản ứng màu của xycloartenol thì tương ứng với tritecpenoit, khác với tính chất của sterol.

10.2.3. Các hợp chất sterol

Trong tự nhiên, tồn tại một loạt hợp chất 5 vòng, với hệ thống vòng xyclopentenphenantren bị khử, gọi là steroid.

Steroid bao gồm nhiều loại hợp chất, nhưng đối với hoá học gỗ thì quan trọng nhất là các hợp chất kiểu sterol (10.12).

Sterol là rượu bậc hai chứa từ 27 đến 29 nguyên tử cacbon trong phân tử.

Như vậy, sterol không thuộc isoprenoit. Song một phần hệ thống vòng của sterol tương tự như terpenoit.

Sterol trong tự nhiên có một nhóm hydroxyl ở C_{3} , với cấu hình β . Các nhóm metyl liên kết với C_{10} và C_{13} . Mạch nhánh, với số cacbon thay đổi, tùy từng loại chất, đính với C_{17} .

Hợp chất sterol với một nối đôi gọi là stenol, khi không có nối đôi được gọi là stanol.

Hợp chất kiểu sterol có thể tồn tại tự do, hoặc dưới dạng liên kết este và glycozit, như este của axit phtalic với β -sitosterol cũng như β -sitosterol-D-glycozit.

β -Sitosterol là đại diện chính của hợp chất kiểu sterol. Hợp chất này có trong một số loại cây lá kim và lá rộng. Ngoài ra, trong thực vật cũng tồn tại một số hợp chất khác.

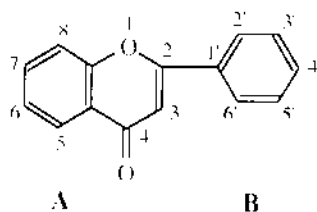
β -Sitosterol có cấu tạo mạch cacbon gần giống với cholesterol, một loại hợp chất kiểu sterol có trong động vật.

Các hợp chất sterol tạo màu khi tác dụng với anhydrit axetic và axit sulfuric ở nhiệt độ thấp. Màu sắc tùy thuộc điều kiện phản ứng.

10.2.4. Flavonoit

Flavonoit là nhóm hợp chất có bộ khung cacbon $C_6C_3C_6$ tương tự như flavon.

Flavon có cấu tạo như ở sơ đồ sau:



Sơ đồ 10.13.

Flavon gồm hai vòng thơm và một vòng pyran.

Vòng thơm bên trái được gọi là vòng A.

Vòng thơm bên phải được gọi là vòng B.

Vòng trung gian chứa nguyên tử oxy gọi là vòng pyran.

Các vị trí của các nguyên tử được đánh số như ở sơ đồ 10.13.

Ở flavon, vòng thơm B nối với vòng pyran tại vị trí 2.

Khi vòng thơm B nối với vòng pyran ở vị trí 3, hợp chất được gọi là isoflavon.

Flavonoit là các hợp chất có khung cacbon $C_6C_3C_6$, tương tự flavon. Các vòng thơm có thể mang nhóm hydroxyl với số lượng và vị trí khác nhau.

Tùy thuộc vào cấu tạo của phần mạch C_3 trong bộ khung $C_6C_3C_6$, flavonoit được xếp thành các phân nhóm sau:

- Chalcon;
- Flavon và flavonol;
- Flavanon và dihydroflavonol;
- Flavan-3-ol;
- Flavan-3,4-diol.

Phân tử của các hợp chất ở các phân nhóm trên đều có hai vòng thơm, mang nhóm hydroxyl với số lượng và vị trí khác nhau, tùy thuộc từng chất. Các hợp chất này có cấu trúc mạch $C_6C_3C_6$, nhưng khung cầu nối C_3 giữa hai nhân thơm thì khác nhau tùy thuộc từng loại hợp chất.

Mạch cầu nối C_3 có thể là mạch hở (trong chalcon), mạch vòng đơn (trong flavanon) hoặc vòng có nối đôi (flavon, flavonol).

Ở flavon, flavonol hoặc chalcol, nhóm $C=O$ ở mạch cầu nối C_3 liên hợp điện tử với vòng A cũng như vòng B.

Trong khi đó, ở flavanon cũng như ở dihydroflavonol, nhóm $C=O$ chỉ liên hợp điện tử với vòng A.

Do từng phân nhóm của flavonoit có cấu tạo riêng, chúng vừa có tính chất chung, vừa có những khác biệt về tính chất vật lý và hoá học.

Trong thực vật, các hợp chất trên thường tồn tại dưới dạng hỗn hợp của các dẫn xuất, với tỷ lệ khác nhau, tùy thuộc nguồn gốc thực vật.

Các polyphenol thường tập trung ở vỏ cây. Tuy vậy, phần gỗ cũng có một hàm lượng nhất định, nhất là gỗ lõi.

Đa phần các phân nhóm phenol đều có mặt trong cây keo. Ngoài ra, polyphenol cũng có trong bạch đàn, dẻ và một số loại gỗ thông...

*** Hợp chất kiểu chalcon**

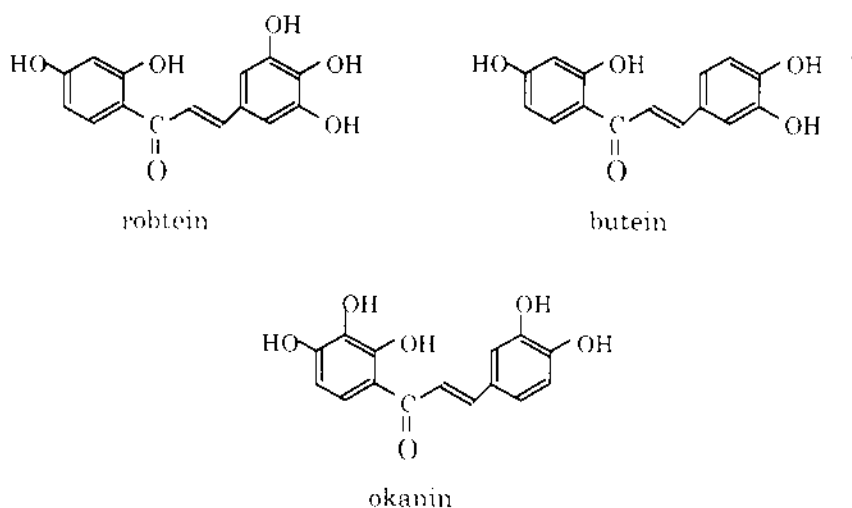
Chalcon là loại flavonoid có cấu tạo mạch C_6 trong cấu trúc $C_6C_3C_6$ ở dạng mạch hở.

Nhóm carbonyl tạo thành hệ liên hợp điện tử với cả vòng A và vòng B.

Chalcon là hợp chất có màu, chỉ tồn tại với lượng ít trong một số thực vật.

Nó có thể được tạo thành do mở vòng furan của cấu trúc C_6 trong hợp chất kiểu flavanon. Do đó, một số hợp chất chalcon có thể được hình thành ngay trong quá trình trích ly polyphenol từ thực vật.

Cấu tạo một số hợp chất chalcon được trình bày ở sơ đồ 10.14.



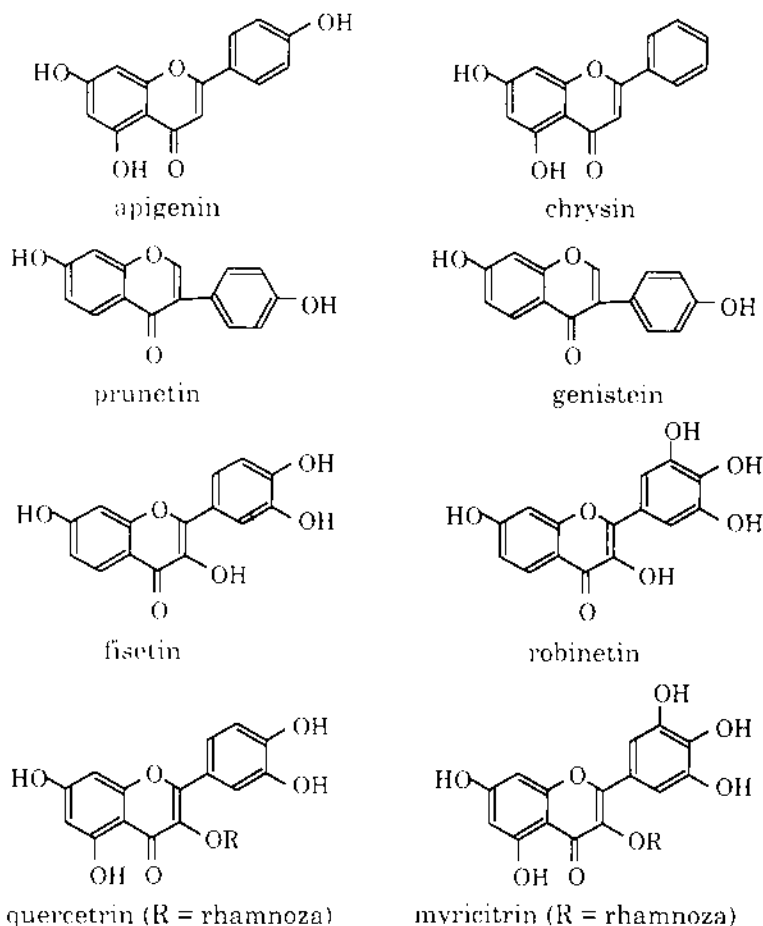
Sơ đồ 10.14. Hợp chất kiểu chalcon.

** Hợp chất kiểu flavon và flavonol*

Các polyphenol, trong đó chỉ có hai vòng thơm chứa nhóm hydroxyl, còn vòng pyran chứa mạch C_3 không có nhóm hydroxyl, được gọi là flavon.

Một số hợp chất thuộc loại này là chrysin (5,7-dihydroxyflavon), apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavon).

Khi nhóm phenyl (nhân thơm B) liên kết với mạch-trung gian C_3 ở nguyên tử cacbon số 3 (thay cho số 2), hợp chất được gọi là isoflavon, ví dụ, prunetin, genistein (7,4'-dihydroxyisoflavon), santal (5,3',4'-tri-hydroxy-7-metoxylisoflavon)... (sơ đồ 10.15).



Sơ đồ 10.15. Hợp chất kiểu flavon và flavonol.

Khi vòng pyran có nhóm hydroxyl thì dẫn xuất được gọi là flavonol. Một số hợp chất thuộc loại này là:

fisetin (3,7,3',4'-tetrahydroxyflavon)

kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavon)

robinetin (3,7,3',4',5'-pentahydroxyflavon)

quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavon)

hoặc quercetrin (là dẫn xuất glycozit của quercetin).

Đặc điểm của các hợp chất trên là nguyên tử C_{31} vừa mang liên kết đôi vừa mang nhóm thế hydroxyl.

Các flavon hoạt động huỳnh quang dưới tác dụng của tia tử ngoại.

Các hợp chất có nhóm hydroxyl ở 3, 3' và 4' có màu đậm.

Nếu hydroxyl tồn tại ở 3, 4' và 7, dẫn xuất có tính axit.

Các chất có hydroxyl ở 3, 5 và 8 tạo phản ứng màu với sắt clorua.

Liên kết hydro có thể xuất hiện giữa nhóm hydroxyl ở C_5 và nhóm $C=O$.

** Hợp chất kiểu flavanon và dihydroflavonol*

Flavanon có mạch tương ứng với flavon nhưng vòng pyran không chứa nối đôi. Do đó, flavanon có thể gọi là 2,3-dihydroflavon.

Một hợp chất kiểu này là butin.

Khác với flavon hay flavonol, nhóm $C=O$ của flavanon chỉ liên hợp điện tử với vòng A của phân tử.

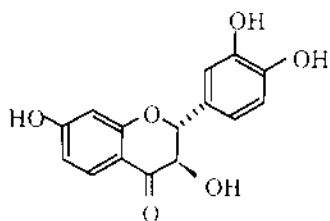
Trong tự nhiên, flavanon có tâm bất đối, chúng là chất hoạt động quang học.

Flavanon là các hợp chất không màu, hầu như không hoạt động huỳnh quang dưới tác dụng của ánh sáng tử ngoại, khác với flavon.

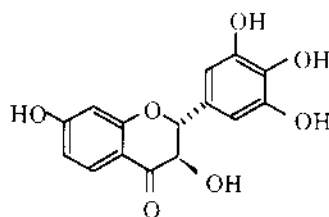
Flavanon dễ chuyển hoá thành flavon hoặc chalcon. Do đó, trong quá trình trích ly, một phần hợp chất flavanon có thể chuyển hoá thành các hợp chất khác.

Khi ở vị trí 3 thuộc vòng pyran của flavanon có nhóm hydroxyl, hợp chất được gọi là dihydroflavonol.

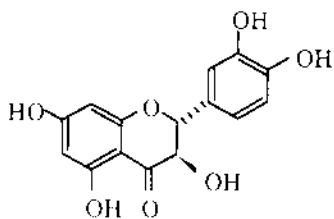
Một số hợp chất loại này là taxifolin, fustin, dihydrorobinetin... (sơ đồ 10.16).



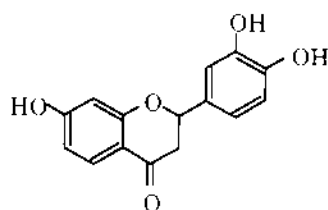
(+)-fustin



(+)-dihydrorobinetin



taxifolin
dihydroquercetin



(+)-butin

Sơ đồ 10.16. Hợp chất kiểu flavanon và dihydroflavonol.

** Các hợp chất flavan-3-ol:*

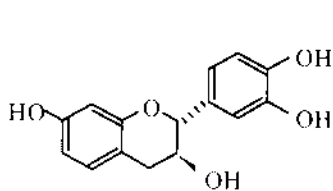
Flavan-3-ol là polyphenol, trong đó vòng pyran chứa nhóm hydroxyl ở vị trí 3, không có nhóm C=O ở vị trí 4.

Đại diện của nhóm chất này là catechin.

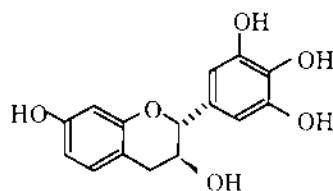
Catechin là tên riêng để chỉ một hợp chất. Tuy vậy, một số tác giả cũng sử dụng thuật ngữ này để chỉ các hợp chất thuộc nhóm này.

Hai đồng phân lập thể (+)-catechin và (-)-epicatechin (khác cấu hình ở C₃) là các hợp chất chủ yếu của thực vật. Các chất này có trong vỏ và gỗ của một số loài như keo, dẻ...

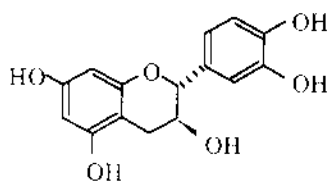
Ngoài ra còn có các hợp chất khác, với số lượng nhóm hydroxyl khác nhau như (+)-gallocatechin, (-)-epiafzelechin (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavan) (sơ đồ 10.17).



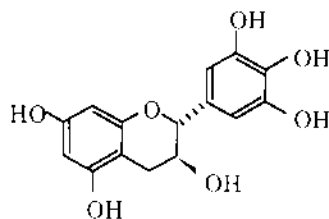
(-)-fisetinidol



(-)-robinetinidol



(+)-catechin



(+)-gallocatechin

Sơ đồ 10.17. Hợp chất kiểu flavan-3-ol.

Flavan-3-ol là các hợp chất tinh thể không màu, một phần tan trong nước.

Các hợp chất này dễ bị ngưng tụ hoặc trùng hợp, đặc biệt là trong môi trường axit.

Flavan-3-ol có thể thu được bằng cách hydro hoá flavan-3,4-diol.

* Các hợp chất leucoantoxyanin

Nhiều loài cây có lá, vỏ hoặc gỗ chứa các chất không màu, nhưng khi tác dụng với dung dịch axit vô cơ thì có màu đỏ hoặc màu giống như antoxyanidin. Đó là các hợp chất leucoantoxyanin hoặc một số trường hợp là leucoantoxyanidin. Các chất này khó tách ra dưới dạng tinh khiết.

Các hợp chất trên có tên gọi liên quan đến antoxyanin hoặc antoxyanidin, nên trước hết cần giới thiệu đôi nét về các hợp chất này (sơ đồ 10.18).

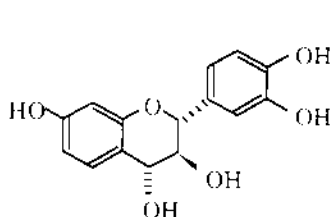
Antoxyanidin là hợp chất thuộc loại flavonoid, có tính bazơ đủ mạnh để tạo thành muối bền với axit vô cơ.

Chúng tạo dung dịch màu đỏ trong axit và màu xanh da trời trong môi trường kiềm.

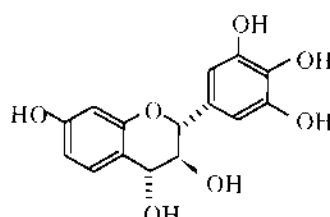
Ở dạng bazơ tự do, antoxyanidin là chất đồng phân với flavanon, là dẫn xuất của flavon mà nhóm cacbonyl bị khử thành rượu.

Antoxyanidin thường tồn tại dưới dạng glycozit, gọi là antoxyanin. Hợp chất dạng aglycon hoặc glycozit tìm thấy trong hoa, lá một số loài cây.

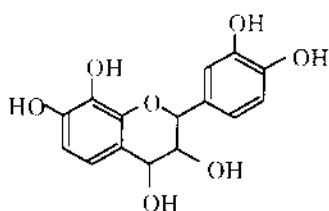
Tuy vậy, antoxyanidin có lẽ được tạo ra từ leucoantoxyanin vốn có trong thực vật.



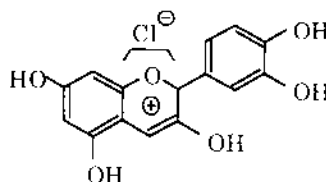
(+)-leucofisetinidin



(+)-leucorobinetinidin



melacacidin



xyanidin

Sơ đồ 10.18. Các hợp chất kiểu leucoantoxyanin

10.2.5. Các chất tannin

Từ lâu con người đã biết dùng một số chất trích ly từ thực vật để thuộc da.

Tannin là thuật ngữ chung để chỉ các chất có tác dụng thuộc da.

Về hoá học, đó là nhóm chất có thành phần hoá học khác nhau, có nhiều nhóm hydroxyl tự do và có độ trùng hợp khác nhau.

Thông thường, chỉ có các hợp chất có khối lượng phân tử tương đối lớn mới thực sự được gọi là tannin.

Tuy vậy cũng có một số hợp chất phân tử thấp, qua đa tự có thể có tính chất thuộc da.

Các hợp chất tannin có thể xếp thành hai nhóm: tannin thủy phân và tannin ngưng tụ.

Tannin thủy phân là hợp chất polyphenol chứa liên kết este và liên kết glycozit.

Khi bị thủy phân, các hợp chất này chủ yếu tạo ra axit gallic, axit ellagic và saccarit (thường là glucoza).

Tannin thủy phân thường nằm ở lá, còn ở trong gỗ chỉ có một lượng nhỏ.

Tannin thủy phân có thể đơn giản như glucogallin, hoặc phức tạp hơn như digalloyl-glucoza...

Các tác giả đã đưa ra một số sơ đồ cấu tạo của tannin. Trong tự nhiên, cấu tạo của tannin có thể phức tạp hơn nhiều.

Tannin ngưng tụ là loại tannin mà dưới tác dụng của axit sẽ trùng ngưng hoặc trùng hợp thành các hợp chất có phân tử lượng lớn hơn.

Quá trình ngưng tụ như vậy có thể xảy ra trong tự nhiên, dưới tác dụng của enzym.

Trước đây các nhà nghiên cứu cho rằng tannin ngưng tụ chỉ được tạo ra từ catechin. Sau đó một số tác giả khác cho rằng, một phần tannin cũng hình thành từ các đơn vị flavan-3,4-diol.

Giả thiết này dựa trên thực tế là leucoantoxyanin thường đi kèm tannin.

Hơn nữa các nhà nghiên cứu cũng phát hiện: các polyme từ leucoantoxyanin có trong các mẫu tannin thông thường. Các polyme này có thể chuyển từng phần thành antoxyanidin.

Như vậy, trong tự nhiên, tannin ngưng tụ được tạo thành từ hydroxyflavan, dạng antoxyanin và dạng catechin.

Để phân nào hình dung được quá trình tạo thành hợp chất tannin, cao phân tử có khả năng thuộc da, ta có thể xem xét chiều hướng phản

ứng của monome flavan-3-4-diol và flavan-3-ol khi hình thành biflavonoit, triflavonoit... (sơ đồ 10.19).

Trong số các flavonoit như đã nghiên cứu ở phần trước, chỉ có flavan-3,4-diol và flavan-3-ol là tham gia vào phản ứng tạo hợp chất tannin phân tử lượng lớn, đáp ứng được yêu cầu chất thuộc da.

Đặc điểm này có thể giải thích trên cơ sở xem xét cấu tạo phân tử các flavonoit.

Trừ hai nhóm hợp chất thuộc hydroxyflavan là flavan-3,4-diol và flavan-3-ol, các flavonoit khác đều mang nhóm C=O ở vị trí 4 của phân tử.

Nhóm C=O liên hợp điện tử với vòng A, giảm mức độ nucleophil, cản trở xu hướng đa tụ xảy ra tại vòng thơm A.

Hơn nữa, nhóm C=O cũng chiếm mất một vị trí đáng ra có thể tham gia phản ứng đa tụ (trùng ngưng).

Ngược lại, nhóm OH ở vị trí meta trong vòng A của flavan-3,4-diol cũng như nguyên tử oxy của vòng pyran có thể tạo ra tâm nucleophil ở vị trí 6 và 8.

Đối với flavan-3-ol, khả năng nucleophil tăng lên bởi ba nhóm thế ở vị trí meta trong vòng A của catechin.

Sự bố trí các nhóm hydroxyl ở vị trí meta so với nhau và với oxy ở vòng pyran của flavan-3,4-diol cũng tạo thuận lợi để xuất hiện ion benzylacboni ở vị trí 4. Ion này được ổn định nhờ hệ thống liên hợp điện tử của các nguyên tử oxy và nhân thơm A.

Do đó, flavan-3,4-diol tác dụng với một hợp chất loại flavan-3-ol có thể tạo thành biflavonoit.

(+)-catechin hoặc (+)-gallocatechin có thể tạo ra tâm nucleophil mạnh nhất, trong khi đó leucofisetinidin và leucorobinetinidin có xu hướng tạo thành ion benzylacboni để tham gia vào phản ứng thế electrophil.

Ion này có lẽ tấn công vào vị trí 8 ở vòng A của catechin để tạo

thành biflavonoit.

Quá trình trùng ngưng có thể xảy ra theo cơ chế tương tự như trên để tạo thành các biflavonoit và tannin cao phân tử từ:

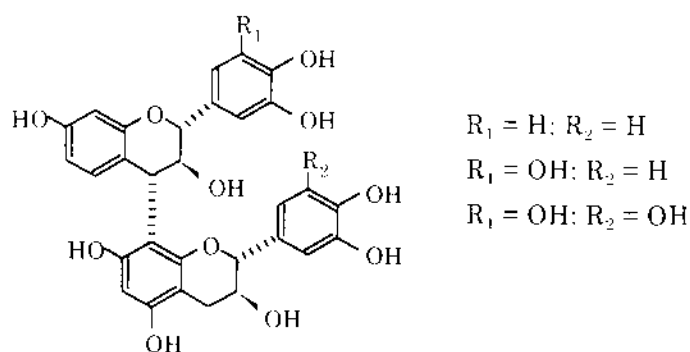
(+)-leucofisetinidin và (+)-catechin;

(+)-leucorobinetinidin và (+)-catechin;

(+)-leucorobinetinidin và (+)-galocatechin;

v.v...

Trên đây chỉ là một số hướng phản ứng. Các hợp chất có số lượng và vị trí nhóm hydroxyl khác nhau nên có thể có nhiều tâm phản ứng khác nhau. Kết quả là hợp chất cao phân tử sẽ có cấu tạo rất phức tạp.



Sơ đồ 10.19. Sự hình thành biflavonoit.

10.2.6. Lignan

Lignan là dime của phenylpropan, trong đó có liên kết giữa hai nguyên tử cacbon ở vị trí β ở nhánh của mỗi đơn vị phenylpropan.

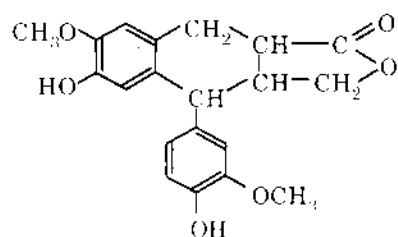
Thông thường, nguyên tử cacbon cuối cùng của nhánh propan bị oxy hoá và tồn tại dưới dạng lacton, rượu hoặc este.

Một số loại lignan thường gặp là: pinoresinol, conidendrin, matairesinol, siringaresinol...

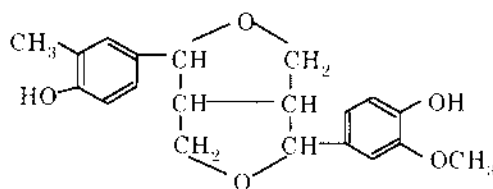
Sự phân bố lignan cũng tùy thuộc loài cây. Có loài chứa một loại lignan, cũng có loài chứa nhiều loại lignan khác nhau.

Đa số lignan trong gỗ và trong mủ cây có chứa đơn vị guaiacyl.

Tuy vậy cũng có loại lignan chứa hai nhóm metoxyl trên một đơn vị phenylpropan, như dimetoxylsolariciresinol.



conidendrin



pinoresinol

Sơ đồ 10.20. Lignan.

10.2.7. Các hợp chất stylben

Stylben là tên gọi của 1,2-diphenyletylen. Đó là hợp chất có hệ nối đôi liên hợp trong toàn phân tử.

Trong các chất trích ly của gỗ, một số hợp chất có cấu tạo tương tự stylben nên được gọi là các hợp chất stylben.

Hợp chất stylben thường thấy là pinosylvin (3,5-dihydroxy-*trans*-stylben).

Pinosylvin có trong cây họ thông. Hợp chất metyl ete của nó cũng tồn tại trong gỗ lõi của thông.

Cũng như stylben, pinosylvin có hệ nối đôi liên hợp nên có khả năng phản ứng cao.

Nó có thể ngưng tụ với lignin khi nấu xenluloza phương pháp sulfit, do đó, cản trở quá trình công nghệ.

Pinosylvin hoạt động huỳnh quang, ta có thể quan sát hợp chất này trên nền sắc ký dưới tác dụng của tia tử ngoại.

Ngoài pinosylvin và dẫn xuất là cấu tử chính của loại hợp chất này, trong một số loài cây còn có những hợp chất khác. Ví dụ, 4-hydroxystylben, 4-metoxystylben trong thông; 2,4,3',5'-tetrahydroxystylben trích ly được từ cây dâu tằm.

Thông thường hợp chất stylben chỉ có các nhóm thế hydroxy hoặc metoxy.

Song, trong một số trường hợp, chúng cũng tồn tại dưới dạng hợp chất phức tạp hơn, như 3-*D*-glucozit của 3.5.4'-trihydroxystylben.

Hợp chất này trích ly được từ bạch đàn.

Trong tự nhiên, hợp chất hydroxystylben có tác dụng kìm hãm sự phát triển của nấm mốc, nên chức năng của chất trích ly này là bảo vệ cây.

10.2.8. Các hợp chất tropolon

Tropolon là xycloheptatrienolon. Đuôi của tử để chỉ chức rượu và chức xeton của hợp chất.

Đó là hợp chất vòng bảy cạnh. Trong vòng có hệ ba nối đôi liên hợp. Nhóm carbonyl cũng có thể liên hợp điện tử với vòng.

Tropolon có tính chất của hợp chất thơm.

Tuỳ theo vị trí tương đối của nhóm hydroxyl so với nhóm carbonyl, ta có 1.2-tropolon, 1.3-tropolon và 1.4-tropolon (sơ đồ 10.21).

Từ gỗ lõi của tùng *Thuja plicata*, ta có thể trích ly được α -, β - và γ -thujaplicin, sản phẩm thế của tropolon, còn được gọi là isopropyl-tropolon.

Tropolon có tính axit cao hơn phenol thông thường, có khả năng tautome hoá cao và tồn tại dạng cộng hưởng.

Khi tác dụng với muối sắt, tropolon cho phức chất màu đỏ và chuyển sang xanh lá cây nếu dư muối sắt; tạo phức màu xanh lá cây khi tác dụng với đồng axetat, thậm chí đồng kim loại.

Ngoài các hợp chất thujaplicin, trong cây cũng có một số hợp chất tropolon khác, nhưng hàm lượng thường nhỏ hơn. Vòng tropolon cũng có trong thành phần của alcaloit.

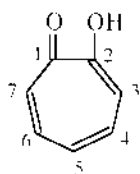
Trong thực vật cũng có dẫn xuất axit của tropolon, như axit thujic.

Axit này dễ đồng phân hoá tạo thành *p*-isopropylbenzoic.

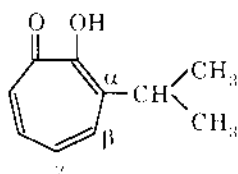
Thujic có thể tồn tại dạng axit hay dạng este, như metyl este.

Các hợp chất tropolon có tác dụng diệt nấm mốc, đóng vai trò chất bảo vệ cây.

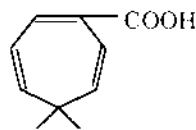
Trong các quá trình công nghệ, nếu có mặt tropolon, vấn đề ăn mòn thiết bị cần được quan tâm.



tropolon



α -thujaplicin
(3-propyltropolon)



axit thujic

Sơ đồ 10.21. Các hợp chất tropolon.

10.2.9. Cacbohydrat

Phần lớn cacbohydrat không bị trích ly khỏi tế bào thực vật bằng dung môi trung tính. Chỉ có một phần nhỏ cacbohydrat phi xenluloza và dẫn xuất có thể hoà tan được trong nước hoặc dung môi trung tính.

Đường saccaroza, glucoza và fructoza thường có trong gỗ giác và phần vỏ trong của cây, kể cả cây lá rộng và lá kim.

Một lượng nhỏ arabinosa và glucoza cũng có trong gỗ lõi của một số loài, ví dụ *L*-arabinosa có trong gỗ lõi của thông, tùng.

Axit *L*-arabinonic cũng có trong gỗ lõi dưới dạng 1,4-lacton.

Một điều đáng quan tâm đối với các nhà sản xuất xenluloza – giấy là sự có mặt của saccaroza và các đường khác trong bã mía. Trong quá trình nấu xenluloza, trong môi trường kiềm, đường bị biến đổi và góp phần làm tiêu hao hoá chất. Do đó, trước khi đưa vào thiết bị nấu, ngoài công đoạn khử tủy, cần phải làm giảm đến tối thiểu hàm lượng đường trong nguyên liệu mía.

Ngoài đường đơn và đường saccaroza, trong thực vật còn có oligosaccarit khác như trisaccarit, tetrasaccarit, pentasaccarit.

Raffinoza, trisaccarit, gồm một đơn vị D-galactosa, một đơn vị D-glucosa và một đơn vị D-fructosa.

Stachyoza, tetrasaccarit, gồm hai đơn vị galactosa, một đơn vị D-glucosa và một đơn vị D-fructosa.

Verbascoza, pentasaccarit, có cấu tạo: $[D\text{-galactosa}]_3\text{-D-glucosa-D-fructosa}$.

Saccarit cũng liên kết với một số chất khác thành hợp chất glycozit, ví dụ tannin (xem 10.2.5).

Tannin, nhất là tannin thủy phân, là hợp chất của một số saccarit với polyphenol, liên kết glycozit hoặc este.

10.3. BIẾN ĐỔI HOÁ HỌC CỦA CHẤT TRÍCH LY TRONG QUÁ TRÌNH NẤU XENLULOZA

** Trong quá trình nấu xenluloza phương pháp sulfat:*

Trong môi trường kiềm, nhiệt độ cao, các chất trích ly có thể bị chuyển hoá hoặc phân huỷ.

Các chất béo, sáp, với cấu tạo este, bị thủy phân (xà phòng hoá), tạo thành dạng muối natri. Các chất này đóng vai trò bảo vệ như xà phòng.

Đặc biệt, muối của axit nhựa là chất bảo vệ nhũ tương rất hiệu quả cho quá trình hoà tan các chất trung hoà và các chất trích ly kỵ nước.

Đối với nguyên liệu gỗ lá rộng, nhiều loại nhựa khó tan, gây khó khăn cho quá trình nấu xenluloza.

Nếu thêm xà phòng từ dầu tall (là sản phẩm phụ của quá trình nấu xenluloza phương pháp sulfat), quá trình hoà tan nhựa sẽ thuận lợi hơn.

Nhựa cây bị biến đổi nhiều khi nấu xenluloza. Este của axit béo với sterol cũng như với dẫn xuất alcol của tritecpenoit trong gỗ lá rộng (chất sáp) bị xà phòng hoá chậm.

Các hợp chất không no dưới dạng axit béo, axit nhựa và tecpenoit

phân tử lượng cao bị polyme hoá thành các hợp chất có khối lượng phân tử lớn, cản trở quá trình sản xuất xenluloza giấy.

** Trong quá trình nấu xenluloza phương pháp sulfít:*

Khi nấu xenluloza phương pháp sulfít, mức độ thuỷ phân của este axit béo phụ thuộc vào điều kiện tiến hành phản ứng.

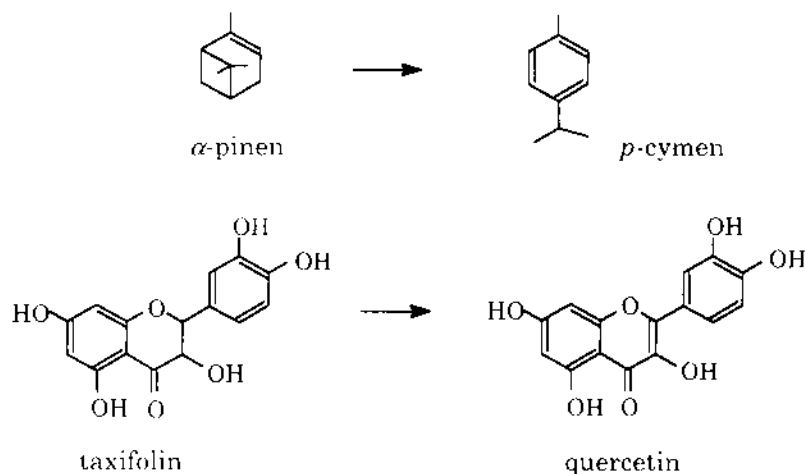
Một số cấu tử nhựa cũng bị sulfo hoá, tăng khả năng hoà tan vào dịch nấu.

Mặt khác, trong quá trình nấu, một phần nhựa có thể bị tách ra khỏi nguyên liệu thực vật, phân tán vào môi trường lỏng.

Các mảnh phân tử lignin chứa các nhóm sulfo đã hoà tan vào chất lỏng có thể đóng vai trò chất bảo vệ hệ nhũ tương của các cấu tử kỵ nước.

Phản ứng dehydro hoá cũng có thể xảy ra ở các chất tecpen, tecpenoit và flavonoit.

Sự hình thành *p*-cymen từ α -pinen, và quercetin từ taxifolin là kết quả phản ứng dehydro hoá trong quá trình nấu sulfít axit (sơ đồ 10.22).



Sơ đồ 10.22. Biến đổi hoá học của chất trích ly trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfít.

Các cấu tử chứa nối đôi tepecnoit, bao gồm cả axit nhựa có thể bị polyme hoá thành các hợp chất có khối lượng phân tử lớn, gây khó khăn cho quá trình sản xuất xenluloza giấy.

Sự phân huỷ và hoà tan lignin trong trường hợp nguyên liệu thực vật chứa nhiều nhựa trở nên khó khăn. Do đó, quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfit trong môi trường axit chỉ thích hợp với các loại nguyên liệu ít nhựa.

Chất trích ly cũng có thể bị phân huỷ dưới tác dụng của vi sinh vật và enzym. Do đó, sự cản trở của chất trích ly đối với quá trình sản xuất xenluloza giấy bước đầu được xử lý bằng công nghệ sinh học.

10.4. ỨNG DỤNG CÁC CHẤT TRÍCH LY

Từ lâu con người đã biết sử dụng chất trích ly thực vật, như chất màu tự nhiên hoặc các chất thuộc da.

Hiện nay chất trích ly vẫn được sử dụng trong nhiều lĩnh vực và càng ngày phạm vi ứng dụng của chất trích ly càng được mở rộng, mặc dù trong một số trường hợp, chất tổng hợp đã thay thế các hợp chất tự nhiên.

Các sản phẩm từ chất trích ly được khai thác và sử dụng nhiều là dầu thông, nhựa thông, axit béo, các chất thuộc da. Ngoài ra trên thị trường còn có các sản phẩm khác như long não, dầu long não, dầu tùng, dầu bạch đàn... Ở nước ta một số cây đặc sản cũng được trồng để lấy chất trích ly dùng trong lĩnh vực hoá chất, y dược và gia vị...

Hiện nay phần lớn chất màu lấy từ thực vật đã được thay thế bằng chất tổng hợp. Chất màu tự nhiên chỉ còn được dùng trong phạm vi hẹp, để tạo ra các sản phẩm may mặc đặc trưng cho cộng đồng người nào đó. Tuy vậy, nhìn chung các chất trích ly càng ngày càng được khai thác sử dụng nhiều hơn, nhất là lĩnh vực chất màu thực phẩm.

Nguồn cung cấp chất trích ly quan trọng là thông. Từ lâu con người đã biết chích mủ thông để sử dụng.

Phần dễ bay hơi là tinh dầu thông, giàu hợp chất monotecpen, sesquitecpen và dẫn xuất. Phần còn lại là colophan, chủ yếu là axit nhựa.

Chất trích ly cũng có thể thu được bằng cách sử dụng dung môi để chiết tách, sau đó phân đoạn.

Nguồn cung cấp dầu thông, colophan và axit béo quan trọng là công nghiệp sản xuất xenluloza theo phương pháp sulfat, nguyên liệu là thông.

Dầm gỗ được gia công trong dung dịch kiềm chứa natri hydroxyt và natri sulfua, ở nhiệt độ $170 \div 175^{\circ}\text{C}$. Trong điều kiện đó phần lớn chất trích ly bị phân tán vào dịch nấu.

Trong giai đoạn đầu của quá trình nấu, tecpenoit dễ bay hơi bị cuốn theo khí thải và tiếp đó được ngưng tụ.

Dầu thông thu hồi có mùi khó chịu vì chứa một số hợp chất lưu huỳnh. Qua quá trình làm sạch, ta thu được dầu thông chất lượng cao, đáp ứng yêu cầu sử dụng.

Trong quá trình nấu xenluloza theo phương pháp sulfat, axit nhựa và axit béo được giải phóng, nằm lại trong dịch đen dưới dạng muối natri.

Dịch đen được bốc hơi tới nồng độ 25% chất rắn.

Xà phòng natri của axit nhựa và axit béo được tách ra khỏi dung dịch nước. Sau khi axit hoá, thu được dầu tall, gồm axit nhựa, axit béo và một số chất trung tính.

Dầu tall thô có thể qua chưng cất dưới chân không để thu các sản phẩm đạt yêu cầu về chất lượng.

Dầu thông thu được thường dùng để sản xuất dầu thông tổng hợp.

Trên thị trường, chỉ có một phần tinh dầu hay dầu thông thu được từ mủ cây, còn lại phần lớn là dầu thông tổng hợp. Loại sản phẩm này đa dạng, tùy thuộc yêu cầu sử dụng.

Dầu thông tổng hợp dùng cho sản xuất tecpin hydrat (sử dụng trong y tế).

Một lượng lớn dầu thông được dùng để sản xuất thuốc diệt sâu bọ toxaphen.

Dầu thông cũng được dùng trong công nghiệp sơn, công nghiệp vật liệu cao phân tử, sản xuất campho (hợp chất dùng trong y học và trong công nghiệp xenluloza axetat, xenluloza nitrat)...

Colophan bán trên thị trường có chất lượng khác nhau, tùy thuộc vào hàm lượng axit nhựa cũng như hàm lượng các chất trung tính trong đó.

Colophan thường dùng dưới dạng biến tính, như qua các quá trình hydro hoá, dehydro hoá, bất đối hoá, este hoá, polyme hoá, hoặc dùng ở dạng muối...

Loại colophan có hàm lượng abietic cao có thể dùng để sản xuất anhydrit maleic Diels-Adler.

Xà phòng từ colophan hiện tại ít được dùng để tẩy rửa, chủ yếu dùng làm chất nhũ hoá, chẳng hạn trong công nghiệp cao su tổng hợp.

Colophan được dùng trong công nghiệp hoá chất sơn, vecni, keo dán, mực in, kẹo cao su, công nghiệp giấy...

Một số chất trích ly từ vỏ, lá hoặc gỗ của một số loài cây từ lâu đã được dùng làm thuốc nhuộm hoặc chất thuộc da.

Mặc dù một số hợp chất crom có thể dùng để thuộc da, chất thuộc tannin thực vật vẫn đóng vai trò rất quan trọng trong ngành thuộc da.

Tannin có trong nhiều loài cây, nhưng nguồn cung cấp chính là cây mè riu (quebracho) mọc nhiều ở Nam Mỹ. Keo, dẻ hoặc một số loài cây vùng ven biển cũng chứa nhiều tannin.

Tannin có thể tách từ thực vật bằng nước nóng. Một số trường hợp, quá trình trích ly được tiến hành trong thiết bị áp lực, nhiệt độ trên 100°C. Dịch trích ly được cô đặc hoặc sấy khô thành dạng bột.

Thường toàn bộ chất trích ly được sử dụng, không cần tách khỏi tạp chất (chỉ cần hàm lượng tannin > 60%).

Nhiều thực vật chứa tannin, nhưng để đáp ứng yêu cầu về chất lượng của sản phẩm da thuộc, tannin cũng phải đạt được những tính chất cần thiết. Do đó, một số dịch trích ly chứa tannin không được dùng cho công nghệ thuộc da.

Trong những trường hợp đó, ta có thể sử dụng tannin vào mục đích khác như tổng hợp các chất dùng để kiểm soát độ nhớt của huyền phù bùn khoan mỏ dầu, dùng làm nguyên liệu trong sản xuất chất kết dính, sơn...

Ở nước ta cũng có một số loài cây cho tannin. Tuy vậy, xét về hiệu quả kinh tế khi sản xuất lớn, cây cần có hàm lượng tannin tương đối cao và mọc tập trung để dễ khai thác.

Một hệ chất trích ly khá quan trọng ở nước ta, đó là mủ cao su.

Mủ cao su, hay còn gọi là latex, chứa khoảng 25 ÷ 35% polyisopren dạng *cis*, khoảng 1.5 ÷ 2% protein, 1.5 ÷ 2% nhựa, 1.5% đường, 0.5 ÷ 1% tro và một lượng nhỏ axit béo. Phần còn lại là nước. Latex là nguyên liệu cho công nghiệp cao su.

Mặc dù cao su tổng hợp được sản xuất rộng rãi, nhưng cao su thiên nhiên vẫn là mặt hàng chiến lược của thế giới.

Ngoài các chất trích ly đã kể ở trên, một số chất trích ly khác cũng được sử dụng hoặc nghiên cứu để sử dụng trong thực tiễn.

Một số hợp chất sterol thực vật có thể dùng trong y dược như β -sitosterol, dihydro- β -sitosterol.

Rutin, một hợp chất glycozit của quercetin, cũng được nghiên cứu sử dụng trong điều trị tim mạch.

Conidendrin được demetyl hoá thành chất chống oxy hoá.

Dihydroquercetin cũng có tính chống oxy hoá. Nó cũng có thể được chuyển hoá thành quercetin, một chất chống oxy hoá mạnh hơn, dùng trong y dược.

Các chất chống oxy hoá nguồn gốc thực vật có ưu điểm là có thể dùng trong bảo quản thực phẩm.

Thujaplicin là chất chống nấm mốc.

Hầu hết các hợp chất kể trên có thể thu hồi từ dịch thái của quá trình nấu xenluloza.

Chương 11

PHẢN ỨNG HOÁ HỌC TRONG QUÁ TRÌNH TẮY TRẮNG XENLULOZA

Bột xenluloza chưa tẩy thường có màu sẫm (tối). Trong quá trình nấu xenluloza, nhất là nấu theo phương pháp sulfat, lignin bị phân huỷ và hình thành các cấu trúc mang màu. Theo tiến trình nấu, nguyên liệu dăm gỗ sẫm màu dần dần cho tới khi đạt được hiệu suất bột khoảng $60 \div 70\%$. Sau đó, màu của dăm gỗ lại sáng dần theo mức độ delignin hoá. Tuy nhiên, sản phẩm thu được vẫn là bột nâu, trong đó có các cấu trúc mang màu.

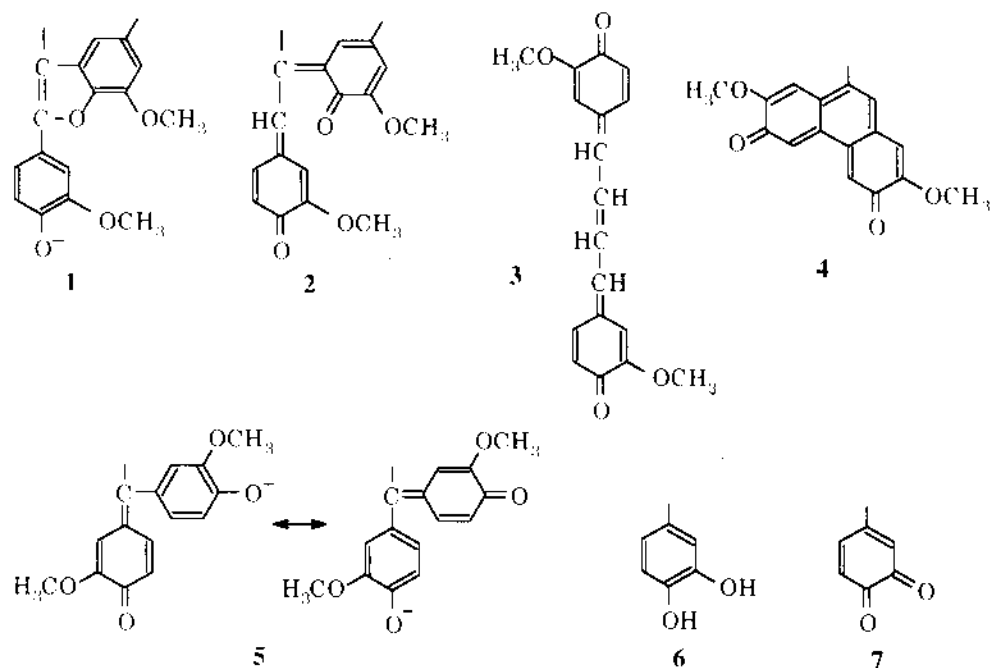
Màu sắc của bột cũng xuất phát từ chất màu tự nhiên, nhất là trường hợp bột giấy sản xuất theo phương pháp cơ học hoặc cơ - nhiệt - hoá.

Ngoài ra, trong bột cũng tồn tại những cấu trúc có khả năng chuyển hoá thành dạng có màu, đó là các chất màu tiềm năng.

Phần lớn chất có màu trong bột sau nấu đều xuất phát từ lignin (sơ đồ 12-1). Tuy nhiên, màu sẫm của bột cũng một phần do nhóm mang màu có mặt trong polysaccarit gây ra, ví dụ, nhóm cacbonyl.

Dạng arylcoumaron (1) và stilben quinon (2) tạo thành từ stilben do phản ứng oxy hoá. Butadien quinon (3) có thể hình thành do oxy hoá dạng hydroxyarylbutadien (xuất hiện từ cấu trúc pinoresinol trong lignin dạng phenol tự do khi nấu xenluloza theo phương pháp sulfit hoặc sulfat). Quá trình đóng vòng dẫn tới hợp chất trung gian, sau đó bị oxy hoá thành cấu trúc vòng dion (4). Các dạng cộng hưởng (5) là kết quả phản ứng ngưng tụ lignin diễn ra trong quá trình nấu xenluloza. Dạng catechol (6) hình thành khi nấu xenluloza theo phương pháp kiềm hoặc trung tính. Dạng này có thể bị oxy hoá trở thành cấu trúc quinon (7).

Để đạt độ trắng mong muốn, phần lignin còn lại trong bột cần được tách bỏ, nói cách khác là giải phóng xơ xenluloza khỏi các nhóm mang màu triệt để đến mức có thể.



Sơ đồ 11.1. Một số cấu trúc mang màu và chất màu tiềm năng:

1. arylcoumaron; 2. stilben quinon; 3. butadien quinon; 4. diol dạng vòng; 5. dạng quinon metit cộng hưởng; 6. catechol; 7. o-quinonit.

Để đạt mục tiêu trên, có hai phương án cần lựa chọn: 1) tẩy trắng trên cơ sở loại bỏ lignin khỏi bột, 2) tẩy trắng trên cơ sở bảo toàn lignin.

Phương án đầu thường áp dụng đối với bột hoá học, nhằm giữ cho độ trắng ổn định lâu dài. Quá trình tẩy trắng được tiến hành theo nhiều giai đoạn. Tác nhân tẩy truyền thống là clo và một số hợp chất của clo. Một số tác nhân khác cũng được sử dụng, như oxy, ozon và peroxit...

Trong quá trình tẩy trắng, các chất trích ly và tạp chất có màu bị phân huỷ và hoà tan, nên độ trắng của bột được cải thiện.

Để thu bột xenluloza cho chế biến hoá học, ngoài việc tách lignin và các tạp chất khác, ta cũng cần triệt để loại bỏ hemixenluloza. Khi chuẩn bị bột xenluloza cho làm giấy, cần tránh loại bỏ hết hemixenluloza (xem chương 7).

Phương án tẩy thứ hai là bảo toàn lignin. Quá trình xử lý này chỉ đạt độ trắng vừa phải. Phương pháp này thường áp dụng cho bột hiệu suất cao, như bột cơ học và nửa hoá học.

Các loại hoá chất thường dùng để tẩy bột theo phương án này là natri dithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) và peroxit.

11.1. TẨY TRẮNG TRÊN CƠ SỞ PHÂN HUỶ LIGNIN

Trong quá trình tẩy trắng, sự phân huỷ lignin xảy ra chọn lọc hơn so với quá trình nấu xenluloza. Tuy nhiên, giá hoá chất tẩy thường cao, chi phí xử lý môi trường ở công đoạn tẩy cũng cao, nên trong thực tế sản xuất, nhiệm vụ phân huỷ lignin phần lớn dành cho khâu nấu. Bột xenluloza sau nấu chỉ còn lại một hàm lượng nhỏ lignin dành cho khâu tẩy.

Nhìn chung, lượng hoá chất tẩy được tính toán dựa trên hàm lượng lignin còn sót lại trong bột sau nấu. Tuy nhiên, khả năng tách bỏ lignin (cũng có nghĩa là khả năng tẩy trắng) phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như cấu trúc phần lignin còn lại sau nấu, khả năng tiếp cận của hoá chất đối với lignin cũng như sự phân bố của lignin trong tế bào thực vật. Nếu quá trình nấu không dừng đúng lúc, phần lignin còn lại có thể bị ngưng tụ mạnh, vấn đề tách phần lignin bị ngưng tụ đó ra khỏi nguyên liệu xơ sẽ trở nên khó khăn hơn.

Phương pháp nấu xenluloza cũng ảnh hưởng tới độ trắng ban đầu của bột vào tẩy. Bột xenluloza sulfit chưa tẩy thường có độ trắng cao hơn so với bột sulfat chưa tẩy. Do đó, bột sulfat được tẩy trắng với điều kiện công nghệ khắt khe hơn so với bột sulfit.

Quá trình tẩy trắng bột xenluloza cho sản xuất giấy hay cho chế biến hoá học thường được tiến hành theo nhiều giai đoạn kế tiếp nhau, trong đó mỗi giai đoạn có yêu cầu riêng về hoá chất cũng như điều kiện tẩy. Công nghệ được lựa chọn phù hợp với từng loại bột đưa vào tẩy để vừa đạt độ trắng cao vừa bảo toàn tính chất cơ lý của sản phẩm.

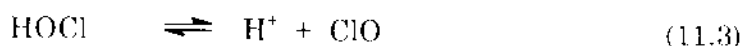
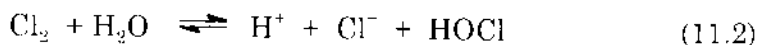
11.1.1. Phản ứng của lignin

11.1.1.1. Phân huỷ lignin và tẩy trắng dựa trên clo và hợp chất của clo

a. Giới thiệu về clo và hợp chất của clo

* Clo:

Khi hoà tan khí clo vào nước, các phản ứng xảy ra theo sơ đồ sau:



Trạng thái cân bằng nhanh chóng được thiết lập, với

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{Cl}^-][\text{HOCl}]}{[\text{Cl}_2]} \approx 3.9 \cdot 10^{-4}$$

$$K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{ClO}^-]}{[\text{HOCl}]} \approx 2.9 \cdot 10^{-8}$$

$$(\text{p}K_2 \approx 7.5 \text{ ở } 25^\circ\text{C}).$$

Độ lớn của K tăng khi nhiệt độ tăng. (Ở các tài liệu khác nhau, giá trị này rất khác nhau).

Thành phần của hệ thay đổi tùy thuộc vào pH của môi trường.

Khi pH = 5.5, dung dịch chỉ có HOCl

Với pH < 5.5, có Cl₂ xuất hiện. Tỷ lệ Cl₂ càng tăng khi pH giảm.

Khi pH > 5.5, xuất hiện ion hypochlorit, pH càng tăng, tỷ lệ ion hypochlorit càng tăng.

Axit hypochlorơ cũng có thể chuyển hoá thành diclomonoxit Cl₂O theo sơ đồ sau:



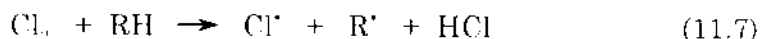
trong đó:
$$K_3 = \frac{[\text{Cl}_2\text{O}]}{[\text{HOCl}]^2} < 10^{-2}$$

Tuy giá trị của hằng số cân bằng không nhỏ, nhưng cân bằng này đạt được khá chậm, do đó, thực tế chỉ tồn tại một lượng nhỏ Cl₂O trong

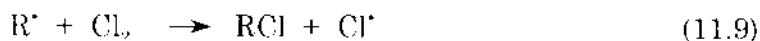
dung dịch. Tuy nhiên, Cl_2O có hoạt tính rất cao, cần phải tính đến sự có mặt của nó trong dung dịch khi $\text{pH} < 7,5$.

Giai đoạn clo hoá tiến hành trong môi trường axit. Phần lớn clo bị tiêu hao nhanh trong 5 ÷ 10 phút đầu. Trong giai đoạn đầu của quá trình, sự khuếch tán là yếu tố quyết định tốc độ phản ứng chung. Hệ chất được khuấy trộn tốt sẽ tạo điều kiện cho phản ứng xảy ra.

Clo có thể phản ứng với chất hữu cơ dưới dạng clo phân tử, hoặc dưới dạng gốc tự do, kết quả của phản ứng phân huỷ phân tử Cl_2 . Gốc tự do $\text{Cl}^\bullet$ cũng có thể phản ứng với ion clorua, tạo thành ion - gốc. Gốc clo cũng hình thành khi clo phân tử tác dụng với chất hữu cơ. Các phản ứng diễn ra theo sơ đồ sau:



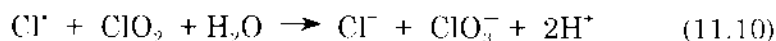
Gốc tự do $\text{Cl}^\bullet$ hình thành với tốc độ chậm. Nhưng một khi đã xuất hiện, gốc này sẽ khởi đầu cho phản ứng chuỗi xảy ra với tốc độ cao giữa $\text{Cl}^\bullet$ và chất hữu cơ. Phản ứng chuỗi xảy ra theo sơ đồ:



.....

Các nhà nghiên cứu cho rằng phản ứng của clo hoặc hypoclorit với cacbohydrat chủ yếu xảy ra theo cơ chế gốc. Điều này đã được chứng minh bằng thực nghiệm. Khi cho vào hệ phản ứng các chất triệt tiêu gốc tự do (còn gọi là chất bẫy gốc tự do), phản ứng trên chậm lại hoặc bị ngừng.

Một trong những chất có tác dụng triệt tiêu gốc tự do chính là clodioxid ClO_2 . Phản ứng bẫy gốc tự do diễn ra theo sơ đồ:



Dựa trên tác dụng bẫy gốc tự do của ClO_2 , các nhà công nghệ đã thay thế giai đoạn clo hoá đơn thuần (C) bằng giai đoạn tẩy có sử dụng clodioxid và clo nguyên tố (D/C) hoặc (D + C). Nhờ tiến bộ này của công

nghe, chất lượng bột xenluloza được nâng lên. Ngoài ý nghĩa nâng cao chất lượng bột sau tẩy, việc thay thế một phần clo nguyên tố bằng clodioxidit còn có tác dụng tốt về mặt môi trường (xem 12.5.2).

Tuy gốc tự do $\text{Cl}^\bullet$ bị triệt tiêu nhờ ClO_2 , phản ứng phân huỷ lignin vẫn xảy ra bình thường, vì clo tác dụng với lignin theo cơ chế khác, với sự tham gia của phân tử Cl_2 .

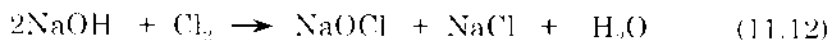
Nguyên tử clo có ái lực lớn đối với điện tử. Tại một thời điểm nào đó, hiện tượng phân cực sẽ xảy ra trong phân tử clo:



Dạng phân cực trên đây của clo tham gia phản ứng với lignin theo cơ chế electrophil, nghĩa là phía clo có điện tích dương phần sẽ tấn công vào vị trí có mật độ điện tử cao của phenylpropan (sơ đồ 11.18).

* *Hypoclorit:*

Dung dịch hypoclorit thường được chuẩn bị bằng cách sục clo vào dung dịch NaOH (hoặc huyền phù sữa vôi), tạo thành hypoclorit theo sơ đồ:



Khi để lâu, hypoclorit sẽ phân huỷ thành clorua và clorat. Với sự có mặt của ion kim loại nặng, hypoclorit bị phân huỷ thành clorua và oxy.

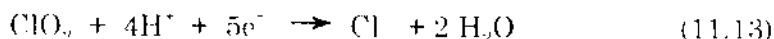
Khi hypoclorit bị khử thành clorua, hai đương lượng oxy hoá được sử dụng. Ví dụ, dung dịch hypoclorit 1M chứa $2 \times 35.5 = 71$ gam clo hoạt tính trong một lít dung dịch.

* *Clodioxidit:*

Trong thời gian gần đây, clodioxidit được sử dụng nhiều để tẩy trắng, nhất là với dây chuyển ECF. ClO_2 là chất khí, được tổng hợp bằng cách khử clorat. Tác nhân khử có thể là SO_2 , HCl , NaCl , CH_3OH ...

Clodioxidit phản ứng khá chọn lọc với lignin và hầu như không phá huỷ polysaccarit.

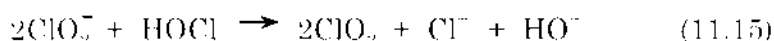
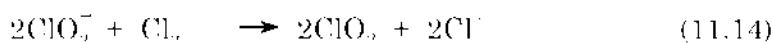
Trong môi trường axit yếu ($\text{pH} = 4 - 5$), clodioxidit có thể bị khử thành clorua:



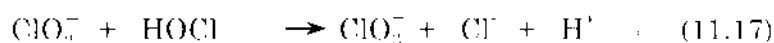
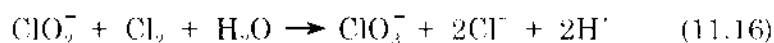
Theo phản ứng 11.13, năm đương lượng oxy hoá được sử dụng. Như vậy, 1 lít dung dịch ClO_2 nồng độ 1 M chứa $5 \times 35.5 = 177.5\text{g}$ clo hoạt tính.

Trong môi trường kiềm, ClO_2 bị khử thành clorit. Ở phản ứng này, chỉ có một đương lượng oxy hoá được sử dụng ($\text{Cl}^{4+} \rightarrow \text{Cl}^{3+}$).

Phản ứng oxy hoá khi dùng ClO_2 trong điều kiện tẩy trắng là rất phức tạp. Nhiều cấu tử chứa nguyên tố clo xuất hiện trong hệ phản ứng, như axit hypoclorơ, axit clorơ, axit cloric. Các tác giả cho rằng ClO_2 chuyển hoá nhanh thành clorua và clorit, sau đó clorit phản ứng chậm với các thành phần của bột xenluloza. Song, ClO_2 lại liên tục được tái sinh nhờ phản ứng giữa clo hoặc axit hypoclorơ với clorit theo sơ đồ sau:



Clo và axit hypoclorơ cũng có thể tác dụng với clorit, tạo thành clorat:



b. Phản ứng của lignin với clo và hợp chất của clo

** Clo hoá:*

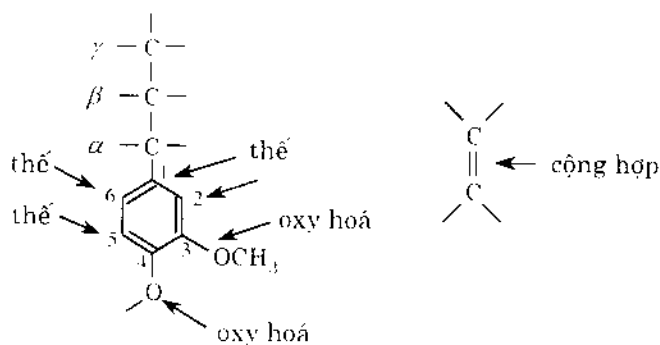
Clo tác dụng với lignin chủ yếu theo hướng phản ứng thế và oxy hoá. Lignin còn có nối đôi ở nhánh propan, nên một lượng nhỏ clo cũng tiêu hao do phản ứng cộng hợp clo vào nối đôi.

Để đánh giá khả năng phản ứng của lignin, ta hãy nghiên cứu cấu tạo của đơn vị phenylpropan (sơ đồ 11.18).

Đối với phản ứng thế ở nhân thơm, nhóm hydroxyl tại vị trí 4 và nhóm metoxy ở vị trí 3 hoạt hoá nhân thơm tại các vị trí *ortho* và *para* so với 4 và 3. Ngược lại, nhóm cacbonyl hoặc cacboxyl ở C_6 làm giảm hoạt tính ở vị trí *ortho* và *para*, nhưng tăng cường phản ứng ở *meta*.

Quá trình depolyme hoá lignin có thể xảy ra theo hai hướng:

- Thế mạch nhánh ở C_7 theo cơ chế electrophil;
- Phân huỷ do oxy hoá liên kết *etc* aryl và phân huỷ nhân thơm.



Sơ đồ 11.18. Các hướng phản ứng của lignin.

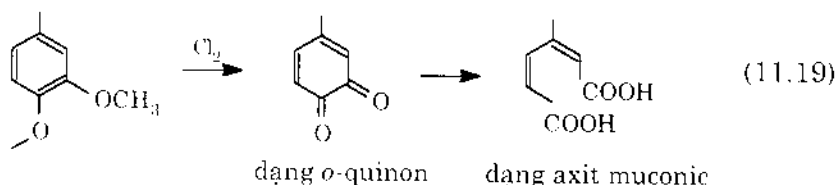
Phản ứng thế chủ yếu xảy ra ở C_6 và C_5 , tạo ra lignin clorua. Khi phản ứng thế xảy ra ở C_1 , lignin sẽ bị chia tách thành các phần nhỏ hơn.

Phản ứng oxy hoá có thể phân huỷ liên kết ete metylaryl.

Khi quá trình oxy hoá diễn ra ở C_1 , lignin cũng bị phân huỷ thành các phần nhỏ hơn.

Ở phần nhánh, phản ứng cộng hợp vào nối đôi cũng làm tăng hàm lượng clo trong lignin clorua. Tuy nhiên, hàm lượng nối đôi ở mạch nhánh thấp, nên phản ứng này cũng chỉ đóng vai trò thứ yếu trong clo hoá lignin.

Lignin không những bị phân huỷ ở các liên kết ete như đã nói ở trên mà bản thân vòng thơm cũng có thể bị phá vỡ dưới tác dụng oxy hoá bởi clo, qua giai đoạn trung gian *o*-quinon:



Trong quá trình clo hoá, khoảng 3 phân tử clo bị tiêu hao cho một đơn vị phenylpropan. Phản ứng thế và cộng diễn ra rất nhanh, tiêu hao tới 50 ÷ 60% lượng clo sử dụng. Phản ứng oxy hoá diễn ra nhanh ở giai đoạn đầu, sau đó chậm lại. Lignin dần dần bị depolyme hoá (giải trùng

hợp), tạo thành các phần nhỏ hơn, giàu nhóm cacboxyl, có thể hoà tan vào môi trường phản ứng, đặc biệt trong giai đoạn kiềm hoá triếp theo.

Ở quá trình tẩy D/C, ClO_2 dần dần bị tiêu hao cho phản ứng oxy hoá cấu trúc phenol tự do, tăng cường quá trình phân huỷ và hoà tan lignin. Nếu clo và clodioxidit đồng thời được đưa vào bột (D + C), quá trình phân huỷ cacbohydrat sẽ diễn ra mạnh hơn so với phương án D/C, trong khi đó, tác dụng phân huỷ lignin ở hai phương pháp này là gần như nhau.

** Tẩy trắng bằng dung dịch hypoclorit:*

Khác với Cl_2 và HOCl (tác nhân electrophil), ion hypoclorit ^-OCl là tác nhân nucleophil. Do đó, ^-OCl sẽ tấn công vào các vị trí mang điện tích dương phần, đặc biệt là các nguyên tử cacbon thuộc nhóm cacbonyl:



trong đó, R và R' là alkyl hoặc aryl; R' cũng có thể là Cl.

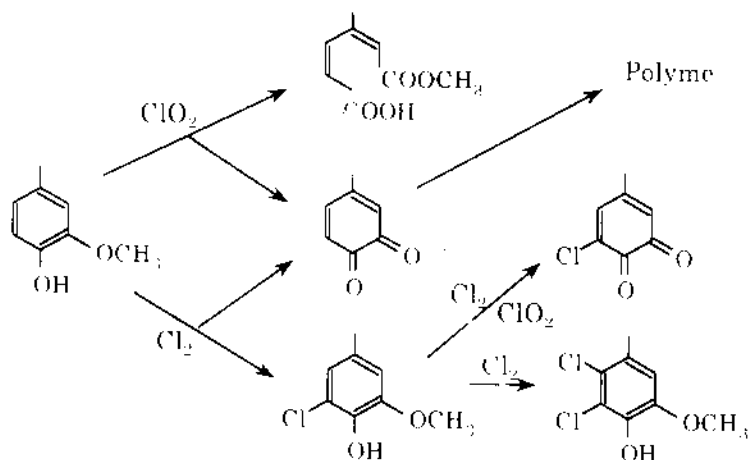
Cấu trúc lignin với các đặc trưng như vậy có thể xuất hiện trong quá trình nấu xenluloza, hoặc tạo thành ở giai đoạn tẩy phía trước.

Qua phản ứng oxy hoá, sản phẩm phân huỷ của lignin vừa có khối lượng phân tử thấp hơn vừa chứa nhóm cacboxyl nên dễ hoà tan vào dung dịch.

** Tẩy trắng bằng clodioxidit:*

Trước đây, clodioxidit đắt tiền nên chỉ được sử dụng ở các công đoạn cuối của quá trình tẩy trắng. Hiện nay, trong các dây chuyền tẩy hiện đại, clodioxidit có thể được sử dụng ngay ở công đoạn tẩy đầu tiên.

Clodioxidit phân huỷ nhanh cấu trúc phenol tự do. Các cấu trúc phenol thế và cấu trúc chứa nối đôi cũng bị phân huỷ dưới tác dụng của clodioxidit. Do phân huỷ vòng thơm, một loạt axit hình thành, như axit oxalic, muconic, maleic, fumaric cũng như các sản phẩm thế của clo (sơ đồ 11.21).



Sơ đồ 11.21. Phản ứng của đơn vị guaiacyl với clo và clodioxit.

Do bị giải trùng hợp thành các mảnh chứa nhóm thế cacboxyl, sản phẩm phân huỷ của lignin hoà tan vào môi trường phản ứng. Một phần sản phẩm phản ứng sẽ được tách ra trong quá trình xử lý kiềm ở công đoạn tiếp theo.

11.1.1.2. Phân huỷ lignin và tẩy trắng bằng tác nhân phi clo

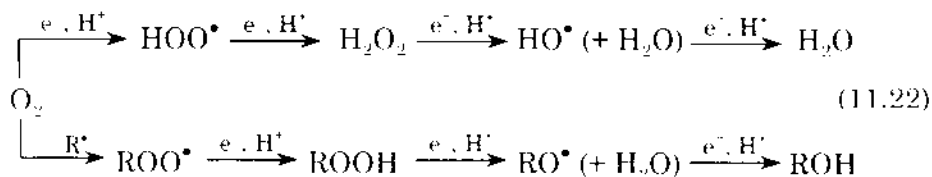
Mấy thập kỷ gần đây, theo yêu cầu giảm thiểu ô nhiễm môi trường, một số tác nhân phi clo đã được sử dụng để phân huỷ lignin và tẩy trắng. Đó là oxy, ozon, hydro peroxit, peroxit và peroxyaxit. Đây cũng là chủ đề có tính thời sự ở Việt Nam.

Ở trạng thái bình thường, oxy phân tử có hai điện tử không cặp đôi thuộc lớp điện tử ngoài cùng. Khi bị kích thích, các điện tử này có thể ở trạng thái năng lượng cao hơn, đặc trưng bằng hai điện tử cặp đôi hoặc không cặp đôi có spin ngược chiều nhau (hình 11.1).

	$2p_x$	$2p_y$	So sánh mức năng lượng (kJ/mol)
Trạng thái kích thích	$\uparrow$	$\uparrow$	157
	$\uparrow\downarrow$		94
Trạng thái cơ bản	$\uparrow$	$\uparrow$	0

Hình 11.1. Trạng thái năng lượng của phân tử oxy.

Oxy có thể bị khử thành nước qua bốn giai đoạn chuyển dịch một điện tử, làm xuất hiện gốc tự do peroxy ($\text{HOO}^\bullet$), hydro peroxit (H_2O_2) và gốc tự do hydroxyl ($\text{HO}^\bullet$). Oxy cũng tham gia vào quá trình biến đổi các chất hữu cơ (sơ đồ 11.22).



Do xuất hiện nhiều loại cấu tử hoạt động, quá trình phản ứng với sự tham gia của oxy trở nên rất phức tạp.

Oxy có điện tử không cặp đôi, vì thế chúng dễ dàng tham gia vào phản ứng dây chuyền (cơ chế gốc).

Với R là gốc hữu cơ, phản ứng có sự tham gia của oxy được biểu diễn ở sơ đồ 11.23.

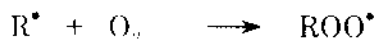
Phản ứng khởi đầu (khởi mào):



hoặc:



Quá trình phát triển mạch:

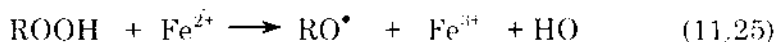
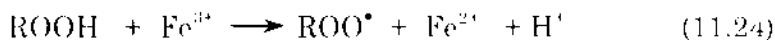


Quá trình dứt mạch:

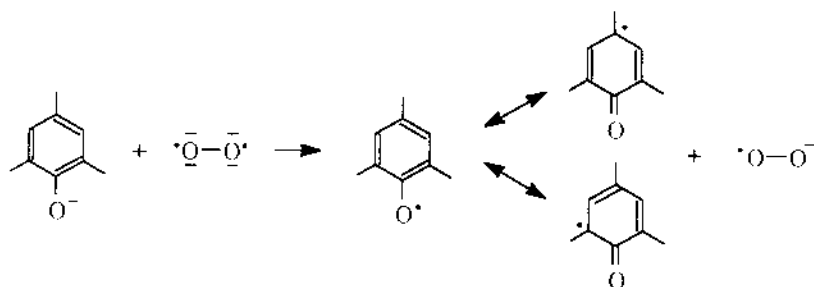


Sơ đồ 11.23. Phản ứng chuỗi khởi đầu bằng oxy.

Các peroxit hữu cơ cũng có thể phân huỷ dưới tác dụng của ion kim loại chuyển tiếp:



Trường hợp chất hữu cơ là lignin, gốc tự do có thể hình thành khi electron tách ra từ dạng phenolat của lignin, tạo thành gốc tự do phenoxy ổn định nhờ cộng hưởng:

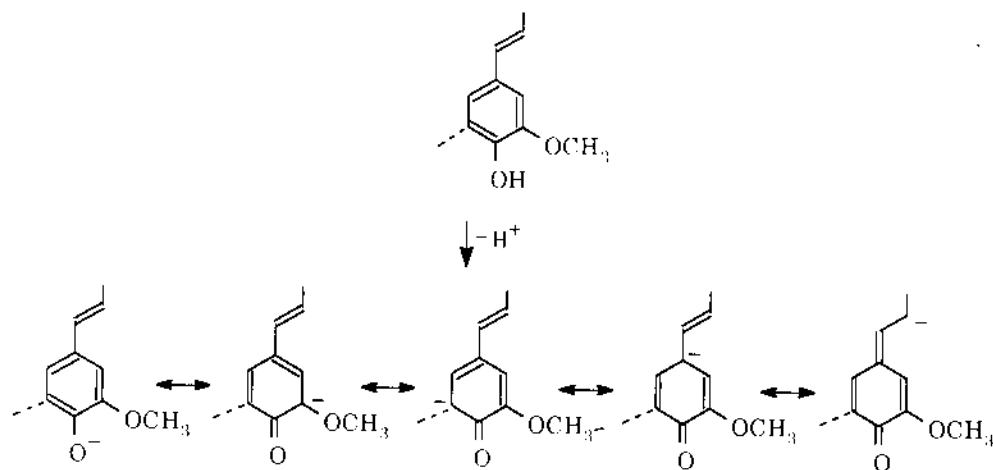


Sơ đồ 11.26. Sự hình thành gốc phenoxy ổn định cộng hưởng từ lignin.

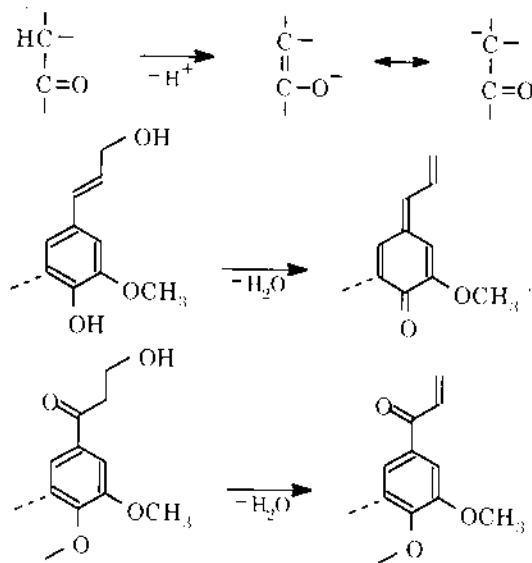
Do đó, quá trình tẩy trắng (delignin hoá) bằng oxy thường được tiến hành trong môi trường kiềm, ở đó phản ứng phân huỷ lignin chủ yếu diễn ra theo cơ chế ion.

Khoảng một nửa lượng lignin trong bột nâu sulfat có thể tách ra khi xử lý bột bằng oxy trong kiềm. Nếu quá trình delignin hoá diễn ra mạnh hơn, sâu hơn, chất lượng bột xenluloza sẽ giảm do oxy hoá cacbohydrat.

Oxy và peroxit có cơ chế tác dụng gần như nhau, vì quá trình đều được tiến hành trong môi trường kiềm. Các dạng cấu trúc của lignin biến đổi theo sơ đồ 11.27.

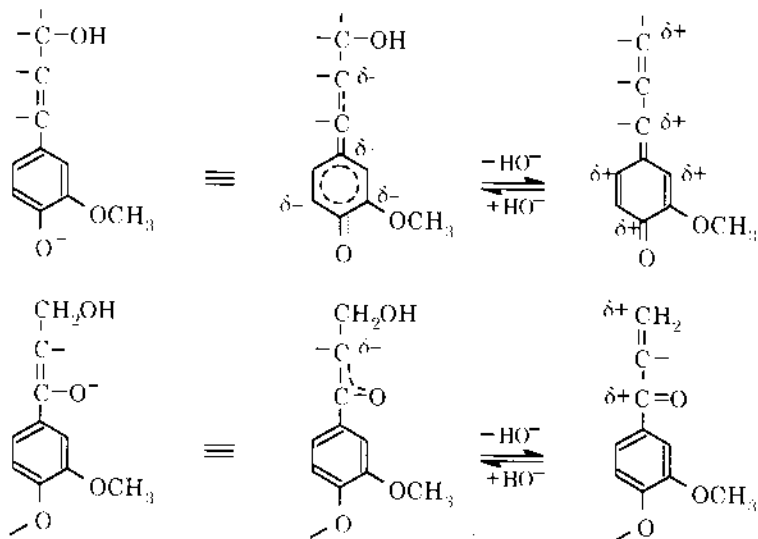


Sơ đồ 11.27. Sự hình thành cacbanion và cấu trúc chứa nhóm cacbonyl liên hợp điện tử (xem tiếp trang sau).



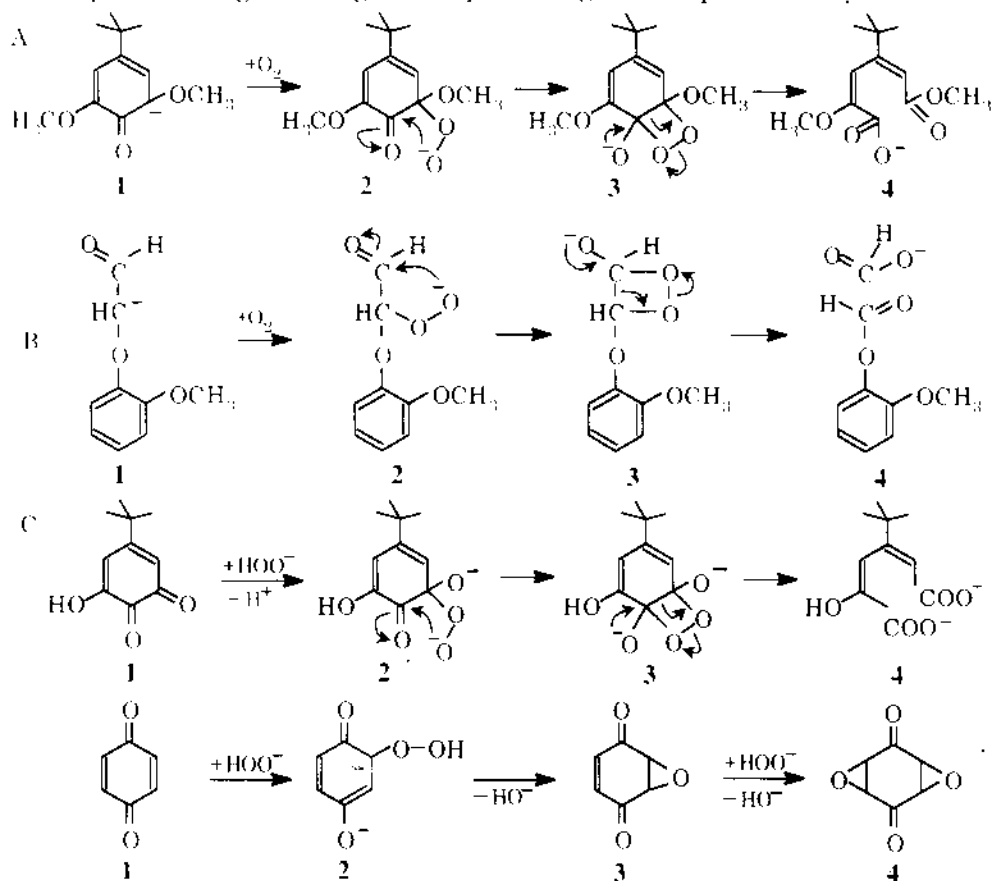
Sơ đồ 11.27. (tiếp theo).

Như đã nhận thấy từ sơ đồ 11.27, đơn vị phenylpropan của lignin chuyển về cấu trúc chứa cacbanion ở các vị trí khác nhau cũng như cấu trúc chứa nhóm carbonyl và hệ thống nối đôi liên hợp. Quá trình chuyển hoá này làm xuất hiện trong phân tử lignin các vị trí hút hoặc đẩy điện tử (sơ đồ 11.28).



Sơ đồ 11.28. Các vị trí phản ứng electrophil và nucleophil ở dạng phenol và enol trong đơn vị phenylpropan.

Là tác nhân electrophil, oxy tấn công vào vị trí có mật độ điện tích âm cao. Trong khi đó, anion peroxy - tác nhân nucleophil - sẽ tấn công vào vị trí giàu điện tích dương. Ngoài ra, các gốc hình thành khi oxy tách hydro của lignin cũng có thể phản ứng với các phân tử oxy khác.



Sơ đồ 11.29. Phản ứng của chất mô phỏng lignin
với oxy và hydro peroxit:

- Cacbanion (1) bị tấn công bởi oxy, tạo thành peroxit (2), phản ứng tiếp qua dioxetan (3) dẫn tới cấu trúc mạch hở (4).
- Cấu trúc (4) thu được khi kết hợp sản phẩm (2) của cacbanion (1) và oxy do phân huỷ liên kết C-C trong dioxetan (3).
- Phản ứng của *o*-quinon (1) với hydro peroxit dẫn tới axit dicarboxylic (4) qua peroxit (2) và dioxetan (3).
- p*-Quinon (1) phản ứng với hydro peroxit tạo thành cấu trúc oxiran (3) và (4) qua sản phẩm trung gian peroxit (2).

Cả oxy và hydro peroxit đều phản ứng với chất hữu cơ (trong đó có lignin), theo các cơ chế khác nhau, tạo thành peroxit hữu cơ (sơ đồ 11.29, trang 158).

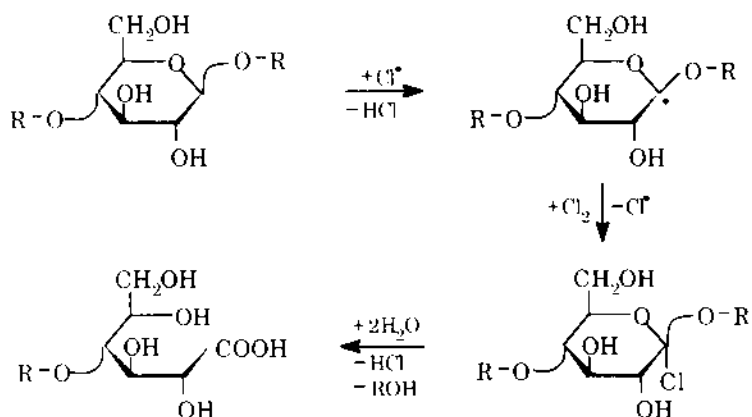
Khi tác dụng với oxy, lignin bị phân huỷ và hình thành nhiều nhóm mang màu. Trong khi đó, hydro peroxit loại bỏ các nhóm mang màu nhưng chỉ tham gia có mức độ vào quá trình phân huỷ và hoà tan lignin.

11.1.2. Phản ứng của cacbohydrat

11.1.2.1. Phản ứng của cacbohydrat dưới tác dụng của clo và hypoclorit

Ngoài lignin, trong quá trình tẩy trắng, cacbohydrat cũng bị phân huỷ một phần. Polysaccarit bị oxy hoá với mức độ nào đó, hình thành các nhóm cacbonyl. Sự xuất hiện nhóm chức này tạo điều kiện diễn ra phản ứng phân huỷ polysaccarit trong môi trường kiềm ở các công đoạn xử lý bằng dung dịch NaOH theo cơ chế tách loại β -alkoxy (xem sơ đồ 11.33).

Liên kết glycozit cũng có thể bị phân huỷ trực tiếp sau khi phản ứng oxy hoá diễn ra ở C_1 , dưới tác dụng của gốc $Cl^\bullet$, tạo thành đơn vị axit aldonic (sơ đồ 11.30).



Sơ đồ 11.30. Oxy hoá xenluloza dưới tác dụng của gốc tự do $Cl^\bullet$:

R là phần mạch xenluloza.

Ngoài ra, khi phân huỷ sâu có thể dẫn tới các sản phẩm chứa nhóm axit arabinonic và erythronic (sơ đồ 11.31).

Các nhóm cacbonyl cũng có thể xuất hiện tại C_6 của các đơn vị mất xích. Trường hợp này không trực tiếp dẫn tới giải trùng hợp.

Quá trình oxy hoá polysaccarit dưới tác dụng của hypoclorit chủ yếu dẫn tới hình thành axit cacboxylic khi $pH > 9$. Ở các giá trị pH thấp hơn, sản phẩm chủ yếu là dẫn xuất chứa nhóm cacbonyl, kém bền trong môi trường kiềm.

Clodioxit tác dụng khá chọn lọc lên lignin. Tác nhân tẩy trắng này chỉ ảnh hưởng rất ít đối với polysaccarit. Hơn nữa, nếu trong giai đoạn clo hoá có bổ sung thêm clodioxit, độ ổn định của polysaccarit cũng được nâng lên do cơ chế triệt tiêu gốc tự do như đã trình bày ở trên.

11.1.2.2. Phản ứng của cacbohydrat dưới tác dụng của oxy

Khi delignin hoá bột xenluloza bằng oxy / kiềm mà không có chất ức chế phản ứng phân huỷ cacbohydrat, độ nhớt của dung dịch polysaccarit giảm rất nhanh.

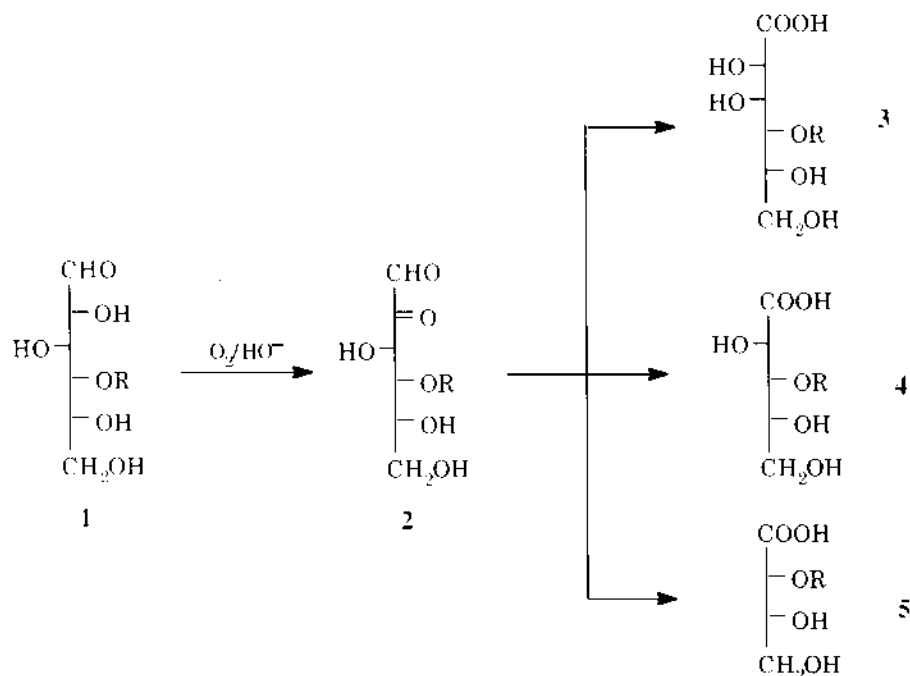
Polysaccarit bị tấn công bởi các gốc tự do. Các gốc này được tạo thành do oxy hoá trực tiếp chất hữu cơ, hoặc do phân huỷ peroxit dưới tác dụng của xúc tác ion kim loại nặng (xem lại sơ đồ 11.24 và 11.25). Phản ứng phân huỷ peroxit bị ức chế một phần khi có mặt một số hợp chất như muối magie và trietanolamin..., có khả năng làm mất hoạt tính của kim loại nặng. Loại chất ức chế khác hoạt động như chất bẫy gốc tự do (làm mất khả năng hoạt động của gốc tự do), hoặc các chất có tác dụng phân huỷ peroxit thành các phần tử không hoạt động.

Nhiều loại muối magie được sử dụng trong thực tế. Các loại muối này chuyển thành kết tủa magie hydroxit trong môi trường kiềm, là tác nhân hoạt động, nhờ có khả năng hấp phụ mạnh các ion kim loại nặng và làm mất hoạt tính của chúng.

Tẩy trắng bằng oxy trong kiềm ít chọn lọc hơn so với phương pháp truyền thống, đặc biệt đối với xenluloza sulfit. Tổn thất xenluloza trong trường hợp này cao, vì trong xenluloza sulfit đưa vào tẩy có nhiều nhóm khử hơn so với xenluloza sulfat. Như đã biết từ 2.2.2.2. T1, nhóm

cacbonyl cuối mạch polysaccarit tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng tách loại β -alkoxy (bào mòn), gây tổn thất polysaccarit.

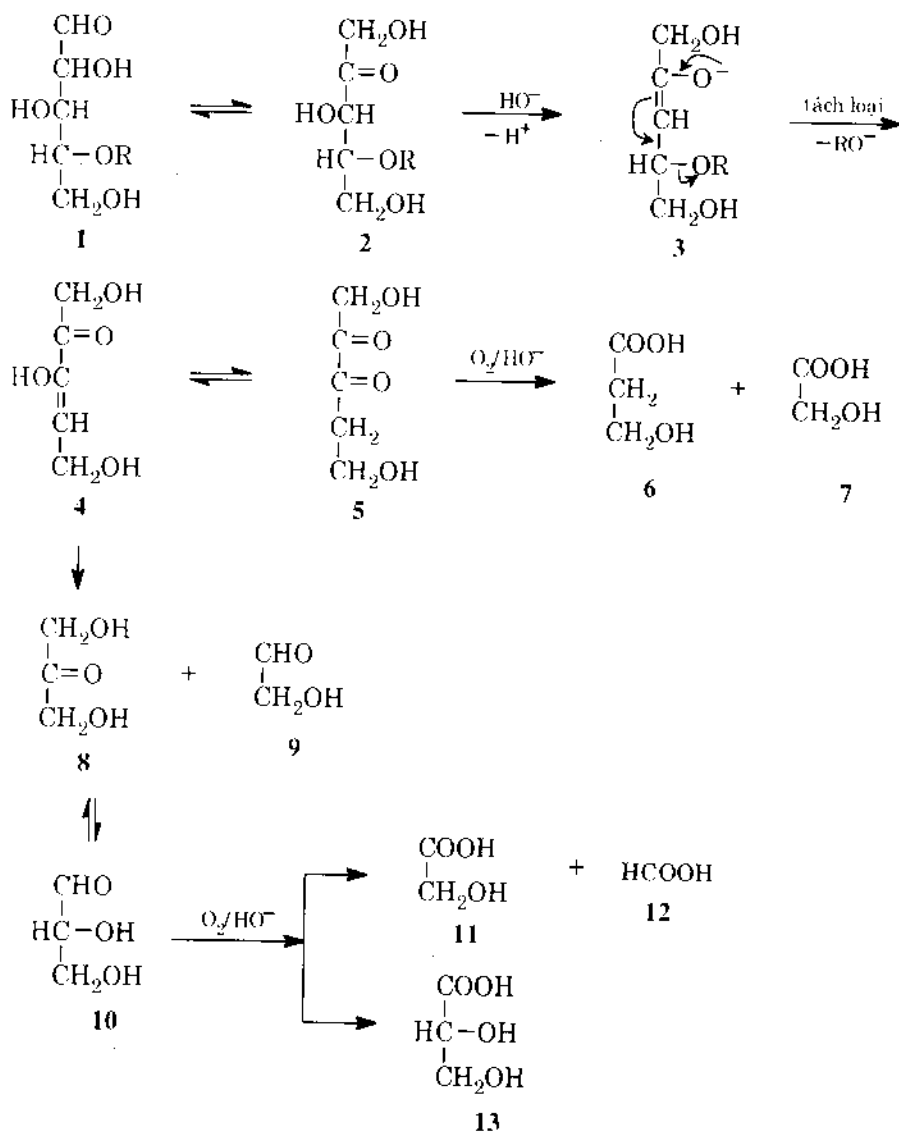
Song, phản ứng tách loại β -alkoxy có thể bị cản trở khi oxy hoá nhóm khử cuối mạch dưới tác động của oxy trong kiềm:



Sơ đồ 11.31. Ổn định mạch xenluloza do oxy hoá nhóm aldehyt cuối mạch thành dạng axit (chỉ biểu diễn các sản phẩm chính):

1. xenluloza; 2. dạng trung gian aldoxeto; 3. dạng axit mannonic;
4. dạng axit arabinonic; 5. dạng axit erythronic.

Trong phản ứng trên, phân tử xenluloza không bị bào mòn, chỉ có đơn vị cuối mạch thay đổi. Sau khi oxy hoá và sắp xếp lại, hình thành cặp epime của axit aldonic mà chủ yếu là dạng axit mannonic (6C), dạng arabinonic (5C) hoặc axit erythronic và giải phóng một số hợp chất phân tử nhỏ, do đứt liên kết C_1-C_2 , và C_2-C_3 . (Xem khái niệm epime ở 2.1.5.2. T1). Trường hợp polysaccarit là glucomannan, đơn vị cuối mạch sau khi bị oxy hoá cũng thường ở dạng mannonic giống như đối với xenluloza.



Sơ đồ 11.32. Phản ứng bào mòn xylan và chuyển hoá đơn vị cuối mạch trong điều kiện tẩy trắng bằng oxy trong kiềm:

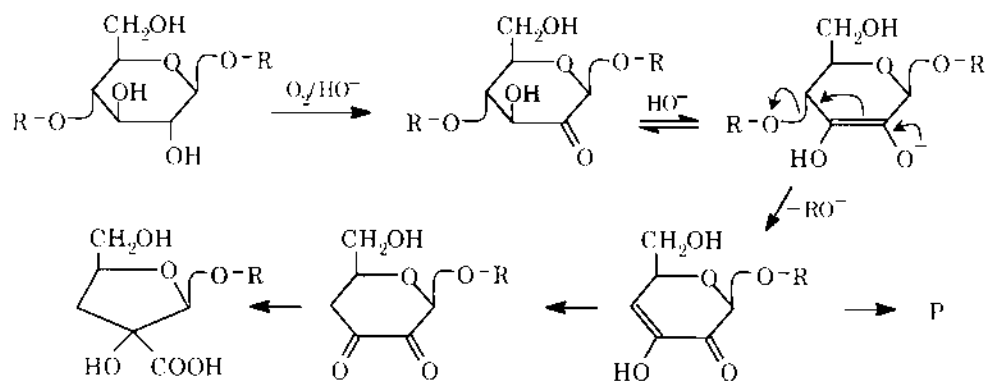
1. xylan; 2. dạng xetoza của đơn vị cuối mạch; 3. ion endiol; 4. dạng xetoenol; 5. dạng dixeton; 6. axit 1.3-hydroxypropanoic; 7. axit glycolic; 8. xetotrioza; 9. glycolaldehýt; 10. aldotrioza; 11. axit glycolic; 12. axit formic; 13. axit glyxeric.

Tuy nhiên, quá trình bào mòn vẫn diễn ra trước khi nhóm cacbonyl cuối mạch bị chuyển hoá, ví dụ, phản ứng đối với xylan (sơ đồ 11.32).

Dạng dixeton (5) bị oxy hoá và phân huỷ trong môi trường kiềm thành axit 1,3 - hydroxypropanoic và glycolic. Tương tự, glyxeraldehyt (glyxerinaldehyt) cũng bị oxy hoá thành axit glyxeric hoặc phân huỷ thành axit glycolic và axit formic.

Đối với xenluloza sulfat, phần lớn nhóm chức cuối mạch ở dạng axit metasaccarinic hoặc axit dạng khác, do đó, phản ứng bào mòn không thể bắt đầu tại đây. Song phản ứng bất lợi đối với polysaccarit khi tẩy trắng bằng oxy trong kiềm là oxy hoá hydroxyl ở C_2 , C_3 và C_6 thành nhóm cacbonyl. Hiện tượng này có thể xúc tiến phản ứng tách loại β -alkoxy. Quá trình đứt liên kết glycozit thường diễn ra sau khi oxy hoá hydroxyl ở C_2 (sơ đồ 11.33). Phản ứng oxy hoá ở C_4 cũng đưa tới kết quả tương tự do chuyển dịch nhóm cacbonyl sang C_2 . Hợp chất cacbonyl được hình thành sẽ tạo điều kiện diễn ra phản ứng tách loại ở C_1 và hình thành nhóm cacbonyl mới.

Sự đứt mạch ở C_1 về nguyên tắc có thể diễn ra khi phản ứng oxy hoá xảy ra ở hydroxyl gắn với C_3 . Tuy nhiên, theo một số nhà nghiên cứu, điều này dường như không xảy ra.



Sơ đồ 11.33. Phân huỷ liên kết glycozit dưới tác dụng của oxy trong môi trường kiềm:

R là phần mạch xenluloza; P là sản phẩm phản ứng.

Hai nhóm hydroxyl rượu bậc hai cũng có thể bị oxy hoá đồng thời. Dẫn xuất dicarbonyl thu được sẽ chuyển hoá tiếp thành axit hoặc dẫn tới đứt mạch.

Phản ứng oxy hoá cũng diễn ra ở C₆, làm tăng khả năng đứt mạch ở C₁. (So sánh với quá trình thủy phân đứt mạch tại C₁ ở mục 2.2.2.2. T1).

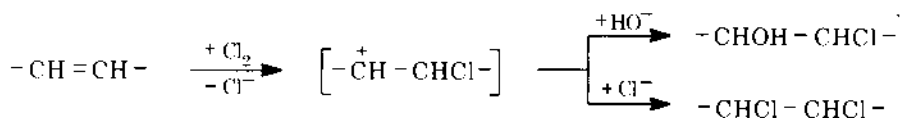
11.1.3. Phản ứng của chất trích ly

Chất trích ly rất đa dạng, với tính chất hoá học khác nhau. Do đó, sau quá trình nấu xenluloza, phần chất trích ly còn lại trong bột đã trải qua nhiều quá trình biến đổi hoá học và hoá lý.

Trong quá trình tẩy trắng, chất trích ly bị phân huỷ và clo hoá thành hàng loạt hợp chất khác nhau. các nhà khoa học chỉ mới nhận dạng được một phần trong số đó.

Phản ứng của chất trích ly với tác nhân tẩy trắng thường được nghiên cứu qua chất mô phỏng. Dựa vào nguyên lý của hoá học hữu cơ về phản ứng của clo, hợp chất clo hoặc tác nhân oxy hoá với chất mô phỏng, ta có thể suy đoán được một phần quá trình hoá học diễn ra trong thực tế tẩy trắng.

Clo chủ yếu tham gia phản ứng cộng hợp với hợp chất không no, như axit béo (sơ đồ 11.34).



Sơ đồ 11.34. Phản ứng cộng clo vào nối đôi.

Thực nghiệm chứng tỏ rằng khi sục clo vào pha triolein (triglyxerit của axit oleic), sản phẩm phản ứng chủ yếu là dẫn xuất diclo.

Clodioxit hiện nay cũng được sử dụng thay cho clo trong giai đoạn tẩy trắng dầu tiên để tránh hiện tượng nhựa bám bản, nhất là khi xử lý nguyên liệu gỗ lá rộng.

Clodioxit phản ứng chậm với chất trích ly, tuy vậy, tác nhân này cũng có thể oxy hoá một số cấu tử nhựa. Sự xuất hiện nhóm chức mới,

nhất là cacboxyl, làm tăng khả năng hoà tan các dẫn xuất này vào môi trường nước.

Tẩy trắng bằng oxy làm giảm đáng kể hàm lượng chất trích ly trong xơ sợi và tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tách nhựa ở các bước xử lý tiếp theo.

Các giai đoạn tẩy cuối cùng (hypoclorit và clodioxit) không làm giảm hàm lượng chất trích ly nhiều như các bước tẩy phía trước.

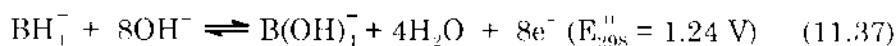
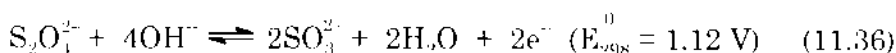
11.2. TẨY TRẮNG TRÊN CƠ SỞ BẢO TOÀN LIGNIN

Bột xenluloza sản xuất theo phương pháp cơ - hoá chứa nhiều nhóm mang màu, cần trải qua quá trình tẩy trắng. Các chất màu cũng như các hợp chất có tiềm năng chuyển hoá thành chất màu gồm các dạng phenol và catechol liên hợp, với hệ thống mối nối không no kiểu styren, stylben, diphenylmetan và butadien.

Thế oxy hoá khử (thế khử hoặc thế oxy hoá) ở điều kiện chuẩn đối với cấu trúc quinon trong lignin của bột giấy có độ lớn cỡ $0.7 \div 0.9V$. Như vậy, chúng có thể bị khử thành dạng hydroquinon:



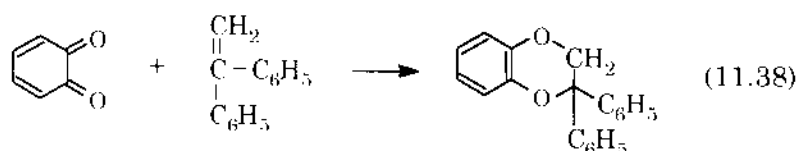
Về nguyên tắc, các chất mang màu và các chất tiềm ẩn khả năng có màu có thể bị loại bỏ bằng tác nhân khử hoặc oxy hoá. Dithionit và borohydrua được dùng làm chất khử cho dạng quinon:



So sánh thế chuẩn của các hệ chất khử ở trên với thế chuẩn của hệ quinon/ hydroquinon, ta thấy các chất khử này có thể sử dụng để làm mất màu cấu trúc quinon trong lignin của bột giấy. Tuy nhiên dạng catechol lại là chất màu ở dạng tiềm năng, vì khi bị oxy hoá trong không khí dưới tác dụng của ánh sáng, chúng sẽ chuyển thành dạng o-quinon có màu.

Nếu oxy hoá bằng peroxit trong môi trường kiềm, các chất màu trong lignin bị phân huỷ dẫn tới dạng bền vững hơn.

Có một khả năng đáng lưu ý để tăng độ trắng của bột xenluloza, đó là biến đổi hệ điện tử liên hợp của dạng quinon nhờ phản ứng cộng hợp kiểu Diels - Adler:



11.3. THỰC NGHIỆM VỀ DELIGNIN HOÁ VÀ TẮY TRẮNG BẰNG TÁC NHÂN PHI CLO

11.3.1. Phân huỷ lignin và tẩy trắng bằng oxy trong môi trường kiềm

Lignin và các chất màu bị phân huỷ dưới tác dụng của oxy trong môi trường kiềm. Do đó, phương pháp oxy trong kiềm có thể được áp dụng để nấu và tẩy trắng xenluloza.

Tuy nhiên, oxy là tác nhân oxy hoá không chọn lọc, vừa phân huỷ lignin vừa phá huỷ hemixenluloza và xenluloza. Do đó, ta cần sử dụng các chất bảo vệ polysaccarit để nâng cao hiệu suất và chất lượng xenluloza, cải thiện tính năng cơ lý của giấy và các vật liệu khác đi từ xơ sợi sản xuất theo phương pháp oxy / kiềm.

Nhiều phương án đã được các nhà nghiên cứu đề xuất, trong đó, có một số phương pháp bảo vệ cacbohydrat đã được áp dụng trong thực tế.

Khi sử dụng chất ức chế, mỗi giai đoạn oxy hoá có thể giảm 50% lượng lignin trong nguyên liệu xơ mà không làm giảm đáng kể tính năng cơ lý của sản phẩm, có trường hợp không giảm độ nhớt của dung dịch sản phẩm và không gây mất mát nhiều hemixenluloza. Đương nhiên, so sánh độ nhớt của bột xenluloza vào khâu tẩy và sau khi oxy hoá chỉ là tương đối, vì sau khi oxy hoá, một phần lignin và một phần hemixenluloza độ nhớt thấp đã bị phân huỷ và hoà tan. Song trong trường hợp có chất ức chế, độ nhớt dung dịch xenluloza cao hơn trường

hợp không có chất ức chế chứng tỏ xenluloza trong trường hợp đầu đã được bảo vệ.

11.3.1.1. Sử dụng magie clorua và một số muối magie khác làm chất ức chế phản ứng phân huỷ polysaccarit

Magie clorua tan tốt trong nước. Hoà tan muối này trong nước ở 25°C , tới nồng độ ít nhất là 1%.

Cho xenluloza đã ngâm trong dung dịch magie clorua tác dụng với dung dịch kiềm. Magie hydroxit hình thành và kết tủa trong lòng xơ sợi, có tác dụng bảo vệ polysaccarit khỏi bị các tác nhân oxy hoá tấn công.

Lượng magie clorua cần dùng là $0,05 \div 1\%$ (tính theo magie), tốt nhất là $0,2 \div 0,6\%$ so với bột xenluloza đưa vào xử lý.

Ngoài magie clorua, ta cũng có thể dùng magie axetat, magie sulfat, magie nitrat ở dạng khan hoặc ngâm nước.

Trong nhà máy xenluloza sulfat, ta có thể sử dụng magie sulfat làm chất bảo vệ. Độ hoà tan của muối này cho phép chuẩn bị dung dịch có nồng độ $1 \div 10\%$.

Huyền phù xenluloza trong dung dịch muối magie được khuấy cấn thận. Sau đó, thêm dung dịch natri hydroxit để kết tủa magie hydroxit. Lượng kiềm cần dùng là $2 \div 15\%$ so với bột xenluloza khô tuyệt đối (khô kiệt). Sau khi tách lượng nước dư, khối bột ướt được đun nóng $0,5 \div 3$ giờ, tới nhiệt độ $90 \div 130^{\circ}\text{C}$, áp suất oxy $0,5 \div 1$ MPa. Sau khi delignin hoá và tẩy trắng bằng oxy/kiềm, bột được làm lạnh và rửa tách tạp chất.

11.3.1.2. Sử dụng natri silicat, magie silicat, magie oxit và các hợp chất khác của magie làm tác nhân bảo vệ polysaccarit

Các silicat kim loại kiềm như natri silicat, các silicat kim loại kiềm thổ như magie silicat, phosphat kim loại kiềm thổ như magie phosphat, oxit kim loại kiềm thổ như magie oxit, peroxit kim loại kiềm thổ như magie peroxit hoặc các chất có khả năng tạo thành hydroxit kim loại kiềm thổ và các muối hoà tan của magie được sử dụng làm chất bảo vệ cacbohydrat trong quá trình tẩy trắng bằng oxy / kiềm.

Khi xử lý bột xenluloza sản xuất theo phương pháp hoá học (bột hoá) hoặc bột xenluloza bán thành phẩm bằng oxy / kiềm, với sự bảo vệ của các hợp chất trên, tính chất cơ lý của xenluloza được bảo toàn, một số trường hợp, tính năng cơ lý còn được cải thiện hơn.

Hiệu quả bảo vệ tốt nhất đạt được khi sử dụng natri silicat, magie oxit, magie hydroxit và magie silicat, với hàm lượng $0.5 \div 3\%$ so với bột xenluloza khô tuyệt đối.

Lượng dùng natri hydroxit khoảng $2 \div 12\%$, phụ thuộc mức độ delignin hoá và yêu cầu về độ trắng cần đạt được đối với sản phẩm. Hàm lượng bột chọn trong khoảng $4-30\%$, tốt nhất là $7 \div 25\%$. Nhiệt độ gia công là $90 \div 135^{\circ}\text{C}$. Áp lực oxy $0.49 \div 1.02 \text{ MPa}$. Quá trình xử lý ở nhiệt độ cuối kéo dài $10 \div 12$ phút, phụ thuộc vào loại nguyên liệu và yêu cầu chất lượng sản phẩm.

11.3.1.3. Tẩy trắng bằng oxy trong kiềm với chất bảo vệ là dithionit và polysulfua

Huyền phù bột xenluloza (hàm lượng bột $3-25\%$) tiếp xúc với oxy trong $0.5 \div 8$ giờ, ở $70 \div 140^{\circ}\text{C}$ (tốt nhất là 100°C), áp suất $0.4 \div 0.9 \text{ MPa}$ (tốt nhất là 0.7 MPa), với sự có mặt của $2 \div 10\%$ chất bảo vệ (so với bột xenluloza khô tuyệt đối).

Chất bảo vệ là polysulfua Na_2S_x ($x = 1 \div 4$) và dithionit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

Dithionit (hypodisulfit, hyposulfit hoặc hydrosulfit) là chất khử, có tác dụng chuyển nhóm cacbonyl thành rượu.

Khi dùng polysulfua (chất oxy hoá), nhóm cacbonyl chuyển thành axit cacboxylic. Polysulfua thích hợp nhất là natri polysulfua.

Lượng dùng natri hydroxit dao động trong khoảng $1 \div 5\%$. Liều lượng kiềm cao dành cho bột xenluloza có hàm lượng lignin lớn hơn 5% . Nếu bột nguyên liệu có hàm lượng lignin thấp, lượng kiềm sử dụng chỉ cần ít hơn 2% . Khi liều lượng dithionit lớn, có thể không cần sử dụng natri hydroxit.

11.3.1.4. Sử dụng muối magie ở dạng phức để bảo vệ polysaccarit

a. Chất tạo phức dạng hydroxyaxit và axit đa chức

Muối magie dưới dạng phức có tác dụng bảo vệ cacbohydrat, hoặc nói khác đi, có khả năng ức chế phản ứng phân huỷ xenluloza và hemixenluloza.

Các chất hữu cơ tạo phức thường dùng là:

- Axit hữu cơ có 2 ÷ 12 nguyên tử cacbon, mang một nhóm cacboxylic và một nhóm hydroxyl ở vị trí α và vị trí β ;
- Các axit hữu cơ mạch béo có hai hoặc nhiều nhóm cacboxylic và 1 ÷ 10 nhóm hydroxyl;
- Các axit dicarboxylic...

Ngoài các hợp chất chứa nhóm cacboxylic và hydroxyl ở vị trí α và β để tạo phức càng của với magie đã kể ở trên, ta có thể sử dụng axit glycolic, axit gluconic, axit mannonic...

Axit polyphosphoric cũng là chất tạo phức tốt với magie. Muối của axit này cũng có tác dụng bảo vệ hiệu quả cacbohydrat trong quá trình tẩy trắng bằng oxy / kiềm. Ta có thể sử dụng magie pyrophosphat với hai nguyên tử natri, magie triphosphat với ba nguyên tử natri và magie polymetaphosphat.

Các axit hữu cơ tạo ra trong quá trình oxy hoá bởi oxy / kiềm cũng đóng vai trò liên kết với magie. Do đó, dung dịch kiềm sau phản ứng oxy hoá có thể tái sử dụng để chuẩn bị dung dịch phức.

Phức magie có thể được chuẩn bị trước rồi đưa vào huyền phù bột. Chất ức chế cũng có thể được tạo ra ngay trên dây chuyền sản xuất đồng thời với quá trình phản ứng, bằng cách cho vào huyền phù bột xenluloza chất tạo phức, sau đó, thêm các muối, oxit hoặc hydroxit. Trình tự cho thêm chất vào huyền phù bột xenluloza cũng có thể thực hiện ngược lại.

Để tạo phức, các hợp chất magie thường dùng là MgSO_4 , MgO , MgCl_2 , Mg(OH)_2 , MgCO_3 và $\text{Mg(NO}_3)_2$.

Các hợp chất magie được quy đổi thành đơn vị MgO khi tính toán

lượng sử dụng. Hợp chất magie được sử dụng với số lượng $0.01 \div 0.5\%$ so với bột xenluloza khô tuyệt đối.

Quá trình xử lý huyền phù bột xenluloza bằng oxy / kiềm thực hiện theo phương pháp thông thường. Áp suất riêng phần của oxy ít nhất là 0.1 MPa. Khi dùng oxy nguyên chất, cận trên của áp suất là 2 MPa. Khi chất oxy hoá là không khí, cận trên của áp suất là 6 MPa.

Nói chung, áp suất càng cao, tốc độ phản ứng càng lớn. Trong thực tế, quá trình được các tác giả tiến hành với áp suất oxy $0.2 \div 1.2$ MPa.

Nhiệt độ phản ứng được lựa chọn trong khoảng $80 \div 150^{\circ}\text{C}$. Nếu cần giảm độ nhớt của dung dịch xenluloza, quá trình được tiến hành ở khoảng nhiệt độ cao. Khi tẩy trắng xenluloza cho sản xuất giấy, phản ứng được thực hiện ở khoảng nhiệt độ thấp để hạn chế phân huỷ và hoà tan hemixenluloza, thường là $90 \div 100^{\circ}\text{C}$.

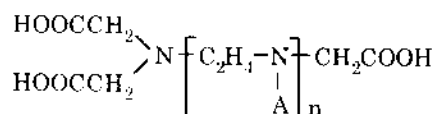
Hàm lượng bột xenluloza trong huyền phù khi tẩy trắng dao động trong khoảng $3 \div 45\%$, tốt nhất là $15 \div 35\%$. Khi hàm lượng bột lớn, ta cần kết hợp khuấy trộn cơ học để khối phản ứng đồng đều hơn.

Lượng kiềm sử dụng phụ thuộc vào lượng lignin (và hemixenluloza) cần tách bỏ. Thông thường, tiêu hao kiềm tính theo NaOH là $0.5 \div 12\%$ so với bột xenluloza. Khi giảm lượng kiềm, tỷ lệ hemixenluloza hoà tan vào dung dịch giảm. Như vậy, ta có thể thay đổi lượng kiềm sử dụng để điều chỉnh lượng lignin và hemixenluloza hoà tan vào dung dịch.

b. Chất tạo phức dạng aminoaxit

Các muối dạng phức của magie với aminoaxit có thể bảo vệ polysaccarit trong quá trình tẩy bằng oxy / kiềm. Bột xenluloza được tẩy trắng bằng oxy hoặc không khí trong môi trường kiềm với sự có mặt của muối magie và tác nhân tạo phức là aminoaxit.

Các aminoaxit có công thức tổng quát sau:



trong đó, A là nhóm CH_2COOH hoặc $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ và $n \leq 5$.

Các axit có công thức cấu tạo như trên là axit etylendiamin-tetraaxetic, axit nitrilotriaxetic. Một số axit khác cũng được sử dụng có hiệu quả, như axit iminodioxetic, axit 2-hydroxyetyliminodioxetic, axit xyclohexandiamintetraaxetic, axit antranil-N,N-dioxetic, axit 2-picolinamin-N,N-dioxetic.

Quá trình tẩy trắng bằng oxy / kiềm đạt hiệu quả cao khi trong công đoạn trước đó là khâu nấu có một số thay đổi.

Hiệu suất xenluloza cao, hàm lượng lignin thấp, độ trắng bột sau tẩy cao, khi độ kiềm trong khâu nấu được duy trì ở mức vừa phải. Điều này đạt được nếu ở giai đoạn đầu của quá trình nấu, lượng kiềm chỉ sử dụng ít hơn 75% tổng lượng kiềm cần thiết. Phần còn lại sẽ được bổ sung dần vào nồi nấu, sao cho pH của dung dịch luôn nằm trong khoảng $9,2 \div 13$, tốt nhất là $9,5 \div 11,5$.

Tổng lượng kiềm sử dụng thay đổi tùy theo loại sản phẩm, nằm trong khoảng $1 \div 10$ mol/kg gỗ khô tuyệt đối.

Để sản xuất bột xenluloza bán thành phẩm, lượng kiềm cần dùng chỉ là $1 \div 2$ mol/kg gỗ khô tuyệt đối.

Đối với xenluloza cho sản xuất giấy thông thường, tiêu hao kiềm thường nằm trong khoảng $2,5 \div 5$ mol/kg gỗ khô.

Để sản xuất xenluloza cho giấy mỏng, giấy thấm hoặc làm nguyên liệu phối hợp với chất dẻo, tiêu hao kiềm cho khâu nấu là $2 \div 6$ mol/kg gỗ khô.

Để giá trị pH ổn định trong các giới hạn đã nói ở trên, ta nên dùng cacbonat kim loại kiềm tốt hơn là hydroxit, vì cacbonat hoặc bicacbonat có khả năng hình thành dung dịch đệm. Tiêu hao chất đệm bicacbonat thường chọn trong khoảng $1 \div 5$ mol/kg gỗ khô tuyệt đối. Các chất đệm cần đưa vào nồi nấu ngay từ đầu hoặc sau một khoảng thời gian nấu nào đó.

11.3.2. Tẩy trắng bảo toàn lignin bằng cách sử dụng peroxit hữu cơ

Tẩy trắng bán thành phẩm xenluloza bằng peroxit hữu cơ được thực hiện theo hai bước hoặc thực hiện trong một giai đoạn xử lý.

Peroxit tạo thành khi cho oxy hoặc không khí tiếp xúc với các chất hữu cơ dễ tạo peroxit, như dioxan, tetrahydrofuran, isopropanol, 2-butanol.

Theo phương pháp hai bước, peroxit được tổng hợp riêng, bằng cách cho dòng không khí hoặc khí chứa oxy đi qua các chất hữu cơ ở nhiệt độ cao (ứng với nhiệt độ sôi của chất hữu cơ), hoặc xử lý trong thiết bị áp lực ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ sôi của chất hữu cơ khoảng 50°C . Áp suất không khí $0.3 \div 5 \text{ MPa}$, tương ứng với áp suất riêng phần của oxy khoảng $0.06 \div 1 \text{ MPa}$ (tốt nhất là áp suất không khí $2 \div 3 \text{ MPa}$, áp suất oxy $0.4 \div 0.6 \text{ MPa}$). Nếu sử dụng oxy nguyên chất thay cho không khí, ta có thể rút ngắn thời gian phản ứng.

Trong quá trình hình thành peroxit, pH của hệ giảm, do phân huỷ peroxit thành axit. Để loại trừ hoặc giảm bớt hiện tượng này, quá trình cần được tiến hành với sự có mặt của chất ổn định, như natri silicat, magie sulfat... Phản ứng giữa peroxit hữu cơ và bột xenluloza diễn ra, ta thu được sản phẩm có độ trắng cao. Thông thường phản ứng oxy hoá được tiến hành ở $40 \div 100^{\circ}\text{C}$, thời gian tẩy $0.5 \div 4$ giờ.

Nếu quá trình tổng hợp peroxit và phản ứng giữa bột xenluloza với peroxit diễn ra đồng thời trong một giai đoạn, việc lựa chọn điều kiện tối ưu cho tẩy trắng cần dựa trên tối ưu về nhiệt độ, áp lực oxy, thời gian phản ứng và pH của môi trường.

Thông thường quá trình được tiến hành như sau:

Cho các chất hữu cơ tạo peroxit vào huyền phù bột xenluloza. Sau đó, sạc nguồn oxy vào huyền phù và đưa hỗn hợp lên nhiệt độ sôi của chất hữu cơ. Hỗn hợp cũng có thể được đun nóng trong thiết bị áp lực ($0.3 \div 5 \text{ MPa}$ cho trường hợp không khí) tới nhiệt độ sôi của chất hữu cơ, hoặc cao hơn 50°C so với nhiệt độ sôi. Thời gian tẩy $5 \div 50$ giờ.

11.3.3. Nấu xenluloza bằng oxy hoặc peroxit trong môi trường kiềm

Quá trình oxy hoá trong môi trường kiềm không chỉ được sử dụng như công đoạn tẩy trắng, tức là xử lý bột xenluloza sau nấu, mà còn được áp dụng để nấu xenluloza, tức là xử lý dăm gỗ để phân rã tổ hợp tế

bào gỗ thành xơ sợi. Sau đây là một số công trình nghiên cứu về nấu xenluloza bằng oxy và peroxit trong môi trường kiềm.

a. Nấu xenluloza bằng oxy - kiềm

Bột xenluloza hiệu suất cao, chất lượng tốt có thể thu được khi xử lý dăm gỗ trong dung dịch kiềm và tiếp đó thực hiện quá trình oxy hoá.

Quá trình xử lý dăm gỗ được thực hiện qua hai giai đoạn. Trong giai đoạn đầu, quá trình nấu được tiến hành ở $140 \div 190^{\circ}\text{C}$, với mức tiêu hao natri hydroxit $10 \div 18\%$ (theo Na_2O) so với dăm gỗ khô. Trong giai đoạn này, chất trích ly và một phần lignin bị phân huỷ và hoà tan vào dung dịch.

Chất lỏng sau giai đoạn phản ứng đầu tiên được tách ra để sử dụng lại. Chất rắn còn lại đi qua khâu nghiền rồi quay lại thiết bị phản ứng để thực hiện quá trình oxy hoá.

Ở giai đoạn hai, mức tiêu thụ NaOH là $5 \div 12\%$. Oxy được sục vào khối bột phân tán trong dung dịch kiềm ở nhiệt độ $90 \div 130^{\circ}\text{C}$. Áp suất riêng phần của oxy trong hệ phản ứng là $0,7 \div 1,4 \text{ MPa}$.

Khi thêm vào khối phản ứng một lượng nhỏ hydroxit kim loại kiềm thổ, như magie hoặc canxi hydroxit (khoảng 1%), ta có thể giảm đáng kể lượng NaOH mà vẫn đạt yêu cầu về chất lượng sản phẩm.

Quá trình hai giai đoạn cũng có thể được thực hiện theo phương án sau:

Trong giai đoạn đầu, dăm gỗ được tẩm dung dịch muối canxi clorua hoặc magie clorua. Sau đó, dăm gỗ đã tẩm được xử lý bằng oxy trong natri hydroxit.

Kết quả tốt đạt được khi tỷ lệ muối dao động trong khoảng $5 \div 20\%$ so với dăm gỗ khô, thời gian tẩm $10 \div 30$ phút, nhiệt độ gia công oxy / kiềm là $150 \div 200^{\circ}\text{C}$ và áp suất oxy $0,7 \div 1,2 \text{ MPa}$.

b. Delignin hoá và tẩy trắng xenluloza bằng peroxit butyl bậc ba trong dung dịch kiềm

Nấu và tẩy được kết hợp trong một giai đoạn xử lý mùn cưa bằng peroxit butyl bậc ba và dung dịch natri hydroxit. Hiệu suất xenluloza trong trường hợp này cao hơn so với nấu sulfat thông thường.

Khác với phương pháp nấu truyền thống, trong khâu xử lý này không xuất hiện các chất màu, vì vậy, không đòi hỏi thêm nhiều bước tẩy trắng bổ sung.

Khi xử lý mùn cưa (kích thước $2.1 \times 2.5 \times 1.6$ mm) bằng peroxit butyl bậc ba / NaOH, lignin bị phân huỷ khá mạnh, trong khi đó polysaccarit ít bị ảnh hưởng.

Giấy tạo ra từ bột xenluloza thu được theo phương pháp kết hợp này có tính năng cơ lý tốt, không thua kém mấy so với giấy từ bột theo công nghệ sulfat thông thường.

Quá trình sản xuất dựa theo phương pháp xử lý này cũng không phát thải chất độc hại. Peroxit chuyển thành rượu butyl bậc ba, cháy cùng với lignin trong khâu thu hồi kiềm, tạo thành nước và cacbon dioxit, không hề có khí CO.

Lượng dùng peroxit butyl bậc ba lựa chọn trong khoảng $2 \div 40\%$ (tốt nhất là $10 \div 35\%$) so với mùn cưa gỗ khô. Tiêu hao kiềm theo tỷ lệ peroxit butyl bậc ba / natri hydroxit = $4/1 \div 1/3$ (tốt nhất là $2/1 \div 1/2$), tỷ lệ L/R = $1/1 \div 3/1$.

Nhiệt độ xử lý có thể nằm trong khoảng $20 \div 150^{\circ}\text{C}$, thời gian $15 \div 120$ phút. Ở khoảng nhiệt độ thấp, tốc độ phản ứng chậm, thời gian phản ứng dài. Do đó, quá trình thường được tiến hành ở $80 \div 110^{\circ}\text{C}$.

Do tác nhân nấu (NaOH) có thể phối hợp với tác nhân tẩy (peroxit...), quá trình nấu - tẩy được gọi là delignin hoá và tẩy trắng.

Nhiều phương án delignin hoá và tẩy trắng khác cũng được các tác giả đề xuất.

Chương 12

CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ ỨNG DỤNG

12.1. VI SINH VẬT VÀ CÁC ENZYM PHÁ HUỖ TẾ BÀO THỰC VẬT

12.1.1. Vi sinh vật phân huỷ các cấu tử của tế bào thực vật

Gỗ cũng như các vật liệu khác chứa lignin - cacbohydrat bị phá huỷ bởi hàng loạt loài nấm và vi khuẩn. Cấu trúc tế bào và thành phần hoá học của gỗ liên quan tới khả năng chống chịu tác động của vi sinh vật.

12.1.1.1. Nấm

Phần lớn nấm có khả năng sản sinh các enzym cần thiết để phá huỷ nguyên liệu thực vật thuộc lớp Nấm túi (Ascomycetes). Nấm đảm (Basidiomycetes).

Nấm cư trú trên gỗ đã chết chủ yếu phân huỷ một hoặc nhiều cấu tử của gỗ, tạo ra ba loại mùn gỗ. Đó là nấm tạo ra mùn mềm (nấm mùn mềm), nấm tạo ra mùn nâu (nấm mùn nâu) và nấm tạo ra mùn trắng (nấm mùn trắng).

Nấm mùn mềm bao gồm *Chaetomium cellulolyticum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* (reesei), *Fusarium oxysporum*, *Thielavia terrestris*, *Penicillium jenthillenium*, *Dactylomyces crustaceus* và nhiều loài thuộc *Paecilomyces*, *Papulaspora*, *Monodictys*, *Allescheria*, *Hypoxylon*, *Xylaria* và *Graphium*.

Tất cả các loài nấm trên đều phá huỷ cacbohydrat, nhưng chỉ làm biến đổi một phần cấu tạo lignin.

Đặc trưng riêng có của nấm mùn mềm là tạo ra hệ thống rãnh hình nón kép và hình trụ trong lớp thứ cấp của thành tế bào. Dạng phá huỷ khác thường này ở phân lớp S_2 là đặc trưng của nấm mùn mềm.

Các nhà khoa học nhận thấy có hai dạng tấn công của nấm mùn mềm. Một dạng hình thành các rãnh trong lớp thứ cấp của tế bào, loại khác là ăn mòn toàn bộ lớp thứ cấp, phát triển từ sợi nấm trong khoang (ruột) tế bào hướng ra lớp liên kết giữa các tế bào. Tốc độ và mức độ phá huỷ phụ thuộc vào loại gỗ. Nói chung, gỗ cứng bị phá huỷ mạnh hơn gỗ mềm.

Các nhà nghiên cứu nhận thấy nấm mùn mềm cũng tấn công phá huỷ một phần lignin. Song, chủ yếu các loài nấm này chỉ có tác dụng demetyl hoá lignin. Quá trình phân huỷ phần mạch propan và nhân thơm của lignin diễn ra ở mức độ thấp.

Nấm mùn nâu bao gồm *Poria placenta*, *Tyromyces balsemeus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Lentinus lepidius*, *Lenzites trabeum*, *Coniophora puteana*, *Laetiporus sulphureus* và *Fomitopsis pinicola*.

Các loài nấm mùn nâu thích tấn công phân huỷ hemixenluloza và xenluloza; lignin bị phân huỷ ở mức độ thấp. Các loài nấm này phân huỷ mạnh xenluloza ngay từ đầu. Các sợi nấm mùn nâu thường cư trú trong khoang (ruột) tế bào, chúng tấn công sang các tế bào bên cạnh qua các lỗ của tế bào hoặc qua các rãnh vừa được hình thành do phân huỷ thành tế bào gỗ.

Trong quá trình phân rã gỗ, lúc đầu nấm mùn nâu tách các chất liệu khỏi phân lớp S_2 của thành tế bào, trong khi phân lớp S_3 hoàn toàn không thay đổi, mặc dù sợi nấm tiếp xúc trực tiếp với phân lớp S_3 . Phân lớp S_1 cũng có thể bị tấn công, còn lớp sơ cấp và lớp liên kết giữa các tế bào (lớp giữa - middle lamella) khá bền vững vì có hàm lượng lignin cao.

Trong một thời gian dài, các nhà nghiên cứu không phát hiện thấy nấm mùn nâu tham gia vào quá trình phân huỷ lignin. Về sau, có nhiều công trình cho thấy nấm mùn nâu cũng phá huỷ một phần lignin trong gỗ. Phản ứng demetoxyl hoá lignin hoặc chất mô phỏng lignin dưới tác dụng của *G. trabeum* đã được một số tác giả nghiên cứu và công bố. Loài nấm này cũng phá huỷ nhóm $^{14}\text{CH}_3\text{O}$ trong hợp chất mô phỏng dime của lignin khi có mặt gỗ giác cây vân sam (*Picea*). Quá

trình diễn ra tương đối nhanh so với nấm mùn trắng *Phanerochaete chrysosporium*.

Nấm mùn nâu chủ yếu phân huỷ cacbohydrat của gỗ. Nhưng theo Nilsson và Highley, phần lớn các loài nấm này không phân giải xenluloza tinh khiết, đặc biệt khi ngâm trong chất lỏng nuôi cấy.

Xơ dầy chứa lignin cũng dễ bị phân huỷ bởi nấm mùn nâu. Trong khi đó, các xơ dầy bị delignin hoá không bị phá huỷ dưới tác dụng của nấm này. Hơn nữa, một số tác giả cũng nhận thấy qua thực nghiệm rằng xơ bông bị phân huỷ khi bông tiếp xúc với gỗ đã nhiễm nấm.

Dường như sự phân huỷ xenluloza dưới tác dụng của nấm mùn nâu được xúc tiến khi có mặt lignin hoặc chất tương tự lignin. Hiện tượng này xảy ra không phụ thuộc vào việc tách bỏ trước đó hoặc đồng thời loại bỏ hemixenluloza. Tuy vậy, cũng chưa có kết luận cuối cùng rằng lignin tạo điều kiện thuận lợi để nấm mùn nâu phân giải xenluloza.

Nienmaa nhận thấy gỗ giác của cây vân sam kích thích nấm mùn nâu tham gia vào quá trình demetyl hoá lignin đánh dấu. Tác giả đưa ra giả thuyết cho rằng gỗ có ảnh hưởng nhất định, tạo điều kiện cho nấm mùn nâu phân huỷ xenluloza hoặc lignin. Tuy nhiên, các nhà khoa học cần tiến hành nghiên cứu một cách hệ thống để rút ra kết luận cuối cùng.

Nấm mùn nâu khác cơ bản so với nấm mùn trắng về khả năng tạo ra các enzym phân huỷ xenluloza và phương thức phân huỷ xenluloza. Theo Highley, các hệ chất oxy hoá có tác dụng giải trùng hợp xenluloza trong giai đoạn đầu của quá trình phân huỷ.

Thực tế, các enzym có kích thước lớn hơn đa số các mao quản của gỗ, nên khó xâm nhập vào gỗ. Do đó, một số tác giả cho rằng có thể các gốc tự do bắt nguồn từ oxy tham gia vào giai đoạn đầu của quá trình tấn công phân huỷ xenluloza, tạo điều kiện để enzym xâm nhập vào thành tế bào gỗ. Tuy vậy, giả thuyết này cũng chưa được nghiên cứu thật đầy đủ và hệ thống.

Nấm mùn trắng là các loại nấm duy nhất có thể tấn công tất cả các cấu tử của thành tế bào gỗ (hình 12.1).

Các loài nấm được nghiên cứu nhiều nhất thuộc nhóm này là *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata*, *Heterobasidium annosum*, *Phellinus pini*, *Cyathus stercoreus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Polyporus anceps* và *Ustulina vulgaris*.

Đa số nấm trên đây thuộc lớp Nấm đảm (Basidiomycetes), trừ *Ustulina vulgaris* thuộc lớp Nấm túi (Ascomycetes).

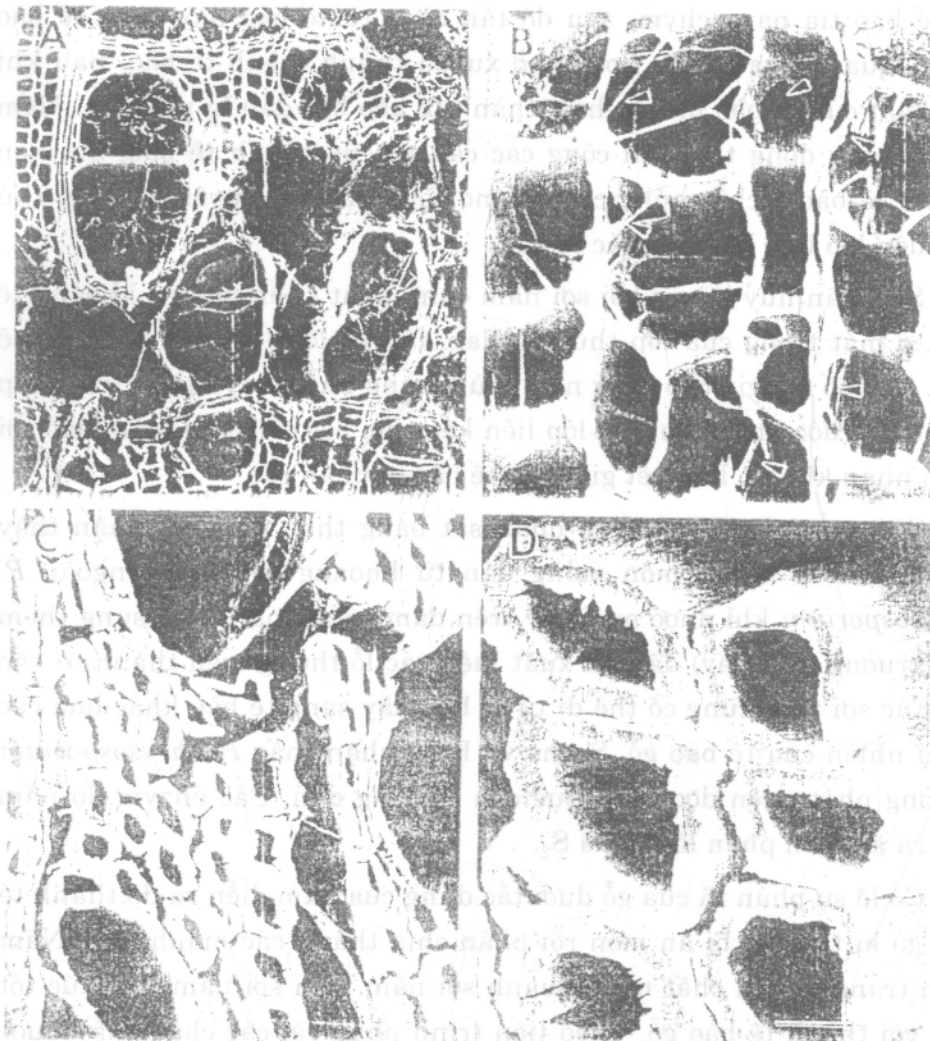
Thông thường, khi phân huỷ gỗ, các loài nấm này đồng thời tấn công cả lignin và polysaccarit. Nấm mùn trắng có khả năng tách lignin khá hiệu quả. Nhờ thế, nhóm nấm này được sử dụng trong công nghiệp xenluloza - giấy.

Một số nấm mùn trắng như *P. chrysosporium* và *T. versicolor* không phá huỷ chọn lọc mà đồng thời tác động lên tất cả các cấu tử của gỗ như hemixenluloza, xenluloza và lignin. Trong khi đó, một số loài nấm khác như *Phlebia tremellosa*, *C. subvermispora* và *P. pini* chủ yếu phân huỷ lignin.

Các nhà sinh học cũng nhận thấy có những loài nấm phân huỷ chọn lọc hoặc không chọn lọc là tùy thuộc vào việc chúng tấn công vào vùng nào của mẫu gỗ.

Một số loài như *P. chrysosporium* và *C. subvermispora* phân huỷ các cấu tử của thành tế bào gỗ theo phương thức khác nhau, mức độ khác nhau. Nguyên nhân dẫn tới hiện tượng phân huỷ chọn lọc lignin hoặc cả lignin và cacbohydrat chưa được làm sáng tỏ.

Dill và Kraepelin cho rằng yếu tố bên ngoài như hàm lượng nitơ trong gỗ có thể ảnh hưởng tới chiều hướng phân huỷ của các loài nấm này. Nấm mùn trắng cũng có phương thức sản sinh khác nhau đối với enzym ngoại bào phá huỷ lignin. Đây cũng là dấu hiệu ảnh hưởng đến phương thức phân huỷ lignin.



Hình 12.1. Sự phân hủy gỗ dưới tác dụng của nấm mùn trắng:

A và B: phân hủy ít chọn lọc, phần lớn cấu trúc tế bào bị phá hủy.

C và D: tác nhân sinh học chủ yếu tấn công vào lignin; bộ khung của tế bào ít bị ảnh hưởng.

Nấm mùn trắng phát triển trong tất cả các loại tế bào gỗ cứng cũng như gỗ mềm. Sợi nấm xâm nhập vào các khoang tế bào, trước hết

là tế bào tia parenchym, sau đó tấn công từ tế bào này sang tế bào khác, qua lỗ của tế bào hoặc nhờ xuyên thủng thành tế bào. Sau khi các chất của tế bào bị tiêu hoá, thành tế bào bắt đầu bị phân rã. Nấm mùn trắng đồng thời tấn công các cấu tử của thành tế bào, ăn mòn thành tế bào ở chỗ chúng cư trú, mở rộng dần ra, xuyên qua lớp thứ cấp đến lớp liên kết giữa các tế bào.

Sự phân huỷ lignin bởi sợi nấm cũng phát triển dần từ khoang tế bào, ở mặt trong của lớp thứ cấp, lan dần ra lớp liên kết giữa các tế bào. Một số tác giả cho rằng nấm mùn trắng phân huỷ lignin trong lớp thứ cấp trước khi phân huỷ lớp liên kết giữa các tế bào. Các tế bào rời khỏi nhau khi lớp liên kết giữa các tế bào bị phân rã.

Wilcox và Eriksson, qua quan sát bằng thực nghiệm, nhận thấy thành tế bào bị ăn mòn mỏng dần từ khoang tế bào ra ngoài. *P. chrysosporium* khi được nuôi cấy trên dăm gỗ dương (có bổ sung thêm môi trường nuôi cấy) đã làm xuất hiện các lỗ thủng trên thành tế bào gỗ. Các sợi nấm cũng có thể di từ tế bào này sang tế bào khác qua các lỗ tự nhiên của tế bào gỗ. Sachs và Ruel nhận thấy *P. chrysosporium* thường phát triển dọc theo trục của các ống dẫn. Các enzym do nấm tiết ra ăn mòn phân lớp S_3 và S_2 .

Có lẽ sự phân rã của gỗ dưới tác dụng của nấm diễn ra do thành tế bào gỗ bị trương, bị ăn mòn rồi phân chia thành các mảnh nhỏ. Nấm mùn trắng tiết ra chất nhầy quanh sợi nấm, làm sợi nấm tiếp xúc tốt hơn với thành tế bào gỗ. Theo tiến trình phân rã, các chất nhầy được tạo ra, làm trương thành tế bào vừa bị delignin hoá. Sự tiếp xúc giữa sợi nấm và các cấu tử của gỗ nhờ thế cũng thuận lợi hơn. Một số giả thuyết đã được đưa ra để giải thích vai trò bao bọc của lớp nhầy do nấm tiết ra. Joseleau và Ruel cho rằng enzym lignin peroxidaza và mangan peroxidaza có liên quan tới chất nhầy tạo ra trong quá trình phân huỷ gỗ. Tuy vậy, cần có nhiều công trình nghiên cứu kỹ mĩ hơn về vai trò của chất nhầy do nấm tạo ra để hiểu thêm cơ chế phá huỷ gỗ dưới tác dụng của nấm.

Akin và đồng tác giả, 1995, đã nghiên cứu sự thay đổi về cấu trúc và biến đổi hoá học diễn ra ở thành tế bào cỏ *Cynodon dactylon* gây nên bởi nấm mùn trắng *C. stercoreus* và *C. subvermispora*. Cả hai loài nấm này xâm nhập mạnh vào vết cắt ở thân cây, phá vỡ tế bào parenchym và một phần tế bào mô cứng. Phổ UV cho thấy axit phenolic liên kết dạng este đã thoát ra từ tế bào parenchym. Các tế bào này dễ dàng bị phá huỷ dưới tác động của hai loài nấm trên. Song các hợp chất thơm chỉ được giải phóng một phần từ tế bào mô cứng.

Ngoài nấm hảo khí, nấm kỵ khí cư trú trong đường tiêu hoá của động vật ăn cỏ cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ thành tế bào thực vật. Nấm kỵ khí phân huỷ tốt polysaccarit, nhưng phần lớn chúng không phân huỷ lignin. Chỉ có một số loài nấm kỵ khí trong dạ dày loài ăn cỏ có khả năng chuyển hoá và hoà tan một phần nhỏ hợp chất phenol. Các loài nấm này có mặt trên các chất liệu thân cỏ và vỏ đậu tương. Nấm kỵ khí cũng cư trú ở một số bộ phận của cây cọ.

Trong số các nấm kỵ khí, các loài được nghiên cứu nhiều là *Neocallimastix frontalis*, *N. Patriciarum*, *Piromyces* (*Piromonas*) *communis* và *Caecomyces* (*Sphaeromonas*) *communis*.

Các nghiên cứu dựa trên phương pháp hiển vi điện tử đã chỉ ra rằng các loài nấm trong dạ cỏ chủ yếu bám vào các phần đặc biệt của mảnh thực vật, như phần có lỗ hổng hoặc vết cắt. Nấm sợi dễ dàng xâm nhập vào khoang (ruột) tế bào thực vật và lớp liên kết giữa các tế bào. Các sợi nấm phát triển rất nhanh, toả nhánh vào khắp thành tế bào thực vật, gây nên sự biến dạng và phân rã thành tế bào.

Khả năng của nấm kỵ khí phân rã mô thực vật liên quan tới hàng loạt enzym do chúng tạo ra, như xenulaza, hemixenulaza, proteaza, amylaza, phenolic axit esteraza và pectinaza.

12.1.1.2. Vi khuẩn

Nói chung vi khuẩn phân huỷ gỗ chậm hơn nấm. Sự phân rã diễn ra trên bề mặt gỗ có độ ẩm cao.

Do khó lọt qua mao quản của gỗ, vi khuẩn thường tấn công vào tế bào gỗ đồng thời với nấm. Chúng xâm nhập vào tế bào parenchym của gỗ lá kim và gỗ lá rộng. Lúc đầu vi khuẩn tiêu hoá các chất trong tế bào, sau đó tấn công thành tế bào.

Mặc dù các vi khuẩn có thể trực tiếp tấn công vào sợi gỗ, ống dẫn..., nhưng chỉ có một số loài vi khuẩn có thể phân huỷ được tất cả các cấu tử của thành tế bào. Một số công trình nghiên cứu đã đưa ra các kết quả về ăn mòn tế bào, tạo thành đường hầm và phân rã lignin. Nhiều tác giả cũng đã nghiên cứu về các hiện tượng phân huỷ thành tế bào trong điều kiện thí nghiệm và điều kiện tự nhiên. Holt, Schmidt và các đồng tác giả cho rằng vi khuẩn không có khả năng phân huỷ thành tế bào thực vật lignin hoá: chúng chỉ làm được điều đó khi xơ sợi được xử lý trước bằng hoá chất. Gỗ sau khi xử lý bằng thể đột biến phi xenulaza của *P. chrysosporium* và *Phlebia gigantea* cũng bị phân huỷ mạnh dưới tác dụng của vi khuẩn.

Các vi khuẩn trong dạ dày loài ăn cỏ chủ yếu phá huỷ thực vật bằng cách sản sinh ra enzym để phân huỷ cấu tử của thành tế bào.

Các loài vi khuẩn trong dạ cỏ được nghiên cứu nhiều là *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* và *R. flavifaciens*. Các loài vi khuẩn này có khả năng bám vào xơ sợi và sản sinh ra hàng loạt enzym phân huỷ polysaccarit. Chúng bám dính rất chặt vào các tế bào thực vật đã bị phân rã một phần. Nhưng quá trình phân huỷ các chất của thành tế bào chỉ xảy ra khi có sự tiếp xúc trực tiếp giữa vi khuẩn và các cấu tử của gỗ.

Một số xạ khuẩn (actinomycetes) cũng phân huỷ mạnh các thực vật chứa lignin - cacbohydrat.

Nhiều loài vi khuẩn thuộc *Streptomyces* xâm nhập vào các ống dẫn, sợi gỗ và tế bào parenchym. *S. flavovirens* xâm nhập vào tế bào parenchym cũng như một số loại tế bào thành dày của gỗ. Tiếp đó, quá trình diễn ra rất nhanh, tế bào parenchym bị phân huỷ hoàn toàn: tế bào mô cứng cũng bị ăn mòn một phần.

Một số loài *Streptomyces* có khả năng tách và phân huỷ lignin từ gỗ lá kim, gỗ lá rộng và thực vật thân thảo. Loài vi khuẩn *Streptomyces viridosporus* có khả năng oxy hoá - depolyme hoá lignin và phân huỷ hemixenluloza cũng như xenluloza của thực vật.

12.1.2. Enzym phân huỷ các cấu tử của tế bào thực vật

Gỗ cũng như các thực vật khác là tổ hợp phức tạp về cấu trúc cũng như thành phần hoá học. Do đó, sự phân rã gỗ dưới tác dụng của enzym cũng diễn ra rất phức tạp.

Đối với xenluloza, quá trình phân huỷ diễn ra dưới tác dụng phối hợp của ít nhất ba loại enzym chủ yếu. Ngoài ra, các enzym oxidaza và phosphorylaza cũng tham gia vào một số quá trình sinh học. Các enzym có tác dụng phân giải xenluloza tự nhiên là:

- Endoglucanaza (endo-1,4- β -D-glucan-4-glucanohydrolaza).

Loại enzym này phân huỷ liên kết 1,4- β -glycozit

- Exoglucanaza-xenlobiohydrolaza (exo-1,4- β -D-glucan-4-xenlobiohydrolaza).

Loại enzym này giải phóng ra xenlobioza và trong một số trường hợp giải phóng cả D-glucosa.

- 1,4- β -glucosidaza

Các enzym này thuỷ phân xenlobioza và các xenlodextrin khác có khả năng tan trong nước, tạo thành D-glucosa.

Hai loại enzym oxy hoá là xenlobioza oxidaza (CBO) - hiện nay gọi là xenlobioza dehydrogenaza (CDH) - và xenlobioza: quinon oxidoreductaza (CBQ).

CBQ oxy hoá nhóm khử trong xenlobioza hoặc trong xenlodextrin có độ trùng hợp lớn hơn khi có mặt chất nhận điện tử thích hợp. Các enzym này được phát hiện trong nhiều loại nấm phá huỷ gỗ. Chúng có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân giải xenluloza.

Ngoài ra, enzym lactonaza cũng hoạt động phối hợp với enzym xenlulaza trong quá trình phân huỷ xenluloza.

Một số vi khuẩn hiếu khí hoặc kỵ khí không sản sinh β -glucosidaza mà tạo ra xenlobioza phosphorylaza. Enzym này có tác dụng phân huỷ xenlobioza nhưng không phân giải được xenlotrioza hoặc các xenlodextrin có độ trùng hợp cao hơn.

Đối với hemixenluloza, do cấu tạo phức tạp nên cần có nhiều loại enzym khác nhau để phân huỷ hoàn toàn hemixenluloza. Hai loại enzym chủ yếu có tác dụng depolyme hoá mạnh hemixenluloza là endo-1,4- β -D-xylanaza và endo-1,4- β -D-mannanaza. Các oligosaccarit bị thuỷ phân bởi 1,4- β -D-xylosidaza, 1,4- β -D-mannosidaza và 1,4- β -D-glucosidaza. Trong khi đó, các mạch nhánh bị phân huỷ dưới tác dụng của α -L-arabinosidaza, α -D-glucuronidaza và α -D-galactosidaza. Các nhóm liên kết este trong hemixenluloza được tách ra dưới tác dụng của axetylxyylan esteraza.

Đối với lignin, quá trình phân huỷ dưới tác dụng của nấm mốc trắng mang đặc trưng oxy hoá. Vai trò của phenol oxidaza trong quá trình phân huỷ lignin đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Các nhà khoa học nhận thấy có ít nhất ba loại enzym phenol oxidaza đóng vai trò quan trọng trong hệ thống enzym phân huỷ lignin. Đó là laccaza, lignin peroxidaza (LiP) và peroxidaza dựa vào hoạt động của mangan (MnP).

Hai peroxidaza oxy hoá cơ chất theo hai bước liên tục oxy hoá chuyển một điện tử, với sự hình thành ion - gốc tự do trung gian. LiP có thể oxy hoá khử rất cao, có thể tấn công vào đơn vị mất xích phi phenolic của lignin. Trong khi đó, MnP chỉ tấn công vào đơn vị mất xích dạng phenolic (có OH phenol tự do) của lignin bằng cách sử dụng cặp oxy hoá khử Mn^{3+}/Mn^{2+} .

Laccaza, một phenol oxidaza, có khả năng hoạt động trên một số cơ chất. Enzym này oxy hoá phenol và các đơn vị phenolic của lignin qua sự hình thành gốc tự do. Enzym này cũng gây ra phản ứng trùng hợp và giải trùng hợp qua con đường tạo thành gốc tự do phenoxy (tham khảo thêm chương 8). Song, laccaza có thể oxy hoá khử quá thấp,

không thể oxy hoá các đơn vị lignin ở dạng phenol thế (cấu trúc không phenolic).

Các enzym khác có khả năng phân huỷ lignin là enzym phát sinh H_2O_2 . Các enzym này là glucoza-1-oxidaza và glucoza-2-oxidaza. Các oxidaza khác phát sinh H_2O_2 cũng được tìm thấy ở *P. chrysosporium*, đó là metanol oxidaza và glyoxal oxidaza. Hoạt động oxy hoá của metanol oxidaza tạo ra formaldehyt. Glyoxal oxidaza sử dụng một số hợp chất aldehyt và hydroxycarbonyl. Các hợp chất này có trong chất lọc nuôi cấy nấm, là kết quả của quá trình trao đổi chất thứ cấp.

Ngoài ra, các enzym có khả năng khử gốc tự do phenoxyl cũng tham gia vào quá trình phân huỷ lignin. Các enzym đó là CDH, CBQ và NAD(P)H: quinon oxido reductaza. Một số enzym có khả năng giải phóng các chất thơm (nhóm feruloyl và *p*-coumaroyl) từ thành tế bào thực vật thân thảo. Đó là enzym feruloyl và *p*-coumaroyl esteraza. Một loại esteraza có tác dụng phân huỷ nhóm *p*-coumaroyl từ tổ hợp chất liệu thực vật đã được xác định là xuất phát từ *Streptomyces viridosporus*. Trong khi đó, feruloyl esteraza được phát hiện khi nuôi cấy *Schizophyllum commune*, *F. succinogenes* và *Butyrivibrio fibrisolvens*. Cả feruloyl và *p*-coumaroyl esteraza đều được tạo ra từ nấm kỵ khí. Sự tấn công và xâm nhập của các nấm kỵ khí vào tế bào thực vật lignin hoá chứng tỏ enzym phenolic axit esteraza đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ tế bào thực vật.

Việc ứng dụng các enzym này phối hợp với enzym phân huỷ hemixenluloza là hướng ứng dụng quan trọng trong công nghệ sản xuất chất thơm và saccarit từ nguyên liệu thực vật.

12.2. PHÂN HUỖ XENLULOZA

12.2.1. Các vi sinh vật sản sinh enzym phân huỷ xenluloza

Nhiều loài vi sinh vật có khả năng sản sinh enzym phân huỷ xenluloza. Đó là các loài nấm mùn mềm, nấm mùn nâu, nấm mùn trắng, nấm kỵ khí trong dạ dày loài ăn cỏ, vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn kỵ khí, vi khuẩn trong dạ cỏ... (bảng 12.1).

Bảng 12.1. Các vi sinh vật có khả năng phân huỷ xenluloza

Nấm mốc mềm <i>Aspergillus niger</i> <i>Chaetomium cellulolyticum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Neurospora crassa</i> <i>Penicillium pinophilum</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Vi khuẩn hiếu khí <i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Cellvibrio gilvus</i> <i>Microbispora bispora</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Nấm mốc nâu <i>Coniophora puteana</i> <i>Lanzites trabeum</i> <i>Poria placenta</i> <i>Tyromyces palustris</i>	Vi khuẩn kỵ khí <i>Acetovibrio cellulolyticus</i> <i>Clostridium cellulovorans</i> <i>Clostridium thermocellum</i>
Nấm mốc trắng <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Sporotrichum thermophile</i> <i>Coriolus versicolor</i>	Vi khuẩn ở dạ cỏ <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Fibrobacter succinogenes</i> <i>Ruminococcus albus</i>
Nấm kỵ khí ở dạ cỏ <i>Caecomycetes (Sphaeromonas) communis</i> <i>Neocallimastix frontalis</i> <i>Neocallimastix patriciarum</i> <i>Piromyces communis</i>	Xạ khuẩn <i>Streptomyces lividans</i> <i>Thermoactinomyces curvata</i> <i>Thermomonospora fusca</i>

Song chỉ có một số ít vi sinh vật có khả năng sản sinh tất cả các loại enzym cần thiết để phân giải xenluloza ở dạng tinh thể. Các vi sinh vật có khả năng phân huỷ xenluloza dạng tinh thể ít nhiều đều tiết ra các hệ enzym phức tạp, có khả năng phân huỷ xenluloza theo phương thức khác nhau như thủy phân, oxy hoá.

Nấm là nhóm được nghiên cứu nhiều nhất trong lĩnh vực phân huỷ xenluloza. Các enzym xenlulaza sản sinh từ nấm đôi khi được tạo ra với nồng độ rất cao và dường như không có các dạng vật lý phức tạp như enzym xenlulaza bắt nguồn từ vi khuẩn. Tuy vậy, enzym xenlulaza

từ nấm có tác dụng phân huỷ rất mạnh xenluloza.

Các loài nấm tạo ra mùn mềm chủ yếu phân huỷ polysaccarit. Trong nhóm nấm này, khả năng sản sinh các enzym phân huỷ xenluloza cũng khác nhau.

Loài nấm có khả năng sản sinh hàng loạt enzym phân huỷ xenluloza và được nghiên cứu kỹ là *T. viride* (*reesei*).

Các loài thuộc *Trichoderma* tiết ra một lượng lớn các enzym khác nhau, có khả năng phối hợp để phân huỷ tinh thể xenluloza.

T. reesei sản sinh ít nhất ba enzym endoglucanaza, hai exoglucanaza và một hoặc hai enzym β -glucosidaza. Nhiều loại nấm mùn mềm khác cũng đã được nghiên cứu.

Nấm mùn nâu phân huỷ xenluloza rất nhanh. Hệ thống enzym này hoạt động khác với hệ thống enzym của nấm mùn mềm *T. viride* (*reesei*) và nấm mùn trắng *P. chrysosporium*.

P. placenta, *L. trabeum* và *Tyromyces palustris* là các loài nấm mùn nâu được nghiên cứu nhiều nhất về khả năng phân huỷ xenluloza.

Theo các tác giả, nấm mùn nâu hoạt động theo cơ chế khác với nấm mùn mềm và nấm mùn trắng. Các nấm mùn nâu giải trùng hợp xenluloza khá nhanh trong giai đoạn đầu của quá trình phá huỷ gỗ. Trong khi đó, nấm mùn trắng depolyme hoá xenluloza chậm, đồng thời sử dụng các sản phẩm của quá trình phân huỷ.

Theo một số tác giả, nấm mùn nâu tạo ra các enzym endoglucanaza và β -glucosidaza, nhưng hầu như không sản sinh ra exoglucanaza. Tuy nhiên, vấn đề sản sinh exoglucanaza đang tiếp tục được tranh luận.

Cơ chế cảm ứng hoặc ức chế ở nấm mùn nâu và nấm mùn trắng cũng có sự khác biệt. Nấm mùn nâu sản sinh ra lượng lớn xenlulaza, lấy glucoza làm nguồn cung cấp cacbon. Trong khi đó, nấm mùn trắng (như *P. chrysosporium*) sản sinh enzym dựa trên xenluloza, quá trình bị ức chế khi có mặt glucoza, dù hàm lượng nhỏ.

Có lẽ vì thiếu exoglucanaza nên ở nấm mùn nâu không có sự phối hợp hoạt động xúc tiến giữa endoglucanaza và exoglucanaza để phân huỷ tinh thể xenluloza.

Cơ chế phân huỷ xenluloza dưới tác dụng của nấm mùn nâu vẫn chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn. Một giả thuyết cho rằng trong quá trình sinh hoá này có sự tham gia của H_2O_2 và Fe^{2+} trong giai đoạn đầu, trước khi enzym tấn công phân huỷ xenluloza.

Enoki và đồng tác giả nhận thấy nấm mùn nâu tiết ra glycoprotein phân tử lượng thấp, các chất này có thể tạo phức càng cua (phức chelate) với ion Fe^{2+} . Trên cơ sở đó, các tác giả cho rằng phức này có kích thước đủ nhỏ để lọt vào các phân lớp S_2 và S_3 của thành tế bào thực vật, làm xúc tác để oxy phân tử oxy hoá các chất cho điện tử, tạo thành $O_2^{\bullet}$ và H_2O_2 . Theo giả thuyết này, tất cả các chất phản ứng cần thiết để phân huỷ thành tế bào thực vật cần đồng thời xuất hiện trong phân lớp S_2 .

Backa và đồng tác giả nhận thấy có sự phát sinh gốc tự do hydroxyl trong môi trường nuôi cấy nấm mùn nâu hoặc trong gỗ. Các quan sát của họ chứng tỏ gốc tự do $HO^{\bullet}$ tham gia một cách mạnh mẽ vào quá trình phân huỷ gỗ ở giai đoạn đầu. Gốc tự do hydroxyl là một trong số ít tác nhân có thể làm phân rã cấu trúc tinh thể của xenluloza.

Một số tác nhân phi enzym khác như sideropho, axit oxalic cũng tham gia vào quá trình phân rã gỗ, nhưng cơ chế phối hợp với enzym chưa được làm sáng tỏ.

Nấm mùn nâu tạo ra lớp vỏ bao quanh, có lẽ để bảo đảm bề mặt hoạt động giữa sợi nấm và gỗ. Quá trình phân huỷ gỗ diễn ra ở khoảng cách nào đó so với sợi nấm.

Vỏ bọc của sợi nấm mùn nâu có chức năng sau:

- Biến đổi môi trường ion và pH phía ngoài tế bào nấm;
- Nhận dạng và bám dính vào cơ chất;

- Làm tăng nồng độ, tàng trữ và vận chuyển các tác nhân phân huỷ:

- Bảo vệ cho hệ chống lại quá trình dehydrat hoá và tác động khác của môi trường:

- Điều chỉnh cơ chất tiến tới phân huỷ:

- Tàng trữ chất dinh dưỡng:

- Điều tiết quá trình phân huỷ:

- Tăng diện tích bề mặt thông khí:

- Vận chuyển và bố trí enzym phân huỷ gỗ trong suốt quá trình hoạt động.

Theo một số tác giả, dưới tác dụng của nấm mùn nâu, hemixenluloza là cấu tử bị phân huỷ đầu tiên.

Nhóm nấm phá huỷ gỗ và tạo ra mùn trắng (nấm mùn trắng) thường không đồng nhất. Nhưng nói chung, chúng có khả năng phân huỷ lignin và các cấu tử trong tổ hợp lignin - cacbohydrat.

Loài nấm mùn trắng được nghiên cứu nhiều nhất lần đầu tiên phát hiện trong dăm gỗ và được đặt tên là *Chrysosporium lignorum*. Về sau, tên này chuyển thành *Sporotrichum pulverulentum* và tiếp đó là *Phanerochaete chrysosporium*.

Loài nấm này phát triển tốt nhất ở $38 \div 39^{\circ}\text{C}$.

Khi nuôi cấy *P. chrysosporium*, có thể xuất hiện ít nhất năm enzym endoglucanaza, ba exoglucanaza và hai enzym β -glucosidaza.

Nấm kỵ khí có trong dạ cỏ tiết ra các xenlulaza. Đó là tổ hợp các enzym cùng tác động lên thực vật, làm xenluloza hoà tan.

Một hệ enzym ngoại bào từ *Neocallimastix frontalis* có hoạt tính riêng cao hơn nhiều lần so với thể đột biến của *T. reesei* về khả năng hoà tan xơ bông, tính theo đơn vị hoạt tính endo- β -glucanaza. Sản phẩm cuối cùng chủ yếu của các xenlulaza từ *N. frontalis* là glucoza, không phải là xenlobioza. Điều đó chứng tỏ enzym này có hoạt tính β -glucosidaza cao.

Wilson và Wood đã chỉ ra rằng một cấu tử khác (4% tổng protein ngoại bào) của enzym phân huỷ xenluloza nguồn gốc *N. frontalis* có trong cấu trúc giống như xenlulosom được tiết ra và hấp phụ trên xenluloza. Về phương diện này, *N. frontalis* giống với vi khuẩn *Clostridium thermocellum*. Tuy vậy, xenlulosom của *N. frontalis* có khối lượng khoảng 700 kDa, nhỏ hơn nhiều so với xenlulosom từ *C. thermocellum* (2×10^6 kDa). Ngoài ra, giữa hai loại xenlulosom này còn có nhiều nét khác biệt.

Wood và Wilson, 1995, nhận thấy *Piromyces communis*, một loài nấm kỵ khí khác trong dạ cỏ có khả năng sản sinh một hệ xenlulaza hoạt tính cao. Loại enzym này có thể làm hoà tan sợi bông dưới dạng kết tinh cao, với tốc độ lớn hơn so với bất kỳ xenlulaza vô bào nào khác.

Xenluloza bị phân rã dưới tác dụng của vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí. Song khả năng phân huỷ xenluloza của vi khuẩn đều không so sánh được với nấm.

Vi khuẩn thường tạo ra xenlulaza với hàm lượng nhỏ (thấp hơn 0,1g/l). Sự phân huỷ xenluloza xảy ra dưới tác động của các tổ hợp đa enzym. Tổ hợp này rất khó phân nhỏ mà không tổn hao về hoạt tính chung hoặc riêng đối với từng cấu tử riêng lẻ.

Vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất là các loài thuộc *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* và *Pseudomonas*.

Tổ hợp các enzym xenlulaza của *C. thermocellum* bao gồm một số endoglucanaza, một exoglucanaza, một xenlobioza phosphorylaza, một xenlodextrin phosphorylaza và hai β -glucosidaza.

Các vi khuẩn khác có khả năng tạo ra các enzym tương tự *C. thermocellum* là *Acetovibro cellulolyticus*, *Bacterioides cellulosolvens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellobioparum*, *C. papyrosolven*, *Fibriobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Thermomonospora curvata* và một loài *Cellulomonas*. Các hệ enzym xenlulaza của *Pseudomonas fluorescens* và *Cellvibrio gilvus* cũng tương tự như các loài trên. Sản phẩm phân huỷ xenluloza dưới tác dụng của các enzym này chủ yếu là xenlobioza và xenlotrioza.

Sinh vật hình tia chưa có nhân điển hình như xạ khuẩn cũng là thành viên quan trọng của cộng đồng vi khuẩn chịu trách nhiệm phân huỷ xenluloza.

Các loài ưa nhiệt trung bình *Streptomyces* và loài ưa nhiệt *Thermomonospora* hoặc *Thermoactinomyces* là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất trong số các vi sinh vật thuộc nhóm này. Các xenlulaza ngoại bào của chúng phá huỷ xenluloza theo cơ chế tương tự với nấm, ví dụ, các enzym không gắn kết được tiết vào môi trường nuôi cấy.

12.2.2. Các enzym phân huỷ xenluloza

12.2.2.1. Sự điều tiết quá trình sản sinh xenlulaza

Quá trình sản sinh enzym xenlulaza có lẽ được kiểm soát theo cơ chế cảm ứng và ức chế.

Trong đa số vi sinh vật, quá trình sinh tổng hợp xenlulaza được xúc tiến nhờ sản phẩm phân huỷ của xenluloza. Về phương diện này, các endoglucanaza được nghiên cứu nhiều nhất.

Một số nhà khoa học nhận thấy *P. chrysosporium* và *G. trabeum* tạo ra endoglucanaza trong môi trường chỉ chứa cacboxymetylxenluloza. Hiện tượng này không xảy ra đối với *T. reesei*.

Xenlobioza là chất cảm ứng cho endoglucanaza trong cả hai trường hợp *P. chrysosporium* và *G. trabeum* nhưng không ảnh hưởng tới hoạt tính của endoglucanaza ở *T. reesei*.

Xenlobioza chỉ gây cảm ứng cho xenlulaza trong trường hợp *T. reesei* khi quá trình thủy phân xenlobioza giảm đi bằng cách thêmnojirimixin vào môi trường nuôi cấy. Các sản phẩm khác của quá trình phân huỷ xenluloza như xenlobiono-1,5-lacton hoặc sản phẩm oxy hoá xenluloza cũng làm tăng khả năng hình thành xenlulaza từ *T. reesei*.

Glucoza là sản phẩm cuối của quá trình thủy phân xenluloza. Glucoza gây hiện tượng ức chế endoglucanaza trong trường hợp *P. chrysosporium* và *T. reesei*.

Ngược lại, nấm mùn nâu *P. placenta* và *G. trabeum* tạo ra

endoglucanaza với nguồn cacbon duy nhất là glucoza hoặc mannoza. Khi thêm glucoza vào *G. trabeum* tới nồng độ 40mM hoặc cao hơn, quá trình sản sinh endoglucanaza vẫn không bị kìm hãm.

Từ nhiều công trình nghiên cứu, các nhà sinh học nhận thấy phương thức tổng hợp xenlulaza trong nấm kỵ khí cũng liên quan tới vai trò cảm ứng của xenluloza và sự ức chế bởi glucoza. Song, Weimer nhận thấy, khi nồng độ glucoza trong dạ cỏ thấp, glucoza cũng không có tác dụng điều tiết sự hình thành xenlulaza.

Quá trình sản sinh xenlulaza ở nấm còn chịu sự chi phối của các hiện tượng khác, ngoài hiệu ứng cảm ứng và ức chế của các sản phẩm phân huỷ.

Nhiều loại hợp chất phenol đã được chứng minh là có tác dụng kìm hãm sự phát sinh xenlulaza và xylanaza ở *S. commune* và *C. globusum*. Ngoài ra, các hợp chất phenol gây ức chế endoglucanaza ở thể đột biến *P. chrysosporium* không tạo phenol oxidaza, nhưng không ức chế đối với thể hồi biến không tạo phenol oxidaza và loại thông thường.

Hơn nữa, hoạt tính của xenlulaza trong chất lọc nuôi cấy nấm không những phụ thuộc vào sự điều tiết sinh tổng hợp xenlulaza mà còn phụ thuộc vào sự có mặt của các chất ức chế trong môi trường nuôi cấy.

Gluconolacton là chất ức chế mạnh đối với β -glucosidaza ở *P. chrysosporium* và *T. reesei*. Sự kìm hãm hoạt động của β -glucosidaza khi có mặt gluconolacton hoặc nojirimixin có thể ngăn ngừa hiệu ứng cảm ứng của xenluloza.

Song, ngoài hiện tượng ức chế, khi nuôi cấy nấm cũng xảy ra hiện tượng hoạt hoá xenlulaza. Chẳng hạn, hai loại proteaza đặc trưng axit được tạo ra trong điều kiện phân huỷ xenluloza có khả năng làm tăng tới 10 lần hoạt tính endoglucanaza của *P. chrysosporium*.

Hiện tượng cảm ứng trong quá trình sinh tổng hợp xenlulaza do có mặt sản phẩm phân huỷ xenluloza cũng nhận thấy ở xạ khuẩn và vi

khuẩn khác. Khi thêm xenlulaza ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy *Thermomonospora fusca*, hiệu ứng cảm ứng xenlulaza tăng lên.

Theo Steward và đồng tác giả, xenlobioza gây hiệu ứng cảm ứng đối với quá trình sinh tổng hợp xenlulaza ở thể đột biến *Cellulomonas* vốn không nhạy cảm với ức chế.

Weimer đã thảo luận về hiện tượng điều tiết hệ xenlulaza ở vi khuẩn trong dạ cỏ. Các tổ hợp xenlulaza ở các vi khuẩn này không bị điều tiết bởi hàm lượng cacbohydrat. Song sự điều tiết các protein riêng lẻ chắc chắn không thể không xảy ra. Quá trình tổng hợp xenlulaza hầu như không xúc tiến nhờ xenluloza và xenlobioza; glucoza không kìm hãm quá trình tổng hợp enzym và cũng không làm giảm hoạt tính của enzym, ngoại trừ ở nồng độ cao.

12.2.2.2. Tính chất phân tử

Đa số xenlulaza từ nấm và một số xenlulaza từ vi khuẩn là glycoprotein, trong đó saccarit liên kết với gốc asparagin (liên kết qua N) hoặc với gốc serin và threonin (liên kết qua O).

Hàm lượng cacbohydrat của xenlulaza thay đổi từ 1 đến 10%. Loại saccarit chủ yếu là mannoza. Song các saccarit khác và dẫn xuất saccarit cũng tồn tại trong enzym này. Đó là glucoza, galactoza, xyloza, N-axetyl glucosamin và galactosamin.

Theo Merivuori và đồng tác giả, liên kết N-glycozyl tạo ra cấu hình đặc biệt và ổn định cấu trúc của xenlulaza, nhờ đó, bảo vệ chúng khỏi phản ứng phân huỷ protein trong quá trình tiết ra enzym. Trong khi đó, liên kết O-glycozyl cần thiết để tạo ra xenlulaza hoạt tính.

Endoglucanaza có tác dụng thủy phân liên kết β -1,4-glucosit tại các điểm bất kỳ trên mạch phân tử xenluloza. Nhờ đó, độ trùng hợp của phân tử giảm nhanh, đồng thời xuất hiện thêm các nhóm khử.

T. reesei tạo ra ba loại endoglucanaza khác nhau, đó là EG I, EG II và EG III. Endoglucanaza chủ yếu là EG I, chiếm khoảng $5 \div 10\%$ tổng số protein tiết ra khi nuôi cấy *T. reesei*.

Mặc dù cơ chế hoạt động khác nhau, EG I và CBH I có mạch tận

cùng chứa N giống nhau.

EG III có các dạng khác nhau, với khối lượng phân tử 48, 48 và 37 kDa và điểm đẳng điện tương ứng ở 5.4; 5.7 và 4.8.

Nhiều endoglucanaza khác cũng được tách ra từ quá trình nuôi cấy *T. reesei*. Exoglucanaza như xenlobiohydrolaza phân huỷ xenluloza theo phương thức tách dần từng đoạn xenlobioza khỏi đầu mạch không có tính khử của phân tử xenluloza. Tuy vậy các enzym này tác dụng rất hạn chế lên dẫn xuất của xenluloza như cacboxymetyl xenluloza và hydroxyetyl xenluloza.

Sự khác biệt giữa các dạng enzym xenlobiohydrolaza (CBH) từ *T. reesei* đã được một số tác giả nghiên cứu kỹ. CBH I và CBH II - hai xenlobiohydrolaza có đặc trưng miễn dịch riêng - là glycoprotein, khác nhau về số lượng cacbohydrat gắn kết với protein. Đoạn mạch aminoaxit không giống nhau. Tâm hoạt động của hai dạng enzym này cũng khác nhau, do đó, phương thức hoạt động có những nét riêng. CBH I ưu tiên liên kết với vùng tinh thể của xenluloza, trong khi đó, CBH II liên kết cả vùng tinh thể và vùng vô định hình.

Theo Kolbe và đồng tác giả, CBH I chiếm khoảng 60% lượng enzym do *T. reesei* tạo ra.

β -Glucosidaza chỉ là một phần nhỏ trong số các protein ngoại bào do vi sinh vật tạo ra. Các enzym này làm xúc tác cho quá trình thủy phân xenlodextrin tan trong nước cũng như alkyl- và aryl- β -glucosit.

β -Glucosidaza nội bào hoặc gắn kết với màng tế bào cũng được nhiều tác giả nghiên cứu. Song mối quan hệ chính xác về gen và sinh hoá giữa các enzym này chưa được làm sáng tỏ. Có ý kiến cho rằng các enzym ngoại bào xuất hiện do giải phóng enzym nội bào cũng như enzym gắn kết với màng tế bào và thoát ra ngoài theo cơ chế tự phân giải.

Aspergillus và *Phanerochaete* sản sinh β -glucosidaza có khối lượng phân tử lớn hơn so với enzym của *T. reesei*. Từ *Sporotrichum thermophile*, Meier và đồng tác giả đã tách được hai enzym β -glucosidaza khác nhau về khối lượng phân tử và tính chất xúc tác.

Một enzym với khối lượng phân tử 440 kDa hoạt tính aryl- β -glucosidaza, enzym khác với khối lượng phân tử 40 kDa có hoạt tính xenlobiaza và chỉ gây tác động rất yếu lên liên kết aryl- β -glucozit (khái niệm chung là β -glycozit). Kashiwagi nhận thấy, enzym β -glucosidaza tinh khiết tách ra từ *C. gilvus* tấn công phân huỷ xenlobioza chậm hơn so với các oligosaccarit có độ trùng hợp cao hơn.

Xenlobioza dehydrogenaza (CDH) được tạo ra nhờ một số loài nấm phân huỷ xenluloza (nấm mùn mềm, nấm mùn trắng và một loài nấm mùn nâu - *C. puteana*).

Gần đây các nhà sinh học cũng nhận thấy CDH sản sinh từ một loài vi khuẩn thuộc *Cytophaga*. CDH mang cả FAD (flavin - adenin - dinucleotit) và phức sắt làm nhóm kết nối.

Nhiều công trình nghiên cứu cho thấy sản phẩm phân huỷ protein của CDH, như đã biết là xenlobioza: quinon oxidoreductaza (CBQ) có vùng chứa flavin của CDH.

Cả CDH và CBQ, khi có mặt chất nhận điện tử thích hợp, sẽ oxy hoá nhóm khử của xenlobioza, xenlodextrin có độ trùng hợp lớn hơn và thậm chí cả xenluloza thành các axit tương ứng qua giai đoạn tạo lacton.

Cả CDH và CBQ sử dụng hợp chất quinon và đồng đẳng như 2,6-diclophenol-indophenol (DCPIP) làm chất nhận điện tử. Xytochrom *c* làm chất nhận điện tử cho CDH nhưng không nhận điện tử cho CBQ. Dựa vào tính chất này, ta có thể phân biệt được CDH và CBQ.

Hoạt tính chung của CDH và CBQ có thể xác định bằng cách sử dụng ferixyanua DCPIP hoặc quinon để khử để làm chất nhận điện tử.

Theo Morpeth, CDH là protein, trong đó nhóm phức sắt có dạng xytochrom *b*. Enzym này khử xytochrom *c* nhanh hơn 200 lần so với khử oxy, trong khi đó hợp chất của Fe^{3+} như $\text{Fe}(\text{OCOCH}_3)_3$ và $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ bị khử nhanh hơn 35 ÷ 50 lần so với oxy phân tử.

CDH có thể phân chia thành FAD và phức sắt dưới tác dụng của nhựa đu đủ hoặc của proteaza từ *P. chrysosporium*, mặc dù trong

trường hợp thứ hai quá trình chỉ diễn ra khi CDH liên kết với xenluloza.

FAD chỉ bị khử khi thêm xenlobioza. Điều này chứng tỏ FDA chịu trách nhiệm trực tiếp oxy hoá xenlobioza. Hiện tượng này cũng chứng tỏ các electron di chuyển từ FAD bị khử tới chất nhận điện tử thích hợp, như vùng phức sắt, quinon, Fe^{3+} , hoặc thậm chí oxy phân tử.

Các nghiên cứu dựa trên phương pháp tia X góc hẹp cho thấy CDH cũng như các phần cấu tạo của nó có dạng toả rộng; mặt cắt ngang của FDA là $4,3 + 5,1\text{nm}$, lớn hơn nhiều so với phần phức sắt ($3,3\text{nm}$).

Các nhà nghiên cứu cũng cho rằng hai phần của CDH nằm thẳng hàng với nhau. Như vậy, theo mô hình này, CDH có dạng thẳng. Tuy nhiên, cũng không loại trừ CDH có dạng uốn cong.

Dựa trên các nghiên cứu tiến hành với các enzym oxy hoá, Eriksson và đồng tác giả đã đưa ra ý kiến về chức năng của các enzym này trong quá trình phân rã xenluloza và lignin như sau:

- Oxy hoá xenluloza và làm xuất hiện nhóm cacboxyl, dẫn tới sự biến dạng vùng tinh thể xenluloza;

- Chuyển hoá xenlobioza (tác nhân cản trở hoạt động của enzym thủy phân) thành axit xenlobionic;

- Oxy hoá nhóm khử trong xenluloza để ngăn ngừa sự xuất hiện trở lại liên kết glycozit vốn đã bị phân huỷ bởi enzym xenlulaza (tham khảo thêm chương 4, T1).

- Điều hoà trực tiếp năng lượng bằng cách kết nối với mạch chuyển electron trên thành tế bào nấm;

- Sản sinh các phần tử hoạt tính (anion - gốc tự do) để làm phân rã cấu trúc tinh thể của xenluloza, nhờ đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân huỷ xenluloza;

- Khử gốc tự do phenoxyl để ngăn ngừa tái trùng hợp các sản phẩm phân huỷ của lignin (xem thêm chương 8).

Đáng lưu ý là CDH cũng hoạt động như tác nhân Fenton, tạo thành gốc $HO^{\bullet}$ khi có mặt ion sắt và H_2O_2 . Gốc tự do hydroxyl là tác

nhân oxy hoá mạnh, tấn công xenluloza và cả các cấu tử khác của tế bào gỗ theo phương thức không đặc hiệu.

Xenulaza nguồn gốc vi khuẩn là hỗn hợp khá phức tạp. Trong quá trình nuôi cấy *Cellulomonas fimi*, Langsford thu được mười cấu tử thể hiện hoạt tính của endoglucanaza, có khả năng phản ứng với cacboxymetylxenluloza. Endoglucanaza của *B. subtilis* có hoạt tính mạnh gấp đôi so với hoạt tính của endoglucanaza từ *T. reesei*.

Một loại enzym xenulaza hai chức cũng nhận được từ một loài *Bacillus*. Enzym này là polypeptit đơn (khối lượng phân tử 35 kDa), có hoạt tính của cả endoglucanaza và exoglucanaza tại các vị trí riêng biệt trong enzym.

Một endoglucanaza gắn kết với thành tế bào và hai endoglucanaza ngoại bào (A và B) cũng tìm thấy ở *P. fluorescens var. cellulosa*. Cả ba enzym này có khả năng phân giải hàng loạt cơ chất. Phương thức mà các enzym này phân huỷ CMC cũng tương tự như hoạt động của endoglucanaza từ nấm.

Endoglucanaza chủ yếu (80% tổng hoạt tính endoglucanaza) của *T. curvata* thể hiện hoạt tính mạnh nhất đối với CMC có độ trùng hợp cao. Axit glutamic và aspartic chiếm 24% tổng aminoaxit.

Theo Lamed, xenulaza vi khuẩn khác với hệ xenulaza từ nấm về sự hình thành tổ hợp đa enzym (xenulosom) và ít tồn tại dưới dạng từng enzym biệt lập.

Các xenulosom được tạo ra nhờ một số vi khuẩn kỵ khí, đặc biệt là *Clostridia*. Hệ xenulaza của *C. thermocellum* rất hoạt động trong quá trình phân huỷ xenluloza ở vùng tinh thể, với hoạt tính riêng cao hơn so với hệ xenulaza của nấm *T. reesei*.

Xenulosom có khối lượng $2 \times 10^6 \div 6.5 \times 10^6$ Da, đường kính khoảng 18 nm, chứa 14 ÷ 26 polypeptit khác nhau với khối lượng phân tử 37 ÷ 210 kDa.

Các xenulosom tạo thành tổ hợp lớn hơn gọi là polyxenulosom, với khối lượng $50 \times 10^6 \div 80 \times 10^6$ Da.

Các khối trên bề mặt vi khuẩn là các tập hợp polyxenulosom, mỗi khối có thể chứa tới vài trăm xenulosom.

Xenulosom thủy phân rất hiệu quả cả vùng vô định hình và vùng tinh thể của xenluloza. Trong khi đó, các peptit đơn lẻ hoặc kể cả hỗn hợp của chúng không thực hiện được đồng thời cả hai chức năng trên.

Nhiều polypeptit trong tổ hợp xenulosom có hoạt tính xúc tác và đã được xác định là endoglucanaza, xylanaza và xenlodextrinaza.

Felix và đồng tác giả cho rằng xenlobiohydrolaza cũng có mặt trong xenulosom. Tuy nhiên, sự tồn tại của chúng cần được nghiên cứu thêm để xác nhận.

Ngoài ra, hoạt tính của β -glucosidaza, β -xylosidaza, β -galactosidaza và β -mannosidaza trong xenulosom cũng được Kohring xác định bằng thực nghiệm.

Một số polypeptit trong xenulosom đã được nhận dạng trong đó mạch có kích thước lớn nhất là 210 + 250 kDa. Protein này trước đây được gọi là S1 hoặc SL, hiện nay được đặt tên là Cel L hoặc Cip A. Cip A có thể hoạt động như chất gắn kết xenluloza hoặc như protein làm dần dờ, bám vào các hợp phần xúc tác của xenulosom. Ngoài ra nó có thể gắn kết với nguồn cơ chất xenluloza và giúp các tổ hợp enzym bám vào bề mặt tế bào vi khuẩn.

Các hợp phần cấu tạo khác của xenulosom cũng được phát hiện, như Cel S (82 kDa) - nhóm cấu trúc có tác dụng xúc tác. Cip A và Cel S là hai cấu tử của xenulosom từ *C. thermocellum*.

Mô hình "enzym có mỏ neo" được đề xuất để giải thích hoạt động phối hợp giữa hai hợp phần xúc tác. Mô hình này được xác nhận qua phân tích ADN các gen ghi mã hai protein kể trên. Dựa vào các quan sát thực nghiệm này, Wu đã mở rộng thành mô hình phức tạp hơn. Cip A neo giữ các cấu tử xúc tác khác, còn Cel S bảo đảm hoạt tính xenlobiohydrolaza hoặc exoglucanaza cần thiết để phân giải xenluloza tinh thể.

Xenulosom trong *Clostridia* khác như *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum* và *C. jsui* cũng có tính chất tương tự như tính chất của xenulosom từ *C. thermocellum*. Xenulosom của *C. cellulovorans* gồm ba hợp phần chủ yếu và có ít nhất sáu hợp phần enzym khác nhau.

Một số vi khuẩn hiếu khí và kỵ khí sử dụng phosphorylaza để phân giải xenluloza. Xenlobioza và xenlodextrin có độ trùng hợp cao hơn bị chuyển hoá dưới tác động của *C. gilvus*. Hiệu suất tế bào theo đường lượng glucoza tăng lên khi độ trùng hợp của xenlodextrin tăng. Điều này chứng tỏ phản ứng phân huỷ liên kết glycozit xảy ra nhờ quá trình phosphoryl hoá. Vai trò sinh lý của xenlobioza phosphorylaza là chuyển hoá xenlobioza thành glucoza-1-phosphat. Hợp chất này được vi sinh vật sử dụng hiệu quả hơn so với glucoza.

Sự tồn tại của xenlobioza phosphorylat lần đầu tiên được phát hiện ở *C. thermocellum*. Hai loại enzym đã được nhận dạng. Một loại enzym đặc hiệu đối với xenlobioza và enzym khác chuyển hoá xenlodextrin có độ trùng hợp cao hơn, tạo thành α -glucozyl phosphat. Sản phẩm chủ yếu của quá trình chuyển hoá là glucoza-1-phosphat và glucoza.

Theo Sasaki, xenlobioza phosphorylaza tinh chế có nguồn gốc từ *C. gilvus* bao gồm bốn hợp phần và đặc hiệu đối với xenlobioza. Enzym này cần phospho và magie cho quá trình phosphoryl hoá.

12.2.2.3. Tổ chức vùng của xenlulaza

Xenlulaza có thể phân chia thành vùng xúc tác và vùng gắn kết xenluloza.

Dựa vào đặc trưng của chuỗi aminoaxit tồn tại trong vùng hoạt động xúc tác, xenlulaza từ nấm và vi khuẩn được chia thành các họ có chuỗi protein tương đồng. Sự phân loại như vậy được xác nhận nhờ phân tích nhóm kỵ nước.

Bảng 12.2. cho thấy, họ A bao gồm xenlulaza của các vi sinh vật như vi khuẩn gram âm, vi khuẩn gram dương, vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn kỵ khí và nấm *T. reesei*.

Bảng 12.2. Xenulaza và xylanaza có vùng xúc tác tương đồng

	Họ vi sinh vật hoặc sinh vật	Enzym	Nhóm cuối
A	<i>Bacillus sp. 1139</i>	EG	N
	<i>Bacillus sp. N - 4</i>	EG A	N
	<i>Bacillus sp. N - 4</i>	EG B	N
	<i>Bacillus sp. N - 4</i>	EG C	N
	<i>Bacillus polymyxa</i>	EG	
	<i>Bacteroides ruminicola</i>	EG	N
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	END 1	N
	<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	EG B	C
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	EG 1	N
	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	EG A	N
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cel B	N
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cel C	
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cel E	N
	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cel H	C
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	EG Z	N
	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	EG 3	C
	<i>Ruminococcus albus SY 3</i>	CEL A	
	<i>Ruminococcus albus SY 3</i>	CEL B	
	<i>Trichoderma reesei</i>	EG III	C
	<i>Xanthomonas campestris</i>	EngXCA	N
B	<i>Cellulomonas fimi</i>	Cen A	C
	<i>Microbispora bispora</i>	Cel A	N
	<i>Streptomyces sp. KSM-9</i>	Cas A	
	<i>Trichoderma reesei</i>	CBH II	C
C	<i>Humicola grisea</i>	CBH I	
	<i>Neurospora crassa</i>	CBH I	N
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CBH I	N
	<i>Trichoderma reesei</i>	CBH I	N
	<i>Trichoderma reesei</i>	EG I	N
	<i>Trichoderma viride</i>	CBH	N

Bảng 12.2 (tiếp theo)

	Họ vi sinh vật hoặc sinh vật	Enzym	Nhóm cuối
D	<i>Bacillus circulans</i> <i>Cellulomonas uda</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Bgc EG Cel A EG Y	N
E	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Clostridium stercorium</i> <i>Dictyostelium discoideum</i> <i>Persea americana</i> <i>Persea americana</i> <i>Persea americana</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	CED 1 Cen B Cen C Cel D Cel Z SGSP270 6 EG Cel 1 Cel 2 Cel A Cel B Cel E	N Internal N N N N N N N N N N
F	<i>Bacillus</i> sp. C-125 <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Cellulomonas fimi</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Cryptococcus albidus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Thermoascus aurantiacus</i>	Xyn A Xyn A Cel B Xyn A ORF 4 Cex Xyn Z Xyn Xyn A Xyn B Xyn	N N N N N N C C C C C
G	<i>Bacillus circulans</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>	Xyn Xyn A Xyn Xyn B	
H	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Erwinia carotovora</i>	EG Cel S	
I	<i>Ruminococcus albus</i>	Cel A	

Bên cạnh các dạng điển hình của aminoaxit kỵ nước, một số vùng bảo tồn chứa các gốc đồng nhất trong hầu hết các chuỗi mạch.

Trong họ B, ba endoglucanaza từ *C. fimi*, một loài *Streptomyces* và *Microbispora bispora* cũng như CBH II của *T. reesei* có tính chất tương tự nhau.

Họ C bao gồm ba xenlulaza có nguồn gốc từ nấm, với mức tương đồng ít nhất là 45%.

Trong số ba xenlulaza nguồn gốc vi khuẩn của họ D, EG Y của *Erwinia chrysanthemi* và EG của *C. uda* có quan hệ gần gũi với nhau hơn.

Họ E, F và G cũng có nguồn gốc vi khuẩn. Phần lớn enzym thuộc F và G đều có hoạt tính xylanaza.

Trong số chín họ enzym, A, B, F và H có cả enzym nguồn gốc từ nấm và vi khuẩn.

Họ C chỉ gồm các enzym từ nấm.

Họ D, G và I chỉ có các enzym nguồn gốc vi khuẩn.

Họ E bao gồm cả enzym nguồn gốc vi khuẩn và thực vật.

Các vùng gắn kết xenluloza (CBD) hình thành các đơn vị chức năng riêng biệt đối với hầu hết enzym phân giải xenluloza. Các CBD này không đóng vai trò chủ chốt tạo ra hoạt tính xúc tác, nhưng chúng điều tiết hoạt tính đặc hiệu của các enzym trên cơ chất xenluloza ở dạng hoà tan và không hoà tan.

Bảng 12.3 liệt kê các CBD khác nhau tồn tại trong xenlulaza nguồn gốc vi khuẩn và nấm.

Kết quả phân tích bốn xenlulaza từ *T. reesei* chứng tỏ sự có mặt các vùng bảo tồn ngắn (AB) ở nhóm cuối N (CBH I và EG III) hoặc C (CBH I và EG I) trong các enzym này.

Bảng 12.3. Vùng gắn kết xenluloza trong xenulaza từ nấm và vi khuẩn

Vi sinh vật	Enzym	Nhóm cuối
Vi khuẩn		
<i>Butyrivibrio fibrosolvens</i>	EG	C
<i>Cellulomonas fimi</i>	Cen A	N
<i>Cellulomonas fimi</i>	Cen B	C
<i>Cellulomonas fimi</i>	Cen C	N
<i>Cellulomonas fimi</i>	Cex	C
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	EG A	C
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	EG Z	C
<i>Microbispora bispora</i>	Cel A	C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>	Cel A	C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>	Cel B	N
<i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>cellulosa</i>	Cel E	C
Nấm		
<i>Neurospora crassa</i>	CBH I	C
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CBH I	C
<i>Trichoderma reesei</i>	CBH I	C
<i>Trichoderma reesei</i>	CBH II	N
<i>Trichoderma reesei</i>	EG I	C
<i>Trichoderma reesei</i>	EG II	N

Khi tách vùng AB ra khỏi CBH, hoạt tính của chúng giảm một cách đáng kể.

CBD của EG I có ái lực mạnh hơn so với CBH I, xét về phương diện gắn kết với xenluloza. Sở dĩ có sự khác biệt này vì tryptophan thay thế tyrosin trong vùng gắn kết xenluloza.

Đặc trưng quan trọng nhất của dãy CBD nguồn gốc vi khuẩn là hàm lượng aminoaxit thấp, hàm lượng hydroxyaminoaxit cao, hàm lượng gốc tryptophan, asparagin và glyxin cao.

Din và đồng tác giả nhận thấy CBD của Cen A (endoglucanaza) từ *C. fimi* tuy không có hoạt tính thủy phân rõ rệt nhưng có thể phân rã

cấu trúc của sợi xenluloza và giải phóng ra các phần tử nhỏ, kết quả của quá trình phân rã xenluloza. CBD của endoglucanaza (Cel B) từ *P. fluorescens var. cellulosa* gắn kết enzym với xenluloza như hoạt động của CBD ở Cen A từ *C. fimi*.

Hall, 1995, đã nghiên cứu một endoglucanaza mới (Cel E), chứa vùng liên kết xenluloza với các mạch cuối chứa N và C. Dạng cụt của enzym thiếu CBD cũng thể hiện khả năng hoạt động như Cel E mạch dài đối với xenluloza hoà tan và xenluloza trương trong axit, nhưng hoạt tính thấp hơn nhiều so với enzym mạch đầy đủ khi chúng tấn công mẫu xenluloza dạng tinh thể.

Xenulosom của *C. thermocellum* gắn kết chặt với xenluloza và mối liên kết này có thể thực hiện nhờ cấu tử không hoạt động xúc tác của xenulosom đóng vai trò trung gian.

Một CBD cũng được xác định là có mặt trong protein A (Cip A), một phần của xenulosom.

Theo Goldstein, protein gắn kết xenluloza cũng đóng vai trò trung gian trong tương tác giữa nguồn cơ chất xenluloza tinh thể và tổ hợp enzym xenlulaza của *Clostridium cellulovorans*.

Các phép phân tích đột biến chứng tỏ rằng vùng CBD gồm 163 aminoaxit cần thiết để enzym gắn kết đến mức cực đại với tinh thể xenluloza.

Sự gắn kết giữa CDH của *P. chrysosporium* với xenluloza được hai nhóm tác giả công bố độc lập (Henriksson và Renganathan). Sự gắn kết này có thể so sánh với trường hợp CBH I từ *T. reesei*, liên quan tới vùng FAD và dường như độc lập đối với tâm xúc tác.

So sánh kết quả phân tích đẳng nhiệt liên kết giữa CDH và CBH I cho thấy hằng số phân ly của CDH thấp hơn nhiều so với CBH I. Năng lực liên kết của CDH (số lượng enzym gắn kết tính theo đơn vị khối lượng xenluloza) cũng thấp hơn so với CBH I. Điều này chứng tỏ CDH gắn kết thưa thớt hơn so với CBH I.

Raices, 1995 và Li, 1996, đã tách dòng và nghiên cứu ADN ghi mã CDH từ *P. chrysosporium*. Qua so sánh chuỗi liên kết xenluloza của

CDH và của xenlulaza, các tác giả cho rằng CDH có thể có một chuỗi đặc hiệu nào đó dùng để gắn kết xenluloza. Chuỗi này khác với chuỗi của xenlulaza.

12.2.2.4. Tính chất xúc tác

Hiện nay, các nhà sinh học đã xác định sự phân huỷ xenluloza tinh thể được thực hiện nhờ hệ enzym nhiều cấu tử, trong đó các cấu tử riêng lẻ hoạt động phối hợp để chuyển hoá cơ chất. Khả năng hoạt động phối hợp của xenlulaza phụ thuộc vào tỷ lệ các enzym riêng biệt, phụ thuộc mức độ bão hoà của cơ chất và loại cơ chất.

Hoạt động phối hợp của CBH I và CBH II cùng với EG I và EG III tinh chế từ *T. reesei* đã được đánh giá đối với các cơ chất khác nhau. Sự phối hợp giữa các EG và CBH II diễn ra theo phương thức thông thường đối với endoenzym và exoenzym. Trong khi đó, sự phối hợp hoạt động giữa các EG với CBH I lại phụ thuộc vào đặc trưng cấu trúc của cơ chất.

Hoạt tính của các enzym riêng biệt từ *T. reesei* là cao nhất đối với xenluloza vô định hình. Trong khi đó, hệ enzym hai cấu tử CBH I/EG III và CBH I/CBH II có khả năng phối hợp tốt hơn đối với xenluloza tinh thể.

Hoạt động phối hợp của hai xenlobiohydrolaza (I và II) từ *Penicillium pinophilum* là cực đại khi tỷ lệ giữa hai cấu tử này là 1:1. Henrissat và đồng tác giả cho rằng đây là hai enzym với cấu trúc không gian đặc biệt, có tác dụng thuỷ phân các đơn vị không khủ ở vị trí khác nhau, một dạng nằm trên bề mặt xenluloza, dạng khác nằm sâu bên trong. Theo Wood, CBH II từ *P. pinophilum* hoạt động phối hợp với xenlobiohydrolaza của *T. koningii* và *Fusarium solani*. Song chỉ có CBH I phối hợp hoạt động với endoglucanaza từ *T. koningii* hoặc *F. solani*.

Ngay từ 1950, Reese và các cộng sự đã đưa ra giả thuyết cho rằng sự chuyển hoá xenluloza tự nhiên dưới tác dụng của vi khuẩn thanh các saccarit hoà tan liên quan tới hai enzym hoạt động liên tiếp nhau.

Theo mô hình này, enzym C_1 tác động trước làm cho cơ chất dễ tiếp cận hơn với enzym C_x - xúc tác thực sự của quá trình thủy phân.

Song hoạt động chính xác của enzym C_1 chưa được giải thích rõ ràng và thực sự cũng chưa xác định được rằng enzym C_1 hoàn toàn không làm xúc tác cho phản ứng thủy phân xenluloza.

Những năm gần đây, một số tác giả nhận thấy có sự phối hợp hoạt động diễn ra bên trong Cen A của *C. fimi*. Enzym này bao gồm vùng xúc tác và CBD không thủy phân hoạt động độc lập với nhau. Các khu vực hoạt động phối hợp để làm phân rã và thủy phân xơ sợi xenluloza.

Như vậy, có thể vùng xúc tác tương ứng với hệ thủy phân C_x , còn CBD tương ứng với hệ C_1 không thủy phân mà Reese và cộng tác viên đã giả định.

Quá trình đứt liên kết β -1,4-glucosit dưới tác dụng của xúc tác xenlulaza xảy ra theo cơ chế men phân giải (lysozyme) qua giai đoạn proton hoá oxy glycosit bởi đơn vị aminoaxit và ổn định ion cacbonion nhờ gốc aminoaxit khác. (So sánh cơ chế thủy phân xenluloza trong môi trường axit - chương 4, T1). Tâm hoạt động của nhiều enzym liên quan tới các gốc axit aspartic và axit glutamic.

Phương thức phân giải của các enzym CBH I và CBH II so với EG I và EG III cũng có sự khác biệt, thậm chí giữa CBH I với CBH II cũng như giữa EG I với EG III.

CBH I tấn công vào xenlodextrin có độ trùng hợp lớn. CBH I cũng thủy phân cả xenlobiozit và lactozit. Ngược lại, CBH II đòi hỏi cơ chất gồm 3 + 4 đơn vị mắt xích anhydro- β -D-glucopyranoza. CBH I hoạt động với mọi dạng hình học của xenluloza, trong khi đó, CBH II hoạt động chọn lọc hơn.

EG I thuộc về nhóm endoglucanaza không đặc hiệu, vì enzym này không những phân giải xenluloza mà còn phân huỷ cả xylan.

Theo Claeysens, phản ứng thủy phân xảy ra cùng với phản ứng chuyển. Điều đó chứng tỏ enzym này có thể chứa một số tiểu tố, mỗi tiểu tố có khả năng gắn kết một đơn vị glucoza. Sau đó, các sản phẩm

glucozyl trung gian tạo thành do phản ứng thủy phân được chuyển tới phân tử nhận.

Cấu trúc của một số enzym thuộc các họ xenlulaza cũng được nhiều nhà khoa học xác định.

Các nghiên cứu tán xạ tia X góc hẹp chứng tỏ rằng CBH I và CBH II từ *T. reesei* thường có hình dạng như con nòng nọc. Phần thân có độ dài khoảng $6 \div 7$ nm, đường kính khoảng 4 nm, phần đuôi dài khoảng 15 nm.

Bergfors và đồng tác giả đã kết tinh thành công phần lõi xúc tác của CBH II từ *T. reesei* sau khi tách 82 aminoaxit khỏi mạch cuối chứa N. Sau đó Divne, 1993, cũng đã kết tinh được phần lõi xúc tác của CBH I và EG I từ *T. reesei*.

Joliff và đồng tác giả đã làm sạch và kết tinh endoglucanaza D từ *C. thermocellum*. Các tinh thể có mặt cắt tam giác và tán xạ tia X với độ phân giải 0,28 nm.

Cel D của *C. thermocellum* bao gồm 12 cấu trúc xoắn, với gốc tâm hoạt động nằm trong rãnh ngang qua bề mặt enzym. Nó chứa một đoạn mạch với nhóm chức NH_2 , nhô ra từ phần lõi của enzym để tương tác với một phân tử có quan hệ đối xứng qua cầu nối muối trung gian (Lys 38 - Asp 201).

Davies đã kết tinh EG I từ *Humicola isolens* dưới các dạng khác, bằng cách sử dụng nhiều loại chất kết tủa theo phương pháp khuếch tán hơi.

Hai dạng thu được nhờ kết tủa bằng amoni sulfat có dạng chóp đôi tứ diện. Dạng thứ ba thu được nhờ PEG 8000, phát triển thành tấm đơn tinh thể, trong khi đó, dạng thứ tư có hình que tiết diện tám cạnh.

EG V từ *H. isolens* có một vùng gồm 6 dải nhiễm sắc, với các đường vòng nối với nhau qua các rãnh rộng 4 nm, chạy dọc theo bề mặt của enzym mang các gốc xúc tác Asp 10 và Asp 121.

So sánh cấu trúc phần lõi có tác dụng xúc tác của CBH II từ *T. reesei* và vùng xúc tác của *Thermomonospora fusca*, các nhà sinh học

nhận thấy có sự khác nhau đáng kể về khả năng tiếp cận tâm hoạt động của enzym. Từ đó, họ đưa ra giả thuyết cho rằng sự khác nhau chủ yếu giữa các endoglucanaza và exoglucanaza là mức độ các tâm hoạt động tiếp cận với cơ chất.

12.2.3. Phương pháp thực nghiệm đối với các enzym phân huỷ xenluloza

Hàng loạt cơ chất đã được sử dụng để nghiên cứu các enzym phân giải xenluloza. Song, do thiếu cơ chất đặc hiệu và việc xác định hoạt tính chưa được chuẩn hoá nên khó có thể so sánh quá trình sản sinh xenlulaza giữa các giống nấm hoặc vi khuẩn.

Phương pháp thường dùng nhất để đánh giá hoạt tính của xenlulaza là dựa trên phản ứng thủy phân giấy lọc.

Hoạt tính được định nghĩa là số lượng đường khử giải phóng ra trong một giờ khi sử dụng 50mg giấy lọc No.1 làm nguồn cơ chất ở điều kiện chuẩn.

Đường khử giải phóng ra được định lượng theo phương pháp axit dinitrosalicylic. Kết quả được biểu diễn theo đương lượng glucoza.

Song phương pháp này chỉ xác định được số lượng nhóm khử. Phương pháp này cũng phụ thuộc vào tỷ lệ β -glucosidaza có trong hỗn hợp enzym.

Một số tác giả đề nghị sử dụng các cơ chất trên cơ sở xenluloza nhuộm màu đã được chuẩn hoá (chẳng hạn giấy lọc hoặc bột tinh thể xenluloza) để so sánh các chế phẩm xenlulaza.

Phương pháp khác được Vardanis sử dụng là dùng xenluloza đánh dấu ^{14}C . trong đó, số lượng ^{14}C chuyển vào dung dịch có thể dễ dàng xác định và so sánh với tổng lượng ^{14}C của mẫu xenluloza ban đầu.

Dựa vào sự giải phóng các saccarit từ các dẫn xuất hoà tan được trong nước, như cacboxymetylxenluloza, hydroxyetylxenluloza, ta cũng có thể xác định hoạt tính endoglucanaza, vì các dẫn xuất này không bị thủy phân dưới tác động của exoglucanaza.

Một số nhà nghiên cứu đã đề xuất phương pháp độ nhớt, trong đó sự biến đổi độ nhớt của dung dịch CMC có thể dựa vào để tính đơn vị enzym tuyệt đối. Song phương pháp này đòi hỏi các nhà nghiên cứu phải hiểu biết kỹ về tính chất của dẫn xuất xenluloza để có số liệu tính toán chính xác.

Eriksson sử dụng phương pháp biểu đồ men, dùng dung dịch nhớt CMC để phát hiện các enzym endoglucanaza trong gel polyacrylamit. Dung dịch CMC được phủ lên giấy và để trên lớp gel trong một khoảng thời gian ngắn, đường khử sẽ được phát hiện nếu có endoglucanaza.

Xác định hoạt tính exoglucanaza trong hỗn hợp các enzym phân giải xenluloza là việc làm khó khăn hơn so với xác định endoglucanaza.

Deshpande và đồng tác giả đã sử dụng một số hệ như *p*-nitrophenyl- β -*D*-xenlobiozit (*p*NPC) hoặc *p*-nitrophenyl- β -*D*-lactozit (*p*NPL) làm cơ chất chọn lọc để xác định hoạt tính của exoglucanaza (xenlobiohydrolaza).

Các exoglucanaza tách các dime xenlobioza từ phần không khử của phân tử xenluloza. Các enzym này đặc biệt tác dụng mạnh lên liên kết giữa hai phần khác nhau của phân tử (như liên kết giữa *p*-nitrophenyl với gốc disaccarit), nhưng lại không làm đứt liên kết giữa hai phần giống nhau của phân tử, như liên kết giữa hai đơn vị *D*-glucopyranoza trong xenlobioza.

Phương án khác được áp dụng để xác định hoạt tính của exoglucanaza là phương pháp dựa trên đặc điểm của enzym xenluloza: quinon oxidoreductaza (CBQ). Enzym này khử quinon khi có mặt xenlobioza hoặc xenlodextrin có độ trùng hợp cao hơn.

Hoạt tính exoglucanaza trong hỗn hợp với endoglucanaza có thể được xác định nhờ sử dụng xenluloza vô định hình. Số đơn vị endoglucanaza trong hỗn hợp enzym được xác định chủ yếu nhờ phương pháp đo độ nhớt (Almin và Eriksson). Đường khử A sản sinh dưới tác dụng của endoglucanaza được tính toán dựa trên đường cong chuẩn thiết lập bằng cách dùng một lượng đã biết endoglucanaza tinh khiết cho mẫu xenluloza vô định hình tương tự.

Lượng đường khử B tạo ra nhờ hỗn hợp endo - exo enzym cũng cần được xác định.

Lượng đường khử C giải phóng ra do hoạt động sinh học của exoglucanaza được tính như sau:

$$C = B - A$$

Khó khăn gây nên do có mặt β -glucosidaza trong hỗn hợp enzym có thể loại trừ bằng cách cho thêm vào hệ một lượng α -gluconolacton. Hợp chất này ức chế khá hiệu quả hoạt động của β -glucosidaza.

Cần chú ý là xenluloza tinh thể không được sử dụng cho phương pháp xác định này. Vì trong trường hợp đó, hiệu ứng phối hợp hoạt động của endoglucanaza và exoglucanaza sẽ làm sai lệch kết quả.

Phương pháp xác định thường dùng nhất đối với β -glucosidaza là đo lượng glucoza giải phóng ra từ xenlobioza hoặc lượng *p*-nitrophenol tạo thành từ *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranozit.

Phương pháp đặc trưng nhất để xác định lượng D-glucoza phát sinh từ xenlobioza là sử dụng glucoza oxidaza/ peroxidaza.

Hoạt tính β -glucosidaza cũng có thể xác định dựa trên lượng 4-metylumbeliferon giải phóng ra từ cơ chất 4-metylumbeliferyl- β -glucozit.

Các cơ chất thường dùng nhất để xác định CBQ là các quinon dễ khử như 2,6-diclophenol-indophenol (DCPIP) hoặc 3-metoxi-5-*tert*-butylbenzoquinon (MTBB). Phản ứng khử cơ chất được ghi nhận theo mức giảm hấp thụ tại độ dài sóng đặc trưng, 600 nm đối với DCPIP và 420 nm với MTBB. CDH cũng có khả năng khử cả hai chất trên. Tuy nhiên, chỉ có CDH khử được xytochrom *c*.

Hoạt tính của xenluloza phosphorylaza thường được xác định theo phương pháp quang phổ dựa vào lượng glucoza-1-phosphat tạo ra từ xenlobioza.

12.2.4. Công nghệ sinh học dựa trên tác nhân phân huỷ xenluloza

Các xenlulaza đã xuất hiện nhiều trên thị trường từ vài thập kỷ

này. Enzym này thu hút sự chú ý của các nhà công nghệ vì chúng có thể sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau như trong quá trình chuyển hoá chất liệu chứa xenluloza, công nghệ sợi dệt, công nghệ được, chất tẩy rửa, công nghệ thực phẩm, chế biến rau - quả và xử lý chất thải...

Khả năng ứng dụng enzym trong công nghệ bột xenluloza và giấy là hướng được quan tâm nhiều trong những năm gần đây.

Hiện nay, công nghệ sinh học đang được áp dụng để tách mực khỏi giấy loại. Ở Mỹ, hơn 40% tổng lượng giấy sử dụng là bắt nguồn từ giấy loại. Ở châu Âu và Nhật Bản, con số này là khoảng 55%.

Phương pháp khử mực truyền thống (dùng hoá chất) kém hiệu quả khi xử lý mực in theo phương pháp laser và xerox.

Xenulaza đơn thuần hoặc phối hợp với các enzym khác, như hemixenulaza, có khả năng tách mực một cách hiệu quả đối với các loại giấy khác nhau.

Heitmann và đồng tác giả nhận thấy endoglucanaza và xylanaza khử mực khá hiệu quả đối với giấy báo cũ, đồng thời cải thiện tính chất quang học cũng như độ bền cơ lý của giấy sản xuất từ bột khử mực.

Yang và Eriksson cũng sử dụng enzym để tách mực khỏi xơ sợi giấy hỗn tạp (giấy báo và giấy tạp chí cũ). Các tác giả này đã dùng hỗn hợp các enzym để xử lý bột giấy loại, sau đó tiến hành tuyển nổi để tách mực đã được giải phóng khỏi xơ sợi.

Quá trình khử mực bằng enzym cũng cải thiện khả năng thoát nước khỏi xơ sợi trong quá trình xeo giấy.

Khử mực bằng enzym cũng là phương pháp thân thiện với môi trường hơn so với phương pháp truyền thống dùng hoá chất.

Xenulaza được sử dụng thành công trong công nghệ sợi dệt, như xử lý quần áo bò, làm bóng vải bông, vải sợi nhân tạo.

Theo phương pháp truyền thống, sau khi tách hồ khỏi vải, quần bò được mài bằng đá bọt (1 + 2 kg cho một quần) trong máy giặt lớn. Sau công đoạn gia công này, quần bò được tách thuốc nhuộm dư.

Song tỷ lệ lượng đá bọt lớn làm giảm năng suất thiết bị (tính theo

lượng quần), làm mòn máy giặt đồng thời làm giảm độ bền cơ lý của vải bò. Xenlulaza giúp giảm nhẹ quá trình tách thuốc nhuộm indigo dư khỏi bề mặt xơ sợi. Quá trình mài có sử dụng enzym cho phép tăng 50% sản lượng quần bò và đảm bảo độ mềm mại cần thiết của vải bò. Thông thường, 1 kg enzym có thể thay thế cho 100 kg đá bọt.

Hai loại enzym xenlulaza có thể sử dụng trong quá trình xử lý quần bò, đó là enzym trung tính và enzym axit. Tuy vậy, loại enzym trung tính được sử dụng nhiều hơn vì loại enzym này có thể hoạt động trong khoảng pH rộng.

Trong những năm gần đây, enzym xenlulaza cũng được sử dụng để cải thiện chất lượng các mặt hàng từ xenluloza.

Quá trình làm bóng vải sợi bằng phương pháp sinh học là công nghệ mới được áp dụng trong lĩnh vực sợi dệt để tăng chất lượng của sợi bông, sợi nhân tạo, sợi gai. Khi xử lý sợi xenluloza bằng enzym xenlulaza axit, độ mềm mại và độ hút ẩm tăng lên, bề mặt vải đẹp hơn về cảm quan.

Các enzym như proteaza và lipaza đã được sử dụng khá phổ biến trong công nghiệp chất tẩy rửa, trong khi đó, xenlulaza chỉ mới được sử dụng trong thời gian gần đây.

Các chất bẩn trong lòng xơ bông là tạp chất khó tách nhất khi áp dụng phương pháp tẩy rửa thông thường. Xenlulaza kiềm tính từ một số loài *Bacillus* có khả năng phản ứng chọn lọc với xenluloza bên trong xơ sợi. Nhờ đó, tạp chất dễ bị tách bỏ khi có mặt chất tẩy rửa thông thường. Như vậy, nhờ sử dụng công nghệ sinh học, khả năng làm sạch của các loại chất tẩy rửa chứa xenlulaza đã tăng lên một cách rõ rệt.

Xenlulaza cũng được sử dụng có hiệu quả để ủ thức ăn cho vật nuôi, tạo ra sản phẩm chất lượng cao từ cỏ với một lượng nhỏ cacbohydrat hoà tan trong nước. Khi thêm xenlulaza và hemixenlulaza vào cỏ, saccarit có thể được giải phóng, thúc đẩy quá trình lên men nhờ vi khuẩn phát sinh axit lactic.

Xenlulaza (dùng một mình hoặc phối hợp với proteaza) làm chất bổ

trợ trong thức ăn, có thể làm tăng trọng một cách đáng kể đối với đàn lợn và tăng chất lượng thịt.

Quá trình đường hoá chất liệu thực vật bằng phương pháp enzym tạo ra monosaccharit, tiếp đó lên men thành hàng loạt sản phẩm như etanol, các alcol khác, các axit hữu cơ, protein và chất béo.

Trong số các phương pháp đã nghiên cứu, phương án xử lý nổi hơi ở nhiệt độ $170^{\circ}\text{C} \div 250^{\circ}\text{C}$ được coi là hiệu quả nhất để chuẩn bị nguyên liệu thực vật cho thủy phân bằng enzym ở giai đoạn tiếp theo.

Bã mĩa sau khi nổi hơi được đường hoá dưới tác dụng của xenlulaza đi từ *T. reesei*. Chế phẩm enzym này có thể đạt mức đường hoá 70%. Khi thêm β -glucosidaza, kết quả đường hoá có thể đạt tới 90%. Hiệu quả đường hoá cao cũng đạt được đối với mùn cưa của gỗ bạch đàn khi thêm β -glucosidaza.

Như vậy, một tỷ lệ β -glucosidaza nào đó là rất cần thiết trong quá trình đường hoá nguyên liệu thực vật.

Giá thành của enzym quyết định một phần giá thành chung của sản phẩm đường hoá. Do đó, việc tái sử dụng enzym là rất cần thiết. Nhiều phương án tái sử dụng enzym đã được đề xuất. Một số phương pháp đã trở nên lạc hậu, một số phương án khác vẫn được coi là có hiệu quả.

Phương án do Vallander và Eriksson đề xuất 1990 là một trong những phương pháp hiệu quả để tái sử dụng enzym.

Theo các tác giả này, một phần chất liệu thực vật đã qua đường hoá (vẫn hấp phụ enzym) được trộn lẫn với phần nguyên liệu mới. Bằng cách này, ta có thể giảm giá thành sản phẩm đường hoá hoặc alcol.

Quá trình lên men đường *D*-glucoza và các hexoza khác thành rượu etylic đã được thực hiện từ lâu. Nhưng các pentoza không chuyển thành etylic theo phương pháp lên men rượu thông thường.

Việc nghiên cứu công nghệ sinh học mới để chuyển hoá cả pentoza và hexoza thành rượu vẫn là thách thức lớn đối với các nhà khoa học.

Xenlulaza từ nấm cũng có khả năng làm tăng hiệu suất đường trong quá trình sản xuất rượu bia. Khi sản xuất rượu từ sắn, nếu thêm

xenulaza từ *Trichoderma*, hiệu suất alcol sẽ tăng nhờ chuyển hoá một phần xenuloza thành glucoza.

Việc tách tinh bột từ ngũ cốc và củ cũng thuận lợi hơn khi dùng enzym thích hợp. Tinh bột ngũ cốc được tách ra với hiệu suất cao khi xenulaza và xylanaza (không lẫn amylaza) được đưa vào huyền phù tinh bột trước khi ly tâm và rửa.

Xenulaza cũng được sử dụng để tăng tốc quá trình trích ly chất màu bằng pectinaza khỏi vỏ củ, quả hoặc rau.

Các chất thải chứa xơ thực vật từ các nhà máy bột và giấy cũng như chất thải từ nhà máy xử lý sản phẩm nông nghiệp.... cũng là các nguyên liệu tiềm năng cho sản xuất protein vi sinh vật.

Hai quá trình công nghệ sinh học đã được áp dụng trong công nghiệp để sản xuất đường từ nguyên liệu gỗ.

Quá trình Candida - sử dụng *Candida utilis* - đã xuất hiện từ lâu. Trong khi đó, quá trình Pekilo sử dụng nấm *Paecilomyces variotii* mới được áp dụng khoảng vài thập kỷ nay.

Hai quá trình khác chuyển hoá trực tiếp rác thải chứa chất liệu thực vật rắn thành protein dưới tác dụng của nấm cũng được thử nghiệm ở quy mô sản xuất nhỏ.

Một quá trình sử dụng nấm mùn trắng *S. pulverulentum* (*P. chrysosporium*) được khởi xướng tại Viện nghiên cứu Bột và Giấy Thụy Điển cách đây vài thập kỷ. Dây chuyền khác sử dụng *C. cellulolyticum* được khởi xướng tại Trường Đại học Waterloo, Canada. Song các giải pháp này chưa đạt hiệu quả kinh tế cao.

Phương pháp sản xuất protein của Viện nghiên cứu Bột và Giấy Thụy Điển dựa trên nguồn cơ chất xơ sợi vế sau được chuyển thành dây chuyền xử lý chất thải từ các nhà máy sản xuất bột cơ (sản xuất bột giấy theo phương pháp cơ học). Trong dây chuyền này, các chất hoà tan và chất lơ lửng phân tán trong hệ thống nước trắng của nhà máy bột cơ là nguồn cơ chất cho chuyển hoá sinh học.

Quá trình này đã được áp dụng trong nhà máy sản xuất giấy in và có khả năng tiến hành với chu trình khép kín về cung cấp và xử lý nước trắng trong khâu sản xuất bột cơ.

12.3. PHÂN HUỖ LIGNIN

12.3.1. Vi sinh vật phân huỷ lignin

Các vi sinh vật khác nhau phân huỷ lignin với mức độ khác nhau. Trong số các vi sinh vật, nấm lâm mục gỗ phân huỷ lignin mạnh nhất, đặc biệt là nấm mùn trắng. Nấm mùn trắng chủ yếu phá huỷ gỗ lá rộng, song một phần gỗ lá kim cũng bị tấn công. Đa số nấm mùn trắng phá huỷ gỗ bằng cách đồng thời tấn công lên các cấu tử của gỗ như lignin, hemixenluloza, xenluloza, nhưng cũng có những loài đặc hiệu phân huỷ lignin.

Nấm mùn trắng sản sinh hàng loạt enzym ngoại bào có khả năng oxy hoá (bảng 12.4).

Bảng 12.4. Nấm mùn trắng sản sinh enzym phân huỷ lignin

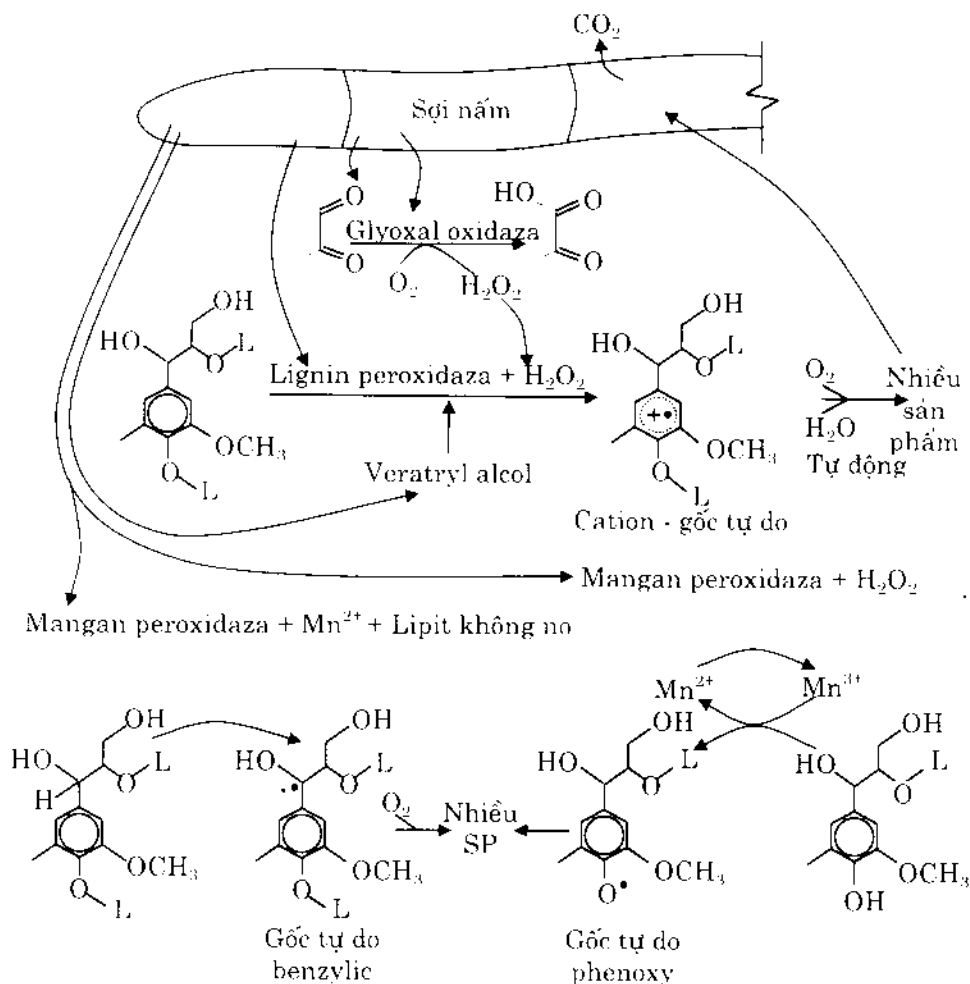
LiP, MnP và laccaza <i>Coriolus versicolor</i> <i>Cyathus bulleri</i> <i>Phlebia radiata</i> <i>Pycnoporus sanguineus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Pleurotus sajor-caju</i>	LiP và laccaza <i>Oudemansiella radicata</i> <i>Pleurotus florida</i> <i>Polyporus pletensis</i> <i>Polyporus brumalis</i> <i>Phlebia tremellosus</i> <i>Phlebia ochraceofulva</i>
LiP và MnP <i>Coriolus pruinoseum</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP <i>Bjerkandera adusta</i> <i>Daedaleopsis confragosa</i> <i>Polyporus varius</i>
	Laccaza <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>
MnP và laccaza <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> <i>Dichomitus squalens</i> <i>Lentinus edodes</i> <i>Panus tigrinus</i> <i>Rigidoporus lignosus</i>	AAO và VAO <i>Bjerkandera adusta</i> <i>Pleurotus eryngii</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Trametes versicolor</i> <i>Pluerotus sajor-caju</i>

Ghi chú: AAO: aryl alcol oxidaza
VAO: veratryl alcol oxidaza.

Hoạt động phân huỷ lignin của nấm màu trắng *P. chrysosporium* được phác hoạ ở sơ đồ 12.1

Các enzym đặc trưng nhất là lignin peroxidaza (LiP), mangan peroxidaza (MnP) và laccaza.

Sự điều tiết sản sinh enzym và phá huỷ lignin là hiện tượng rất phức tạp. Các kết quả thu được trong điều kiện thí nghiệm không dễ gì suy diễn cho quá trình phá huỷ gỗ ở điều kiện tự nhiên.



Sơ đồ 12.1. Hoạt động của nấm mùn trắng *P. chrysosporium* phân huỷ lignin.

Ảnh hưởng về dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy lên quá trình phân huỷ lignin đã được nhiều nhóm tác giả công bố.

Khi nghiên cứu quá trình phân huỷ lignin, Eriksson và Blanchette nhận thấy có sự lắng đọng mangan trong nấm mùn trắng. Các tác giả cho rằng mangan đóng vai trò điều tiết trong quá trình phân huỷ lignin. Tuy nhiên, vai trò các yếu tố điều tiết như mangan lên phản ứng phân huỷ lignin chưa được giải thích một cách rõ ràng.

Nấm mùn mềm phá huỷ khá hiệu quả các polysaccarit của gỗ, nhưng chỉ biến đổi một phần cấu trúc của phân tử lignin với tốc độ chậm. Nấm mùn mềm hoạt động trên gỗ lá rộng nhiều hơn so với gỗ lá kim. Một số loài nấm mùn mềm được sử dụng để nghiên cứu quá trình phân huỷ lignin của gỗ cũng như các chất mô phỏng lignin được liệt kê ở bảng 12.5.

Bảng 12.5. Nấm mùn nâu, nấm mùn mềm và vi khuẩn phân huỷ lignin

Nấm mùn nâu <i>Fomitopsis pinicola</i> <i>Gleophyllum trabeum</i> <i>Poria placenta</i> <i>Lentinus lepideus</i> <i>Pholiota adiposa</i> <i>Spongiporus sinuosus</i> <i>Tyromyces palustris</i>	Xạ khuẩn <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Microbispora</i> sp. <i>Nocardia</i> sp. <i>Streptomyces badius</i> <i>Streptomyces cyaneus</i> <i>Streptomyces setonii</i> <i>Streptomyces viridosporus</i> <i>Thermomonospora mesophile</i>
Nấm mùn mềm <i>Chaetomium globosum</i> <i>Daldinia concentrica</i> <i>Lecythophora hoffmannii</i> <i>Petrillidium boydii</i> <i>Pialophora mutabilis</i>	Vi khuẩn khác <i>Acinetobacter</i> sp. <i>Xanthomonas</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Achromobacter</i> sp. <i>Aerobacter</i> sp. <i>Erwinia</i> sp.

Savory và đồng tác giả đã nghiên cứu quá trình phân huỷ lignin trong gỗ sồi dưới tác dụng của *Chaetomium globosum*. Mức tổn thất chất liệu gỗ tương ứng với tổn thất lignin do phản ứng demetyl hoá các đơn vị phenylpropan. Haider và đồng tác giả nhận thấy $20 \div 30\%$ $^{14}\text{CO}_2$ được giải phóng từ lignin đánh dấu trong thân cây sau bảy tuần. *Daldinia concentrica* cũng phân huỷ lignin, trong đó syringylpropan bị phân huỷ trước đơn vị guaiacylpropan.

Theo Ribbons, nhiều loài nấm mùn mềm sản sinh enzym có tác dụng phân huỷ nhóm metoxy trong axit vanilic khi có mặt NADH và oxy, tạo thành axit protocatechuic và formaldehyt.

Quá trình demetyl hoá lignin trong gỗ đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Tuy nhiên, phản ứng phân huỷ nhóm metoxy dưới tác dụng của nấm mùn mềm đối với lignin được tách ra từ gỗ thì rất ít được công bố.

Nấm mùn mềm được cho là có hoạt tính protocatehuat 3.4-dioxygenaza thấp. Hoạt tính peroxidaza yếu cũng nhận thấy ở *C. cellulolyticum* và *C. piluliferum*.

Các loại nấm mùn nâu tấn công lignin cũng được liệt kê ở bảng 12.5. Nấm mùn nâu thích tấn công vào gỗ lá kim. Chúng phá huỷ mạnh các polysaccarit của gỗ, nhưng chỉ phân huỷ một phần lignin. Ở giai đoạn cuối của quá trình phá huỷ gỗ, phần còn lại chỉ là khối chất có màu nâu, chủ yếu là lignin.

Sự biến đổi của lignin ở mức độ thấp dưới tác dụng của nấm mùn nâu bao gồm các quá trình sau:

- Demetoxyl hoá (hoặc demetyl hoá):
- Hydroxyl hoá nhân thơm;
- Oxy hoá mạch propan với mức độ hạn chế.

Các loại nấm này hầu như không phá huỷ vòng thơm.

Theo Ander và đồng tác giả, nấm mùn nâu có khả năng phân huỷ và chuyển hoá metoxy ở nhân thơm của axit vanilic và axit ferulic. Các loại nấm này chuyển hoá nhóm metoxy thành metanol, trong khi đó, nấm mùn mềm giải phóng ra formaldehyt làm sản phẩm khởi nguồn.

Nấm mốc nâu cũng giống như nấm mốc trắng, có khả năng decarboxyl hoá vanilat thành metoxyhydroquinon. Enzym vanilat hydroxylaza xuất hiện ở nấm mốc trắng và nấm mốc nâu nhưng không có mặt trong trường hợp nấm mốc mềm.

Theo Tanaka và đồng tác giả, phần lớn nấm mốc nâu tạo ra etylen từ axit 2-xeto-4-methiolbutyric. Phản ứng này được sử dụng để đánh giá hoạt tính phân huỷ lignin.

Theo một số tác giả, có ít nhất bốn tác nhân phi enzym tham gia vào quá trình phân huỷ lignin dưới tác dụng của nấm mốc nâu. Đó là axit oxalic, siderophore, tác nhân Fenton (dẫn tới hình thành gốc tự do hydroxyl) và glycopeptit. Song cơ chế theo đó các tác nhân này hoạt động cùng với enzym chưa được làm sáng tỏ.

Nấm mốc trắng, dựa trên phương thức tiết ra enzym ngoại bào, được chia thành sáu nhóm (theo Hattaka) hoặc bốn nhóm (theo Tuor và đồng tác giả). Cả hai cách phân loại có một số trùng lặp và một số ngoại lệ đối với các giống khác nhau về năng lực sản sinh enzym này hoặc enzym khác. Eggert - Eriksson, 1996, phân loại nấm mốc trắng theo hướng tránh lẫn lộn giữa chúng. Bảng 12.4 liệt kê nấm mốc trắng được phân loại dựa trên khả năng sản sinh enzym.

Các vi khuẩn phân huỷ lignin ít được chú ý hơn so với nấm. Đa số công trình nghiên cứu liên quan tới các loài thuộc giống *Pseudomonas* và xạ khuẩn (hình tia).

Theo Kern, vi khuẩn nhìn chung chỉ phân huỷ một phần lignin đánh dấu ^{14}C . Các xạ khuẩn được cho là có khả năng phân huỷ lignin mạnh hơn, mặc dầu không nhanh và không toàn diện như đối với nấm.

Nhiều loài vi khuẩn gram âm (bảng 12.5) thuộc giống *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter* và *Erwinia* có khả năng phân huỷ lignin. Song phần lớn hiểu biết hiện nay đều dựa trên các công trình nghiên cứu về các giống *Xanthomonas* và *Pseudomonas*. Một loài *Xanthomonas* có khả năng chuyển hoá 30% DHP đánh dấu ^{14}C thành $^{14}\text{CO}_2$. Song lignin cao phân tử chỉ phân huỷ khi khối lượng phân tử nhỏ hơn 1000 Da. Hiện tượng này, theo Kern, liên quan tới enzym nội bào phân huỷ lignin.

P. fluorescens tạo ra enzym phân ly benzaldehyt có khả năng phân huỷ liên kết axylain của các hợp chất 1.2-diaryletan anisoin và benzoin.

Một số loài *Pseudomonas* cũng có khả năng phân huỷ biphenyl qua oxy hoá thành 2.3-dihydroxyphenyl và 2-hydroxy-6-oxy-phenylhexa-2.4-dienoate thành axit benzoic.

P. paucimobilis sản sinh enzym protocatechuat-4.5-dioxygenaza làm xúc tác phá vỡ vòng protocatechuat và axit 3-metylalic, một chất trung gian của quá trình chuyển hoá các chất mô phỏng lignin có cấu trúc biphenyl.

Các xạ khuẩn (bảng 12.5) phân huỷ lignin của loài thân cỏ bằng cách tách ra các mảnh lignin hoà tan trong nước. Các sản phẩm phân huỷ lignin này gọi là lignin cao phân tử có khả năng kết tủa bằng axit (APPL). APPL không bị chuyển hoá tiếp dưới tác dụng của xạ khuẩn. Sự hình thành APPL có lẽ là đặc tính duy nhất có của các vi sinh vật này. Nét đặc trưng này chủ yếu nhận thấy ở *Streptomyces* và *Thermomonospora*.

Enzym lignin peroxidaza từ *S. viridosporus* làm xúc tác phân huỷ liên kết C-C ở phần nhánh propan trong chất mô phỏng dạng phenolic (OH phenol tự do) và dạng phi phenolic (OH phenol bị thế) khi có mặt H_2O_2 . Enzym này cũng oxy hoá lignin cao phân tử, thể hiện qua mức tiêu hao nhanh H_2O_2 khi thêm enzym tinh chế vào lignin. Ngoài ra, theo Deobald, *S. viridosporus* cũng tạo ra enzym phân huỷ axit thơm và enzym oxy hoá aldehyt thơm.

Ball và đồng tác giả đã tuyển chọn 20 xạ khuẩn có hoạt tính phân huỷ lignin, trong đó, *S. badius*, *T. mesophile* và *S. cyaneus* là các tác nhân phá huỷ lignin mạnh nhất.

S. badius tiết ra bốn peroxidaza ngoại bào, tương tự với enzym từ *S. viridosporus*. Việc phát hiện ra enzym LiP ngoại bào từ một số loài *Streptomyces* chứng tỏ rằng các xạ khuẩn này tấn công lignin theo cách tương tự với nấm mùn trắng.

S. viridosporus cũng tạo ra một hoặc nhiều enzym ngoại bào oxidaza phát sinh H_2O_2 . Tuy nhiên, chưa có bằng chứng nào chứng tỏ các enzym này cung cấp H_2O_2 cho LiP phân huỷ lignin.

12.3.2. Các enzym phân huỷ lignin

Trong số các enzym phân huỷ lignin, peroxidaza, laccaza và oxidaza phát sinh H_2O_2 là các tác nhân sinh học được nghiên cứu nhiều nhất.

Peroxidaza (LiP và MnP) và laccaza được Eriksson và đồng tác giả, 1990, định nghĩa là phenol oxidaza. Các phản ứng xúc tác diễn ra dưới tác dụng của các enzym này rất giống nhau. Các xúc tác này oxy hoá hợp chất có cấu trúc phenolic, nhờ tạo ra gốc tự do phenoxy, trong khi đó, cấu trúc phi phenolic (phenol thế ở nhóm OH đính với C_4) bị oxy hoá thành cation - gốc tự do tương ứng. Các phenol oxidaza oxy hoá tất cả các hợp chất có cấu trúc phenolic, nhưng đối với các cấu trúc phenol thế, các enzym khác nhau cần các cơ chất khác nhau.

LiP và MnP từ *P. chrysosporium* đã được kết tinh và nghiên cứu cấu trúc. Đối với laccaza, chưa có nhiều công trình nghiên cứu kỹ về cấu tạo.

Cấu trúc về phương diện tinh thể học của LiP từ *P. chrysosporium* đã được nghiên cứu ở các mức phân giải khác nhau: 0,20, 0,25 và 0,26 nm. Mô hình này bao gồm 343 aminoaxit, một phân tử phức sắt và ba gốc saccarit. Theo cấu trúc tinh thể, LiP tạo thành chủ yếu từ các cấu trúc xoắn, với các vùng tách biệt ở về hai phía của phức sắt có tác dụng xúc tác.

LiP cũng chứa bốn cầu nối disulfua tạo thành từ tám gốc xystein và có hai ion canxi tham gia vào cấu trúc. Các ion này có lẽ đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì tính toàn vẹn của tâm hoạt động.

MnP có các chuỗi tương tự LiP. Song, về loại enzym MnP chỉ mới có những thông tin sơ lược, chưa có nhiều thông báo chi tiết như đối với LiP.

Đối với laccaza cũng vậy, các nhà nghiên cứu đang cố gắng kết tinh enzym này để nghiên cứu cấu trúc của chúng.

12.3.2.1. Lignin peroxidaza

Lignin peroxidaza LiP (ligninaza) lần đầu tiên được phát hiện khi nuôi cấy *P. chrysosporium* (Glenn - Tien công bố 1983). LiP là cấu tử chủ yếu của hệ enzym phân huỷ lignin.

Enzym này làm xúc tác cho hàng loạt phản ứng, trong đó có phản ứng phân huỷ liên kết ete β -O-4 và liên kết C_{α} - C_{β} trong trường hợp chất mô phỏng dime của lignin.

LiP cũng xúc tiến quá trình decarboxyl hoá axit phenylacetic, oxy hoá rượu có OH ở C_{α} thành hợp chất C_{α} -oxo, hydroxyl hoá, tạo thành quinon và xúc tác cho phản ứng mở vòng thơm.

Lignin peroxidaza phản ứng với cơ chất qua hai giai đoạn oxy hoá kế tiếp chuyển dịch một điện tử, hình thành cation - gốc tự do trung gian. Do thế oxy hoá khủ cao, LiP cũng có thể oxy hoá đơn vị mất xích của lignin (phenylpropan) ở dạng không phenolic.

Một số công trình nghiên cứu đã chỉ ra vai trò quan trọng của lignin peroxidaza trong quá trình phân huỷ lignin và các thực vật chứa lignin. Enzym này có thể phân giải lignin trong dung dịch loãng, oxy hoá và phân huỷ hàng loạt dime và oligome tương ứng với các cấu trúc của lignin trong điều kiện phòng thí nghiệm, xúc tác cho quá trình tạo ra các phân tử oxy hoạt tính.

Các nghiên cứu về tác dụng oxy hoá của LiP đối với DPH đã khẳng định rằng lignin peroxidaza tham gia vào giai đoạn đầu phân huỷ lignin.

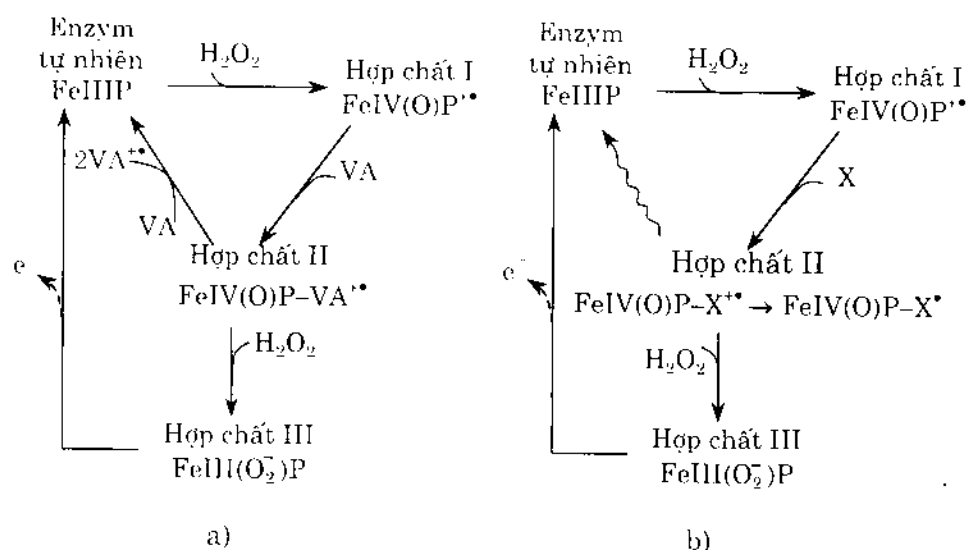
Lignin peroxidaza có chu trình xúc tác tương tự với chu trình hoạt động của peroxidaza khác trong một số thực vật.

Năm giai đoạn oxy hoá khủ của LiP đã được nhiều nhà sinh học nghiên cứu và mô tả thành chu trình hoạt động xúc tác (sơ đồ 12.2).

Ở chu trình xúc tác của LiP, ion Fe^{3+} trong enzym tự nhiên đầu tiên bị oxy hoá bởi H_2O_2 chuyển thành hợp chất I. Sau đó, phản ứng khủ chuyển dịch một điện tử diễn ra giữa hợp chất I và rượu veratrylic, hoặc H_2O_2 thể hiện vai trò oxy hoá, dẫn tới hợp chất II.

Phản ứng khử hợp chất II chuyển dịch một điện tử lại diễn ra với rượu veratrylic, đưa enzym trở lại trạng thái tự nhiên. Theo phương thức này, chu trình xúc tác của LiP được duy trì.

Song, cạnh tranh với cơ chất có tính khử, hợp chất II phản ứng với H_2O_2 và hình thành hợp chất III, với hoạt tính xúc tác yếu hơn. Hợp chất III ổn định, trở nên không hoạt hoá khi có mặt H_2O_2 . Các tác giả nhận thấy hợp chất III có thể trở lại dạng enzym ban đầu một cách tự động hoặc khi có mặt H_2O_2 và rượu veratrylic. Xúc tác LiP lại sẵn sàng cho chu trình mới.



Sơ đồ 12.2. Chu trình xúc tác của LiP thể hiện (a) quá trình oxy hoá, với sự tham gia của veratryl alcol VA và (b) điều khiển liên hệ ngược (phản hồi), với sự tham gia của hợp chất phenolic X.

(Theo Harvey và đồng tác giả, 1993).

Sự phát sinh gốc tự do phenoxy khi oxy hoá các cơ chất phenolic trong quá trình demetoxyl hoá và trong phản ứng làm đứt liên kết etc là nguyên nhân dẫn tới tái trùng hợp lignin dưới tác dụng của LiP.

Phản ứng oxy hoá hợp chất phenolic dẫn tới ức chế hoạt động của

LiP. Quá trình ức chế này có thể khắc phục bằng cách giảm hàm lượng H_2O_2 so với phenol và enzym. Ngoài ra, lignin peroxidaza ưa tấn công vào hợp chất phenolic hơn so với rượu veratrylic. Như vậy, để đạt được tổng chuyển hoá cực đại của enzym và oxy hoá các hợp chất phi phenolic, hàm lượng hợp chất phenolic bên cạnh LiP phải giữ ở mức thấp.

Harvey và đồng tác giả cho rằng rượu veratrylic bị oxy hoá thành cation - gốc tự do, có khả năng tham gia vào quá trình chuyển điện tích giữa các phân tử. Dựa vào tính chất này của cation - gốc tự do, có thể quan niệm rằng các cation - gốc tự do của veratrylic - sản phẩm của quá trình xúc tác LiP - đóng vai trò trung gian trong phản ứng oxy hoá lignin. Ngoài ra, các cation - gốc tự do này có thể đóng vai trò hỗ trợ trong phản ứng của hợp chất II với chất khử, nhờ thế duy trì chu trình hoạt động của peroxidaza.

Phản ứng khử LiP dưới dạng hợp chất II thành enzym tự nhiên dẫn tới giải phóng hai cation - gốc tự do của cơ chất (sơ đồ 12.2a).

Cơ chế mà theo đó các cation - gốc tự do của cơ chất xúc tiến phản ứng khử hợp chất II chưa được làm sáng tỏ. Các cation - gốc tự do có thể là phương tiện chuyển điện tích khỏi khu vực lân cận của porphyrin để giảm thiểu cơ hội hình thành gốc tự do bên cạnh tâm hoạt động của LiP. Hiện tượng này chắc không xảy ra với gốc tự do phenoxy, phân tử không có khả năng tham gia vào phản ứng chuyển điện tích. Sự xuất hiện của chúng sẽ dẫn tới kìm hãm hoạt động của LiP (sơ đồ 12.2b).

Kết quả nghiên cứu từ nhiều nguồn khác nhau đã chỉ ra rằng rượu veratrylic có thể vừa đóng vai trò chất ổn định LiP vừa là chất trung chuyển điện tích.

12.3.2.2. Mangan peroxidaza

Mangan peroxidaza (MnP), một peroxidaza khác tìm thấy trong môi trường nuôi cấy *P. chrysosporium*, được Kuwahara và đồng tác giả phát hiện và công bố vào 1984.

Enzym này hoạt động như một phenol oxidaza trên cơ chất phenolic bằng cách sử dụng Mn^{3+}/Mn^{2+} làm cặp oxy hoá khử trung gian.

MnP cũng phát sinh H_2O_2 khi oxy hoá glutathion, NADPH và axit dihydroxy - malic. Song sự phát sinh H_2O_2 không phải là chức năng chủ yếu của MnP. Nhiệm vụ chính của enzym này là tham gia vào phản ứng oxy hoá hợp chất phenol cũng như cấu trúc phenolic của lignin (có OH phenol tự do).

Mangan peroxidaza oxy hoá Mn^{2+} thành Mn^{3+} khi có mặt tác nhân tạo phức càng cua (chelate) và có lẽ Mn^{3+} cũng tạo phức càng cua trước khi oxy hoá cơ chất phenolic. Nhiều axit hữu cơ là chất tạo phức càng cua tốt. Năm mùn trắng là nhà cung cấp axit oxalic, malonic, pyruvic và malic. $Mn^{3+}/oxalat$ và $Mn^{3+}/malonat$ tạo ra phức càng cua rất bền, các phức này có lẽ cũng hoạt động trong tự nhiên.

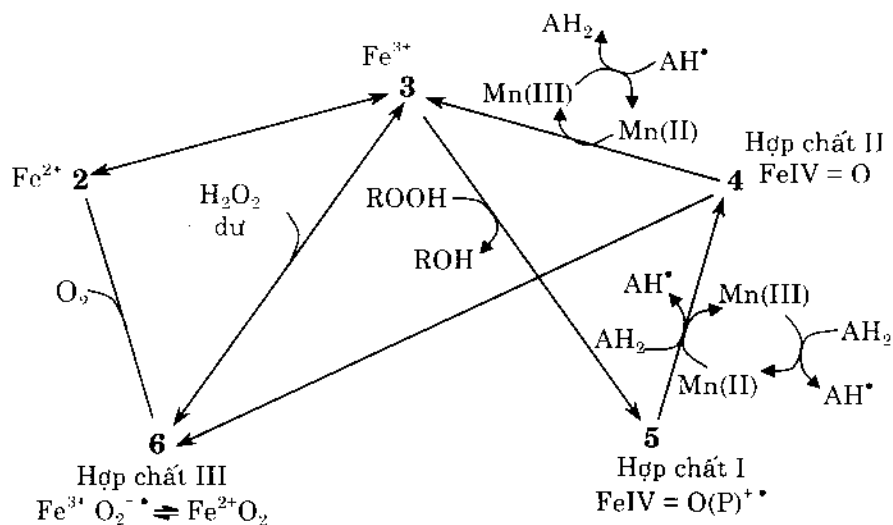
Malonat tạo điều kiện thuận lợi để phân ly Mn^{3+} từ enzym. Hợp chất này có hằng số liên kết với Mn^{2+} tương đối thấp (hằng số không bền lớn).

MnP có chu trình xúc tác rất giống với chu trình hoạt động của LiP. Song, trong trường hợp này, hợp chất II dễ dàng bị khử bởi Mn^{2+} thành enzym tự nhiên để hoàn thành chu trình xúc tác (sơ đồ 12.3).

Phức của Mn^{3+} có thể oxy hoá các cấu trúc phenolic của lignin nhờ hoạt động như một chất trung gian (môi giới) giữa enzym và polyme, dẫn tới hình thành gốc tự do phenoxy. Sau đó, liên kết $C_{\alpha}-C_{\beta}$ bị đứt hoặc liên kết alkyl - phenyl bị phân huỷ, tạo thành các sản phẩm giải trùng hợp, bao gồm cả hợp chất dạng quinon và hydroquinon.

Theo Wariishi và Lackner, mangan peroxidaza tinh chế có thể depolyme hoá DHP và phân huỷ clolignin phân tử lượng lớn.

MnP xuất hiện sớm hơn LiP khi nuôi cấy *P. chrysosporium*. MnP có thể oxy hoá các phần cấu trúc phenolic của lignin, trong khi đó LiP phân huỷ cấu trúc phi phenolic. Như vậy, nếu điều kiện thuận lợi MnP phối hợp với LiP hình thành hệ enzym hoạt tính cao, có khả năng phân huỷ vật liệu gỗ và phi gỗ giàu lignin.



Sơ đồ 12.3. Chu trình xúc tác của mangan peroxidaza (MnP) và năm trạng thái oxy hoá. AH₂ là cơ chất phenolic.
(Theo Gold và đồng tác giả, 1987).

Theo Waldner, Nerud và Vias, một số loài nấm mùn trắng có khả năng sản sinh peroxidaza khác với MnP và LiP. Các enzym này được gọi là peroxidaza không phụ thuộc mangan (MIP). Tuy nhiên, các thông tin về hoạt động của MIP vẫn còn sơ lược.

12.3.2.3. Laccaza

Laccaza (benzendiol:O₂ oxidoreductaza) cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ lignin.

Enzym này được tạo ra từ phần lớn nấm mùn trắng. Dạng cấu thành và dạng cảm ứng của laccaza đều đã được nghiên cứu. Tất cả các laccaza là glycoprotein. Theo Sariaslani, các enzym này chứa bốn ion đồng. Các ion đồng phân bố ở ba vị trí liên kết khác nhau; mọi ion đồng đều đóng vai trò quan trọng trong cơ chế xúc tác.

Laccaza là phenol oxidaza thực thụ, có tính đặc hiệu rộng đối với các hợp chất thơm chứa nhóm hydroxyl và amin. Enzym này oxy hoá hợp chất kiểu phenol cũng như các phần cấu trúc phenolic của lignin

bằng cách tách một điện tử, tạo thành gốc tự do. Các gốc tự do sau đó có thể tái trùng hợp hoặc tiếp tục depolyme hoá.

Laccaza làm xúc tác cho phản ứng phân huỷ nhóm metoxy của đơn vị phenylpropan. Enzym này cũng làm đứt liên kết $C_{\alpha}-C_{\beta}$. Kawai nhận thấy laccaza cũng xúc tác cho phản ứng phá vỡ vòng thơm theo cách tương tự như ở LiP. Laccaza nguồn gốc *C. versicolor* chuyển 4,6-di-*tert*-butylguaiacol thành sản phẩm mạch hở, dẫn xuất muconolacton-2,4-di(*tert*-butyl)-4-(metoxy cacbonylmetyl)-2-buten-4-olid. Công trình nghiên cứu này chứng tỏ ^{18}O tham gia vào muconolacton là từ phân tử oxy $^{18}O_2$, không phải từ phân tử nước $H_2^{18}O$. Như vậy, laccaza cũng như LiP có thể phân huỷ vòng thơm.

Qua nghiên cứu phản ứng phân huỷ mạch nhánh propan và mở vòng các hợp chất mô phỏng lignin, nhóm tác giả nhận thấy cả laccaza và LiP - loại xúc tác oxy hoá chuyển một điện tử cả dạng phenolic và phi phenolic - đều tham gia vào giai đoạn đầu phân huỷ chất mô phỏng lignin.

Cho đến 1990, laccaza được coi là chỉ có khả năng phân huỷ cấu trúc phenolic của chất mô phỏng lignin. Song, Bourbonnais và Paice nhận thấy laccaza từ *T. versicolor* cũng tham gia vào quá trình phân huỷ cấu trúc phi phenolic, khi có mặt chất môi giới oxy hoá khử thích hợp, như chất màu 2,2'-azino-bis(3-etylthiazolin-6-sulfonat) (ABTS).

Các tác giả cũng nhận thấy laccaza cùng với ABTS có thể phân huỷ lignin trong bột xenluloza kraft (Bourbonnais, 1992). Sự có mặt của chất môi giới đã ngăn ngừa phản ứng tái trùng hợp lignin trong xenluloza kraft dưới tác dụng của *T. versicolor*.

Một số hợp chất phenolic khác cũng thể hiện vai trò của chất môi giới. Quá trình delignin hoá và tẩy trắng bột xenluloza kraft có thể diễn ra với chất môi giới 1-hydroxybenzotriazol (HBT) (Call, 1994). Theo Eggert, 1996, chất môi giới cho hoạt động oxy hoá khử của laccaza cũng có thể thu được từ nấm mùn trắng *Pycnoporus cinnabarinus*.

Laccaza và các phenol oxidaza khác hoạt động phối hợp với các enzym khác. Enzym nội bào khử quinon dựa vào NAD(P)H nhận được

từ *P. chrysosporium*. Các enzym này có thể là một bộ phận của hệ chuyển hoá, tạo thuận lợi cho nấm sử dụng các mảnh lignin để phân huỷ chúng ở bên trong tế bào nấm.

Phản ứng của laccaza với các phân có khối lượng phân tử lớn của lignosulfonat khi có mặt glucoza oxidaza đã tạo điều kiện tiến hành giải trùng hợp nhiều hơn là trùng hợp. Theo Szklarz, glucoza oxidaza làm giảm khả năng của laccaza phát sinh hợp chất trung gian quinon.

Phản ứng khử gốc tự do phenoxy và hợp chất quinon diễn ra nhanh nhờ laccaza phối hợp hoạt động với các enzym oxidoreductaza có thể là phương thức chuyển dịch cân bằng polyme hoá/ depolyme hoá về phía giải trùng hợp.

Galliano nhận thấy laccaza hoạt động phối hợp với MnP để tăng hiệu quả quá trình phân huỷ lignin đánh dấu phóng xạ.

Arachibald nhận được phức cang của Mn^{3+} từ Mn^{2+} dưới tác dụng của *T. versicolor*. Một aryl alcol oxidaza dựa vào FAD (veratryl alcol oxidaza, VAO) có khả năng khử DCPIP guaiacyl quinonoit và gốc tự do phenoxy sinh ra bởi laccaza, đồng thời oxy hoá veratryl alcol thành aldehyt veratrylic. Hoạt động hợp tác của laccaza và VAO có thể ngăn ngừa phản ứng trùng hợp các chất phenolic và giải trùng hợp khá mạnh lignosulfonat hoà tan.

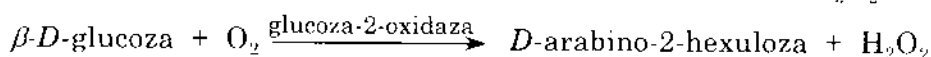
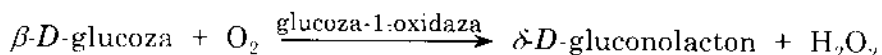
Các công trình nghiên cứu vẫn còn tiếp tục để làm sáng tỏ vai trò của laccaza phối hợp các enzym khác trong quá trình phân huỷ lignin.

12.3.2.4. Các enzym phát sinh H_2O_2

Nấm mùn trắng cũng tạo ra một số enzym có khả năng phát sinh H_2O_2 .

Các enzym nội bào là glucoza-1-oxidaza, glucoza-2-oxidaza, metanol oxidaza và axyl - CoA oxidaza. Các enzym ngoại bào phát sinh H_2O_2 là glyoxal oxidaza. Các enzym này được *P. chrysosporium* tiết ra, còn aryl - alcol oxidaza được sản sinh từ *T. versicolor*, *P. sajor caju*, *P. ostreatus* và *P. adusta*.

Glucosa oxidaza có thể xúc tác cho các phản ứng sau, tạo thành H_2O_2 :



Metanol oxidaza oxy hoá metanol thành formaldehyt và H_2O_2 . Ngoài metanol, etanol cũng bị oxy hoá thành axetaldehyt.

Glyoxal oxidaza (GLOX) đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh H_2O_2 , vì enzym này oxy hoá một số aldehyt và hợp chất α -hydroxy cacbonyl là các sản phẩm chuyển hoá thứ cấp. Kurek, 1995, cho rằng GLOX có vai trò điều tiết quá trình phân huỷ lignin dưới tác dụng của peroxidaza. GLOX không hoạt tính có thể được hoạt hoá khi kết hợp LiP, với veratryl alcol làm cơ chất cho LiP.

Aryl alcol oxidaza oxy hoá rượu thơm thành aldehyt và khử O_2 thành H_2O_2 .

Ngoài ra, MnP cũng phát sinh H_2O_2 khi làm xúc tác cho phản ứng oxy hoá NADP(H), glutathion, dithiothreitol và axit dihydroxymaleic.

12.3.2.5. Oxidoreductaza

Các enzym khác góp phần quan trọng trong quá trình phân huỷ lignin là NAD(P)H: quinon oxidoreductaza, aryl alcol dehydrogenaza và có thể cả CDH(CBQ).

P. chrysosporium sản sinh ít nhất hai enzym nội bào, đó là NAD(P)H: quinon oxidoreductaza. Các enzym này khử metoxyquinon bằng cách sử dụng NADH hoặc NADPH làm chất nhường điện tử.

Laccaza có thể tương tác với enzym này làm tăng phản ứng decarboxyl hoá hợp chất mô phỏng lignin.

Ngoài ra, glucosa-1-oxidaza từ *C. versicolor* có thể hoạt động như glucosa: quinon oxidoreductaza và sử dụng quinon cũng làm cơ chất (co-substrate) thay cho O_2 khi áp lực oxy thấp.

CDH hoặc CBQ (sản phẩm phân giải protein của CDH), không nghi ngờ gì nữa, đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ lignin. Nhưng khi được phát hiện lần đầu tiên CBQ được cho là đóng

vai trò kết nối trong quá trình phân huỷ xenluloza và lignin. Hai enzym CDH và CBQ có khả năng khử nhiều loại chất nhận điện tử, bao gồm dạng quinon, gốc tự do phenoxyl và cation - gốc tự do, ion sắt ở dạng phức, hợp chất II của LiP, MnP và oxy phân tử (bảng 12.6). Phản ứng khử quinon diễn ra nhanh hơn nhiều so với khử oxy. Oxy bị khử từ từ thành superoxit hoặc H_2O_2 .

CDH tham gia phân huỷ lignin theo các hướng sau:

- Khử quinon để tránh ngộ độc xúc tác (Westmark - Eriksson, 1974):
- Khử gốc tự do phenoxyl để ngăn ngừa tái trùng hợp (Samejima - Eriksson, 1992):
- Khử hợp chất II của LiP và MnP (Ander - Duarte, 1993):
- Sản sinh gốc tự do hydroxyl $HO^\bullet$ để phân huỷ lignin và các cấu tử khác của gỗ (Henriksson - Pettersson, 1995):
- Hỗ trợ hoạt động của MnP bằng cách chuyển MnO_2 (dạng rắn) thành dạng hoà tan và sản sinh tác nhân tạo phức càng cua (chelate) cho ion mangan (Roy - Misiak, 1994).

Bảng 12.6. Chất nhận điện tử cho CDH (CBO) và CBQ

ABTS cation - gốc tự do	3-Metoxyl-5- <i>tert</i> -butyl benzoquinon
Cation - gốc tự do 4-aminopyridin	2-Metoxyl-benzoquinon
Xerulignol	Metylen xanh
Xytochrom c	Mn^{3+} malonat
2,6-Diclophenol-indophenol	Osmi (III)
Ferixyanua	Gốc tự do TMB
Ferixetat	Tetrametoxyl-azo- <i>p</i> -metylenquinon
Ferixitrat	Gốc tự do phenoxyl của axit vanilic
Gốc tự do guaiacyl phenoxyl	Cation - gốc tự do veratryl alcol
Oxy	

12.3.3. Phương pháp thực nghiệm đối với enzym phân huỷ lignin

Các phương pháp thực nghiệm đối với enzym phân huỷ lignin được nêu tóm tắt ở bảng 12.7.

Hoạt tính của lignin peroxidaza (LiP) thường được xác định trong hỗn hợp phản ứng chứa veratryl alcol và H_2O_2 , với chất đệm thích hợp. Phản ứng này được khởi nguồn bằng cách thêm H_2O_2 . Phản ứng oxy hoá veratryl alcol thành aldehyt veratrylic được ghi nhận ở 310nm.

Bảng 12.7. Phương pháp xác định hoạt tính của enzym phân huỷ lignin

Enzym	Cơ chất	Xác định tại độ dài sóng, nm
Lignin peroxidaza	Veratryl alcol H_2O_2	310
Mangan peroxidaza	Vanilylaxeton	336
	Phenol đỏ	610
	MBTH và DMAB	590
	H_2O_2	
Laccaza	Syringaldehyt	525
	ABTS	436
	MBTH và DMAB	590
Xenlobioza: quinon oxidoreductaza	DCPIP	600
	MTBBQ	(giảm hấp thụ)
	Xenlobioza	
Xenlobioza oxidaza (CBO / CDH)	Xytochrom c	550
	Xenlobioza	

Ghi chú: ABTS: 2,2'-azino-bis (3-etylbenzothiazolin)-6-sulfonat;

MBTH: 3-metyl-2-benzothiazolin hydrazon;

DMAB: axit 3-dimetylaminobenzoic;

DCPIP: 2,6-diclophenol-indophenol

MTBBQ: 3-metyl-5-*tert*-butyl-benzoquinon

Hoạt tính của mangan peroxidaza (MnP) được xác định theo một số phương pháp. Song phần lớn các phương pháp này đều có nhược điểm, kể cả thiếu định nghĩa về đơn vị hoạt tính, độ nhạy thấp... Phương pháp thường được áp dụng nhất là dựa trên sự biến mất của cơ chất (vanilylaxeton) tại 336nm.

Hỗn hợp phản ứng chứa vanilylaxeton, H_2O_2 và $MnSO_4$ trong một chất đệm thích hợp. Phản ứng khởi đầu bằng cách thêm peroxit. Sự giảm tuyến tính độ hấp thụ được ghi nhận ở độ dài sóng đã cho.

Phương pháp khác là dùng phenol đỏ trong chất đệm succinat chứa H_2O_2 , $MnSO_4$, gelatin và lactat. Một thể tích xác định hỗn hợp phản ứng được lấy ra sau khoảng thời gian một phút và thêm vào dung dịch NaOH. Phenol đỏ bị oxy hoá được xác định tại 610 nm.

Pillar Castillo và đồng tác giả, 1994, đề xuất phương pháp mới xác định hoạt tính của MnP. Thực nghiệm dựa trên phản ứng oxy hoá MBTH và DMAB khi có mặt H_2O_2 , Mn^{2+} và MnP, tạo ra màu với giải hấp thụ rộng và peak ở 590nm. Phương pháp này cho phép xác định được cả hoạt tính ở mức thấp.

Hoạt tính của laccaza thường được xác định dựa vào phản ứng oxy hoá syringaldehyt thành dạng quinon ở 525 nm. Hấp thụ phân tử của màu tạo thành rất mạnh. Song syringaldehyt kém tan trong nước nên cần có nồng độ alcol cao.

Hoạt tính laccaza cũng được xác định dựa trên ABTS, bằng cách ghi nhận tiến trình oxy hoá ở 436 nm. Song, nếu peroxidaza và các oxidaza khác có mặt cùng với laccaza, khó khăn sẽ xuất hiện, vì một số oxidaza phát sinh H_2O_2 , ảnh hưởng tới quá trình phân tích.

Lanergan và Baker, 1995, đề xuất phương pháp xác định laccaza dựa vào phản ứng kết hợp 3-metyl-2-benzothiazolin hydrazon (MBTH) và axit 3-dimetylaminobenzoic (DMAB). Trước khi xác định hoạt tính, mẫu được xử lý bằng catalaza để phân huỷ hydro peroxit và nhờ đó giảm thiểu hoạt tính peroxidaza.

Hoạt tính CBO (CDH) và CBQ được đánh giá trên cơ sở xác định khả năng khử đối với chất nhận điện tử thích hợp. Cả CDH và CBQ có

thể sử dụng DCPIP làm chất nhận điện tử, trong khi đó, chỉ CDH có khả năng khử xytochrom c.

Hoạt tính khử của DCPIP được xác định ở 30°C, trong hỗn hợp phản ứng chứa xenlobioza và DCPIP với chất đệm thích hợp. Sự giảm hấp thụ ở 600nm được ghi nhận. Một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là số lượng enzym cần thiết để khử một μmol cơ chất trong một phút.

Hoạt tính khử xytochrom c được xác định với hỗn hợp phản ứng chứa xenlobioza và cytochrom c trong chất đệm thích hợp. Hoạt tính được xác định ở 30°C khi tăng hấp thụ ở 550nm. Một đơn vị hoạt tính khử xytochrom c được định nghĩa là số lượng enzym cần thiết để khử một μmol cơ chất trong một phút.

12.3.4. Khả năng ứng dụng công nghệ sinh học dựa trên các loại enzym phân huỷ lignin

Các enzym phân huỷ lignin do nấm mốc trắng sinh ra có tính đặc hiệu đối với cơ chất trong khoảng rộng. Do đó, chúng có tiềm năng sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau, như liệt kê ở bảng 12.8.

Lignin peroxidaza, mangan peroxidaza và laccaza có nguồn gốc từ nấm mốc trắng đã và đang được nghiên cứu để ứng dụng trong lĩnh vực tẩy trắng bột xenluloza. Sau khi xử lý bằng hỗn hợp enzym phân huỷ lignin, số kappa có thể giảm $20 \div 30\%$.

LiP từ *P. chrysosporium* đã được xem xét để ứng dụng trong quá trình tẩy trắng bột xenluloza. MnP và laccaza từ *T. versicolor* cũng được sử dụng để tẩy trắng bột giấy. Các enzym này cũng tìm thấy ở các loài nấm mốc trắng khác.

Paice và đồng tác giả nhận thấy MnP làm sạch sơ bộ có thể demetyl hoá và delignin hoá bột xenluloza với mức độ như khi sử dụng chất lọc nuôi cấy *T. versicolor* hoàn toàn không chứa tế bào.

Vào 1995, Kaneko - Murakami nhận thấy MnP tinh chế từ một loại nấm được sử dụng để tẩy trắng thành công bột xenluloza của gỗ lá rộng, thu được theo phương pháp oxy - kiềm.

Bảng 12.8. Ứng dụng vi sinh vật và enzym có khả năng phân hủy lignin

Lĩnh vực ứng dụng	Mục đích
Thực phẩm và thức ăn gia súc	Sản xuất nấm, tăng cường khả năng tiêu hoá thức ăn xơ cho động vật ăn cỏ.
Bột và giấy	Sản xuất bột bằng phương pháp sinh học, tẩy trắng bột bằng phương pháp sinh học, biến tính xơ sợi, delignin hoá dăm gỗ để giảm tiêu hao năng lượng trong sản xuất bột cơ và hoá.
Hoá chất	Chuyển hoá lignin để tạo ra các hoá chất mới.
Môi trường	Xử lý dịch thải tẩy trắng xenluloza và các chất hữu cơ độc hại như PAH, PCB và dioxin.
Biosensor	Phát hiện xenlodextrin, xác định bề mặt xenluloza của các loại bột bằng cách sử dụng CDH.

CBQ từ *T. versicolor* cũng được sử dụng để tẩy trắng bột xenluloza. Nhiều công trình nghiên cứu đã chỉ ra rằng enzym này tham gia vào phản ứng khử các sản phẩm oxy hoá của laccaza hoặc peroxidaza, như hợp chất dạng quinon, gốc tự do phenoxy và Mn^{3+} .

Phương pháp tiếp cận khác, như sử dụng chất môi giới oxy hoá khử thích hợp, để đẩy mạnh quá trình delignin hoá và tẩy trắng bằng laccaza cũng đã được nhiều tác giả đề xuất. Các chất môi giới có hiệu quả đối với laccaza dùng để tẩy trắng bột bằng enzym đã được áp dụng trong thực tế.

Hệ enzym phân huỷ lignin dựa trên *P. chrysosporium* cũng có khả năng phân huỷ nhiều chất hữu cơ gây ô nhiễm môi trường. Dẫn xuất phenol chứa halogen cũng bị oxy hoá và chuyển hoá tiếp thành sản phẩm oligome hoặc polyme, thường ít độc hại hơn so với các chất ban

dầu. Các hydrocacbon thơm phân tử lượng lớn (PAH) được sử dụng để nghiên cứu quá trình oxy hoá - phân huỷ dưới tác động của nấm mùn trắng và enzym của chúng là anthracen, metylantraxen, florentren, biphenyl, phenantren, pyren, benzopyren, floren, axenaphten, một số chất thơm đơn vòng và các cấu tử PAH của dầu anthracen chưng cất từ nhựa than đá.

Do có thể oxy hoá khử lớn, lignin peroxidaza từ *P. chrysosporium* được đề xuất sử dụng trong quá trình xử lý sinh học các dẫn xuất clo của hydrocacbon, như DDT, CCl₄, TCDD và PCB.

Việc sử dụng enzym tự do có một số nhược điểm. Đó là kém ổn định nhiệt, mẫn cảm với sự tấn công của proteaza, giảm hoạt tính cũng như khó khăn trong việc tách và sử dụng lại sau khi hoàn thành phản ứng.

Phenol oxidaza được cố định thành công trên chất mang nguồn gốc tự nhiên và tổng hợp, như đất, đất sét, hạt thủy tinh xốp. Nhờ thế, ta có thể khắc phục được một số khó khăn như đã kể trên.

Laccaza cố định trên chất mang đã được sử dụng trong thực tế để tách chất màu từ nước thải công nghiệp chứa hợp chất phenol.

Gần đây, phenol oxidaza cố định trên chất mang cũng hoạt động rất hiệu quả trong quá trình tách các chất thơm tồn tại trong tự nhiên khỏi dung dịch nước.

LiP sản sinh từ *P. chrysosporium* cũng được dùng làm mất màu một số loại thuốc nhuộm trong nước thải. Sự có mặt của veratryl alcol có tác dụng xúc tiến phản ứng oxy hoá thuốc nhuộm azo.

Hoạt tính của laccaza và peroxidaza phá huỷ chất màu hứa hẹn khả năng thiết lập dây chuyền xử lý chất màu trong nước thải từ nhà máy bột và giấy.

Trong số nấm mùn trắng, *P. chrysosporium* đã được sử dụng để làm sạch dòng chất thải của dây chuyền tẩy trắng xenluloza sulfat. Một dây chuyền xử lý liên tục để tách chất màu dựa trên hoạt động của *P. chrysosporium* đã được đề xuất.

Enzym ngoại bào LiP và MnP có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình tẩy trắng. Tiềm năng của nhóm enzym LiP và MnP, đặc biệt từ *Pycnoporus sanguineus* trong quá trình khử màu chất thải từ khâu tẩy trắng đã được Esposito và Duran nghiên cứu.

Song, các công trình của Jasper và đồng tác giả, 1994, lại cho thấy MnP tinh chế làm mất màu một phần E_{11} , trong khi đó LiP không đóng vai trò gì trong quá trình này.

Biosensor dựa trên CDH / CBO cũng được Elmgren và đồng tác giả đề xuất. CDH được cố định hoặc tạo liên kết ngang trên nền polyme oxy hoá khử chứa osmi (III) gắn trên đĩa điện cực quay, đóng vai trò biosensor.

Biosensor tổ hợp trên cơ sở glucoza oxidaza cùng với CDH cũng đã được sử dụng. Biosensor được gắn vào cột sắc ký, có nhiệm vụ phát hiện xenlodextrin.

Các công trình nghiên cứu và phát triển liên quan tới enzym phân huỷ lignin đã đạt những bước tiến dài. Tiềm năng sử dụng enzym phân huỷ lignin dưới dạng đơn lẻ, hỗn hợp hoặc phối hợp với cơ chất dễ oxy hoá (chất môi giới) để tẩy trắng bột giấy là rất lớn. Vấn đề tẩy trắng bột xenluloza và xử lý chất thải theo công nghệ sinh học sẽ được đề cập kỹ hơn ở các mục sau.

12.4. PHÂN HUỶ HEMIXENLULOZA

12.4.1. Các vi sinh vật sản sinh enzym phân huỷ hemixenluloza

Hemixenlulaza rất phổ biến trong tự nhiên. Các enzym này được tạo ra nhờ hoạt động của vi sinh vật ở đất liền, trong môi trường biển, trong dạ cỏ của động vật...

Nấm, nấm men và một số vi khuẩn tiết ra hemixenlulaza ngoại bào, ngoài ra cũng có enzym nội bào hoặc gắn với màng tế bào.

Một số vi sinh vật chủ yếu có khả năng sản sinh enzym phân huỷ hemixenluloza được liệt kê ở bảng 12.9.

Bảng 12.9. Vi sinh vật sản sinh enzym phân huỷ hemixenluloza

Enzym	Vi khuẩn	Nấm
β -1,4-Xylanaza	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Cellulomonas uda</i> <i>Streptomyces xylophagus</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Aspergillus wentii</i> <i>Trichoderma koningii</i> <i>Neurospora crassa</i>
β -1,4-Xylosidaza	<i>Clostridium thermocellum</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Acetovibrio cellulolyticus</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Corticium rolfsii</i> <i>Penicillium wortmanni</i> <i>Trichoderma reesei</i>
α -Arabinosidaza	<i>Streptomyces pupurascens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Ruminococcus albus</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Corticium rolfsii</i> <i>Trichoderma reesei</i>
α -Glucuronidaza		<i>Trichoderma reesei</i> <i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>
Esteraza	<i>Fibrobacter succinogenes</i> <i>Bacteroides cellulosolvens</i> <i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus phoenicis</i> <i>Trichoderma reesei</i>
β -1,4-Mannanaza	<i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Caldocellum saccharolyticum</i> <i>Streptomyces lividans</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Thielavia terrestris</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Paecilomyces variotii</i>
β -1,4-Mannosidaza	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Thielavia terrestris</i> <i>Polyporus sulphureus</i>
α -Galactosidaza	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Cellulomonas sp.</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> <i>Aspergillus tamaris</i> <i>Mortierella vinacea</i>

Hoạt động phân huỷ hemixenluloza nói chung liên quan tới tổ hợp enzym, bao gồm hàng loạt enzym có khả năng phân huỷ nhóm thế của hemixenluloza cũng như thuỷ phân mạch chính polysaccarit. Phần lớn nấm sợi tiết ra các tổ hợp enzym thuỷ phân để đáp lại các yếu tố kích thích cảm ứng.

Các xylanaza, mannanaza, xenlulaza và các enzym liên quan khác thông thường được đồng thời tiết vào môi trường nuôi cấy. Sự cảm ứng chọn lọc của các enzym riêng lẻ không phải là cơ chế chung ở các loài nấm.

Các enzym phân huỷ hemixenluloza có nguồn gốc từ nấm đã được nghiên cứu khá chi tiết, như enzym từ các giống *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*...

Hemixenlulaza từ nấm được nghiên cứu kỹ nhất là các enzym của *A. niger*. Cấu trúc không gian ba chiều của một số xylanaza có khối lượng phân tử thấp cũng đã được Campbell, Törönen và đồng tác giả công bố. Xylanaza từ *Trichoderma* dạng elip có kích thước 3.2×4.2 nm.

Đối với nấm men, chỉ có một số ít loài có khả năng sản sinh enzym phân huỷ xylan.

Các hemixenlulaza nguồn gốc vi khuẩn ít được nghiên cứu hơn vì đã có các vi sinh vật chứa nhân chuẩn, như nấm sợi là đối tượng chính cung cấp các loại enzym này.

Phần lớn các nghiên cứu về vi khuẩn giới hạn đối với các giống *Bacillus*, *Streptomyces*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora* và *Chainia*.

Trong số xạ khuẩn (actinomycetes), các hệ enzym phân huỷ xylan của một số *Streptomyces* đã được nghiên cứu kỹ, trong khi đó, có rất ít thông tin về cấu tạo và chức năng hoạt động của enzym phân huỷ hemixenluloza sản sinh từ các xạ khuẩn khác.

Vi khuẩn kỵ khí cũng được coi là đối tượng sản sinh enzym phân huỷ hemixenluloza. Các vi khuẩn chủ yếu thuộc giống *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Acetovibrio* và *Bacteroides*.

Khan và đồng tác giả nghiên cứu sự sản sinh endoxylanaza.

xylosidaza và esteraza từ *C. Thermocellum*, *A. cellulolyticus*, *A. cellulosolvens* và *B. cellulosolvens*. Shao và các đồng sự đã tinh chế và nhận dạng hai axetylxytan esteraza, hai β -xylosidaza, một α -glucuronidaza và một endoxytanaza gắn kết với tế bào của một loài thuộc *Thermoanaerobacterium*. Sáu gen β -xylosidaza đặc trưng của *C. stercorarium* đã được tách dòng. Một trong số đó (Xyl A) ghi mã protein lưỡng chức với hoạt tính β -D-xylosidaza và α -L-arabinofuranosidaza. Song sản phẩm gen có lẽ không có hai vùng xúc tác, vì cả hai hoạt tính đều thể hiện trong một vùng xúc tác.

12.4.2. Các enzym phân huỷ hemixenluloza

Các đơn vị mắt xích (đơn vị monome) xyloza và mannoza là thành phần chủ yếu tạo nên hemixenluloza. Do cấu tạo của hemixenluloza rất phức tạp nên cần có nhiều loại enzym khác nhau để phân huỷ polysaccarit hỗn tạp này.

Hai loại enzym chủ yếu tham gia vào quá trình phân huỷ hemixenluloza là endo-1,4- β -D-xytanaza và endo-1,4- β -D-mananaza.

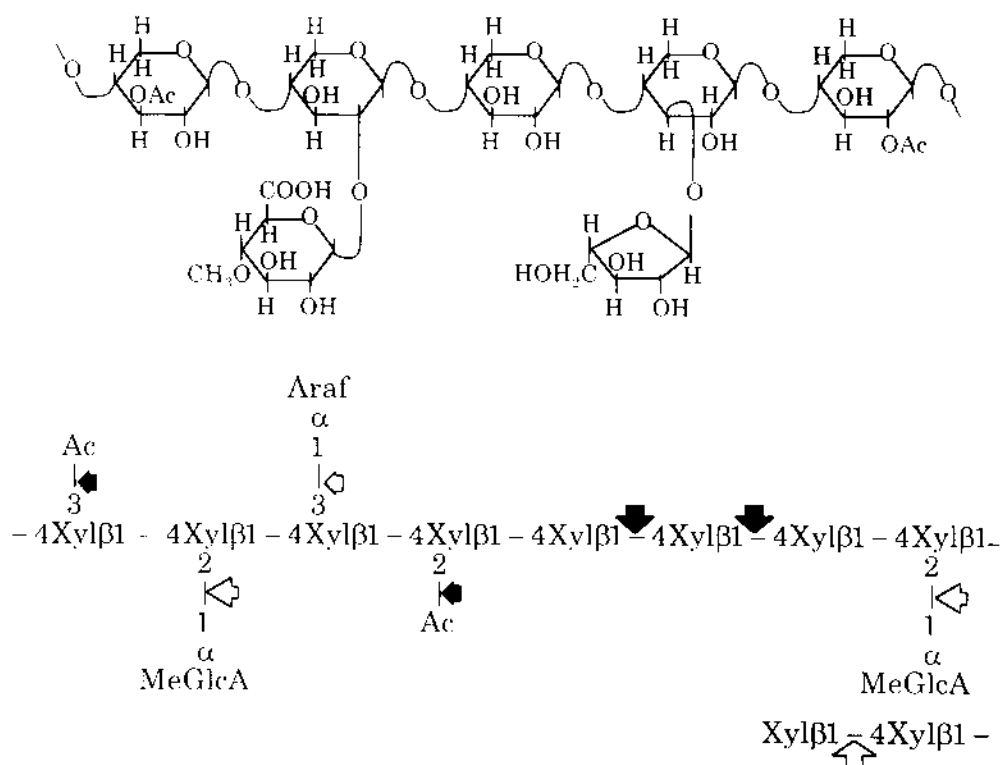
Các oligosaccarit hoà tan được trong nước bị thuỷ phân tiếp dưới tác dụng của 1,4- β -D-xylosidaza.

Các enzym thuộc nhóm α -L-arabinosidaza, α -D-glucuronidaza, α -D-galactosidaza, axetylxytan esteraza và axetylgalactoglucomannan esteraza cũng có vai trò quan trọng trong quá trình phân huỷ hoàn toàn loại polyme hỗn hợp này.

12.4.2.1. Các enzym phân huỷ xylan

Để phân huỷ hoàn toàn polyme xylan phân nhánh cần có một số loại enzym khác nhau, như: endoxytanaza, β -xylosidaza, α -glucuronidaza, α -arabinosidaza và axetylxytan esteraza (sơ đồ 12.4).

Endoxytanaza đã được nhiều tác giả nghiên cứu. Enzym này tấn công mạch chính của xylan, tạo ra xyloza và các oligome chứa nhóm thế hoặc không chứa nhóm thế.



Sơ đồ 12.4. Hướng tấn công của các enzym lên xylan.

β -Xylosidaza có tác dụng chuyển hoá các oligome thành xyloza. Enzym này cũng phối hợp hoạt động với endoxylanaza, α -glucuronidaza, α -arabinosidaza và axetylxytan esteraza để thủy phân hoàn toàn xylan thành monosaccarit.

Endoxylanaza (1,4- β -D-xylan xylanohydrolaza) xúc tác cho quá trình thủy phân liên kết 1,4- β -D-xylopyranozyt của xylan như

L-arabino-D-xylan, *L-arabino-D-glucurono-D-xylan* và *D-glucurono-D-xylan*.

Bên cạnh endoenzym cũng tồn tại exoenzym, như 1.4- β -*D*-xylan xylohydrolaza. Tuy nhiên loại exoenzym phân huỷ hemixenluloza ít được nghiên cứu hơn so với endoenzym.

Theo một số tác giả, liên kết glycozit trong xylan của thực vật không hoàn toàn tương đương nhau về khả năng tiếp cận với enzym phân huỷ xylan. Khả năng tiếp cận của một số liên kết cũng thay đổi trong quá trình thủy phân, do tách nhóm thế và đứt dẫn mạch chính.

Ishihara đã nghiên cứu hai loại endoxylanaza, một loại có tác dụng làm đứt mạch nhánh (hoặc giải phóng arabinoza) và loại khác không xúc tác cho phản ứng phân huỷ mạch nhánh (hoặc làm đứt mạch xylotrioza). Cả hai loại xylanaza có khả năng tấn công glucuronoxylan và 1.4- β -*D*-xylan không có nhóm thế.

A. niger sản sinh ba enzym endoxylanaza, đó là Xyl I, Xyl II và Xyl III.

Xyl I xúc tác cho quá trình thủy phân arabinoxylan ở rơm lúa gạo, tạo thành arabinoxylotrioza và arabinoxylodioza. Các hợp chất này bị phân huỷ dưới tác dụng của Xyl II. Xyl III có cả hoạt tính giải phóng arabinoza và phân tách xylotrioza.

Loại enzym xylanaza không phân huỷ nhánh phản ứng với xylan hỗn tạp một cách bất kỳ. Fredrick đã tách được năm loại xylanaza có đặc trưng khác nhau từ chế phẩm enzym thương mại (Rhozym HP - 150 từ *A. niger*). Các enzym này không có tác dụng phân huỷ nhánh arabinoglucuronoxylan.

Một loại enzym trong số đó (20,8 kDa, pI = 6,7) phân huỷ xylan hỗn tạp và xylooligosaccarit thành sản phẩm chủ yếu là xylobioza và xyloza. Bốn xylanaza khác (12 + 18 kDa) phân huỷ xylan thành xylooligosaccarit (xylan hỗn tạp chứa nhóm thế) nhưng không giải phóng ra xyloza.

Vrsanska và đồng tác giả đã nghiên cứu mức độ gắn kết và quá trình thủy phân xylooligosaccarit dưới tác dụng của một loại xylanaza từ *A. niger*. Khu vực có vai trò liên kết cơ chất của enzym bao gồm bảy

phân tổ liên kết *D*-xylozyl. Mức độ phân huỷ liên kết oligosaccarit dưới tác dụng của enzym này phụ thuộc vào nồng độ cơ chất. Khi nồng độ cơ chất thấp, quá trình thuỷ phân xylooligosaccarit xảy ra theo cơ chế đơn phân dẫn tới xyloza từ xylotrioza và xylobioza từ xylopentoza. Khi nồng độ cơ chất cao, xuất hiện sự sai khác so với cơ chế đơn phân, dẫn tới thay đổi sản phẩm của quá trình thuỷ phân. Chẳng hạn, enzym này thuỷ phân xylotrioza tạo thành xylobioza. Trong khi đó, xylotetroza và xylopentoza có xu hướng tham gia phản ứng chuyển hoá glycozyl, dẫn tới các oligosaccarit có độ trùng hợp cao hơn. Đến lượt mình, chúng lại tiếp tục phân huỷ thành xylotrioza và xylobioza.

Cả xylobioza và xyloza có thể được sử dụng làm chất nhận glycozyl trong phản ứng chuyển glycozyl.

Sporotrichum dimorphosporum phân huỷ arabinoglucuronoxylan chủ yếu thành xyloza, xylobioza, arabinoxylobioza, arabinoxylotrioza, glucarabinoxylotrioza và glucarabinoxylotetroza.

Nấm *Trametes hirsutus* sản sinh xylanaza (23 kDa) có tác dụng phân huỷ 4-O-metylglucuronoxylan trong gỗ liễu thành xylotetroza, xylopentoza và dẫn xuất 4-O-metyl.

Các loài thuộc *Trichoderma* từ lâu đã biết là có khả năng tạo ra xylanaza. Các enzym này được sản sinh cùng với xenlulaza khi vi sinh vật sinh trưởng trên nguyên liệu thực vật.

Các xylanaza từ *Trichoderma* hoạt động trên xylan có nguồn gốc khác nhau, thông thường tạo ra xylooligome độ trùng hợp cao, xylobioza và xyloza. Xyloza không phải là sản phẩm chính. Thông thường chúng được tạo ra sau khi đã tích lũy nhiều xylooligome.

Xylooligome đã deaxetyl hoá một phần dễ bị thuỷ phân hơn dưới tác dụng của xúc tác enzym so với xylooligome chứa nhiều nhóm axetyl.

Đa số endoxylanaza từ *Trichoderma* có hoạt tính yếu đối với phản ứng tách nhóm thế arabinozyl khỏi arabinoxylan. Song, các xylanaza từ *T. koningii* có thể giải phóng nhanh arabinozyl từ arabinoxylan.

Các xylanaza không đặc hiệu từ một số loài *Trichoderma* không những có khả năng thủy phân xylan mà còn phân huỷ xenluloza, cacboxymetylxenluloza, *p*-nitrophenyl- β -glucozit, xylooligome.

Wong đã tìm thấy xylanaza dạng tổ hợp có nguồn gốc vi khuẩn (các endoxylanaza khác biệt về điện di). Vi sinh vật này sản sinh ra hệ enzym, trong đó mỗi enzym có chức năng riêng. Có lẽ đây là chiến lược mà vi sinh vật theo đuổi để đạt hiệu quả thủy phân cao. Chủ đề này rất phức tạp, các nhà khoa học cần tiến hành nghiên cứu toàn diện và sâu sắc hơn để hiểu rõ bản chất và cơ chế hoạt động của hệ enzym tổ hợp, như cơ chế điều tiết, đặc trưng cơ chất chéo, sự biến đổi sau dịch mã.

Ở nấm, một số enzym tổ hợp có thể là alloenzym, sản phẩm từ các alen khác nhau của cùng một gen. Ngược lại, mỗi xylanaza tổ hợp có thể là một sản phẩm gen tách biệt, do vi sinh vật tạo ra để tăng cường khả năng phân huỷ xylan.

Sự phối hợp hoạt động giữa các endoxylanaza từ *N. crassa*, *S. exofoliatum*, *T. hyssochlamydoides* và *T. harzianum* cũng được nhiều tác giả xác nhận.

Nhờ hoạt động phối hợp, khả năng thủy phân xylan có thể tăng lên. Chẳng hạn, dựa vào sự phối hợp tương tác của cả ba endoxylanaza từ *T. harzianum*, enzym đã đạt tới mức thủy phân cực đại đối với xylan của gỗ dương. Mức độ phối hợp cũng tăng lên theo độ phức tạp của cơ chất, từ polyme deaxetyl hoá đến polyme axetyl hoá, đặc biệt là holoxenluloza.

Theo Kasukabe, quá trình thủy phân arabinoxylan của cùi ngô đã giải phóng ra arabinoxylotrioza chứa gốc *L*-arabinoza gắn với đơn vị *D*-xyloza cuối mạch.

Các nấm men thuộc giống *Aureobasidium*, *Cryptococcus* và *Trichosporon* có thể tạo ra xylanaza. *T. cutaneum* sản sinh một loại xylanaza ($M = 45$ kDa). Enzym này có thể phân huỷ xylan, nhưng không thủy phân được xylobioza hoặc xenluloza.

Arabinoxylan trong vỏ yến mạch bị phân huỷ dưới tác động của xylanaza từ *T. cutaneum*, tạo thành xyloza, xylobioza và xylotrioza.

Endoxylanaza từ *C. albidus* có ái lực thấp đối với *p*-nitrophenyl- β -D-xylozit. Xylobioza bị enzym này tấn công với tốc độ chậm. Mức độ phân huỷ chỉ ghi nhận được khi dùng phương pháp đánh dấu phóng xạ.

Một trong những giống vi khuẩn được nghiên cứu nhiều nhất là *Bacillus*, đặc trưng kiềm tính. Vi khuẩn này sản sinh ra một loại xylanaza phân huỷ arabinoxylan của rơm lúa gạo, sản phẩm chủ yếu là xylobioza, xylotrioza và một tỷ lệ nhỏ xylooligosaccarit có độ trùng hợp cao hơn.

Xylanaza axit tính hình thành từ một loài *Bacillus*. Enzym này phân huỷ xylan của rơm lúa gạo và xylan của gỗ cây thông rụng lá (*Larix*) theo phương thức của endoenzym, giải phóng ra xylobioza, xylotrioza và xyloza.

Endoxylanaza của *Streptomyces* thích tấn công vào các mạch xylan, trong đó mức độ phân nhánh arabinoza thấp. Các xylanaza này chủ yếu tạo ra xylotrioza trong giai đoạn đầu của quá trình thuỷ phân. Theo mức độ tiến triển của phản ứng thuỷ phân, xylooligosaccarit có độ trùng hợp $DP = 3 \div 5$ sẽ phân huỷ tiếp thành xylobioza và xyloza.

Kasukabe và đồng tác giả đã nghiên cứu quá trình thuỷ phân arabinoxylan của vỏ ngô và cùi ngô cũng như một số loại xylan khác dưới tác dụng của endoxylanaza tinh chế có nguồn gốc từ một loài *Streptomyces*. Sản phẩm chủ yếu của quá trình này là xylotrioza, D-xyloza và L-arabinoza.

Gilbert, Kellett và đồng tác giả nhận thấy có các vùng tồn tại trong xylanaza từ *P. fluorescens var. cellulosa*. Các đoạn mạch aminoaxit đã được xác định bằng cách tách dòng và thể hiện gen ghi mã các endoxylanaza (Xyl A và Xyl B), arabinofuranosidaza (Xyl C) và axetyl esteraza (Xyl D).

Đoạn mạch cuối chứa N của Xyl A rất giống với đoạn mạch tận cùng chứa C của endoglucanaza A và tương tự đoạn mạch tận cùng chứa N của endoglucanaza B từ *P. fluorescens var cellulosa*. Trong các vùng của cả ba enzym tồn tại một đoạn mạch giống nhau gồm khoảng

100 aminoaxit, tiếp theo là hai vùng giàu serin nằm cạnh một vùng nhỏ hơn.

Xyl A gắn kết mạnh với xenluloza tinh thể, nhưng không gắn kết với xylan không hoà tan. Tuy vậy, nó cũng có thể thuỷ phân xylan hoà tan khi gắn kết với xenluloza.

Các xylanaza không đặc hiệu của *Myrothecium verrucaria* và *Penicillium capsulatum* cũng gắn kết với xenluloza và hoạt động khi còn ở trạng thái gắn kết. Song chúng dễ dàng bị rửa trôi bởi chất đệm và cũng chưa xác định rõ chúng gắn kết không đặc hiệu hay là qua các vùng liên kết xenluloza.

Christakopoulos và đồng tác giả, 1996, đã xác định một loại endoxylanaza ngoại bào từ *F. oxysporum* chứa CBD, một peptit (khoảng 2 kDa) bao gồm 18 aminoaxit. Các đoạn mạch aminoaxit không giống với các CBD đã biết. Do đó, có thể đây là loại CBD mới của nấm.

β -D-Xylosidaza (1,4- β -D-xylan xylohydrolaza) có thể thuỷ phân xylooligosaccarit thành xyloza. Do đó, loại enzym này rất cần thiết trong quá trình phân huỷ xylan. Enzym này được sản sinh với lượng lớn nhờ *A. niger*. Các enzym xylosidaza cũng hình thành từ *T. reesei*, *Sclerotium rolfsii*, *Chaetomium trilaterale* và *B. pumilus*.

Một số tác giả đã tách được hai gen β -xylosidaza từ *B. pumilus* và so sánh các sản phẩm của chúng. β -Xylosidaza tinh khiết I và II đều là lưỡng phân, bao gồm các phần cấu tạo 65 ÷ 70 kDa. Xylosidaza I chuyển oligosaccarit thành xyloza, trong khi đó, xylosidaza II chỉ có hoạt tính yếu đối với xylobioza.

Xylosidaza nguồn gốc từ nấm có một số tính chất khác với enzym từ vi khuẩn *B. pumilus*. Khối lượng phân tử các protein của enzym từ nấm nói chung cao hơn. Các enzym này thể hiện hoạt tính của transferaza. Hoạt tính transferaza cao nhận thấy ở các β -xylosidaza từ *A. niger* và *Penicillium wortmanni*. Đa số các enzym thể hiện hoạt tính mạnh nhất đối với xylobioza nhưng không hoạt động đối với xylan.

Hoạt tính đối với xylooligosaccarit giảm nhanh khi tăng độ dài mạch. Ví dụ, xylosidaza của *T. viride* thuỷ phân các xylooligosaccarit

với tốc độ giảm dần khi độ trùng hợp tăng dần từ hai đến năm.

Một số tác giả đã nghiên cứu sự sản sinh α -D-glucuronidaza từ *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* và *T. reesei*. Puls và đồng tác giả đã chỉ ra vài trò của enzym α -D-glucuronidaza đối với quá trình thủy phân các xylooligome chứa gốc axit. Enzym này hoạt động phối hợp với endoxylanaza và giải phóng axit 4-O-metylglucuronic từ xylooligome chứa nhóm thế axit 4-O-metylglucuronic.

Trong số các vi sinh vật đã thử nghiệm, chỉ có *T. reesei* sản sinh tất cả các enzym có hoạt tính phân huỷ nhóm thế.

F. oxysporum và *S. olivochromogenes* tạo ra axetylxytan esteraza. Trong khi đó, chất lọc từ môi trường nuôi cấy *A. awamoni* và *B. subtilis* lại thể hiện hoạt tính rất yếu đối với phản ứng phân huỷ các nhóm thế khác.

Khối lượng phân tử của α -D-glucuronidaza từ *T. reesei* và *A. bisporus* tương ứng là 70 và 45 kDa.

α -L-Arabinofuranosidaza có khả năng xúc tác thủy phân nhóm α -L-arabinofuranozyl không khử của α -L-furanozit, arabinan, arabinoxylan và arabinogalactan. Một số α -arabinosidaza đã được làm sạch và sơ bộ nghiên cứu tính chất. Tuy vậy, có ít công trình thông báo về vai trò của các enzym này trong quá trình thủy phân xylan.

Kaji, Greve, Karimi đã nghiên cứu enzym này từ *A. niger*, *Corticium rolfsii*, *Streptomyces purpurascens*, *B. subtilis*, *Thermoascus aurantiacus* và *Ruminococcus albus*. Tất cả các α -arabinosidaza có thể thủy phân arabinan của củ cải thành arabinoza. Arabinoza cũng thu được dưới tác dụng của xylanaza tinh chế, có nguồn gốc từ *A. niger* và *T. koningii*. Song các enzym này không thể hiện hoạt tính đối với *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranozit, arabinotrioza hoặc arabinotetraoza.

Một số α -arabinosidaza cũng tạo ra arabinoza từ arabinoxylan. Mặc dù xylooligosaccarit chứa nhóm thế arabinoza tạo ra dưới tác dụng của endoxylanaza là các cơ chất ưa thích đối với α -arabinosidaza của *T. reesei*. Enzym này ở dạng tinh khiết cũng giải phóng arabinoza từ phân tử arabinoxylan mạch dài.

Các chế phẩm enzym axetyl esteraza có khả năng thủy phân cacbohydrat chứa nhóm axetyl, như axetylmannoza, axetylglucoza, axetylmaltoza và axetylxenlobioza.

Williams và Withers đã tách được hàng trăm mẫu enzym vi khuẩn trong dạ cỏ của bò và nghiên cứu hoạt tính axetyl esteraza của một số mẫu.

Biely và đồng tác giả là người đầu tiên xác nhận sự tồn tại của axetylxyylan esteraza trong môi trường nuôi cấy nấm. Các esteraza của *T. reesei*, *A. niger*, *S. commune* và *A. pullulans* có khả năng deaxetyl hoá hiệu quả xyylan đã được xử lý bằng hơi nước.

Axetyl - esteraza sơ chế và endoxylanaza từ *T. reesei* và *S. commune* chứng tỏ có sự phối hợp hoạt động trong quá trình thủy phân xyylan chứa nhóm thế axetyl, tạo ra xylooligome, xyloza và axit axetic.

Axetyl esteraza từ *T. reesei* có khối lượng phân tử 45 kDa. Hoạt tính của axetyl esteraza này có thể phân chia theo phương pháp sắc ký thành hai isoenzym (enzym đồng tính), với $pI = 6.8$ và $pI = 6.0$.

Enzym này cũng thể hiện hoạt tính đối với naphtyl axetat, triaxetin và glucoza - xyloza axetat.

Feruloyl và *p*-coumaroyl esteraza cũng phát hiện được trong dịch nổi nuôi cấy nấm và vi khuẩn, như *S. commune*, *A. niger*, *A. phoenicis*, *A. awamori* và *F. succinogens*. Các enzym này có tác dụng xúc tác chọn lọc đối với quá trình thủy phân liên kết este giữa gốc *L*-arabinozyl và axit ferulic (4-hydroxy-3-metoxyxinnamic) hoặc axit *p*-coumaric (4-hydroxyxinnamic).

McCrae và đồng tác giả đã tách và nhận dạng các enzym loại này từ *A. awamori*. Xylan của rơm lúa mì bị phân huỷ tại liên kết este dưới tác dụng của esteraza mà không cần phải xử lý trước để phân rã cấu trúc của polysaccarit.

12.4.2.2. Các enzym phân huỷ mannan

1.4- β -D-Mannanaza (1.4-D-mannan mannanohydrolaza) có khả

năng thủy phân liên kết 1,4 β -D-mannopyranozyl của D-mannan và D-galacto-D-mannan.

Chế phẩm enzym có độ tinh khiết cao từ *B. subtilis* và *A. niger* cũng có khả năng thủy phân D-glucoza-D-mannan của rễ cây một số loài, tạo thành D-glucoza, D-mannoza, và hàng loạt oligome của mannoza, glucomannoza.

Cả dạng endo và exo của D-mannanaza được tạo ra nhờ các vi sinh vật, kể cả các vi khuẩn và nấm ở ruột và dạ cỏ.

Endomannanaza của vi khuẩn thường được tiết ra ngoài tế bào. Song ở một số loài vi khuẩn, như *Sporocytophaga myxococcoides*, *Aerobacter mannanolyticus* và *Xanthomonas campestris*, cũng tồn tại endomannanaza nội bào hoặc gắn kết với màng tế bào.

Endomannanaza làm xúc tác cho quá trình thủy phân β -D-mannan thành D-mannoza và hàng loạt mannooligosaccarit có DP = 2 ÷ 6.

Khi tấn công vào glucomannan của gỗ cây thông rụng lá (*Larix*), với tỷ lệ mannoza: glucoza là 3 : 1, enzym này tạo ra D-glucoza và D-mannoza.

Galactoglucomannan của cây vân sam (*Picea*) cũng bị phân huỷ dưới tác dụng của endomannanaza từ *A. niger*, tạo thành glucoza, mannoza, mannobioza và mannooligome khác...

Một số mannooligosaccarit chứa glucoza và galactozo cũng xuất hiện trong dịch thủy phân bằng enzym khi xử lý nguyên liệu cần dộc Canada.

Araujo và Ward đã tách và nghiên cứu bốn β -D-mannanaza và một β -mannosidaza từ *Thielavia terrestris*. Các enzym này là glycoprotein với hàm lượng cacbohydrat dao động trong khoảng 6 ÷ 37%. Các cấu tử enzym này hoạt động phối hợp trong quá trình phân huỷ mannan của hạt cà phê.

Có lẽ do yêu cầu gắn kết ở gần hoặc ngay tại tâm hoạt động, đa số endomannanaza của nấm cần có bốn hoặc nhiều gốc mannozyl thì quá trình thủy phân mới có hiệu quả.

Theo Park, một số mannanaza cũng có khả năng thuỷ phân mannotrioza, nhưng phản ứng diễn ra với tốc độ chậm.

Tổ hợp mannanaza cũng được phát hiện ở một số loài nấm, bao gồm *Tyromyces palustris*, *Polyporus versicolor* và *T. terrestris*.

1.4- β -Mannosidaza (β -D-1.4-mannozit mannohydrolaza) làm xúc tác cho quá trình thuỷ phân, tách nhóm β -D-mannozyl liên kết 1 - 4 khỏi phần không khử của cơ chất. Enzym này cũng phân huỷ mannooligosaccarit và glycopeptit chứa mannoza. Sự vắng mặt các enzym này sẽ dẫn tới tích lũy oligosaccarit trong quá trình thuỷ phân mannan.

Theo Wan, mannosidaza tinh chế từ *Polyporus sulphurius* có khả năng giải phóng β -D-mannopyranozyl từ nhiều loại cơ chất tự nhiên.

Công trình nghiên cứu của Elbein đã chỉ ra rằng một β -mannosidaza từ *A. niger* thể hiện hoạt tính cao đối với *p*-nitrophenyl- β -D-mannozit tương ứng cũng như các *p*-nitrophenyl glycozit khác đã được thử nghiệm.

Hoạt tính của enzym này đối với 1.4- β -mannotrioza cao hơn hoạt tính đối với mannobioza. Song, tốc độ thuỷ phân 1.4- β -D-manno-oligosaccarit dưới tác dụng của β -mannosidaza từ một loại nấm ăn được, *Tremella fuciformis*, lại giảm mạnh khi tăng độ trùng hợp của oligome này. Chẳng hạn, β -mannotrioza bị thuỷ phân với tốc độ bằng 30% so với mannobioza; β -mannotetroza phân huỷ với tốc độ bằng 13% so với mannobioza.

α -Galactosidaza (α -galactozit galactohydrolaza) tồn tại rộng khắp trong vi sinh vật, thực vật và động vật. Enzym này làm xúc tác cho quá trình thuỷ phân melibioza, metyl-, etyl-, phenyl- và *o*-nitrophenyl- α -D-galactozit. Khi thêm một cấu tử nào đó trong số các hợp chất đã kể trên vào môi trường nuôi cấy *A. aerogenes*, tốc độ sản sinh α -galactosidaza sẽ tăng gấp hàng trăm lần. Enzym này có thể tách các nhánh α -D-galactozyl ở O-axetylgalactoglucomannan của gỗ lá kim. Enzym tinh chế từ *A. niger* rất đặc hiệu đối với cấu hình anomeric của liên kết glycozit (xem chương 2, T1).

Suzuki đã làm sạch và kết tinh α -galactosidaza từ nấm *Mortierella vinacea*. Enzym này thủy phân α -D-galactopyranozit thông thường, nhưng không giải phóng ra D-galactoza từ galactoglucomannan của gỗ nhưa cây.

Tương tự như vậy, hai α -galactosidaza từ *Aspergillus tamaris* làm xúc tác cho quá trình thủy phân o-nitrophenyl- α -D-galactozit, melibioza, rafinoza và stachyoza, nhưng không phân huỷ galactoglucomannan.

Song, một loại α -galactosidaza của *T. reesei* có thể giải phóng galactoza từ polyme galactomannan.

12.4.3. Phương pháp thử nghiệm đối với enzym phân huỷ hemixenluloza

Hoạt tính endoxylanaza thường được xác định bằng cách đo mức tăng đường khử giải phóng ra từ cơ chất xylan (bảng 12.10).

Song cũng có một số yếu tố gây nên sự sai lệch khi xác định hoạt tính xylanaza và xylosidaza, như mức độ pha loãng trước khi phân tích, loại cơ chất... Đơn vị hoạt tính của enzym thu được cũng khác nhau khi có mặt oligosaccarit của xyloza trong cơ chất. Số đo hoạt tính xylanaza phụ thuộc khá rõ vào phương thức hoạt động của các xylanaza từ các nguồn enzym khác nhau.

Cơ chất p-nitrophenyl- β -D-xylopyranozit và metyl- β -D-xylopyranozit thường được sử dụng để xác định hoạt tính của β -xylosidaza. Sau đó, ta xác định lượng p-nitrophenol và xyloza giải phóng ra nhờ hoạt động của enzym trên các cơ chất này.

Hoạt tính α -glucuronidaza thường được xác định dựa trên cơ sở axit 2-O-(4-O-metyl- α -D-glucopyranozyluronic)-xylobioza làm cơ chất tiêu chuẩn.

p-Nitrophenyl- α -L-arabinofuranozit và phenyl- α -L-arabinozit cũng được dùng làm cơ chất để xác định hoạt tính của α -arabinosidaza.

Song rất khó đánh giá mức độ đặc trưng của phương pháp này, vì một số tác giả khác nhận thấy β -xylosidaza từ *A. niger* và *Penicillium*

wortmanni cũng thể hiện hoạt tính đối với *p*-nitrophenyl- α -*L*-arabinofuranozit.

Bảng 12.10. Thử nghiệm enzym phân hủy hemixenluloza

Enzym	Cơ chất	Phương pháp xác định
<i>D</i> -Xylanaza	Xylan	Đường khử Độ nhớt
β -Xylosidaza	<i>p</i> -Nitrophenyl- β - <i>D</i> xylopyranozit Methyl- β - <i>D</i> -xylanopyranozit Xylobioza	<i>p</i> -Nitrophenol Xyloza
α -Arabinosidaza	<i>p</i> -Nitrophenyl- α - <i>L</i> -arabinofuranozit Phenyl- α - <i>L</i> -arabinofuranozit	<i>p</i> -Nitrophenol Đường khử
α -Glucuronidaza	2-O-(4-O-methyl- α - <i>D</i> -glucopyrano- xyluronic)-xylobioza	Axit uronic
Esteraza	<i>p</i> -Nitrophenyl axetat Hemixeluloza gỗ bulô α -Naphthyl axetat Methyl este của axit ferulic và <i>p</i> -Coumaric	<i>p</i> -Nitrophenol Axit axetic α -Naphthol Axit ferulic Axit <i>p</i> -oumaric
<i>D</i> -Mannanaza	Galactomannan của đậu	Đường khử
β -Mannosidaza	<i>p</i> -Nitrophenyl- β - <i>D</i> -mannopyranozit 1.4 β - <i>D</i> -mannooligosaccarit	<i>p</i> -Nitrophenol Mannoza
α -Galactosidaza	<i>p</i> -Nitrophenyl- α - <i>D</i> -galactopyranozit Melibioza Rafinoza	<i>p</i> -Nitrophenol Đường khử

Để đánh giá hoạt tính của axetyl esteraza, ta có thể dựa vào tốc độ giải phóng *p*-nitrophenol từ *p*-nitrophenyl axetat. Biely và đồng tác giả đã sử dụng dung dịch chứa phần không phân ly của hemixenluloza gỗ bulô để xác định hoạt tính của axetyl xylan esteraza. Một đơn vị enzym

được định nghĩa là số lượng enzym giải phóng ra một μmol axit axetic từ 10 mg cơ chất hoà tan ở điều kiện chuẩn, trong thời gian một phút.

McCrae và đồng tác giả, 1994, đã mô tả phương pháp xác định hoạt tính của feruloyl và *p*-coumaroyl esteraza, trong đó metyl este của axit ferulic cũng như axit *p*-coumaric được sử dụng làm cơ chất. Số lượng axit ferulic và *p*-coumaric giải phóng ra được xác định để làm cơ sở tính toán.

Xác định tốc độ đứt liên kết glycozit thông qua xác định tốc độ giải phóng *p*-nitrophenol là phương pháp thường dùng nhất để xác định hoạt tính của β -mannosidaza.

Hoạt tính β -mannosidaza cũng có thể xác định dựa vào tốc độ giải phóng đường lượng đường khử *D*-mannoza từ cơ chất 1,4- β -*D*-manno-oligosaccarit.

Để xác định hoạt tính của α -galactosidaza, các cơ chất thường dùng nhất là melibioza, rafinoza, *p*-nitrophenyl- α -*D*-galactopyranozit.

Trên đây là các phương pháp khác nhau được các nhà khoa học sử dụng để xác định hoạt tính enzym.

Điều cần thiết là phải áp dụng phương pháp thống nhất để chuẩn bị cơ chất xylan và chuẩn hoá mức độ pha loãng enzym, giảm thiểu sai lệch.

Các phương pháp khác như đo độ nhớt, độ dẫn cũng được áp dụng để xác định hoạt tính xylanaza.

12.4.4. Công nghệ sinh học dựa trên các enzym phân huỷ hemixenluloza

Hemixenlulaza đã và đang được sử dụng trong nhiều lĩnh vực.

Chỉ tiêu quan trọng đối với công nghiệp là chế phẩm enzym phải rẻ tiền, hoạt tính cao, có thể sản xuất với lượng lớn.

Lựa chọn đúng tỷ lệ các enzym, tỷ lệ giữa enzym và cơ chất, phối hợp đúng đắn các enzym phân huỷ xylan và mannan là cơ sở để đạt hiệu suất sử dụng enzym cao, giảm giá thành và giảm tiêu hao năng lượng.

Các ứng dụng chủ yếu enzym phân huỷ hemixenluloza ở quy mô công nghiệp được đưa ra ở bảng 12.11.

Bảng 12.11. Ứng dụng các enzym phân huỷ hemixenluloza

Lĩnh vực ứng dụng	Mục đích sử dụng enzym
Chuyển hoá sinh học	Phân giải polysaccarit dưới tác dụng của enzym thành monosaccarit rồi chuyển hoá hoặc lên men tiếp thành etanol, xylitol, các hoá chất khác và protein...
Bột và giấy	Xử lý hỗ trợ tẩy trắng, xử lý vỏ cây, nghiền bột, sản xuất xenluloza cho chế biến hoá học...
Thực phẩm và thức ăn gia súc	Tách dầu cả phê và dầu thực vật, tăng hiệu quả thu hồi tinh bột, xử lý bột ngũ cốc, sản xuất chất làm đặc thực phẩm, hoàn thiện sản phẩm bánh, làm trong nước ép quả và rượu vang, sản xuất xylooligosaccarit từ xylan... Tăng cường độ dinh dưỡng trong thức ăn cỏ lá cho vật nuôi ...
Sợi dệt	Ngâm giấm xơ lạnh ...

Công nghệ sinh học từ lâu đã được áp dụng vào quá trình chuyển hoá các polysaccarit trong nguyên liệu thực vật thành các sản phẩm lên men. Sử dụng tối đa và hiệu quả nhất các polysaccarit của thực vật là điều có ý nghĩa quan trọng trong thực tế. Có được hệ thống enzym hoàn chỉnh để phân giải xenluloza và hemixenluloza là điều mong muốn của các nhà công nghệ.

Để thu saccarit hiệu suất cao, nguyên liệu thực vật cần được xử lý trước khi phân giải bằng enzym.

Nổ hơi là phương pháp xử lý được coi là có hiệu quả và giảm tiêu hao năng lượng so với các phương pháp khác.

Saccarit thu được trong quá trình đường hoá có thể biến đổi tiếp thành xylitol, axit hữu cơ, etanol và các dung môi... qua giai đoạn lên men.

Pentoza cũng có thể được sử dụng làm cơ chất cho vi sinh vật hoạt động (*C. utilis*), tạo ra sinh khối giàu protein. Nhiều quá trình chuyển hoá khác cũng đã được nghiên cứu để sử dụng hiệu quả pentoza.

Xylanaza cũng được sử dụng để làm trong nước quả ép và rượu vang, trích ly dầu cà phê và dầu thực vật, nâng cao chất lượng dinh dưỡng của cỏ lá làm thức ăn gia súc, sản xuất chất làm đặc thực phẩm, sản xuất các loại sản phẩm bánh khác nhau...

Trong các mục đích sử dụng trên, xylanaza không nhất thiết phải ở dạng tinh khiết.

Xylooligome tạo ra nhờ thủy phân xylan dưới tác dụng của enzym là sản phẩm quý nhờ tính chất lưu biến của chúng.

Xylanaza cũng được đề xuất sử dụng trong gia công ngũ cốc. Thêm xylanaza vào bột mì nhào có thể làm giảm mức độ hấp phụ nước, giảm độ rắn chắc của bột cũng như tạo ra những thay đổi theo chiều hướng mong muốn về kết cấu của bánh mì.

Xylanaza cũng được sử dụng để tăng hiệu suất thu hồi tinh bột từ bột mì.

Ứng dụng công nghiệp chủ yếu của α -galactosidaza là xúc tác cho phản ứng thủy phân rafinoza trong quá trình sản xuất đường từ củ cải đường. (Rafinoza là trisaccarit chứa một mắt xích *D*-galactosa, một đơn vị *D*-glucoza và một đơn vị fructoza).

Quá trình thủy phân có giới hạn hoặc tách bỏ mạch nhánh dưới tác dụng của endoenzym được sử dụng để biến tính các polyme, chẳng hạn galactoglucomannan, dùng làm chất đông đặc trong công nghệ thực phẩm.

Các enzym phân giải xylan được sử dụng trong công nghiệp bột và giấy để hoàn thiện quá trình sản xuất hiện hành.

12.5. CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG CÔNG NGHIỆP XENLULOZA – GIẤY

Do yêu cầu về bảo vệ môi trường, ngành sản xuất hữu cơ – xenluloza – giấy cần phải thay đổi công nghệ nấu, tẩy cũng như xử lý

chất thải để giảm thiểu tác động xấu đến môi trường. Công nghệ sinh học là một trong những hướng khá thi để giải quyết vấn đề này.

Nguyên liệu đầu cho công đoạn nấu là gỗ, tre nứa..., nguyên liệu đưa vào tẩy trắng là xơ sợi xenluloza. Như đã biết, trong tự nhiên, gỗ cũng như các thực vật khác bị phân huỷ dưới tác dụng của nấm và vi khuẩn. Do đó, nếu kiểm soát được quá trình sinh học này, lignin và hemixenluloza sẽ bị phân huỷ, ta thu được sản phẩm xenluloza. Tất nhiên, lignin bị phân huỷ càng nhiều càng tốt, còn đối với hemixenluloza, mức độ phân huỷ bao nhiêu là tùy thuộc mục đích sử dụng xenluloza cho sản xuất giấy hay cho chế biến hoá học.

Thành tế bào là tổ hợp của nhiều cấu tử, đó là xenluloza, hemixenluloza và lignin. Tác nhân sinh học có thể tấn công không chọn lọc, hoặc chỉ phân huỷ một cấu tử nào đó. Như vậy, nếu ta lựa chọn đúng tác nhân và điều kiện phản ứng, các vi sinh vật hoặc enzyme chủ yếu phân huỷ lignin và hemixenluloza, để lại xenluloza dưới dạng sản phẩm xơ sợi. Đây là mục tiêu cần phấn đấu của các nhà sinh học và hoá học.

Trong hai thập kỷ qua, nhiều thử nghiệm đã được tiến hành. Hiện nay, công nghệ sinh học đã bước đầu tham gia vào dây chuyền sản xuất xenluloza – giấy và xử lý chất thải.

Vấn đề ứng dụng xenluloza trong công nghệ khử mực đã được trình bày ở mục 12.2.4. Trong phần này, ta sẽ đề cập tới ứng dụng các tác nhân sinh học khác trong công nghiệp xenluloza – giấy.

12.5.1. Chuẩn bị bột xenluloza theo phương pháp sinh học

Công nghiệp bột và giấy đặc biệt phát triển mạnh trong những thập kỷ gần đây. Quá trình chuẩn bị nguyên liệu xơ cho sản xuất giấy đại thể chia thành hai nhóm lớn:

- Chuẩn bị bột bằng phương pháp hoá học;
- Chuẩn bị bột bằng phương pháp cơ học.

Theo các phương pháp khác nhau, bột giấy thu được có đặc trưng khác nhau. Việc lựa chọn quá trình xử lý phụ thuộc vào mục đích sử

dụng bột giấy và cũng căn cứ vào tính chất của nguyên liệu ban đầu.

Trong nhiều khâu của quá trình sản xuất giấy, yếu tố hoá học và cơ học có thể cùng phối hợp để đạt chất lượng sản phẩm mong muốn.

Sản xuất bột xenluloza theo phương pháp hoá học dựa vào việc sử dụng hoá chất để phân huỷ và hoà tan lignin từ tế bào gỗ cũng như phân huỷ và hoà tan một phần hemixenluloza. Trong trường hợp sản xuất xenluloza cho chế biến hoá học, ta cần loại bỏ hết hemixenluloza, để lại xenluloza dưới dạng sản phẩm xơ.

Quá trình hoá học đòi hỏi phải có công đoạn hoàn nguyên hoá chất và xử lý chất thải với chi phí lớn.

Chuẩn bị nguyên liệu xơ theo phương pháp cơ học chủ yếu dựa trên tác dụng cơ học để phân chia gỗ thành các xơ sợi thích hợp cho sản xuất giấy. Trong thực tế, nhóm giải pháp cơ học thường kết hợp với yếu tố vật lý và thậm chí cả một phần tác động hoá học để tạo thuận lợi, đẩy nhanh quá trình sản xuất. Quá trình cơ học thường đạt hiệu suất xơ sợi cao (95% so với 40 ÷ 50% trong phương pháp hoá học). Song quá trình này tiêu hao nhiều năng lượng, độ bền của sản phẩm thấp, dễ hồi màu (giấy ngả màu vàng theo thời gian).

Tẩy trắng bột giấy bằng clo, hợp chất clo, kết hợp trích ly trong môi trường kiềm là phương pháp được áp dụng từ nhiều thập kỷ nay. Tuy nhiên dòng chất thải từ khâu clo hoá và trích ly kiềm E₁ thường không thể sử dụng lại. Ngoài ra dòng thải chứa nhiều hợp chất hữu cơ clo hoá, khá độc hại, gây đột biến và ung thư, do đó, cần giảm thiểu nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường.

Sản xuất bột theo phương pháp sinh học (biopulping) là xử lý chất liệu thực vật bằng vi sinh vật hoặc enzym do chúng tiết ra nhằm tách bỏ lignin, tạo điều kiện để xử lý tiếp bằng yếu tố cơ học hoặc hoá học.

12.5.1.1. Vai trò của nấm trong delignin hoá để chuẩn bị bột xenluloza

Hiện nay, một trong những loại tác nhân sinh học thường dùng là nấm. Quá trình này đã được nghiên cứu thử nghiệm từ vài thập kỷ nay. Các nghiên cứu chủ yếu xoay quanh vấn đề gia công sơ bộ dăm gỗ

bằng nấm, sau đó sử dụng lực cơ học để chuyển dăm gỗ đã bị phân rã một phần thành dạng xơ sợi.

Phương pháp xử lý sinh học cho phép giảm năng lượng tiêu hao ở khâu tác động cơ học, công đoạn quyết định giá thành của sản phẩm. Xử lý sinh học cũng làm tăng chất lượng sản phẩm giấy và giảm thiểu ô nhiễm môi trường.

Công trình đầu tiên nghiên cứu sử dụng nấm mùn trắng để delignin hoá nguyên liệu gỗ có lẽ thuộc về Lawson và Still, 1957. Sau đó, nhiều công trình khác đã được công bố, kể cả được cấp bằng phát minh về "phương pháp mới sản xuất bột xenluloza" (Eriksson, 1976).

Các công trình nghiên cứu ở phòng thí nghiệm Thụy Điển (STFI) sử dụng các thể đột biến của nấm mùn trắng không mạng hoạt tính xenlulaza, có tác dụng phân hủy lignin chọn lọc hơn, nhờ đó, nâng cao tính đặc hiệu của quá trình sản xuất bột theo phương pháp sinh học. Song các thể đột biến này phân huỷ lignin kém hơn so với các giống hoang dã phát triển trên gỗ. Do đó, mục đích tiết kiệm năng lượng trong khâu tiếp theo chưa đạt được như mong muốn.

Một số công trình thử nghiệm về sau đã dẫn tới kết quả hứa hẹn với nguyên liệu bã mía. Bar - Lev và đồng tác giả nhận thấy, xử lý bột cơ nhiệt bằng nấm mùn trắng trước khi nghiền có thể giảm tiêu hao năng lượng và tăng độ bền cơ lý của giấy. Akamatsu, 1984, cũng đạt được kết quả tương tự khi xử lý bột cơ nhiệt từ dăm gỗ dương.

Nấm phân huỷ lignin một cách chọn lọc sẽ là đối tượng lựa chọn cho quá trình sản xuất bột theo phương pháp sinh học. Để xác định được loài thích hợp, ta cần có chương trình tuyển chọn để phát hiện loài sinh trưởng nhanh và có khả năng tách lignin một cách chọn lọc.

Để có được loài nấm mong muốn, trước hết ta cần tiến hành thử nghiệm phân huỷ gỗ trong phòng thí nghiệm.

Một số phương pháp đã được đưa ra để lựa chọn loài nấm có khả năng phân huỷ chọn lọc lignin. Một trong những hướng thích hợp nhất là xác định mức phân huỷ. Mẫu gỗ được đặt vào buồng tăng tốc phân huỷ và xác định sản phẩm phân giải lignin và các polysaccarit.

Dựa trên phương pháp tuyển chọn trong phòng thí nghiệm, ta thu được một số loài nấm thích hợp cho quá trình sản xuất bột. Trong số các loài tốt nhất có *P. chrysosporium*, *C. subvermispora*, *Phlebia brevispora*, *Phlebia tremellosa*, *Dichlomitus squalens* và *Phellinus pini*.

Các loài hoặc giống khác nhau thường khác nhau về độ chọn lọc đối với lignin. Hai loài nấm được nghiên cứu kỹ là *P. chrysosporium* và *C. subvermispora*.

Sau đó, các loài nấm đã lựa chọn được đánh giá hiệu quả tạo bột theo phương pháp sinh học.

Theo Leatham, lượng lignin tách ra từ dăm gỗ không có quan hệ thật rõ rệt với mức tiết kiệm năng lượng hoặc cải thiện độ bền của giấy khi tiến hành xử lý sinh học trên thực tế. Điều này chứng tỏ vấn đề thay đổi cấu trúc liên quan tới quá trình cơ học nhiều hơn mức độ tách lignin bằng nấm.

Phương pháp tuyển chọn này mất nhiều thời gian và công sức, do đó, một số nhà khoa học đang tìm kiếm cách tiếp cận khác để giải quyết vấn đề.

12.5.1.2. Vai trò của các enzym trong quá trình sản xuất xenluloza – giấy

a. Khả năng ứng dụng enzym phân huỷ lignin

Trong công nghệ chuẩn bị bột và tẩy trắng xenluloza, loại enzym này có tác dụng delignin hoá, giảm năng lượng tiêu tốn cho sản xuất bột cơ, bột hoá...

LiP, MnP và laccaza đã được nghiên cứu nhiều để áp dụng vào lĩnh vực xenluloza – giấy. Khi dùng hỗn hợp enzym phân huỷ lignin, trị số kappa có thể giảm 20-30%.

LiP từ *P. chrysosporium* được sử dụng để tẩy trắng bột xenluloza (Arebeloa, 1992). MnP và laccaza từ *T. versicolor* được dùng để tẩy trắng bột gỗ. Một số enzym từ nấm mùn trắng khác cũng được sử dụng. Paice và đồng tác giả nhận thấy, MnP làm sạch một phần cũng

có tác dụng demetyl hoá và delignin hoá bột xenluloza đạt chất lượng như sử dụng dạng enzym làm sạch từ *T. versicolor*. MnP tinh chế cũng được sử dụng để tẩy trắng bột sulfat gỗ lá rộng, phối hợp gia công oxy/kiềm (Kaneko, 1995).

CBQ từ *T. versicolor* cũng được dùng trong tẩy trắng. Một số tác giả cho rằng enzym này tham gia vào phản ứng khử các sản phẩm oxy hoá bởi laccaza hoặc peroxidaza, như các dạng quinon, gốc tự do phenoxy và Mn (III).

Qua nghiên cứu, một số tác giả cũng đề xuất phương án sử dụng chất môi giới oxy hoá khử thích hợp để tăng khả năng delignin hoá của laccaza và tẩy trắng bột xenluloza sulfat. Một hệ thống chất môi giới khá hiệu quả đối với enzym laccaza dùng cho tẩy trắng cũng đã được nghiên cứu và ứng dụng (Call, 1994). Paice (1995) cho rằng, để tẩy trắng bột một cách hiệu quả bằng enzym oxy hoá, như laccaza hoặc MnP, cần dùng thêm các tác nhân hỗ trợ, như chất môi giới, chất hoạt hoá, hoặc chất kiểm soát quá trình. Laccaza đòi hỏi áp suất O_2 cao và chất mang điện tử có khối lượng phân tử thấp. Các MnP cần lượng nhỏ H_2O_2 cùng với ion Mn (II) và chất tạo phức càng của như oxalat, malonat.

b. Vai trò của hemixenlulaza trong sản xuất bột và giấy

Xylanaza có thể được sử dụng trong khâu sản xuất bột đặc biệt là tẩy trắng và chuẩn bị bột nghiền cũng như một số khâu khác của quá trình sản xuất.

Các enzym phân giải hemixenluloza được nghiên cứu để xử lý vỏ cây cũng như nghiền bột giấy, nhằm giảm năng lượng cần thiết khi sản xuất bột bằng cơ học.

Trong quá trình nghiền bột có sử dụng tác nhân sinh học, các chế phẩm enzym được bổ sung vào bột đã tẩy trắng để tăng khả năng phân tư chổi hoá, nhằm cải thiện tính chất làm giấy của bột xenluloza. Xử lý bằng xylanaza sẽ tạo ra loại bột xenluloza, trong đó xơ sợi có tính chất tương tự tính chất của loại bột nghiền ở mức vừa phải.

Các chế phẩm enzym thô chứa cả xenlulaza và hemixenlulaza đã

được sử dụng để tăng cường độ phân tơ chổi hoá và hoàn thiện tính chất thoát nước của sợi tái sử dụng.

Các thử nghiệm tại nhà máy theo phương hướng này đã được thực hiện thành công khi sử dụng enzym thương mại từ *T. reesei* có tên gọi Liftaza A40.

Bột xenluloza cho chế biến hoá học (bột hoà tan) được sử dụng làm nguyên liệu sản xuất nhiều dẫn xuất xenluloza, như xenluloza axetat, xenluloza nitrat, màng và sợi nhân tạo... Trong nguyên liệu bột này, hemixenluloza được coi là tạp chất cần tách bỏ.

Khi sử dụng xylanaza, ta có thể thu được bột xenluloza không chứa xylan. Công nghệ này lần đầu tiên được Paice và Jurasek đề xuất (1984).

Xử lý bằng xylanaza có thể làm giảm lượng kiềm cần thiết cho khâu trích ly xylan từ bột kraft.

Song hiệu quả của phương pháp dùng xylanaza để sản xuất bột xenluloza cho chế biến hoá học phụ thuộc vào độ chọn lọc của enzym. Đặc biệt, chế phẩm enzym không được có hoạt tính phân giải xenluloza.

Ứng dụng quan trọng nhất của hemixenlulaza là hỗ trợ tẩy trắng xenluloza.

Bột kraft không tẩy có độ trắng thấp do chứa nhóm mang màu trong lignin còn sót lại trong bột. Lượng lignin này sẽ được tách bỏ trong giai đoạn tẩy trắng tiếp theo.

Tẩy trắng là khâu cần thiết để đảm bảo độ trắng yêu cầu của bột nhưng phải bảo tồn tính năng cơ lý của bột.

Các chất tẩy có tác dụng mạnh là clo (C), ozon (Z) và peroxyaxit. Các tác nhân này có thể tác dụng với phần cấu trúc thơm của lignin.

Clodioxit (D) và oxy (O) dễ phản ứng với các cấu trúc của lignin chứa nhóm hydroxyl tự do.

Natri hypoclorit (H) và hydro peroxit (P) phản ứng với một số nhóm chức, trong đó có cả nối đôi.

Như vậy để quá trình delignin đạt hiệu quả cao, cần kết hợp nhiều loại tác nhân tẩy, có khả năng tấn công vào các phần cấu trúc khác nhau của lignin.

Khi bổ sung giai đoạn xử lý bằng enzym, ví dụ xylanaza, vào dây chuyền tẩy trắng truyền thống, ta sẽ thu được sản phẩm bột sau tẩy có độ trắng cao hơn.

Phối hợp khâu xử lý trước bằng xylanaza cũng cho phép giảm lượng hoá chất sử dụng cho khâu tẩy trắng.

Như đã biết, màu nâu của bột sau nấu chủ yếu do lignin còn sót lại trong bột gây nên. Enzym phân huỷ lignin đã được sử dụng để xử lý phần lignin này, nhưng kết quả chưa đạt được như mong đợi. Hiện nay, tác nhân tẩy trắng bằng sinh học đang được sử dụng có hiệu quả là hemixenlulaza.

Ý tưởng sử dụng các enzym hemixenlulaza để tăng cường khả năng tẩy trắng xuất hiện từ những năm 1980. Viikari, lần đầu tiên vào 1986, đã công bố kết quả nghiên cứu sử dụng xylanaza cho quá trình tẩy trắng bột xenluloza sulfat. Từ đó, nhiều công trình nghiên cứu khác cũng được thực hiện, đưa tới ứng dụng ở quy mô công nghiệp như hiện nay.

Khái niệm tẩy trắng với sự trợ giúp của enzym dựa trên thực tế là khi một phần hemixenluloza có trong bột xenluloza sulfat bị thủy phân dưới tác dụng của enzym hemixenlulaza, chủ yếu là xylanaza, khả năng tách và hoà tan lignin vào dung dịch tăng lên. Nhờ xử lý bột nâu trước khi tiến hành các công đoạn tẩy trắng khác, ta có thể giảm lượng hợp chất clo dùng cho quá trình tẩy trắng bột sulfat; bằng cách đó, giảm lượng chất thải chứa clo từ khâu tẩy trắng.

Thực nghiệm trên dây chuyền công nghiệp đầu tiên được thực hiện tại Phần Lan vào 1988. Là phương tiện trợ giúp hiệu quả, xylanaza hiện được sử dụng trong công đoạn xử lý trước khi tẩy trắng bằng hợp chất clo hoặc các tác nhân khác.

Xử lý bằng hemixenlulaza đồng thời trích ly bằng hoá chất sẽ làm giảm đáng kể hàm lượng lignin còn sót lại trong bột sau nấu. Song

hemixenlulaza không trực tiếp tác động lên lignin, nên hiệu quả quá trình chưa cao như mong đợi.

Các nhà nghiên cứu đang tìm kiếm và áp dụng vào thực tế phương pháp delignin hoá trực tiếp bằng enzym. Song, so với hemixenlulaza, quá trình sinh học dựa trên xúc tác phân huỷ lignin khó kiểm soát hơn, cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện.

Hemixenlulaza là nhóm enzym đầu tiên được sử dụng ở khâu sản xuất của công nghiệp xenluloza – giấy, góp phần phát triển công nghệ sạch.

Xét trên phạm vi toàn thế giới, công đoạn tẩy trắng chủ yếu dựa vào clo và hợp chất của clo. Gần đây, một số phương pháp mới được áp dụng để giảm thiểu hàm lượng lignin đi vào khâu tẩy, như nấu biến tính hoặc delignin hoá bằng oxy. Phương pháp tẩy bằng clo nguyên tố cũng được thay thế bằng clo dioxit, ozon, oxy, peroxit và peroxiaxit.

So với clo nguyên tố hoặc clo dioxit, các chất tẩy trên cơ sở oxy, ozon ít hiệu quả và ít chọn lọc hơn. Để thu được bột chất lượng cao mà không cần dùng tới hợp chất clo, hàm lượng lignin trong bột vào tẩy cần phải nhỏ tới mức có thể. Delignin hoá bằng oxy thường được thực hiện như một giai đoạn công nghệ trước khi tẩy ECF hoặc TCF. Với tiến bộ công nghệ hiện nay, có thể giảm 50% lignin trong bột nấu, khi dùng oxy để phân huỷ lignin mà ít dụng chạm tới cacbohydrat và không ảnh hưởng xấu tới tính năng cơ lý của bột.

Yang - Eriksson, 1993, đã đề xuất quá trình tẩy không sử dụng clo (non - chlorine bleaching process - EnZone Process), gồm một giai đoạn xử lý bằng xylanaza (X) phối hợp với các giai đoạn O, Z và P để tẩy trắng bột kraft từ gỗ bạch đàn (gỗ lá rộng).

Bột được delignin hoá theo dây chuyền OXZP dễ dàng đạt độ trắng 85 ÷ 90% (ISO) (so với độ trắng 78,0 ÷ 84,7% từ dây chuyền OZP).

So với bột thu được trên dây chuyền ODEDED (độ trắng 90,2%), bột từ gỗ lá rộng theo dây chuyền bổ sung enzym OXZP có mức ổn định về độ trắng cao hơn, độ bền kéo tương tự, độ bền xé giảm chút ít.

Sau đó, vào 1994, các tác giả Yang - Eriksson đã đề xuất dây

chuyển tẩy trắng với sự trợ giúp của xylanaza cho gỗ thông (gỗ lá kim). đó là OXE_pZP.

Không chỉ xylanaza mà endomannanaza và các enzym phân giải mạch nhánh hemixenluloza cũng tạo thuận lợi cho quá trình delignin hoá. Khi xử lý bột kraft bằng endomannanaza từ *T. reesei*, *B. subtilis* và *A. niger*, khả năng tẩy trắng ở các giai đoạn tiếp theo cũng được nâng lên.

Các enzym phân huỷ mạch nhánh cũng đóng vai trò nhất định trong khâu xử lý bằng xylanaza. α -Arabinosidaza và α -glucuronidaza đã gây hiệu ứng nào đó, thể hiện qua sản phẩm bột kraft gỗ thông có độ kappa thấp hơn và độ trắng cuối cùng cao hơn.

Ảnh hưởng của hemixenlulaza không dựa trên sự tấn công trực tiếp của enzym vào lignin, mà dựa vào sự chuyển hoá hemixenluloza, tạo thuận lợi cho quá trình phân huỷ và hoà tan lignin khi sử dụng các hoá chất để tẩy trắng. Một số tác giả cho rằng, tác động của xylanaza là thuỷ phân xylan kết tủa lại trên xơ trong quá trình nấu (Kantelinen - Viikari, 1993) hoặc tách xylan khỏi tổ hợp phức lignin - cacbohydrat (Viikari, 1986. Yang - Eriksson, 1992).

Hai yếu tố này tạo điều kiện để lignin hoà tan dễ hơn vào dung dịch tẩy.

Ngoài ra, xử lý bằng enzym cũng tách được các chất màu khỏi bột (Wong - Nelson, 1996).

Vai trò của xylan kết tủa trở lại lên xơ đã thu hút nhiều nhà nghiên cứu.

Đối với gỗ lá rộng, khi nấu xenluloza theo phương pháp gián đoạn truyền thống, lượng xylan kết tủa lại trên xơ lớn hơn so với phương pháp dòng liên tục. Một số tác giả đã nghiên cứu bề mặt xơ và xác nhận hiện tượng kết tủa xylan trở lại xơ (Suurnäkki - Westermarck, 1996).

Song, trong trường hợp gỗ lá kim, ta khó có thể nói về vai trò của enzym tách xylan kết tủa, vì trong trường hợp này hàm lượng xylan kết tủa không đáng kể. Ngoài ra một số tác giả cũng nhận thấy

xylanaza tác động khá đồng đều lên bề mặt tiếp xúc với enzym (Suurnäkki - Viikari, 1996). Xylanaza cũng có tác dụng tốt khi tẩy trắng bột nấu theo phương pháp mới, mặc dù trong trường hợp này có lẽ bột chứa ít xylan kết tủa (Suurnäkki - Buchert, 1996). Các kết quả trên chứng tỏ rằng cơ chế tác dụng của hemixenlulaza không chỉ là sự tấn công của enzym lên xylan kết tủa.

Munk và đồng tác giả, 1992, đã dùng DMSO trích ly chọn lọc xylan kết tủa lại khỏi bột xenluloza. Các nhà nghiên cứu này nhận thấy, dù xylan kết tủa lại đã tách ra nhưng cũng không xúc tiến được quá trình tẩy trắng, trong khi đó, nếu gia công trước enzym thì quá trình tẩy tiếp theo có hiệu quả hơn. Song Allison và đồng tác giả (1995) nhận thấy rằng khả năng của DMSO tách xylan trong bột còn phụ thuộc vào mức độ trùng hợp của xylan. Khi DP của xylan kết tủa chưa biết rõ thì chưa thể kết luận điều gì có liên quan tới việc trích ly bằng DMSO.

Bột xenluloza của cả gỗ lá kim và lá rộng đều chứa tổ hợp phức lignin - cacbohydrat (LC), trong đó, giữa cacbohydrat và lignin có thể tồn tại một số loại liên kết như este, etc, glycozit. Khi xử lý bằng enzym, khả năng hoà tan của phức xylan - lignin từ bột mô phỏng và bột sylfat cho thấy phức LC có thể có vai trò nào đó trong quá trình tẩy trắng với sự trợ giúp của xylanaza. Tác dụng của enzym này lên xylan trong LC và xylan kết tủa không những phụ thuộc loại xylan mà còn phụ thuộc vị trí của chúng trong xơ xenluloza. Xylanaza từ *T. reesei* tác dụng khá đồng đều lên bề mặt tiếp cận của bột sulfat. Điều đó chứng tỏ ảnh hưởng của xylanaza không phải là hiện tượng bề mặt.

Loại xylan và vị trí của chúng có ảnh hưởng như thế nào tới sự khuếch tán của lignin khỏi xơ sợi, đây là vấn đề cần được tiếp tục nghiên cứu thêm để làm sáng tỏ.

** Các enzym hemixenlulaza thường dùng trong tẩy trắng xenluloza:*

Do hemixenluloza có nhiều dạng cấu tạo nên cần một số loại enzym khác nhau để phân huỷ chúng.

Hai glycanaza chủ yếu để giải trùng hợp mạch hemixenluloza thành oligome là endo-1,4- β -D-xylanaza và endo-1,4- β -D-mannaza.

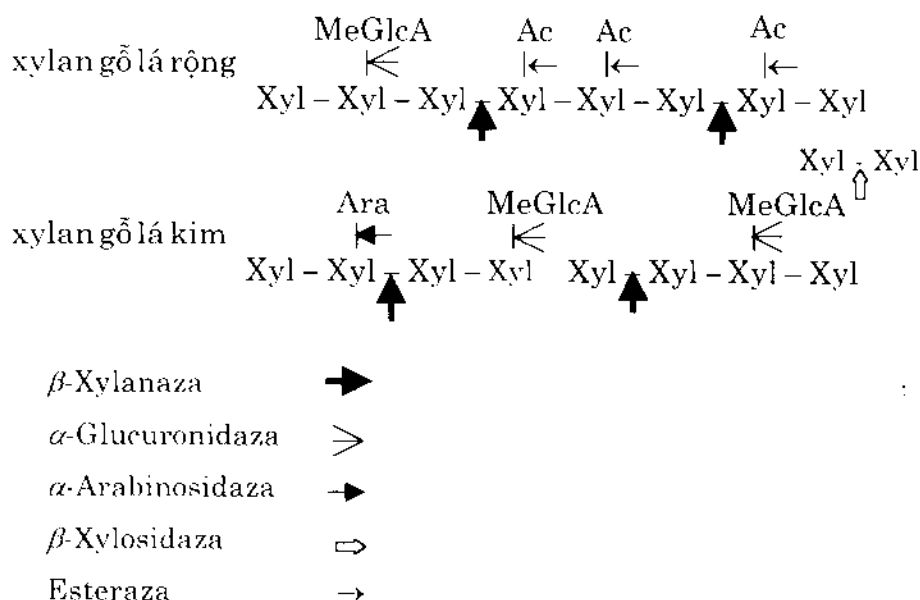
Oligosaccharit sau đó được thủy phân bởi 1.4- β -D-xylosidaza, 1.4- β -D-mannosidaza và 1.4- β -D-glucosidaza.

Các mạch nhánh của hemixenluloza được tách ra nhờ 1.3- α -L-arabinosidaza, 1.2- α -D-glucuronidaza và 1.6- α -D-galactosidaza. Các nhóm thế este cũng được giải phóng khỏi mạch nhờ enzym axetylxyylan esteraza và axetylgalactoglucomannan esteraza.

• Xylanaza:

Nhiều công trình nghiên cứu đã đề cập tới tính chất, cơ chế hoạt động và ứng dụng xylanaza.

Endoxylanaza (1.4- β -D-xylan xylanohydrolaza) xúc tác thủy phân liên kết 1.4- β -D-xylozit trong xylan (sơ đồ 12.5).



Sơ đồ 12.5. Hướng phân huỷ xylan gỗ lá rộng và gỗ lá kim dưới tác dụng của enzym.

Phần lớn xylanaza là protein kích thước phân tử khá nhỏ (khoảng 20 kDa), với điểm đẳng điện $pI = 8 - 10$. Một nhóm xylanaza khác cũng đã được xác định. Nhóm này có kích thước lớn hơn (khối lượng phân tử

trên 40 kDa), với điểm đẳng điện $pI = 3 \div 5$. Sự phân nhóm theo tính chất hoá lý tương ứng với phân loại xylanaza thành họ glycozyl hydrolaza 10 và 11 (hoặc F và G), dựa trên sự tương tự về aminoaxit.

Các enzym thuộc về hai nhóm xylanaza này cũng khác nhau về tính chất xúc tác. Họ xylanaza 10, với khối lượng phân tử lớn và pI thấp, có tính xúc tác linh hoạt hơn so với họ xylanaza 11 (khối lượng phân tử thấp, pI cao). Như vậy, chúng có khả năng thuỷ phân một cách hiệu quả các xylan có mức độ thế cao.

Phần lớn các xylanaza có khả năng thuỷ phân các nhóm polysaccarit dạng xylan. Điểm khác nhau giữa chúng chỉ là tạo thành các sản phẩm cuối khác nhau. Các sản phẩm chủ yếu xuất hiện khi thuỷ phân xylan là xylobioza, xylotrioza. Các oligome với $DP = 2 \div 5$ có chứa nhóm thế cũng được tạo ra trong quá trình này.

Độ dài mạch và cấu tạo của sản phẩm thế phụ thuộc vào cơ chế tác dụng của các xylanaza... Một số xylanaza có tính đặc hiệu cao đối với cơ chất. Một loại xylanaza sản sinh từ *Bacillus subtilis* đòi hỏi các đơn vị mắt xích của mạch xylan chứa nhóm thế axit glucuronic. Một loại xylanaza khác từ *Talaromyces emersonii* yêu cầu đoạn mạch xylan có ít nhất 24 đơn vị xyloza không mang nhóm thế.

Cấu trúc không gian ba chiều của một số xylanaza khối lượng phân tử thấp cũng đã được xác định. Enzym này có dạng elip, kích thước $3,2 \times 4,2$ nm. Khác với phần lớn xenlulaza, xylanaza này không chứa vùng gắn kết cơ chất nào nằm ở vị trí tách biệt.

Song theo Winterhalter, 1995, và Irving, 1994, một số xylanaza nguồn gốc vi khuẩn lại chứa một vùng gắn kết xenluloza hoặc một vùng gắn kết xylan.

Đa số các enzym xylanaza đã được nghiên cứu đều có hoạt tính lớn trong khoảng $pH = 4 \div 6$ và ở nhiệt độ dưới $70^{\circ}C$.

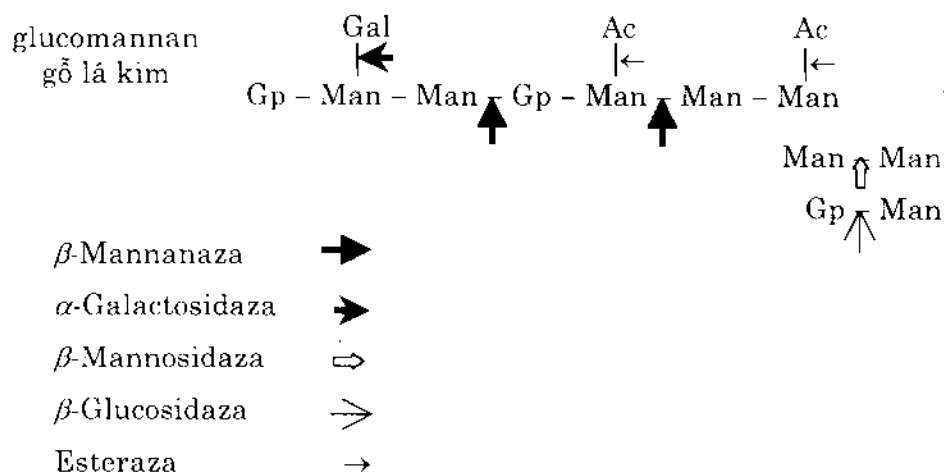
Các xylanaza chịu được môi trường kiềm và chịu nhiệt độ cao hơn sẽ có ý nghĩa rất lớn, vì hiện nay phần lớn xenluloza được sản xuất theo phương pháp sulfat, $pH = 13 \div 14$, nhiệt độ $170^{\circ}C$. Gần đây các nhà sinh học cũng tìm được một số xylanaza có hoạt tính tương đối cao

trong môi trường kiềm. Các xylanaza bền nhiệt và có hoạt tính ở nhiệt độ cao cũng được tạo ra từ một số vi khuẩn ưa nhiệt, như *Thermotoga*. *T. maritima* sản sinh ít nhất hai loại xylanaza chịu nhiệt, trong đó một loại hoạt động tối ưu ở 90°C, loại khác ở 105°C. Song, các vi sinh vật sống trong điều kiện khắc khe như vậy nói chung khó nuôi cấy và hiệu suất xylanaza thường thấp.

Sự tương đồng về aminoaxit của các xylanaza mở ra khả năng áp dụng kỹ thuật di truyền hiện đại để tạo ra xylanaza tốt hơn dùng trong công nghiệp. Chẳng hạn một số gen xylanaza ghi mã protein hoạt động ở nhiệt độ 75 ÷ 95°C, pH = 6 ÷ 8 đã được phân lập từ vi khuẩn ưa nhiệt *Thermotoga* và *Dictyoglomus* mà không cần sản xuất và tinh chế khó nhọc các enzym tương ứng.

• Mannanaza:

Endomannanaza (1,4- β -D-mannan mannanohydrolaza) xúc tác cho quá trình thủy phân liên kết 1,4- β -D-mannozit giữa các đơn vị mất xích trong mạch chính của mannan và các polysaccarit khác tạo thành chủ yếu từ mannoza, như glucomannan, galactomannan và galactoglucomannan (sơ đồ 12.6).



Sơ đồ 12.6. Hướng phân huỷ glucomannan của gỗ lá kim dưới tác dụng của enzym.

Nói chung các mannanaza có kích thước lớn hơn so với các xylanaza (khối lượng 30 ± 90 kDa) và có điểm đẳng điện trong môi trường axit.

Sản phẩm thủy phân chủ yếu từ galactomannan và glucomannan là mannobioza, mannotrioza và nhiều loại oligosaccarit hỗn tạp. Hiệu suất thủy phân phụ thuộc vào mức độ thể và sự phân bố của nhóm thế. Tỷ lệ các đơn vị mắt xích glucoza/ mannoza cũng ảnh hưởng tới quá trình thủy phân glucomannan.

Một số mannanaza vừa làm xúc tác thủy phân liên kết 1,4- β -glycozit giữa các đơn vị mắt xích mannoza vừa làm đứt liên kết giữa mắt xích glucoza và mannoza.

Stalbrand và Tenkanen, 1995, nhận thấy loại mannanaza từ *T. reesei* có cấu trúc đa vùng tương tự cấu trúc của một vài enzym xenlulaza. Protein này chứa một vùng lõi xúc tác liên kết với một vùng gắn kết xenluloza qua cầu nối.

Mannanaza từ *Caldocellulosiruptor saccharolyticus* cũng là bộ phận của một protein đa vùng, chứa hai vùng xúc tác (một vùng có hoạt tính mannanaza và vùng khác có hoạt tính endoglucanaza) cùng hai vùng liên kết với cơ chất. Ngoài mannanaza từ *C. saccharolyticus*, mannanaza ưa nhiệt, với nhiệt độ hoạt động tối ưu là 100°C , cũng nhận được từ *Thermotoga neapolytana* (Adams, 1995).

Các mannanaza hoạt động tối ưu trong môi trường kiềm cũng được phát hiện từ một loài *Bacillus* ưa kiềm (Horikoshi, 1991).

• Các hemixenlulaza khác:

Các endoenzym đã nói ở trên làm xúc tác cho phản ứng đứt mạch glycozit, tạo thành oligome. Tiếp đó, các enzym β -xylosidaza (1,4- β -D-xylozit xylohydrolaza), β -mannosidaza (1,4- β -D-mannozit mannohydrolaza) và β -glucosidaza xúc tác cho quá trình chuyển oligome thành monome. Các β -xylosidaza xúc tiến phản ứng thủy phân oligosaccarit của xyloza, trong khi đó, β -mannosidaza xúc tiến cho phản ứng làm đứt mạch oligosaccarit của mannoza.

Nói chung, các exoglycanaza là protein có kích thước lớn hơn so với endoglycanaza.

Các mạch nhánh nối với mạch chính xylan và glucomannan bị phân huỷ bởi α -glucuronidaza, α -arabinosidaza (α -L-arabinofuranozit arabinofuranohydrolaza) và α -D-galactosidaza (α -D-galactozit galactohydrolaza).

Các nhóm axetyl liên kết với hemixenluloza được tách ra bởi enzym esteraza.

Các enzym phân huỷ mạch nhánh có tính chất rất khác nhau. Một số enzym chỉ làm đứt mạch nhánh mà không đụng tới mạch chính, trong khi đó, một số loại enzym khác chỉ tấn công nhóm thế sau khi mạch chính đã bị phân huỷ bởi xylanaza hoặc mannanaza.

Sự phối hợp hoạt động giữa các loại enzym phân huỷ hemixenluloza là hoạt động xúc tiến của các endoglucanaza khi có mặt enzym hỗ trợ. Một số enzym hỗ trợ như α -arabinosidaza và esteraza từ *Pseudomonas fluorescens subs. cellulosa* và axetylxytan esteraza của *T. reesei* cũng có cấu trúc đa vùng với một vùng gắn kết xenluloza tách biệt.

** Sự tiếp cận của enzym đối với hemixenluloza trong vật liệu xơ:*

Tác động của enzym phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như diện tích bề mặt riêng và độ xốp (kích thước mao quản của xơ sợi, hình thái cấu trúc của các cấu tử trong vật liệu xơ) cũng như liên kết giữa lignin và cacbohydrat.

Nói chung, mao quản của xơ sợi từ gỗ cho phép các hợp chất cao phân tử xâm nhập vào thường có kích thước khoảng 1nm. Trong quá trình sản xuất bột hoá, kích thước mao quản tăng khi hiệu suất bột giảm. Với hiệu suất khoảng 50%, bột sulfat và sulfit có đường kính mao quản khoảng 5 ÷ 6 nm.

Kích thước phân tử và cấu trúc của enzym là yếu tố quan trọng khi xét tới khả năng tiếp cận của enzym đối với xơ sợi.

Kích thước phân tử enzym thay đổi nhiều, phụ thuộc vào khối lượng phân tử và hình dạng trong không gian của phân tử protein. Kích thước

phân tử xylanaza từ *T. reesei* (20 kDa) có độ lớn khoảng $0,3 \times 0,4$ nm, cho phép protein này lọt vào phần lớn các mao quản của bột hoá. Như vậy, khác với gỗ ban đầu, bột hoá có thể xử lý bằng enzym xylanaza.

Khi sử dụng enzym với liều lượng cao, có tới 50% hemixenluloza trong bột hoá bị phân huỷ mà không đung chạm tới xenluloza. Trong quá trình tẩy trắng với sự trợ giúp của enzym, ta thường chỉ dùng liều lượng enzym nhỏ để tách khoảng 10% hemixenluloza. Xylan trong bột xenluloza chưa tẩy trắng bao gồm phần xylan thực sự còn lại sau các phản ứng phân huỷ xảy ra trong quá trình nấu và phần xylan bị hấp phụ trở lại xơ sợi. Thật là hữu ích khi enzym chỉ xúc tiến quá trình tách phần xylan cản trở sự hoà tan lignin. Mặc dù đã tiến hành nghiên cứu về đặc điểm của các loại xylan cũng như nghiên cứu ứng dụng cho bột biến tính, các nhà khoa học cũng không thu được bằng chứng nào chứng tỏ enzym chỉ xúc tác cho phản ứng thuỷ phân phần xylan bị hấp phụ.

So với xylanaza, cơ chế của quá trình tẩy với sự trợ giúp của mannanaza ít được nghiên cứu hơn, có lẽ vì chúng gây tác động yếu hơn lên phần lớn các loại bột xenluloza.

Cơ chế tác dụng của mannanaza khác với xylanaza, vì sự phân bố của xylan và glucomannan trong bột có sự khác biệt. Qua thực nghiệm, một số tác giả nhận thấy, không tồn tại mối tương quan nào giữa số lượng, thành phần glucomannan hoà tan bởi enzym và khả năng tẩy trắng (Allison, 1995).

Song, thành phần và hình dạng bề mặt ngoài của bột xenluloza lại có tầm quan trọng trong quá trình tẩy với trợ giúp của mannanaza. Khâu xử lý bằng mannanaza làm tăng khả năng tẩy trắng bột nấu biến tính hoặc bột nấu liên tục, loại bột được coi là chứa ít xylan kết tủa cũng như có ít lignin trên bề mặt xơ sợi. Ngoài ra, mannanaza chỉ có thể thúc đẩy quá trình tẩy khi bột xenluloza từ gỗ thông nấu theo phương pháp truyền thống và được xử lý bằng biện pháp cơ học trước khi sử dụng enzym. Có lẽ phía dưới của lớp ngoài cùng của bột sulfat và trên bề mặt của bột nấu biến tính, glucomannan nằm sát lignin

hơn. Do đó, sau khi tách glucomannan, lignin dễ bị phân huỷ và hoà tan trong các công đoạn tẩy trắng bằng hoá chất.

Có một số yếu tố ảnh hưởng tới hoạt động của enzym, như tính chất của các enzym, pH, nhiệt độ tối ưu cũng như cơ chế tác động của enzym.

Quá trình sản xuất xenluloza thường diễn ra ở nhiệt độ cao, độ kiềm cao, nên ta cần sử dụng các enzym hoạt động tốt ở $\text{pH} = 9 \div 10$ và nhiệt độ $80^{\circ}\text{C} \div 90^{\circ}\text{C}$. Trường hợp trên thị trường không có xylanaza đáp ứng yêu cầu đó, quá trình có thể tiến hành tại $\text{pH} = 5 \div 7$, ở $50 \div 60^{\circ}\text{C}$.

Mức độ thuỷ phân cần thiết để đạt kết quả tối ưu được điều chỉnh qua lựa chọn thời gian phản ứng và liều lượng enzym. Liều lượng enzym là thông số mấu chốt, liên quan tới hiệu quả tẩy trắng, hiệu suất và giá thành sản phẩm. Mức độ thuỷ phân cần xác định trước bằng thực nghiệm. Nói chung, khi tăng liều lượng enzym, mức độ thuỷ phân cacbohydrat tăng. Song, hiệu quả tẩy trắng đạt tối ưu ở liều lượng enzym nhất định. Nếu cao hơn mức đó, hiệu quả tẩy hầu như không tăng. Như vậy, để đạt hiệu quả sử dụng enzym cao, đồng thời giảm tổn thất bột xenluloza, ta cần tối ưu hoá liều lượng enzym.

Hoạt động của enzym cũng bị ảnh hưởng bởi tương tác điện hoá giữa xơ sợi và enzym. Nhóm cacboxyl trong các chất của thành tế bào làm cho bột có thể trương trong nước. Điện tích bề mặt và sự trương của xơ sợi cũng ảnh hưởng tới hoạt động của xylanaza. Điện tích âm càng lớn, mức độ thuỷ phân dưới tác động của enzym càng thấp.

Song sự trương và điện tích bề mặt không phải là yếu tố có ảnh hưởng duy nhất đến thuỷ phân. Kiểu ion trái dấu và mức độ thế của nhóm cacboxyl trong bột cũng có ảnh hưởng sâu sắc đến hoạt động của xylanaza trong mạng xơ sợi của tế bào xenluloza. Bột không chứa ion kim loại khó bị thuỷ phân bởi hemixenlulaza (Buchert - Viikari, 1995). Hiện tượng này cần được tính đến khi tẩy trắng hoàn toàn không dùng clo, trong đó ion kim loại cần được tách bỏ để duy trì tính năng cơ lý của bột (xem 11.1.1.2).

Trong phần lớn các trường hợp, tác động của xylanaza không phụ thuộc vào nguồn gốc enzym. Xylanaza từ nấm và từ vi khuẩn đều làm tăng khả năng tẩy trắng. Hoạt tính của xylanaza trong quá trình tẩy bột xenluloza sulfat đã được nghiên cứu với xylanaza tinh chế từ *T. reesei*. Các xylanaza này có pI khác nhau, pH tối ưu khác nhau và tính đặc hiệu đối với cơ chất khác nhau. Các loại xylanaza với pI = 9 và pI = 5.5 đều tấn công vào phần hemixenluloza bị thế. Các loại xylanaza trên cũng có thể phân huỷ xylan không thể. Tuy nhiên trong trường hợp này, hoạt tính của xylanaza pI = 9 mạnh hơn so với xylanaza pI = 5.5.

Song, với bột sulfat gỗ thông, khi thủy phân xylan ở mức độ hạn chế, cả hai loại xylanaza tinh chế từ *T. reesei* đều dẫn tới mức giảm kappa như nhau, tăng độ trắng như nhau sau công đoạn tẩy bằng hoá chất.

Glucomannan là phần chủ yếu của hemixenluloza gỗ lá kim. Nhưng ở bột sulfat, tỷ lệ xylan và glucomannan hầu như bằng nhau.

Các nhà nghiên cứu đã so sánh hiệu quả đối với tẩy trắng khi sử dụng các enzym endo- β -mannanaza có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* và *Trichoderma reesei*.

Trước hết, xử lý bột xenluloza gỗ thông bằng mannanaza nguồn gốc *B. subtilis*, sau đó gia công bằng xylanaza, các tác giả nhận thấy hiệu quả tẩy trắng chỉ tăng chút ít so với trường hợp dùng xylanaza đơn thuần.

Một số công trình cho thấy mannanaza từ *B. subtilis* có khả năng phân huỷ mannan của gỗ, nhưng lại hoàn toàn không tách được mannan từ bột xenluloza sulfat. Hơn nữa hiệu quả thủy phân của enzym này thấp hơn rất nhiều so với loại mannanaza đi từ *T. reesei*. Loại mannanaza từ *T. harzianum* và *T. reesei* đều có hiệu quả khi sử dụng chúng trước dây chuyền tẩy trắng bằng peroxit hoặc (D/C) E cũng như DED.

Tác dụng của mannanaza phụ thuộc loại xơ sợi. Mannanaza từ *T. reesei* cũng có tác dụng tốt đối với tẩy trắng bột xenluloza gỗ lá kim sản

xuất theo phương pháp nấu biến tính và nấu liên tục, đặc biệt sau khi delignin hoá bằng oxy (Suurnäkki 1994, 1996).

So với xylanaza và mannanaza, các enzym phân hủy mạch nhánh của hemixenluloza ít quan trọng hơn đối với quá trình tẩy trắng, song cũng có một số công trình nghiên cứu dành cho chủ đề này.

** Ảnh hưởng của enzym lên chất lượng bột xenluloza:*

Khi xử lý trước bằng enzym, một phần cacbohydrat bị tách bỏ. Quá trình này ảnh hưởng tới độ trùng hợp trung bình của polysaccafit còn lại trong xơ sợi. Dưới tác động của xylanaza, xylan vốn có độ trùng hợp thấp bị phân huỷ, do đó phần polysaccarit còn lại trong sản phẩm sẽ có độ trùng hợp trung bình cao hơn, dẫn tới tăng độ nhớt dung dịch xenluloza thành phẩm.

Khi xử lý bột bằng mannanaza không có hoạt tính của xenlulaza, các nhà nghiên cứu không thấy có hiện tượng thay đổi độ trùng hợp trung bình một cách đáng kể. Hoạt tính phụ xenlulaza nói chung được coi là bất lợi trong quá trình xử lý bột, nếu chúng tồn tại trong chế phẩm enzym hemixenlulaza. Điều này thực sự xảy ra khi hoạt tính của endoglucanaza và xenlobiohydrolaza thể hiện trong chế phẩm enzym thô.

Do hoạt động phối hợp của các enzym phân huỷ xenluloza, quá trình giải trùng hợp xenluloza sẽ xảy ra với tốc độ lớn. Song, khi tác động riêng lẻ, các xenlulaza riêng biệt lại có ảnh hưởng khác nhau đáng kể lên tính chất cơ lý của bột.

Endoglucanaza được cho là bất lợi nhất, do chúng hoạt động ở vùng vô định hình của bột xenluloza.

Ngược lại, xenlobiohydrolaza không ảnh hưởng đáng kể tới độ nhớt của dung dịch xenluloza, thậm chí khi chúng được sử dụng với liều lượng tương đối cao.

Khả năng ứng dụng và ảnh hưởng của enzym trong quá trình tẩy trắng bột được trình bày ở bảng 12.12.

Ảnh hưởng của enzym lên khả năng tẩy trắng bột đã được nghiên cứu theo nhiều phương pháp.

Bảng 12.12. Ảnh hưởng của enzym phân huỷ cacbohydrat có nguồn gốc từ *T. reesei* lên khả năng tẩy trắng bột kraft (Buchert, 1994 và Pere, 1995)

Enzym	Ảnh hưởng lên khả năng tẩy trắng	Ảnh hưởng lên độ nhớt của dung dịch polysaccarit
Xylanaza	+++	+
Mannanaza	+	± (phụ thuộc dây chuyền tẩy)
Endoglucanaza I	+++	--
Endoglucanaza II	0	---
Xenlobiohydrolaza I	0	±
Xenlobiohydrolaza II	0	±

* *Đánh giá hiệu quả của enzym đối với bột xenluloza:*

Enzym thường được khảo sát qua các cơ chất tách biệt. Các cơ chất này thường được sử dụng để xác định hoạt tính của enzym.

Song cơ chất đã tách ra thay đổi rất nhiều về thành phần hoá học và trạng thái vật lý so với ban đầu. Hơn nữa, so sánh hoạt tính enzym là rất phức tạp vì các nhà nghiên cứu áp dụng nhiều phương pháp phân tích khác nhau. Do đó, trong lĩnh vực sản xuất bột xenluloza, hoạt động của enzym cần được so sánh khi sử dụng nguồn cơ chất thực tế, tức là bột giấy.

Trong các phép phân tích này, mức độ giải phóng saccarit từ bột xenluloza và hoà tan vào dung dịch thường được xác định theo phương pháp đường khử hoặc phương pháp hoá lý.

Song đối với oligome, độ chính xác của phép phân tích có thể bị hạn chế. Do đó, cần tiến hành giai đoạn thuỷ phân bổ sung, dưới tác dụng của axit hoặc enzym.

Ngoài ra, ta cũng cần xác định mức độ tách sản phẩm có nguồn gốc từ lignin, sau khi xử lý enzym hoặc sau trích ly kiềm. Đây cũng là tiêu chí quan trọng để đánh giá hiệu quả của enzym.

Phương pháp tin cậy nhất để so sánh ảnh hưởng của các enzym là tẩy trắng bột xenluloza sau khi xử lý bằng enzym. Trong thực tế, mức tăng độ trắng sau một hoặc hai giai đoạn delignin hoá thường được dựa vào để đánh giá hiệu quả xử lý bột bằng enzym. Phương pháp này nói chung có thể sử dụng để xác định hiệu quả thu được nhờ xử lý enzym phối hợp với dây chuyển tẩy trắng bằng hoá chất.

12.5.2. Vai trò của tác nhân sinh học trong xử lý chất thải từ nhà máy bột giấy

12.5.2.1. Thực trạng về môi trường

Tẩy trắng bột xenluloza là vấn đề được bàn tới nhiều từ thập kỷ 80 của thế kỷ XX, vì lý do gây ô nhiễm môi trường của các chất hữu cơ có trong dòng thải, đặc biệt là dẫn xuất dioxin và furan.

Do đó, nhiều công trình nghiên cứu đã được tiến hành để đưa ra giới hạn cho phép đối với tỷ lệ hợp chất clo hữu cơ có thể chấp nhận so với toàn bộ hợp chất clo hữu cơ (AOX/TOCl). Theo xu thế chung, mức phát thải cho phép ngày càng giảm.

Trong dây chuyền CE₁D₁E₂D₂ tẩy trắng bột sulfat gỗ lá kim, khoảng 75% các chất hoà tan (COD cũng như chất màu) và 95% hợp chất clo hữu cơ nằm trong dòng thải từ C và E₁, trong đó nguồn chủ yếu là E₁. Theo Lindberg, dòng thải E₁ chiếm tới 96% lượng chất màu, 70% các chất COD và 50% BOD trong dòng thải chung.

Tổng các hợp chất clo hữu cơ (TOCl) phát sinh trong quá trình tẩy trắng thay đổi tùy theo loại gỗ, số kappa của bột, dây chuyển và điều kiện công nghệ tẩy.

Thông thường, TOCl trong dòng thải từ phân xưởng tẩy trắng bột sulfat gỗ lá kim là 5 ÷ 8 kg/t bột sau tẩy.

Khoảng 20% clo tồn tại dưới dạng hợp chất hữu cơ có khối lượng phân tử thấp ($M < 1000$). Trong những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các chất clo hữu cơ này gây độc hại cho sinh vật sống dưới nước, do chúng dễ xâm nhập qua màng tế bào hoặc có khả năng tích lũy trong mô mỡ của động vật bậc cao.

Một số cấu tử chủ yếu của phần phân tử thấp là các chất hoà tan trong nước, như axetic clo hoá hoặc axeton clo hoá. Các hợp chất này dễ dàng phân huỷ trước hoặc trong quá trình xử lý sinh học, ít ảnh hưởng xấu tới môi trường.

Phần AOX có thể trích ly bằng dung môi hữu cơ không cực (EOX - extractable organically - bound halogen) chiếm khoảng 1 - 3% tổng clo liên kết. Phần đoạn này phần lớn chứa các chất phân tử thấp, dễ tan trong chất béo. Các chất này được coi là tác nhân chính gây ô nhiễm môi trường.

Trong số các hợp chất thuộc nhóm trên, chất thơm có mức thế clo cao (3 hoặc 4 clo trên một nhân thơm) đặc biệt được dư luận quan tâm.

Các thông số tẩy trắng như kappa của nguyên liệu xơ, liều lượng clo và các loại hợp chất clo, hàm lượng kiềm, pH, nhiệt độ đều ảnh hưởng tới BOD, COD, chất màu cũng như sự hình thành hợp chất clo.

Lượng TOCl trong nước thải từ giai đoạn clo hoá phụ thuộc nhiều vào lượng Cl_2 và hàm lượng lignin trong bột. Các chất hữu cơ clo hoá tan được trong chất béo sẽ tăng lên theo mức độ tăng kappa và liều lượng Cl_2 .

Cl_2 cũng làm tăng BOD và COD trong dòng thải từ clo hoá và trích ly kiềm.

Sự hình thành TOCl và các hợp chất clophenol tăng lên khi nâng nhiệt độ và giảm pH của công đoạn clo hoá.

Crawford và đồng tác giả cho rằng, khi tăng pH cuối và nhiệt độ clo hoá cũng như tăng liều lượng clo, sẽ xúc tiến quá trình hình thành cloroform (tác nhân tiềm tàng gây đột biến và ung thư) trong dòng thải từ giai đoạn clo hoá.

Giai đoạn hypoclorit là nguồn chủ yếu tạo ra cloroform. Trong giai đoạn clo hoá, cloroform xuất hiện ở mức độ thấp hơn, nhưng hàm lượng chất này có thể tăng lên khi tăng các thông số pH, nhiệt độ và kappa.

Số kappa cao cũng dễ dẫn tới tăng hàm lượng cloroform trong giai đoạn kiềm hoá.

Chan và McDonald nhận thấy, việc sử dụng ClO_2 thay thế một phần Cl_2 trong giai đoạn C sẽ làm giảm khả năng hình thành cloroform trong công đoạn clo hoá. Thay thế một phần Cl_2 bằng ClO_2 cũng làm giảm TOCl , chất màu, nhưng ít ảnh hưởng tới mức phát sinh dioxin clo hoá.

Nguồn dioxin clo hoá chủ yếu tạo ra từ giai đoạn C, tiếp đó là E. Sự hình thành dioxin phụ thuộc vào số kappa của bột nâu, điều kiện phối trộn trong clo hoá...

Dù áp dụng một số tiến bộ khoa học như đã nói ở trên, vấn đề ô nhiễm ở khâu tẩy trắng vẫn rất nặng nề, cần có các biện pháp xử lý triệt để hơn.

12.5.2.2. Xử lý chất thải từ công đoạn tẩy trắng

Nhiều phương pháp vật lý, hoá lý và hoá học đã được áp dụng để giải quyết vấn đề chất thải, như 1) kết tủa bằng cách sử dụng vôi, phèn và ion kim loại, các chất đông tụ nguồn gốc polyme tổng hợp, 2) hấp phụ trên than hoạt tính, đất sét tự nhiên và các chất hấp phụ tổng hợp, 3) tách chất dựa trên kỹ thuật màng, 4) lọc nhanh, 5) phát xạ UV, 6) oxy hoá bằng oxy, lưu huỳnh dioxit, hydro peroxit và natri hypoclorit...

Khó khăn nảy sinh khi áp dụng các phương pháp xử lý trên là chi phí lớn, độ tin cậy không cao. Phương pháp đông tụ và kết tủa tạo ra dạng bùn có thể tích lớn, khó tách nước. Thông thường, khoảng pH tối ưu được duy trì trong quá trình xử lý, sau đó, trước khi thải bỏ, môi trường lại phải đưa về trung tính, tổn hao chất. Oxy hoá bằng ozon và hydro peroxit khá đắt tiền. Oxy hoá dựa trên hợp chất clo lại phát sinh chất ô nhiễm thứ cấp như các chất hữu cơ clo hoá. Công nghệ màng đòi hỏi đầu tư lớn, hơn nữa, chất thải phải được xử lý sơ bộ. Vấn đề bám bẩn trên màng cũng gây khó khăn lớn cho các nhà công nghệ.

Các phương pháp dựa trên công nghệ sinh học có thể giảm thiểu hoặc loại bỏ hoàn toàn khó khăn đã nói ở trên.

a. Xử lý chất thải bằng vi sinh vật

Xử lý bằng vi sinh vật là phương pháp hiệu quả để giảm BOD và đồng thời giảm độ độc hại của dòng chất thải từ nhà máy xenluloza sulfat.

** Xử lý chất thải bằng vi khuẩn:*

• Quá trình hóa khí:

Oxy hóa bằng tác nhân sinh học là phương pháp được áp dụng rộng rãi nhất để giảm BOD và các chất hữu cơ clo hóa. Phương án này có giá thành thấp, hiệu quả cao.

Leach và đồng tác giả nhận thấy bảy cấu tử đại diện cho nhóm chất có độc tính cao bị phân hủy trong đầm phá thông khí ở điều kiện thí nghiệm. Các axit nhựa (nguồn gây độc chính) dễ dàng bị phân hủy dưới tác dụng sinh học. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ giảm được một phần (ít hơn 30%) hợp chất clophenol.

Song, Gergov và đồng tác giả cho rằng xử lý sinh học, đặc biệt là quá trình dùng bùn hoạt tính, có thể làm giảm 75 ÷ 95% hợp chất clophenol. Các hợp chất clo hữu cơ trung tính (nguồn gây độc biến) cũng được phân hủy khá triệt để. Cloroform cũng bị chuyển hóa hết dưới tác dụng của không khí khi xử lý sinh học. COD, TOCl và hợp chất phân tử lượng lớn giảm với mức độ thấp hơn. Eriksson và Kolar, 1985, cũng nhận thấy phần chất hữu cơ phân tử lượng lớn trong dòng thải không bị phân hủy trong đầm phá thông khí.

Trong khi các nhà nghiên cứu Thụy Điển cho rằng xử lý sinh học ít có tác dụng giảm TOCl, các nhà sản xuất Mỹ lại nhận thấy có tới 50 ÷ 90% TOCl bị phân hủy trong đầm phá thông khí hoặc dùng bùn hoạt tính. Gergov và đồng tác giả, 1988, đã nghiên cứu hiệu quả phân hủy chất ô nhiễm tại hệ thống xử lý chất thải của nhà máy và nhận thấy 48 ÷ 65% AOX giảm đi qua quá trình xử lý bùn hoạt tính.

Deardoff và cộng tác viên, 1994, cho rằng hiệu quả xử lý sinh học AOX trong dòng thải hỗn hợp của công đoạn tẩy trắng lên khi tỷ lệ ClO_2/Cl_2 tăng. Xử lý sinh học trong đầm phá thông khí làm giảm 97% hợp chất phenol chứa nhiều clo.

Jokela và đồng tác giả, 1993, nhận thấy hệ thống đầm phá thông khí có thể giảm được 58 ÷ 60% hợp chất clo hữu cơ từ pha nước; cả hai cách xử lý (bùn và pha lỏng) đều làm giảm các loại hợp chất clo hữu cơ với khối lượng phân tử khác nhau. Nhưng qua so sánh phân bố khối

lượng phân tử, các tác giả nhận thấy đường phân bố của các chất còn lại trong pha nước chuyển dịch một ít về phía khối lượng phân tử lớn hơn, chứng tỏ phân hợp chất có kích thước lớn khó bị phân huỷ.

Để tăng hiệu quả xử lý sinh học, Ek và Eriksson đã kết hợp quá trình siêu lọc với xử lý sinh học. Hiệu quả chung của công nghệ xử lý phối hợp được nâng lên nhờ tách bớt các chất độc hại qua quá trình siêu lọc.

Như vậy, quá trình tách bỏ hợp chất clo hữu cơ khỏi dòng thải bao gồm phân huỷ chất bay hơi, thủy phân, oxy hoá hoá học, oxy hoá sinh học, tách bọt, hấp phụ và kết tủa.

• Quá trình kỵ khí:

Xử lý chất thải dưới tác dụng của vi khuẩn kỵ khí dẫn tới phân huỷ hợp chất clophenol, tác nhân có độc tính cao và gây đột biến.

Quá trình Enso - Fenox có thể làm giảm $64 \div 94\%$ lượng hợp chất clophenol, giảm chất gây đột biến và ung thư trong dòng chất thải.

Theo McFarlane và Greenwood, có thể giảm 92% cường độ màu của dòng thải từ khâu tẩy trắng sau hai ngày xử lý trong hệ kỵ khí có sử dụng than hoạt tính.

Nhiều hợp chất trong dòng thải từ khâu tẩy trắng được coi là độc hại đối với vi sinh vật kỵ khí. Các hợp chất này bao gồm H_2O_2 dư từ dây chuyền tẩy bột cơ - nhiệt - hoá (CTMP), tác nhân tạo phức càng cua (chelate), các chất trích ly và các hợp chất hữu cơ clo hoá. Do đó, cần lựa chọn phương án thích hợp để đạt hiệu quả xử lý cao.

Raizer - Neto và đồng tác giả đã nghiên cứu hiệu quả xử lý hợp chất clo hữu cơ bằng vi khuẩn kỵ khí trong thiết bị có lớp màng vi khuẩn nằm cố định.

Fitzsimon và đồng tác giả nhận thấy sau 1,5 ngày xử lý kỵ khí, COD giảm $35 \div 40\%$ và AOX giảm $42 \div 45\%$. Các tác giả cũng nhận thấy một phân hợp chất chứa clo có khối lượng phân tử lớn bị phân huỷ. Vi khuẩn kỵ khí được cho là không có khả năng phân huỷ clolignin cao phân tử, do đó, hiện tượng giảm hợp chất clo hữu cơ ở đây

có thể chủ yếu dựa trên tác động hoá lý hoặc hoá học diễn ra trong quá trình kỵ khí. Sự phân huỷ clolignin trong điều kiện kỵ khí do kết hợp yếu tố tăng chuyển hoá năng lượng, thủy phân với sự có mặt của tác nhân hoá học và có thể cả hiện tượng hấp phụ.

Ek và Eriksson đề xuất quá trình dựa trên kỹ thuật siêu lọc (UF) và xử lý háo khí - kỵ khí. UF được dùng để tách các chất có khối lượng phân tử lớn, vì các chất này tương đối bền dưới tác dụng sinh học. Đối với các hợp chất chứa nhiều nhóm clo, vi sinh vật kỵ khí được cho là có tác dụng mạnh hơn so với loại háo khí. Nhóm chất còn lại bị phân huỷ dưới tác dụng của vi sinh vật háo khí. Phối hợp cả ba yếu tố này, ta có thể giảm được 80% AOX, COD, phenol clo hoá và hoàn toàn loại bỏ clorat.

Armentat và đồng tác giả đã nghiên cứu quá trình phối hợp kỵ khí - háo khí để phân huỷ hợp chất thơm chứa clo. Hỗn hợp thu được từ thiết bị phân huỷ kỵ khí được sử dụng để tạo ra tổ hợp kỵ khí có khả năng phân huỷ một phần clo trong 2,4,6-triclophenol. Dòng chất làm sạch và thanh trùng từ cùng thiết bị kỵ khí cũng được sử dụng làm môi trường cho tổ hợp kỵ khí.

Trong quá trình kỵ khí, 2,4,6-triclophenol lúc đầu bị tách bớt clo thành 2,4-diclophenol, sau đó thành 4-clophenol. Các tác giả đã nhận được 4-clophenol theo đúng phương trình tỷ lệ.

Kết quả tương tự cũng thu được khi ta cố định vi sinh vật kỵ khí trên chất mang. Sau khi cố định, tổ hợp kỵ khí có khả năng phân huỷ 150 μM 2,4,6-triclophenol trong bốn ngày.

Strehler và Welander nghiên cứu khả năng làm giảm AOX và COD từ dịch thải của công đoạn tẩy xenluloza sulfat trong phòng thí nghiệm với thiết bị có chất mang phân tán lơ lửng vi khuẩn kỵ khí và một thiết bị khác không có vi sinh vật tham gia, dưới tác dụng của nhiệt trong môi trường kiềm. Ở pH = 7.0 và 37°C, thời gian lưu trên 3,5 giờ, mức giảm cực đại COD là 55% đạt được trong thiết bị có chất mang lơ lửng. Tốc độ chuyển hoá COD khi thời gian tiếp xúc ngắn là 2.6 kg COD/m³ ngày.

Xử lý bằng chất mang lơ lửng thực hiện thành công ở pH = 9.0 và 45°C cũng như pH = 7.0 và 50°C, có thể giảm trên 50% COD với thời gian lưu là 4 giờ. Đối với AOX, mức giảm 50% đạt được ở pH = 9.0 và 45°C, trong khi đó, AOX chỉ giảm 39% ở pH = 7.0 và 37°C. Hiện tượng này có thể do ở nhiệt độ cao, pH cao, diễn ra phản ứng phân huỷ hoá học (không chỉ sinh học) hợp chất clo.

Các tác giả cũng thực hiện quá trình xử lý ở quy mô nhỏ. Khâu xử lý kiềm được tiến hành ở pH = 10.0 và 54°C, thời gian lưu 2 giờ, tiếp đó tiến hành quá trình sinh học ở pH = 8.0 và 35°C, thời gian lưu 4 giờ. Sau khi nước thải nhà máy sulfat được xử lý qua hai khâu trên, AOX giảm 80% và COD giảm 50%.

** Xử lý chất thải bằng nấm:*

Các vi khuẩn phân huỷ cơ chất dựa trên hệ thống enzym nội bào. Do đó, hiệu quả xử lý bằng vi khuẩn đối với COD, TOC và các cololignin phân tử lượng lớn không cao. Để bị phân huỷ, các cơ chất cần phải đi qua màng tế bào của vi khuẩn. Nhưng phần lớn các chất TOC, COD lại có phân tử lượng lớn. Do đó, hiệu quả quá trình xử lý bằng vi khuẩn không cao là điều dễ hiểu.

Phương pháp khác hiệu quả hơn được áp dụng để phân huỷ cololignin phân tử lượng lớn dựa vào nấm mốc trắng, tác nhân sinh học có khả năng phân huỷ mạnh lignin và các sản phẩm từ lignin.

Nấm mốc trắng sản sinh các enzym phân huỷ lignin trong giai đoạn chuyển hoá thứ cấp, khi một trong số các nguồn dinh dưỡng như nitơ, phospho, cacbon bị thiếu hụt (điều kiện tự nhiên không thuận lợi). Nấm mốc trắng tiết ra một hệ thống bao gồm các enzym ngoại bào. Các enzym này phân huỷ cololignin một cách hiệu quả.

Ứng dụng rộng rãi nhất của nấm mốc trắng trong lĩnh vực xử lý nước thải xoay quanh vấn đề làm mất màu dòng thải từ nhà máy sản xuất bột xenluloza hoặc phân xương tẩy trắng.

Cơ chế phân huỷ lignin dưới tác dụng của nấm mốc trắng diễn ra theo bốn giai đoạn. Enzym ligninaza làm xúc tác cho hai giai đoạn đầu tiên. Tiếp đó là giai đoạn hydroxyl hoá nhân thơm, tạo ra cấu trúc

catechol trong các sản phẩm phân huỷ. Ở giai đoạn thứ tư, enzym dioxygenaza làm xúc tác cho quá trình oxy hoá mở vòng. Các sản phẩm này chuyển hoá tiếp thành nước và cacbon dioxit. Các hợp chất thơm chứa clo bị phân huỷ dưới tác dụng của nấm mùn trắng tương tự như cách đã mô tả ở trên. Các vòng thơm bị phân huỷ bởi dioxygenaza. Sản phẩm cuối cùng là cacbon dioxit, nước và các muối clorua vô cơ.

Nhiều vi sinh vật khác cũng sinh trưởng dựa vào hợp chất clo hữu cơ. Chúng phân huỷ các chất này theo cách tương tự hoặc theo phương thức khác dựa vào enzym monooxygenaza.

Loài nấm mùn trắng được biết đến nhiều nhất là *Phanerochaete chrysosporium*. Chúng tiết ra một họ enzym phân huỷ lignin, sản phẩm phân huỷ và dẫn xuất của lignin. Cả clolignin phân tử lượng thấp và phân tử lượng cao đều bị phân huỷ mạnh dưới tác dụng của loài nấm này.

P. chrysosporium làm giảm COD bằng cách phân huỷ clolignin thành CO₂ và clorua, làm mất màu dòng thải từ khâu tẩy trắng nhờ phá huỷ cấu trúc mang màu và các chất màu. Các enzym có thể làm giảm TOC bằng cách chuyển các chất thành clorua vô cơ. Phần lớn clophenol phân tử lượng thấp biến mất sau một ngày xử lý bằng nấm. *P. chrysosporium* cũng có khả năng phân huỷ các chất nguy hiểm và độc hại như TNT, PCB (biphenyl chứa nhiều gốc clo), hexacloxyclohexan, DDT, dioxin clo hoá và nhiều hợp chất khác.

Sự phân huỷ lignin thành CO₂ dưới tác dụng của *P. chrysosporium* đòi hỏi cơ chất sinh trưởng như xenluloza hoặc glucoza. Sự sinh trưởng dựa vào lignin làm nguồn cacbon duy nhất là không đáng kể. Ngoài yêu cầu về một chất cùng làm cơ chất (co - substrate), hệ thống enzym phân huỷ lignin có một số đặc điểm sau: 1) được sản sinh thậm chí khi vắng mặt lignin, 2) thể hiện trong quá trình chuyển hoá thứ cấp, 3) được sản sinh khi hạn chế nguồn cacbon, lưu huỳnh hoặc nitơ, 4) ức chế mạnh bởi glutamat và một số aminoaxit khác, 5) nhạy cảm với kim loại hiếm, 6) có khoảng pH tối ưu hẹp (4 ÷ 5) và bị tác động nhiều khi nồng độ oxy thay đổi.

Tác dụng khử màu của nấm cũng như phân huỷ lignin là hiện tượng chuyển hoá thứ cấp và có thể quy về chuyển hoá lignin vì lignin và sản phẩm phân huỷ của lignin là nguồn gây màu chủ yếu trong nước thải từ E₁.

Điều kiện tối ưu để nấm phát triển và điều kiện tối ưu để khử màu là không đồng nhất. Khoảng pH tối ưu để nấm sinh trưởng là $4.3 \div 4.8$. Do đó, quá trình khử màu sẽ bị kìm hãm khi pH nhỏ hơn 4.0 hoặc lớn hơn 5.0, vì nấm kém phát triển. Nhiệt độ tối ưu để nấm sinh trưởng là 40°C, trong khi đó quá trình khử màu không bị giới hạn trong khoảng nhiệt độ như vậy. Tuy nhiên, tốc độ cũng giảm một ít khi nhiệt độ giảm xuống 25°C.

Hoạt động khử màu của nấm đòi hỏi có oxy và chất cùn làm cơ chất (co - substrate). Nhưng không giống như sự sinh trưởng của nấm, việc cung cấp thêm nguồn nitơ là không cần thiết.

Eaton và đồng tác giả đã nghiên cứu quá trình khử màu dưới tác động của *P. chrysosporium*. Loài nấm này cần cơ chất sinh trưởng cho quá trình làm mất màu như khi chúng phân huỷ lignin. Các nghiên cứu chỉ ra rằng, bùn ban đầu giàu xenluloza rất thích hợp cho quá trình này. Nấm cần bề mặt cố định cho sinh trưởng trong giai đoạn đầu để khử màu có hiệu quả.

Thiết bị phản ứng có màng cố định trong cơ cấu tiếp xúc sinh học dạng roto (RBC) hiện được sử dụng để xử lý nước thải được cho là rất hiệu quả. RBC bảo đảm cho quá trình thông khí. Quá trình khử màu được tăng cường đáng kể dưới tác dụng của môi trường giàu oxy.

Giai đoạn sinh trưởng là cần thiết trước khi quá trình khử màu bắt đầu. Trong giai đoạn này, dưỡng chất nitơ giảm, nấm bắt đầu tấn công phân huỷ lignin và làm mất màu hỗn hợp.

Thiết bị khử màu dựa trên sợi nấm MyCoR (mycelial color removal) có màng cố định được nạp chất dinh dưỡng sinh trưởng, các chất này gồm cả bùn ban đầu làm nguồn cacbon. Thiết bị được cấy loại nấm thích hợp. Tuy từng nhà máy, bùn cung cấp một số khoáng chất và nguyên tố hiếm cũng như nguồn cacbon. Bùn thứ cấp giàu nitơ cũng

được dùng để cung cấp nitơ cần thiết cho sợi nấm sinh trưởng. Sau khi sợi nấm sinh trưởng trên bề mặt thiết bị phản ứng, nấm chuyển hoá hết nitơ sẵn có và trở thành tác nhân phân huỷ lignin (giai đoạn sinh trưởng đầu tiên là $2 \div 4$ ngày). Sau đó, thiết bị có thể hoạt động trong 60 ngày. Theo phương pháp này, sau 48 giờ xử lý, có thể chuyển hoá 70% hợp chất clo hữu cơ thành clorua vô cơ và giảm một nửa COD hoặc BOD.

Trong quá trình xử lý sinh học, ta có thể kết hợp sử dụng cả nấm và vi khuẩn. Yin và đồng tác giả đã làm giảm TOC, COD cũng như cường độ màu trong dòng thải của công đoạn tẩy xenluloza sulfat gỗ lá kim bằng cách phối hợp sử dụng nấm và vi khuẩn. Trong sáu hệ nấm mùn trắng/ vi khuẩn đã nghiên cứu, các tác giả chỉ thay đổi mức độ xử lý nấm. Trong ba phương án, công nghệ siêu lọc được áp dụng để nâng cao nồng độ clolignin phân tử lượng lớn, giảm thể tích dịch thải trước khi xử lý nấm (để giảm chi phí). Phương án tốt nhất là sử dụng siêu lọc/ nấm mùn trắng/ vi khuẩn, giảm được 71% TOC, 50% COD và 65% cường độ màu trong dòng chất thải. Xử lý bằng nấm tạo khả năng cho vi khuẩn phân huỷ các chất hữu cơ đã khử clo. Nấm có khả năng tách clo từ clo lignin. Nấm có thể tấn công cả clolignin phân tử lượng thấp cũng như loại phân tử lượng lớn.

Guo và đồng tác giả đã sử dụng roto tiếp xúc sinh học để xử lý các chất mô phỏng như pentaclophenol, 2,4,6-triclophenol, 2,4-diclophenol, 4,5-dicloguaiacol và 4,5,6-tricloguaiacol trong môi trường nước nguyên chất. Họ nhận thấy, tại nồng độ 30 mg/l, $80 \div 85\%$ clophenol và cloguaiacol bị phân huỷ sau $3 \div 4$ giờ xử lý. Trong khi đó, một số hợp chất trên bị metyl hoá thành cloanisol và cloveratrol.

Messner và đồng tác giả đã đề xuất một quá trình xử lý tương tự, đó là MyCoPOR. Trong quá trình này, chất mang có cấu trúc xốp được cấy bào tử *Phanerochaete chrysosporium*. Các thử nghiệm được tiến hành với trường hợp có và không có chất mang cấu trúc xốp đã chỉ ra rằng, mức khử màu dòng thải E_1 từ công đoạn tẩy bột sulfite tăng từ 50% (không có chất mang xốp) lên $70 \div 80$ (khi dùng chất mang xốp).

Trong quá trình khử màu, 70% AOX cũng bị giảm khi ta sử dụng chất mang xốp. Nếu dưỡng chất được thay thế và dòng thải tách hàng ngày, thời gian hoạt động hiệu quả của sợi nấm có thể kéo dài 6 ÷ 8 tuần, phụ thuộc vào giống nấm.

Hệ thống lọc nhỏ giọt được coi là có hiệu quả nhất để phân huỷ chất thải. Mức độ khử màu dòng thải E₁ có thể đạt 70% khi thông khí. AOX có thể giảm 60%. Quá trình phân huỷ diễn ra nhanh nhất trong 3 ÷ 6 giờ đầu tiên, giảm khoảng 50% cường độ màu và AOX.

Một loài nấm mùn trắng khác cũng hoạt động tốt, đó là *Coriolus versicolor*. Loài nấm này cần nguồn cơ chất sinh trưởng là xenluloza hoặc glucoza để phân huỷ lignin thành cacbon dioxit. Điều kiện nuôi cấy thuận lợi cho phân huỷ lignin tương tự như điều kiện xúc tiến khử màu bằng nấm.

Livernoche và đồng tác giả nhận thấy *C. versicolor* trong dịch nuôi cấy có thể làm giảm 60% cường độ màu của dòng thải chung từ công đoạn tẩy trong 6 ngày, với sự có mặt của saccaroza. Khử màu dòng thải hiệu quả hơn khi nồng độ đường (cơ chất sinh trưởng) cao và lượng nấm lớn.

Khi xử lý bằng loại nấm này nhưng được cố định trên các hạt gel canxi alginat, mức khử màu có thể đạt 80% sau ba ngày hoạt động, với sự có mặt của saccaroza. Trong quá trình khử màu, pH của dòng chất thải giảm từ 5.7 xuống còn 3.6, có lẽ do xuất hiện các axit hữu cơ qua quá trình chuyển hoá của nấm cố định. Nhưng sự mất màu không phải do giảm pH.

Quá trình xử lý không chỉ tác động tới sắc thể ở dạng hoà tan mà còn ảnh hưởng tới cả chất rắn lơ lửng. Các chất rắn (thu được nhờ ly tâm) trước khi xử lý mẫu thường có màu nâu sẫm. Sau bốn ngày xử lý bằng nấm, chất rắn có màu nâu nhạt. Các hạt với sợi nấm cố định vẫn có màu sáng trong suốt quá trình thí nghiệm, không có biểu hiện nào về sự tích lũy chất mang màu.

Quá trình khử màu diễn ra ở pH = 5.0 nhanh hơn ở pH = 7.0.

Các hạt gel tái sử dụng cũng có khả năng làm giảm cường độ màu một cách hiệu quả khi có mặt không khí, nhưng không hoạt động được trong điều kiện kỵ khí.

Thiết bị sinh học kiểu thông khí sử dụng hạt canxi alginat để cố định nấm *C. versicolor* đã được Royer sử dụng để nghiên cứu khử màu liên tục dòng chất thải từ nhà máy xenluloza sulfat. Dòng thải dùng trong nghiên cứu chứa saccaroza, không có nguồn dưỡng chất nào khác. Một mô hình động học đã được đưa ra để diễn tả quá trình khử màu dưới tác dụng của nấm, nhưng không làm sáng tỏ cơ chế về hoá học liên quan tới phản ứng khử màu.

Sử dụng trực tiếp sợi nấm *C. versicolor* ở dạng lơ lửng là không khả thi vì có khó khăn liên quan tới độ nhớt, khả năng chuyển oxy và vấn đề tái sử dụng nấm. Do đó, ta cho nấm sinh trưởng dưới dạng viên, nhờ thế loại bỏ khó khăn liên quan đến tái sử dụng sinh khối và tạo điều kiện tiến hành quá trình với lượng lớn.

Tốc độ khử màu nhờ viên nấm cấy từng mẻ nhanh gấp hàng chục lần so với nuôi cấy liên tục trong cùng điều kiện.

Bergbauer và Karaepelin nhận thấy *C. versicolor* phân huỷ một cách hiệu quả clolignin trong dòng chất thải từ khâu tẩy trắng. Sau 9 ngày xử lý bằng nấm, trên 50% clolignin chuyển hoá, giảm 39% AOX và 84% cường độ màu. Trong thiết bị sinh học của phòng thí nghiệm, với 0,8% glucoza và 12 mM amoni sulfat, khoảng 88% chất màu bị phân huỷ sau ba ngày. Đồng thời, nồng độ AOX giảm từ 40mg/l vào thời điểm ban đầu xuống còn 21.9 mg/l sau hai ngày hoạt động. Khi dùng maltoza thay cho glucoza, cường độ màu và AOX cũng giảm tương tự.

Bajpai và đồng tác giả sử dụng *T. versicolor* để khử màu chất thải từ E₁. Các viên nấm sợi oxy hoá các sắc thể của chất thải khi có mặt một trong số các chất cùng làm cơ chất sau: saccaroza, glucoza, maltoza, tinh bột, etanol, cacboxymetylxenluloza, xenluloza tinh thể và bột giấy. Mức khử màu cao nhất đạt được trong trường hợp dùng glucoza. Giá trị pH tối ưu là 4,5, nhiệt độ tối ưu là 30°C.

Trong thiết bị gián đoạn xử lý dòng chất thải có 7000 đơn vị màu trong một lít, mức khử màu tốt nhất là 93% đạt được sau 48 giờ hoạt động; COD giảm 35%. Trong khi đó, ở thiết bị hoạt động liên tục, mức giảm tương tự về COD và cường độ màu đạt được sau 38 giờ. Khả năng khử màu của viên sợi nấm không bị mất sau 30 ngày hoạt động liên tục.

Các tác giả này cũng sử dụng *T. versicolor* để khử màu dòng chất thải từ nhà máy bột giấy sử dụng phụ phẩm nông nghiệp làm nguyên liệu. Khi xử lý dòng thải có 18.500 đơn vị màu, mức giảm màu tối đa là 92%, mức giảm COD là 69%.

Theo Royer và đồng tác giả, quá trình sử dụng viên sợi nấm *C. versicolor* để khử màu dịch thải sulfat đã qua siêu lọc ở điều kiện không thanh trùng, mức tổn thất hoạt tính là rất nhỏ. Tốc độ khử màu tỷ lệ thuận với nồng độ chất thải. Tốc độ này thấp hơn so với tốc độ đạt được trong quá trình MyCoR. Điều này có thể do thí nghiệm tiến hành ở nhiệt độ thấp (22°C) và do sử dụng loại viên có đường kính tương đối lớn, hạn chế hoạt động của vi sinh vật so với nấm ở trạng thái tự do dùng trong quá trình MyCoR.

Marton và đồng tác giả nhận thấy *C. versicolor* làm nhạt màu nâu thâm đặc trưng của dung dịch lignin trong kiềm. Song họ đã xác định được rằng khoảng 1/2 sắc thể và 1/4 hợp chất thơm được hoàn nguyên từ tế bào nấm bằng cách trích ly kiềm. Như vậy, có thể kết luận rằng hiện tượng hấp phụ cũng đóng vai trò quan trọng trong phân huỷ lignin. Quá trình khử màu cũng diễn ra trong điều kiện kỵ khí nhưng ở mức độ thấp hơn.

Xử lý chất thải từ khâu kiềm hoá đầu tiên (E₁) bằng ozon và nấm *C. versicolor* đã được Roy - Arcand tiến hành 1991. Xử lý ozon và xử lý sinh học đều phân huỷ khá hiệu quả các chất màu, nhưng nấm phân huỷ mạnh hơn, thể hiện qua mức giảm COD. Các hợp chất clophenol một nhân thơm cũng như độc tính của chất thải giảm một phần qua ozon hoá. Các hợp chất này bị phân huỷ hoàn toàn sau khi qua khâu xử lý sinh học.

Kết quả phân tích phân bố khối lượng phân tử cho thấy, trong cả hai quá trình xử lý (ozon và sinh học), các phân tử có kích thước khác nhau đều bị phân huỷ với mức độ gần như nhau. Kết hợp xử lý nhanh bằng ozon với xử lý bằng nấm ở bước tiếp theo là phối hợp hoạt động giữa hai cơ chế khử màu đối với dòng chất thải từ E₁.

Để so sánh, dòng chất thải được xử lý sơ bộ hoặc bằng ozon hoặc bằng sinh khối. Nồng độ ozon dao động trong khoảng 110 ÷ 160 mg/l; sinh khối *C. versicolor* (2 ÷ 5 g/l - theo khối lượng ướt), thời gian xử lý sơ bộ bằng nấm là 24 giờ. Sau khâu xử lý sơ bộ bằng ozon hoặc nấm, chất thải tiếp xúc với *C. versicolor* trong năm ngày.

Các tác giả nhận thấy, xử lý sơ bộ bằng ozon hiệu quả hơn so với sử dụng nấm.

Sau 20 giờ tiếp xúc, cường độ màu giảm 46 ÷ 53% đối với dòng thải xử lý sơ bộ bằng ozon, so với 29% trong trường hợp sử dụng nấm đơn thuần.

Vai trò của ozon quan trọng nhất trong 24 giờ đầu tiên tiếp sau khâu xử lý sơ bộ. Xử lý trước bằng ozon cũng tạo thuận lợi nhiều hơn để nấm tiếp cận với các chất hữu cơ.

Trong dây chuyền tẩy trắng, sử dụng giai đoạn tẩy bằng ozon (Z) để thay thế một phần clo cũng là biện pháp thích hợp nhằm giảm bớt các hợp chất clophenol phân tử lượng thấp có độ độc cao và tạo điều kiện thuận lợi cho khâu xử lý chất thải bằng vi sinh vật.

Một loại nấm mùn trắng nữa được Belsare sử dụng để khử màu và phân huỷ các mảnh lignin trong dòng chất thải của nhà máy bột và giấy, đó là *Schizophyllum commune*.

Loại nấm này phân huỷ các sản phẩm từ lignin khi có mặt nguồn cacbon dễ chuyển hoá. Khi thêm nguồn cacbon và nitơ vào hệ, ta có thể nâng cao hiệu quả khử màu của nấm và giảm BOD cũng như COD của dòng chất thải. Saccaroza được coi là nguồn cacbon tốt nhất để nấm phân huỷ dẫn xuất từ lignin.

Dưới tác dụng của *S. commune* trong thời gian hai ngày, phần lớn các hợp chất từ lignin đều bị phân huỷ. Hiệu quả xử lý chất thải đạt

cao ở pH = 4 ÷ 5 và kết hợp thông khí. Ở điều kiện tối ưu, sau hai ngày cấy nấm, *S. commune* làm giảm 90% cường độ màu của dòng thải, đồng thời giảm 70% BOD, 72% COD.

Theo Fukuzumi, loại nấm mùn trắng *Tinctoporia borbonica* cũng có khả năng làm nhạt màu dịch thải nhà máy sản xuất xenluloza sulfat. Sau 4 ngày xử lý bằng loại nấm này cường độ màu có thể giảm 99%. Phân tích UV nước lọc từ môi trường nuôi cấy cho thấy, hàm lượng clolignin và các sản phẩm phân huỷ khác giảm theo thời gian. Các chất ô nhiễm hoàn toàn bị phân huỷ sau 14 ngày.

Nấm *Aspergillus niger* cũng có thể khử màu nước thải từ nhà máy bột giấy. Loại nấm này có khả năng làm giảm 81% cường độ màu và 43% BOD, 41% COD sau hai ngày hoạt động.

Tono và đồng tác giả nhận thấy một số loài thuộc *Aspergillus* và *Penicillium* làm giảm 90% cường độ màu sau một tuần xử lý ở 30°C và pH = 6.8. Sau đó, Milstein và đồng tác giả cũng thông báo rằng, các vi sinh vật này có thể phân huỷ khá mạnh các clophenol cũng như các clo hữu cơ khác từ dịch thải phân xưởng tẩy trắng.

Phần lớn TOCl cũng như chất màu của nước thải đều bắt nguồn từ phần clolignin phân tử lượng lớn. Do đó, công trình nghiên cứu trong tương lai cần tập trung vào việc xử lý các hợp chất này. Các vi khuẩn chỉ phân huỷ mạnh clo hữu cơ phân tử lượng dưới 1000. Vì vậy, cần có các công trình nghiên cứu làm giảm khối lượng phân tử clolignin hoặc tách phần clolignin phân tử lượng lớn trước khi xử lý sinh học.

Có ba phương án làm giảm khối lượng phân tử của clolignin:

- Sử dụng oxy trong giai đoạn tẩy trắng đầu tiên và nâng cao mức thay thế ClO₂ cho Cl₂ trong dây chuyền tẩy trắng bằng hoá chất;

- Xử lý sinh học hai giai đoạn;

- Xử lý sinh hoá sau đó xử lý sinh học.

Ngoài ra, ta có thể kết hợp thêm các phương pháp khác. Qua khâu siêu lọc, ta có thể tách riêng phần phân tử lượng lớn, khả năng xử lý sinh học đối với phần đi qua màng nhờ đó được tăng cường. Phương

pháp khác là kết tủa phần clolignin phân tử lượng lớn, phần chất còn lại dễ xử lý hơn bằng tác nhân sinh học.

*** Xử lý chất thải bằng enzym:**

Một số loại enzym có khả năng phân huỷ chất màu và AOX từ dòng thải nhà máy bột - giấy.

Peroxidaza, laccaza là các loại enzym quan trọng nhất trong lĩnh vực này. Phương pháp xử lý dựa vào enzym có một số ưu điểm so với phương pháp vật lý hoặc hoá học. Ở đây enzym chỉ đóng vai trò xúc tác, không cần lượng lớn theo phương trình tỷ lệ. Các hệ vi khuẩn cũng như enzym đã tách ra - peroxidaza và laccaza - có thể làm giảm độc tính của dòng thải nhờ polyme hoá, làm cho các chất phenol không clo hoá hoặc clophenol phân tử lượng thấp trở nên khó tan trong nước.

Các enzym lignin peroxidaza được sản sinh từ nấm mũ trắng có khả năng phân huỷ hàng loạt chất hữu cơ gây ô nhiễm, bao gồm biphenyl chứa nhiều nhóm thế clo (PCB), DDT, indan, anilin clo hoá, các phenol chứa nhiều nhóm thế clo như PCP và clolignin...

Lýr nhận thấy laccaza của *T. versicolor* có thể phân huỷ một phần hợp chất clo của PCP.

Hammel và Tardone chỉ ra rằng peroxidaza từ *P. chrysosporium* có thể tách clo từ PCP và 2,4,6-triclophenol.

Arcand và Archibald đã tiến hành nghiên cứu một cách hệ thống quá trình phân huỷ các hợp chất clophenol trong dòng thải từ nhà máy bột - giấy bằng laccaza của *T. versicolor*. Đa số laccaza tiết ra từ *T. versicolor* có thể declo hoá nhiều loại hợp chất clophenol. Tốc độ và mức độ giải phóng Cl^- phụ thuộc nhiều vào cơ chất và nồng độ enzym. Quá trình declo hoá xảy ra kèm theo polyme hoá mạnh các cơ chất.

Paice và Jurasek đã sử dụng peroxidaza làm xúc tác khử màu chất thải từ khâu tẩy trắng. Khả năng khử màu ở môi trường trung tính với sự có mặt của hydro peroxit tăng lên khi thêm peroxidaza. Không có quá trình kết tủa diễn ra khi khử màu. Quá trình xúc tác (20 mg peroxidaza/lít) diễn ra trong khoảng nồng độ peroxit (0,1 ÷ 800 mM). Nhưng ảnh hưởng rõ rệt nhất thể hiện trong khoảng nồng độ peroxit 1

mM ÷ 100 mM. Giá trị pH tối ưu cho quá trình xúc tác là 5,0. So sánh với quá trình khử màu bằng nấm sợi *C. versicolor*, tốc độ khử màu bằng peroxit phối hợp với peroxidaza lúc đầu nhanh hơn, nhưng sau 45 giờ hoạt động, mức độ khử màu bằng nấm lại cao hơn. Khi thêm peroxidaza vào dòng chất đã xử lý bằng enzym, quá trình xúc tác bổ sung hầu như không diễn ra. Như vậy, hệ peroxit / peroxidaza không hoàn toàn thể hiện phương thức chuyển hoá mà nấm đã sử dụng.

Paice và Jurasek đã đưa ra giả thuyết để giải thích hoạt động của enzym trong quá trình khử màu. Glucoza được tế bào nấm sử dụng để sản sinh peroxidaza. Một trong số các enzym ngoại bào thường thấy trong nấm mùn trắng là peroxidaza. Có thể enzym này oxy hoá các sắc thể và làm mất màu nước thải.

Forss và đồng tác giả cho rằng, sử dụng laccaza kết hợp với thông khí có thể làm giảm trên 90% lượng hợp chất phenol trong nước thải. Khối lượng các hợp chất clophenol cũng giảm 75 ÷ 99%, tùy thuộc loại hợp chất phenol.

Call được cấp bằng sáng chế 1992 về quá trình khử màu và loại bỏ chất gây ô nhiễm trong dòng chất thải từ nhà máy bột và giấy. Trong quá trình này, laccaza từ *C. versicolor* được sử dụng, kết hợp với các chất oxy hoá (H_2O_2 , O_2 và oxy không khí) để xử lý các hợp chất phenol và chất thơm khác. Các sản phẩm nguồn gốc lignin trong nước thải hầu như bị polyme hoá hoàn toàn, nhiều hơn 20 ÷ 50% so với trường hợp dùng laccaza đơn thuần. Khoảng 70 ÷ 90% hợp chất nguồn gốc lignin được chuyển về dạng không tan, có thể tách ra nhờ kết bông và lọc.

Ferrer và đồng tác giả, 1991, đã sử dụng lignin peroxidaza ở dạng cố định để khử màu dòng chất từ nhà máy xenluloza sulfat. Các enzym mới này được gọi là pulpaza, do thể đột biến của *P. chrysosporium* tiết ra. (Các enzym này là kết quả nghiên cứu của Farrel - được cấp bằng phát minh 1987).

LỜI KẾT

Hai tập của cuốn “**Cơ sở Hoá học Gỗ và Xenluloza**” bao gồm 12 chương, đề cập tới cấu tạo, thành phần hoá học, tính chất vật lý, hoá lý, phản ứng hoá học và ứng dụng các hợp phần của gỗ cũng như nguyên liệu phi gỗ.

Các cấu tử quan trọng nhất của gỗ là xenluloza, hemixenluloza và lignin; đó là các hợp chất cao phân tử tự nhiên. Về phương pháp luận, khi nghiên cứu các hợp chất này, tác giả đặt chúng trong phạm trù của Hoá học Polyme và Hoá lý Polyme. Các cấu tử của gỗ được xem xét trong nhiều chương khác nhau, nhưng gắn kết chặt chẽ với nhau, dựa trên phương pháp luận có tính chất xuyên suốt đó.

Các chất trích ly không tham gia vào cấu trúc thành tế bào gỗ. Đa số chất trích ly là hợp chất phân tử thấp, chỉ một phần nhỏ là hợp chất cao phân tử. Chất trích ly là nguyên liệu quý trong công nghệ hoá, nhất là tổng hợp hữu cơ, hoá dược, hoá mỹ phẩm, hương liệu, hoá chất bảo vệ thực vật, công nghệ giấy... Một số loại chất trích ly cũng được sử dụng dưới dạng hợp chất cao phân tử.

Ngược lại các hợp chất cao phân tử của gỗ, ngoài ứng dụng dưới dạng polyme, chúng cũng được chuyển hoá để sử dụng dưới dạng chất hữu cơ phân tử thấp, sử dụng trong công nghệ hoá, y dược, hoá chất cơ bản...

Xenluloza là hợp chất được sử dụng rộng rãi nhất dưới dạng polyme tự nhiên hoặc bán tổng hợp. Xenluloza và dẫn xuất có mặt trong nhiều lĩnh vực sản xuất và đời sống, như sợi dệt, chất dẻo, phim ảnh, vật liệu composit, giấy, màng lọc, sợi lọc, sợi trao đổi ion, chất mang cố định enzym...

Trong cuốn sách này, tác giả cũng bước đầu đề cập tới xu thế mới của thế giới, đó là ứng dụng công nghệ sinh học dựa trên vi sinh vật và enzym phân huỷ thực vật. Ở Việt Nam, trong tương lai gần, công nghệ sinh học cần phải và có thể được áp dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực sản xuất và bảo vệ môi trường, nhất là trong công nghiệp xenluloza – giấy.

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU	3
CÁC TỪ VIẾT TẮT	5

Chương 7

HEMIXENLULOZA VÀ POLYURONIT	7
-----------------------------	---

7.1. GIỚI THIỆU CHUNG	7
7.2. HEMIXENLULOZA	8
7.2.1. Hemixenluloza gỗ lá kim	9
7.2.1.1. <i>Galactoglucomannan</i>	9
7.2.1.2. <i>Arabinoglucuronoxylan</i>	10
7.2.1.3. <i>Arabinogalactan</i>	12
7.2.2. Hemixenluloza gỗ lá rộng	13
7.2.2.1. <i>Glucuronoxylan</i>	13
7.2.2.2. <i>Glucomannan</i>	14
7.2.3. Sự phân bố hemixenluloza trong gỗ	17
7.2.4. Phương pháp chiết tách hemixenluloza	17
7.2.5. Phản ứng hoá học của hemixenluloza và vai trò của hemixenluloza trong kỹ thuật	19
7.3. PECTIN VÀ CÁC CHẤT PECTIN	29

Chương 8

LIGNIN – KHÁI NIỆM CHUNG	33
--------------------------	----

8.1. CẤU TẠO PHÂN TỬ LIGNIN	34
8.1.1. Nghiên cứu lignin qua phản ứng phân huỷ	34
8.1.2. Nghiên cứu lignin qua quá trình sinh tổng hợp	36
8.1.2.1. <i>Sinh tổng hợp tiền chất của lignin</i>	36
8.1.2.2. <i>Quá trình dehydro hoá tiền chất của lignin</i>	39
8.1.3. Các loại liên kết giữa các đơn vị phenylpropan	43

8.1.4. Các nhóm chức trong lignin	46
8.1.5. Hình dung về cấu tạo phân tử lignin	47
8.2. TƯƠNG TÁC HOÁ LÝ VÀ LIÊN KẾT HOÁ HỌC GIỮA LIGNIN VÀ CACBOHYDRAT	48
8.3. VẤN ĐỀ TRẬT TỰ SẮP XẾP - TÍNH CHẤT VẬT LÝ VÀ DUNG DỊCH LIGNIN	50
8.3.1. Trật tự sắp xếp các phân tử lignin	50
8.3.2. Dung dịch lignin và tính chất vật lý của lignin	53
8.4. PHƯƠNG PHÁP CHUẨN BỊ MẪU LIGNIN	56
8.5. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH LIGNIN	57
8.5.1. Phương pháp phân huỷ mẫu	57
8.5.2. Phương pháp không phá huỷ mẫu	59
8.6. TÍNH CHẤT HOÁ HỌC CỦA LIGNIN	60

Chương 9

PHẢN ỨNG CỦA LIGNIN TRONG QUÁ TRÌNH NẤU XENLULOZA THEO PHƯƠNG PHÁP SULFAT VÀ SULFIT	61
9.1. PHẢN ỨNG CỦA LIGNIN KHI NẤU XENLULOZA THEO PHƯƠNG PHÁP XÚT VÀ SULFAT	61
9.1.1. Phản ứng của lignin khi nấu xenluloza theo phương pháp xút	63
9.1.1.1. Khả năng phân huỷ liên kết ete ở nhóm metoxy	63
9.1.1.2. Phản ứng của cấu trúc ete ở C_{α}	63
9.1.1.3. Phản ứng của cấu trúc ete C_{β}	69
9.1.1.4. Phản ứng ngưng tụ lignin	73
9.1.2. Vai trò natri sulfua khi nấu xenluloza theo phương pháp sulfat	75
9.1.2.1. Ngăn ngừa phản ứng ngưng tụ và phân huỷ liên kết ete giữa các monome	75
9.1.2.2. Phân huỷ liên kết ete metylaryl trong đơn vị phenylpropan	79

9.2. PHẢN ỨNG CỦA LIGNIN TRONG QUÁ TRÌNH NẤU XENLULOZA THEO PHƯƠNG PHÁP SULFIT	80
9.2.1. Tác nhân nucleophil trong quá trình sulfit	81
9.2.2. Phản ứng hoá học ở các nhóm cấu trúc của lignin trong quá trình sulfit axit	84
9.2.2.1. <i>Phản ứng ở cấu trúc ete mạch hở</i>	84
9.2.2.2. <i>Phản ứng ở cấu trúc ete mạch vòng</i>	87
9.2.2.3. <i>Cấu trúc lignin có liên kết C=C ở α và β</i>	88
9.2.2.4. <i>Cấu trúc lignin chứa nhóm cacbonyl</i>	91
9.2.2.5. <i>Phản ứng ngưng tụ lignin trong môi trường axit</i>	92
9.2.3. Phản ứng hoá học ở các nhóm cấu trúc của lignin trong quá trình sulfit trung tính và sulfit môi trường kiềm	93
9.2.3.1. <i>Quá trình sulfit trung tính</i>	93
9.2.3.2. <i>Quá trình sulfit môi trường kiềm</i>	97

Chương 10 CÁC CHẤT TRÍCH LY

98

10.1. KHÁI NIỆM CHUNG VỀ CÁC CHẤT TRÍCH LY	98
10.2. CÁC LOẠI CHẤT TRÍCH LY	100
10.2.1. Các hợp chất mạch béo	100
10.2.2. Các chất tecpen và tecpenoit	103
10.2.2.1. <i>Monotecpen và tecpenoit</i>	105
10.2.2.2. <i>Sesquitecpen và dẫn xuất</i>	116
10.2.2.3. <i>Ditecpen và dẫn xuất</i>	118
10.2.2.4. <i>Tritecpen và dẫn xuất</i>	121
10.2.3. Các hợp chất sterol	123
10.2.4. Flavonoit	124
10.2.5. Các chất tannin	131
10.2.6. Lignan	134
10.2.7. Các hợp chất stylben	135
10.2.8. Các hợp chất tropolon	136
10.2.9. Cacbohydrat	137

10.3. BIẾN ĐỔI HOÁ HỌC CỦA CHẤT TRÍCH LY TRONG QUÁ TRÌNH NẤU XENLULOZA	138
10.4. ỨNG DỤNG CÁC CHẤT TRÍCH LY	140

Chương 11

PHẢN ỨNG HOÁ HỌC TRONG QUÁ TRÌNH TẮY TRẮNG XENLULOZA

11.1. TẮY TRẮNG TRÊN CƠ SỞ PHÂN HUỖ LIGNIN	147
11.1.1. Phản ứng của lignin	148
11.1.1.1. <i>Phân huỷ lignin và tẩy trắng dựa trên clo và hợp chất của clo</i>	148
11.1.1.2. <i>Phân huỷ lignin và tẩy trắng bằng tác nhân phi clo</i>	154
11.1.2. Phản ứng của cacbohydrat	159
11.1.2.1. <i>Phản ứng của cacbohydrat dưới tác dụng của clo và hypoclorit</i>	159
11.1.2.2. <i>Phản ứng của cacbohydrat dưới tác dụng của oxy</i>	160
11.1.3. Phản ứng của chất trích ly	164
11.2. TẮY TRẮNG TRÊN CƠ SỞ BẢO TOÀN LIGNIN	165
11.3. THỰC NGHIỆM VỀ DELIGNIN HOÁ VÀ TẮY TRẮNG BẰNG TÁC NHÂN PHI CLO	166
11.3.1. Phân huỷ lignin và tẩy trắng bằng oxy trong môi trường kiềm	166
11.3.1.1. <i>Sử dụng magie clorua và một số muối magie khác làm chất ức chế phản ứng phân huỷ polysaccarit</i>	167
11.3.1.2. <i>Sử dụng natri silicat, magie silicat, magie oxit và các hợp chất khác của magie làm tác nhân bảo vệ polysaccarit</i>	167
11.3.1.3. <i>Tẩy trắng bằng oxy trong kiềm với chất bảo vệ là dithionit và polysulfua</i>	168
11.3.1.4. <i>Sử dụng muối magie ở dạng phức để bảo vệ polysaccarit</i>	169
11.3.2. Tẩy trắng bảo toàn lignin bằng cách sử dụng peroxit hữu cơ	171
11.3.3. Nấu xenluloza bằng oxy hoặc peroxit trong môi trường kiềm	172

Chương 12

CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ ỨNG DỤNG

175

12.1. VI SINH VẬT VÀ CÁC ENZYM PHÁ HUỖ TẾ BÀO THỰC VẬT	175
12.1.1. Vi sinh vật phân huỷ các cấu tử của tế bào thực vật	175
12.1.1.1. <i>Nấm</i>	175
12.1.1.2. <i>Vi khuẩn</i>	181
12.1.2. Enzym phân huỷ các cấu tử của tế bào thực vật	183
12.2. PHÂN HUỖ XENLULOZA	185
12.2.1. Các vi sinh vật sản sinh enzym phân huỷ xenluloza	185
12.2.2. Các enzym phân huỷ xenluloza	191
12.2.2.1. <i>Sự điều tiết quá trình sản sinh xenlulaza</i>	191
12.2.2.2. <i>Tính chất phân tử</i>	193
12.2.2.3. <i>Tổ chức vùng của xenlulaza</i>	199
12.2.2.4. <i>Tính chất xúc tác</i>	205
12.2.3. Phương pháp thực nghiệm đối với các enzym phân huỷ xenluloza	209
12.2.4 Công nghệ sinh học dựa trên tác nhân phân huỷ xenluloza	210
12.3. PHÂN HUỖ LIGNIN	215
12.3.1. Vi sinh vật phân huỷ lignin	215
12.3.2. Các enzym phân huỷ lignin	221
12.3.2.1. <i>Lignin peroxidaza</i>	222
12.3.2.2. <i>Mangan peroxidaza</i>	224
12.3.2.3. <i>Laccaza</i>	226
12.3.2.4. <i>Các enzym phát sinh H_2O_2</i>	228
12.3.2.5. <i>Oxidoreductaza</i>	229
12.3.3. Phương pháp thực nghiệm đối với enzym phân huỷ lignin	231
12.3.4. Khả năng ứng dụng công nghệ sinh học dựa trên các loại enzym phân huỷ lignin	233
12.4. PHÂN HUỖ HEMIXENLULOZA	236
12.4.1. Các vi sinh vật sản sinh enzym phân huỷ hemixenluloza	236

12.4.2. Các enzym phân huỷ hemixenluloza	239
12.4.2.1. <i>Các enzym phân huỷ xylan</i>	239
12.4.2.2. <i>Các enzym phân huỷ mannan</i>	247
12.4.3. Phương pháp thử nghiệm đối với enzym phân huỷ hemixenluloza	250
12.4.4. Công nghệ sinh học dựa trên các enzym phân huỷ hemixenluloza	252
12.5. CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG CÔNG NGHIỆP XENLULOZA - GIẤY	254
12.5.1. Chuẩn bị bột xenluloza theo phương pháp sinh học	255
12.5.1.1. <i>Vai trò của nấm trong delignin hoá để chuẩn bị bột xenluloza</i>	256
12.5.1.2. <i>Vai trò của các enzym trong quá trình sản xuất xenluloza - giấy</i>	258
12.5.2. Vai trò của tác nhân sinh học trong xử lý chất thải từ nhà máy bột giấy	275
12.5.2.1. <i>Thực trạng về môi trường</i>	275
12.5.2.2. <i>Xử lý chất thải từ công đoạn tẩy trắng</i>	277
LỜI KẾT	292

CƠ SỞ
HOÁ HỌC GỖ VÀ XENLULOZA
TẬP 2

Tác giả: TS. HỒ SĨ TRẮNG

Chịu trách nhiệm xuất bản:	PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI
Biên tập và sửa bài:	ThS. NGUYỄN HUY TIẾN
Chế bản:	DUƠNG VĂN QUYẾN
Vẽ bìa:	HƯƠNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
70 Trần Hưng Đạo – Hà Nội

In 700 cuốn, khổ 16 x 24cm tại Xưởng in NXB Văn hóa Dân tộc.

Quyết định xuất bản số: 136-2006/CXB/115.2-06/KHKT-10/8/2006

In xong và nộp lưu chiểu quý III năm 2006.



1956 - 2006

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

50 NĂM XÂY DỰNG
VÀ PHÁT TRIỂN

206301



Giá: 44.000đ