

原材料·配方

超声波水基纯化法制备高纯长丝杜仲精胶的研究

贺扬洁¹, 张学俊^{1,2,3*}, 谢玲², 陶菡^{1,2*}, 张萌萌³, 韩凌³, 胡川渝³

(1. 贵州大学 贵州省发酵工程与生物制药重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 酿酒与食品工程学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州艾科米亚生物科技有限公司, 贵州 贵阳 550002)

摘要:通过超声波水基纯化法制备高纯长丝杜仲精胶。该方法采用纤维素酶降解杜仲橡胶含胶细胞的细胞壁, 形成杜仲橡胶与植物组织碎片之间的细缝, 基于细缝水分子层超声波空化效应制得的杜仲精胶未改变杜仲橡胶的原有形貌, 保留了杜仲胶丝的长丝和松散束状结构, 有利于杜仲橡胶保持固有的特性和功能。

关键词:杜仲橡胶; 超声波; 水基纯化; 长丝; 植物组织; 纤维素酶; 表面活性剂; 缝隙

中图分类号: TQ332.2; O426.9

文献标志码: A

文章编号: 1000-890X(2021)08-0595-09

DOI: 10.12136/j.issn.1000-890X.2021.08.0595



OSID开放科学标识码
(扫码与作者交流)

杜仲树的含胶活性器官树皮、树叶和翅果皮经生物酶有针对地降解植物组织, 溶出高生物活性天然药物后, 余留的固形物中富含原生态杜仲胶丝。但此时杜仲胶丝的纯度不超过80%, 不能用作工业原料, 该杜仲胶丝称为粗胶。长丝杜仲粗胶具有憎水性, 在酶解水溶液中缠绕成团, 裹挟大量的未被降解完全的植物组织碎片, 严重降低了杜仲橡胶的纯度。

当前酶生物技术的发展还不完善, 所发现的生物酶种类有限, 未发现可将植物组织完全降解的生物酶种, 从而限制了生物酶解技术制备杜仲精胶, 即仅依靠生物酶的降解技术不可能获得纯度达到90%以上的原生态杜仲精胶, 而工信部印发的《重点新材料首批次应用示范指导目录(2019年版)》中对生物基杜仲橡胶纯度的要求为94%~99%, 因此不破坏杜仲胶丝天然特性的超声波物理纯化法成为制备高纯度杜仲橡胶的必由补

偿途径。

目前最常见的杜仲粗胶纯化方法为有机溶剂溶解分离法。利用不饱和烷烃杜仲橡胶易溶于有机溶剂的特性, 杜仲粗胶经氯仿、甲苯、二甲苯、汽油、石油醚、正己烷、环己烷等溶剂溶解后, 与不溶的植物组织分离, 得到杜仲纯胶(块状凝聚态, 痕量有机溶剂), 但是溶剂法杜仲纯胶也存在细胞壁碎片残留的问题, 纯度不超过96%。

有机溶剂法杜仲纯胶改变了杜仲胶丝的原生态高级结构, 呈块状凝聚态, 而超声波水基纯化(物理)法制备的杜仲精胶(水作纯化溶剂, 呈天然松散束状凝聚态, 无有机溶剂)则维持了胶丝原有形貌及其物理和化学性质。两者最大的区别在于溶剂法杜仲纯胶含有残留溶剂, 呈比表面小的块状结构, 而超声波水基法杜仲精胶不含有机溶剂, 具有分散性好的大比表面积丝状结构。

生物基橡胶高聚物是由单体异戊二烯分子

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0600702); 贵州省科技攻关项目(黔科合SY字[2009]3096号); 贵阳市科技计划项目([2011102]1-09号)

作者简介:贺扬洁(1994—), 女, 贵州毕节人, 贵州大学硕士研究生, 主要从事酶化学和天然产物化学方面的研究。

*通信联系人(xzhang203@aliyun.com; taohanedu@126.com)

引用本文:贺扬洁, 张学俊, 谢玲, 等. 超声波水基纯化法制备高纯长丝杜仲精胶的研究[J]. 橡胶工业, 2021, 68(8): 595-603.

Citation: HE Yangjie, ZHANG Xuejun, XIE Ling, et al. Preparation of high purity filament eucommia essence rubber by ultrasonic water-based purification method[J]. China Rubber Industry, 2021, 68(8): 595-603.

经细胞中橡胶聚合酶聚合而成的大分子聚合物。杜仲橡胶是由众多单根聚异戊二烯高分子长链丝彼此独立集成束状的束状,具有三级结构:①单体组成成分为一级结构,也叫近程结构;②单根聚合链的单体分子链接方式为二级结构,或远程结构,主要为烯键的反式结构;③众多单根高分子聚合物长链分子集中在一起的结构为三级结构或高级结构,也称为材料的聚集态。杜仲橡胶呈多根胶丝的固体束状,三叶橡胶呈颗粒胶的乳液流动状。

有机溶剂溶解杜仲橡胶的纯化过程是物理和化学变化过程,虽不会改变其一级和二级结构,但其天然的三级聚集态结构(晶态、非晶态、取向态、液晶态、织态等)却在溶解和析出过程中发生巨大变化而失去原有的物理和化学特征,杜仲胶丝缠绕结团,成品胶为块状结构。天然杜仲橡胶的分子为独立单链,其呈彼此分散的丝状松散束状结构。杜仲橡胶属于半硬性橡胶,不具有粘性,胶丝之间相互独立的特性通过水基纯化能完整地保留下来,更有利于杜仲橡胶加工过程中的良好分散、分布以及保持其固有特性和功能。

1 缝隙水分子层空化的杜仲橡胶超声波纯化理论

本研究在大量试验探索的基础上建立并提出了缝隙水分子层空化剥离植物组织碎片以纯化杜仲橡胶的超声波理论。

物理和化学纯化法是制备高纯度杜仲橡胶不可或缺的补充手段。相比之下,物理纯化法更具有保持杜仲橡胶原有物理和化学特性的优势。超声波纯化法是一种物理方法,但超声波在空气中会被大量吸收,而在液体中吸收较少,因此超声波纯化杜仲橡胶在水溶液中进行。

频率在20 kHz以上的声波即为超声波,其以频率高和波长短而有别于普通声波,具有近似于光学的某些性质。超声波频率越高波长愈短,近场区范围愈宽,束射性愈强和定向能力愈大。超声波定向传播时,在两种不同媒质界面上会出现类似光波的透射、反射和折射现象。超声波传播时媒介会吸收其一部分能量,随着路程的延长和

能量的转换,声波的强度会逐渐减弱。超声波频率越高,介质的吸收性越强,传播距离越短,故超声波纯化杜仲橡胶只能小批量、分批进行。

根据有关声学试验, 10^6 Hz的超声波能量比同振幅频率 10^3 Hz的可听声波大 10^6 倍,即超声波拥有巨大的能量。声波的振动使得杜仲橡胶和植物组织碎片随之受迫振动,接受超声波的媒介水分子与受迫振动物质分子的振动频率是一致的,物质分子的振动状态取决于受迫振动的速度,振动频率越高,振动速度越大。运动物体的动能(E)与其质量(M)和运动速度(v)的关系为: $E = (1/2)Mv^2$ 。根据上式可知,高速运动使物质分子具有很大的动能,这就是超声波拥有巨大能量的缘故。

杜仲橡胶的超声波纯化是高能超声波剥离、清除杜仲橡胶表面植物组织碎片的过程,是基于超声波在水溶液中的空化作用以撕裂水分子团而形成空腔微气泡^[1]。当超声波空化作用发生在杜仲橡胶与植物组织碎片之间的缝隙水分子层中时,形成大量微气泡,高频振动的微气泡带动杜仲橡胶和植物组织碎片高频振动,而两种材料的基本物质不同且具有的固有振动频率不同,其固有频率差致使彼此间差频振动而分离。同时微气泡膨胀和内爆产生的撕裂和巨大挤压力形成高速的微射流,气泡内爆瞬间产生的冲击波使气泡周围产生 $10^{12} \sim 10^{13}$ Pa的压力及局部高温^[2],冲击波破坏植物组织碎片,将植物组织碎片从杜仲胶丝上剥离,净化胶丝表面。这就是超声波空化所产生的巨大压力和振动引起植物组织碎片振动疲劳,使植物碎片对杜仲橡胶表面的附着力减小而剥离。

当超声波作用在水溶液中时,对水溶液会产生空化、辐射压和声流等物理效应。液体内部出现拉应力而形成负压,压力的降低使原来溶于液体的气体过饱和,从液体中逸出,成为小气泡。强大的超声波拉应力把液体“撕开”成一空洞,称为空化^[3]。

当超声波振动使水分子挤压压缩时,水分子所受到压力是大气压加上水分子压缩时受到的“声压”压力,而当声波扩张疏拉时水分子被撕扯向四面八方^[4],水分子氢键键力承受不住撕扯力形

成空腔化气泡。水分子超声波空化作用集中在拉扯应力集中的超声界面反射密集区(如图1所示), 气泡出现在杜仲橡胶与植物组织碎片之间的缝隙水分子层中, 如图1所示。

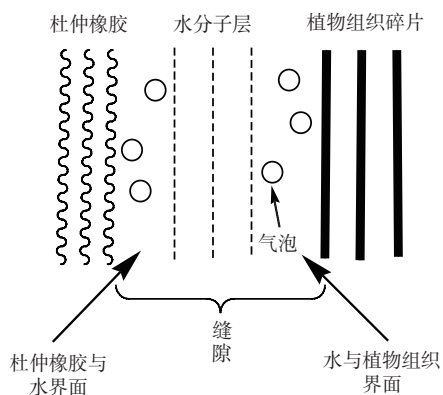


图1 杜仲橡胶和植物组织碎片与其缝隙中水分子层形成的界面密集区

Fig. 1 Interface dense area formed by eucommia rubber and plant tissue fragments and water molecule layers in crevices

杜仲橡胶是烷烃链非极性疏水物质, 而植物组织是富含亲水基团羟基、羧基、甲氧基等的极性亲水物质, 两种物质彼此间无任何共价键、离子键和氢键相连。两者之间存在着天然的缝隙, 但因紧密的生理结构而无法形成缝隙水。酶解除去含胶细胞壁之后, 植物组织与杜仲橡胶之间空出厚度达12 μm 以上的缝隙。从图1可以看出, 缝隙水分子层由于两组界面层紧密叠加, 形成了水分子氢键键力变化的应力集中区和界面反射的超声波叠加区, 此区域内空化作用生成大量微气泡, 即水分子氢键键力变化的应力集中区的水分子团承受不住超声波的扩张撕裂作用形成气泡。这一现象最容易发生在有杂质存在的表面张力差异显著的水分子层中, 即杜仲橡胶、植物组织碎片与水分子接触的界面集中区缝隙中, 因为此区域水分子氢键键力不连续且波动明显。

综上所述, 由于杜仲橡胶、植物组织和水溶液是三类截然不同的物质, 彼此结合形成紧邻的液-固界面, 差异明显的表面张力叠加使其成为超声波空化小气泡的集中生成区。

超声纯化理论指出, 微小空化气泡并不是如许多文献认为的在水体中生成后再钻进缝隙, 而

是由于两界面区不同的表面张力层紧密相邻, 超声波直接在缝隙水分子层中撕开水层生成大量微气泡, 即应力集中区的缝隙水助力超声波撕开水体生成空化气泡, 水的空化使其处于低压力、高流速的状态, 当水压力小于饱和蒸汽压力时, 水中的气泡就会不断膨胀, 体积变大, 拉开杜仲橡胶与植物组织碎片的距离。而随着水运动, 气泡到达高压、低流速区域之后, 气泡就会塌缩、爆裂, 引起植物组织碎片的脱落。另一方面, 高频超声波使微小空化气泡快速振动, 杜仲橡胶和植物组织碎片受迫随之高速振动, 两种不同物质具有不同的固有振动频率, 两者间的差频振动使附着在杜仲橡胶上的植物组织碎片脱离。缝隙水分子层气泡的膨胀和振动是剥离植物组织碎片的原生动力。

缝隙水分子层的超声波空化原理是从杜仲粗胶中分离植物组织碎片而制备杜仲精胶的基本原理, 这就是超声波剥离杜仲橡胶上的植物组织碎片的超声波纯化理论。

2 实验

2.1 原材料及化学试剂

杜仲树皮, 采自贵州省遵义地区, 树龄为10~20年; 杜仲籽皮粗胶, 即使杜仲翅果开口后取出果仁, 与果仁分离后的籽皮在酶解器中经pH缓冲溶液激活后的ZH·Euco-pro蛋白酶、ZH·Euco-pect果胶酶、ZH·Euco-cell纤维素酶酶解籽皮植物组织并提取其桃叶珊瑚苷、绿原酸、京尼平苷酸等天然药物后, 再经多次自来水清洗的含胶固体。

ZH·Euco-pro蛋白酶(酶活力为50 000 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)、ZH·Euco-pect果胶酶(酶活力为50 000 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)、ZH·Euco-cell纤维素酶(酶活力为50 000 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$)和ZH·Hemicell(酶活力为40 000 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$), 市售饲料级食用酶制剂; 柠檬酸(食品添加剂, 纯度99%)和柠檬酸钠(食品添加剂, 纯度99%), 潍坊英轩实业有限公司产品; 无水乙醇(分析纯99.7%), 天津市富宇精细化工有限公司产品; 氢氧化钠溶液、月桂醇硫酸钠、蒸馏水和SZ-96A石英蒸馏器, 实验室自制。

2.2 主要仪器

SHA-CA型数显水浴恒温振荡器,常州普天仪器制造有限公司产品;多频道超声仪,宁波新芝生物科技股份有限公司产品;CP214型电子天平,上海奥豪斯仪器有限公司产品;Thermo Heraeus Multifuge X3R型通用台式离心机,赛默飞世尔科技公司产品;XW-80A型旋涡混合仪,海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品;DF-101S型集热式恒温水浴锅,邦西仪器科技(上海)有限公司产品。

2.3 试验方法

2.3.1 碱液预处理和生物酶降解细胞壁试验

将杜仲树皮(尺寸为6 cm×2 cm)浸泡于质量分数为0.01的氢氧化钠溶液中并在40℃恒温振荡器上振摇48 h,经蒸馏水多次洗涤后再放入质量分数为0.02的氢氧化钠溶液继续浸泡并在40℃恒温振荡器上振摇24 h,再经蒸馏水洗成中性。然后将其放入质量分数为0.03的半纤维素酶pH缓冲溶液中,在48℃恒温振荡器上振摇24 h,之后用清水在恒温振荡器上洗涤3次,放入质量分数为0.03的纤维素酶pH缓冲溶液中,在50℃恒温振荡器上振摇40 h,中间取下3次用玻棒搅拌分散均匀。最后将固形物用自来水洗净,得到不含任何细胞壁碎片的杜仲精胶。

2.3.2 超声波-表面活性剂纯化试验

准确称取5 g酶解后杜仲籽皮粗胶,与水溶液混合后进行超声波分离提取。设定超声波频率和功率(400 W),在50℃下超声波作用6 h后停止,固形物过滤并反复清洗,60℃真空烘干,获得超声波处理后的杜仲粗胶。将粗胶放入质量分数为0.02的表面活性剂十二烷基硫酸钠中,在80℃下于磁力搅拌50 h后静置,由于胶丝密度小于水,因此浮于液面上,收集胶丝并反复清洗,得到原生态杜仲精胶。

3 结果与讨论

3.1 杜仲胶丝与植物组织碎片之间的缝隙

杜仲橡胶与植物组织碎片之间一旦有缝,超声波便能在缝隙水分子层中撕裂水分子形成大量微气泡,缝隙水分子层中气泡的振动、内爆致使植

物组织碎片剥离。由此可见,杜仲胶丝与植物组织碎片之间缝隙的存在是提高超声纯化杜仲橡胶效率的一个关键因素。

杜仲橡胶和植物组织是完全不同的两类物质,杜仲橡胶的一级结构化学物质是异戊二烯单体,而植物组织碎片的一级结构主体化学物质是糖类聚合物(聚糖、木葡聚糖、甘露聚糖和混联型葡聚糖等)。异戊二烯聚合物是疏水的有机烷烃,糖类聚合物则是富含羟基的六碳糖和五碳糖为主的以 α 苷键和 β 苷键聚合的亲水杂多糖聚合物。杜仲橡胶与植物组织仅仅是两类生物体的生理结合,彼此间并不存在相连化学键,而是相互独立存在^[5],但具有细微间隔。杜仲橡胶和植物组织这种生理和生物性质为超声波空化剥离杜仲橡胶表面的植物组织碎片提供了基础条件。

此外,生长在含胶细胞之中的杜仲橡胶与植物组织之间天生隔着细胞壁,且与细胞壁也仅是生理附着并无化学键的连接,为了增大杜仲橡胶与植物组织之间的间隙,强化缝隙中水分子层的空化和振动作用,可以酶促降解杜仲橡胶上残留的细胞壁,在杜仲橡胶与植物组织碎片之间留出缝隙。

在杜仲植物的活性器官中含有大量的杜仲橡胶,与三叶橡胶树生长在树干形成层的乳管乳液中的三叶橡胶颗粒不同,杜仲橡胶是固体半硬性橡胶,生长在杜仲树植物组织的含胶细胞中,而三叶橡胶树橡胶颗粒的含胶细胞在成熟时就已退化消失,只留下无细胞壁的裸露橡胶颗粒分散在乳管乳液中。成熟的杜仲橡胶始终被含胶细胞的细胞壁紧紧包裹。

无论植物组织多复杂,包裹杜仲橡胶多紧密,在杜仲橡胶与植物组织之间始终存在着一层含胶细胞的细胞壁。细胞壁由胞间层、初生壁和次生壁构成,杜仲植物组织中的生理结构关系依次为:杜仲橡胶、细胞壁(次生壁、初生壁、胞间层)、植物组织。

由杜仲橡胶在植物组织中的生理结构排列次序可以发现,杜仲橡胶与植物组织之间被含胶细胞的细胞壁分隔,细胞壁厚达12~15 μm ,细胞壁

组成中纤维素占40%~50%,还有10%~30%的半纤维素,以及细胞壁特化时在纤维素形成的细胞壁框架内填充的20%~30%木质素,若用纤维素酶和半纤维素酶等有针对性降解除去细胞壁,细胞壁的消失会在杜仲橡胶和植物组织之间留下至少12 μm 的缝隙。

含胶细胞在生长过程中其细胞壁的组成变化十分复杂^[6],因为细胞壁主要是由纤维素构成,在生长环境影响和生理机能的作用下发生各种不同的特化,在纤维素形成的细胞壁框架内填充了其他物质,从而改变了细胞壁的理化性质,完成了一定的生理机能,特别是木质化和木栓化的特化阻挡了纤维酶与底物(纤维素)结合。因此,仅依靠纤维素酶和半纤维素酶无法完全降解细胞壁。

3.2 超声波频率

在制备杜仲精胶的过程中,需两次采用超声波处理,一次是纤维素酶降解细胞壁之前,一次是在细胞壁被降解之后。这两次超声波处理的目的不同,所采用的超声波频率不同。

酶解之前,杜仲粗胶中存在大量的杜仲植物组织碎片,相对分子质量巨大的纤维素酶分子无法直接趋近和结合在细胞壁上并在底物上准确定向和定位附着^[7]。所以必须先用25 kHz左右的低频超声波破坏和疏解植物组织结构,以暴露出杜仲橡胶表面的细胞壁,便于活性生物酶趋近底物。酶解之后,为了剥离杜仲橡胶表面尚未被水解的植物组织碎片,纯化且保护杜仲橡胶的原生态长丝,采用较高频率(≥ 40 kHz)超声波进行处理。

超声波频率越低,撕裂水分子能力越强,在水分子层中产生的空化气泡越少,气泡越大。低频率超声波不但对植物组织碎片有破坏作用,也引起杜仲胶丝的水蚀断裂。高频率超声波方向性强,空化气泡微小,空化能力小,适合于精细、柔软的杜仲橡胶清洗。随着超声频率的增大,气泡细化且增多,有利于杜仲胶丝与植物组织碎片剥离,且爆破冲击力减小,避免了杜仲胶丝的断裂。

在超声波处理杜仲橡胶时涉及功率和频率。频率是超声波引起介质单位时间振动的次数,仅与材料性质有关,不同材料具有不同吸收和共振

频率;而功率则是某一固定频率的振幅,振幅越大超声赋予的能量越大,声流越强。

纯化杜仲橡胶常用的超声波频率在20~130 kHz之间,对于大块植物组织碎片的破坏、分离,一般使用20~40 kHz的超声波频率,而对在小间隙、窄狭缝、深孔和盲孔中的细小植物组织碎片的清除,则需用不低于40 kHz的高频超声波,甚至100 kHz超声波,这样可大大降低超声波对杜仲胶丝的水点腐蚀和破坏。试验证实超声波处理杜仲橡胶的最佳温度在50~75 $^{\circ}\text{C}$ 之间。所以酶解之前所用超声波频率约为25 kHz,而酶解之后所用超声波频率约为60 kHz。

3.3 杜仲橡胶细胞壁的酶解

杜仲橡胶含胶细胞的细胞壁是包围在原生质体外面的具有一定硬度和弹性的薄层,是由原生质体分泌的非生命物质(纤维素、半纤维素和果胶质)组成。在光学显微镜下可以看到果胶将相邻两个细胞粘连所共有的细胞壁。

由于环境的影响和生理机能不同,细胞壁会因侵入原生质分泌的化学物质变化而引发其性质变化,即木质化、木栓化、角质化、粘液质化和矿质化,这称为特化。其中阻碍纤维素酶和半纤维素酶降解细胞壁的主要原因是细胞壁中增生了木质素的木质化和使细胞原生质体与外界隔离而坏死(成为死细胞)的木栓化。

酶解除去细胞壁后,杜仲橡胶与植物组织碎片之间的缝隙中形成的水分子层供超声波空化作用而产生大量的微气泡。

目前纤维素酶的酶学性质研究已较清晰。纤维素酶的酶解反应与一般酶的酶降解反应不同,其最主要的区别在于纤维素酶不是多酶复合体而是一个多酶组成的多酶体系,且底物的结构也极其复杂。

酶的降解机理如下。

纤维素酶可使纤维素生成D-葡萄糖、纤维二糖和寡糖。酶的降解作用分3步完成。

(1)趋近效应和定向效应。酶解反应第1步是酶首先趋近底物、识别并与底物取向结合,这是底物降解的先决条件。底物则需先暴露以便酶的活

性中心趋近与之直接结合。

(2) 张力作用。与底物的结合诱导大分子酶的电子云分布发生相应改变, 酶的三、四级结构构象随之发生变化, 对底物产生张力作用, 使底物扭曲, 结合部位被作用的分子链键力减弱而易于断裂。

(3) 酸碱催化作用。酶的活性中心具有某些氨基酸残基(功能基团), 这些基团往往是良好的质子供体或受体, 在水溶液中这些广义的酸性基团或碱性基团是许多分子链断裂的强力催化剂。

由此可见, 在酶解反应中, 趋近效应和随之发生的识别定位效应是酶解的开始。然而, 由于植物组织的复杂性和组织结构的致密性, 杜仲橡胶含胶细胞的细胞壁被其他的植物组织紧密地包裹, 阻断了酶向底物的趋近, 即使水溶液对植物组织有明显的浸润膨胀作用, 但相对分子质量巨大的纤维素酶分子也无法趋近和定位在细胞壁底物上。

因此, 在纤维素酶降解细胞壁之前, 必须除去和疏解植物组织使细胞壁底物直接裸露在酶解液中, 特别是预先降解阻挡纤维素酶连续水解纤维素的木质化木质素。为此在酶解之前采用破坏植物组织能力强的低频率(25 kHz)超声波打散含胶细胞与植物组织的结合, 破坏植物组织的结构, 使纤维素酶能够直接趋近暴露在外的细胞壁底物。

试验显示经过生物酶降解后的杜仲胶丝上仍附着有褐色的细胞壁碎片(见图2), 这是因为木质素沉积在纤维素和半纤维素的细胞壁表层, 阻碍了纤维素酶在纤维素上的附着和定位结合, 无法降解纤维素。

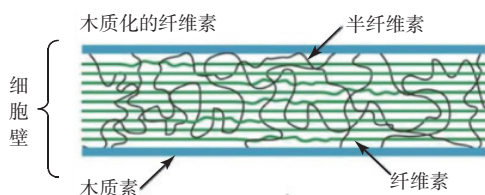


图2 含胶细胞的细胞壁结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of cell wall structure of gutta-containing cell

3.4 超声波剥离植物组织碎片

含胶细胞的细胞壁被酶解后, 杜仲橡胶与植物组织碎片之间空出至少12 μm 厚的缝隙而形成水分子层。超声波处理之前加入表面活性剂以使水分充分充盈缝隙以触及到杜仲胶丝, 提高杜仲

橡胶表面的润湿性, 使水分子更好渗进杜仲橡胶与植物组织碎片之间的缝隙中, 形成水-胶和水-植物组织碎片界面。

超声波纯化理论指出, 超声波剥离杜仲橡胶表面的植物组织碎片是基于缝隙中水分子层的超声波空化效应, 其中低频超声波空化效应所产生的巨大压力破坏不溶性植物组织碎片而使它们溶于水溶液中, 高频超声波空化效应使杜仲橡胶与植物组织碎片产生差频振动, 减小了植物组织碎片对杜仲橡胶表面的附着力, 气泡的振动和内爆引起植物组织碎片从杜仲橡胶表面剥离, 并对杜仲胶丝表面有清洁作用。

不低于40 kHz频率的高频超声波产生的空化气泡数多、体积小, 集中于缝隙中, 穿透力大, 内爆力小, 对杜仲橡胶不会造成任何损害。并且在相同声强下, 40 kHz频率超声波产生的空化气泡数量比25 kHz频率超声波成倍提高, 微射流穿透力小, 而微小气泡宜进入小缝隙和形状复杂的盲孔, 适合除去与杜仲橡胶表面结合力较小的植物组织碎片。

由于细胞壁与杜仲橡胶表面结合力大, 很难直接用超声波纯化除净, 图3示出了超声波-表面活性剂纯化的白色籽皮杜仲精胶。



图3 40 kHz超声波-表面活性剂纯化的籽皮杜仲精胶

Fig. 3 Seed peel eucommia essence rubber purified by 40 kHz ultrasonic-surfactant

从图3可以看出, 纤维素酶深度酶解的杜仲橡胶经过超声波和表面活性剂纯化后, 仍然残留褐色碎片, 这种褐色碎片就是含胶细胞的细胞壁, 因为细胞壁与杜仲橡胶结合最为紧密, 附着力大, 很难被超声波剥离, 这也说明了纤维素酶没能完全降解细胞壁。分析认为, 这是因为木质化的细胞壁由于木质素的存在阻碍了纤维素酶对纤维素底物的

趋近和识别定位,阻断了纤维素酶降解纤维素的反应,从而留下部分细胞壁碎片。这也是目前本方法制备的杜仲精胶纯度无法突破96%的原因。

经过氢氧化钠溶液的水解,除去了木质素的细胞壁暴露出其构成胞壁骨架的纤维素组织,使纤维素酶和半纤维素酶得以趋近裸露的组织,并识别底物,定向在相关对应基团上相互结合,当酶的电子云分布改变,酶蛋白构象发生变构,引起了纤维素和半纤维素分子定位断键,生成单糖或寡糖而溶于水中以被除去,得到的杜仲橡胶显现出纯白色丝絮状原貌,如图4所示。



图4 碱液预处理和生物酶降解除去细胞壁的高纯度杜仲橡胶

Fig. 4 High-purity eucommia rubber with cell wall removed by alkali pretreatment and biological enzymatic degradation

酶解前低浓度碱液的预处理,证实了杜仲橡胶含胶细胞的细胞壁表面确实有木质化的木质素存在,也确实阻碍了纤维素酶的降解作用,所以纤维素酶降解细胞壁之前必须先行木质素降解。

3.5 杜仲橡胶的亲水疏解和分散纯化

植物组织碎片是亲水的,可以分散在水溶液中,而烷烃的杜仲胶丝却是疏水的,在水溶液中易缠绕成团。只有提高杜仲胶丝与水的亲和性和降低分散自由能,打开杜仲胶丝缠绕,使其自由地展开,剥离后被裹挟的植物组织碎片才能挣脱杜仲胶丝的束缚而分散在水溶液中,如图5所示。

提高杜仲胶丝与水的亲和力和在水溶液中的分散性,必须降低两相的表面张力,显然表面活性剂有助于两相表面张力的下降,特别是强润湿作用的表面活性剂,能有效地提高杜仲胶丝与水的亲和性,使杜仲胶丝在水溶液中呈自由分散状态,

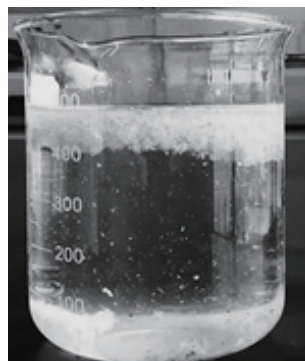


图5 浮于水上的自由分散的杜仲胶丝

Fig. 5 Freely dispersed eucommia filaments floating on water

促进杜仲橡胶的水溶液溶解向分散热力学平衡方向移动。

表面活性剂分子具有独特的两亲性:一端为极性基团($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{NH}_2$ 等),具有亲水性,另一端为非极性基团(如烷基、芳香基),而非极性烷烃链一般含有8个以上碳原子,具有亲油性和憎水性^[8]。性能截然相反的基团分处于同一分子的两端并以化学键相连接,形成了一种不对称的极性结构,因而赋予了表面活性剂既亲水又亲油,但又不是整体亲水或亲油的特性,而是将极性与非极性的物质组成了一个整体。表面活性剂的这种特有结构通常称之为双亲结构,两相(杜仲胶丝与水)与表面活性剂分子间不存在界面。

降低两相间相亲的热力学能垒,就降低了两相的表面张力和杜仲胶丝在水中分散的表面自由能。活性剂分子排列在两相之间,使两相的表面转入本体相内部。在恒温恒压条件下杜仲胶丝可以自由伸展,与水接触的面积增大,对水溶液本体做的功(即表面自由能)大大降解^[9],从而使得卷曲缠绕的胶丝自由地地展开。

未经超声波处理的籽皮粗胶直接用表面活性剂分离植物组织碎片,此时的杜仲橡胶呈籽皮的片状结构(如图6所示),没有释放出其中夹杂的植物组织碎片,纯度不超过92%。润湿性表面活性剂是最为有效和直接的助剂。十二烷基硫酸钠的极性基团硫酸钠为亲水端,非极性烷烃链与杜仲橡胶烷烃链相亲。

反式1,4-聚异戊二烯的杜仲橡胶分子链上存

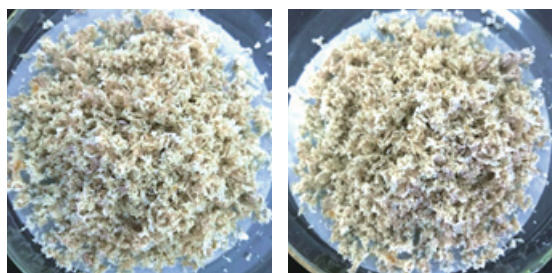


图6 表面活性剂纯化的籽皮杜仲粗胶

Fig. 6 Seed peel eucommia crude rubber purified by surfactant

在大量的折叠结晶区,链中单体分子排列规整、堆砌紧密,相互作用力大、结晶能高,活性剂分子难渗入,即晶态杜仲橡胶的溶解比非晶态三叶橡胶困难^[10-13]。杜仲橡胶溶解时通过加热破坏晶格而变成非晶态,就易于与表面活性剂结合而分散在水溶液中,从而使松散的杜仲胶丝在水溶液中打开,与释放出的剥离植物组织碎片一起分散在水溶液中而彼此分离,即密度小于水的杜仲胶丝浮于水上层,而密度大于水的植物组织碎片则沉于水底。

超声波-表面活性剂纯化的絮状杜仲籽皮精(胶离心后的干品)如图7所示。



图7 超声波-表面活性剂纯化的絮状籽皮杜仲精胶

Fig. 7 Flocculent seed peel eucommia essence rubber purified by ultrasonic-surfactant

从图7可知,结团打开的杜仲胶丝处于松散絮状,但有许多细胞壁碎片残留在杜仲胶丝表面。

对于相对分子质量相同的同种化合物,支化聚合物比线性聚合物更易与水亲和。杜仲橡胶是结晶性直链聚合物,其可溶于芳香烃及氯代烃中,但在植株中已形成的结晶形式降低了其在溶剂中的溶解度,且杜仲橡胶不溶于酮和低级醇等极性较大的有机溶剂。在加热条件下,能溶解杜仲橡胶的溶剂种类增多,如石油醚和乙酸乙酯都能使

杜仲橡胶发生溶胀和溶解。结晶态杜仲橡胶在常温下为半硬质固体,因为杜仲橡胶结晶时生成 α 型和 β 型两种晶体。 α 型晶体的熔点为65℃, β 型晶体的熔点为55℃,所以温度达65℃以上杜仲橡胶才能完全熔融^[14]。处于熔融态的杜仲橡胶在许多溶剂中的溶解度明显提高,而80℃是杜仲橡胶特殊的温度节点,其物理和化学性质发生骤变,杜仲胶丝得以解晶打开,比表面积显著增大,溶解度陡增,表面活性剂能显著提高杜仲橡胶的分散和溶解。

4 结论

本研究基于缝隙水分子层超声波空化效应剥离杜仲橡胶与植物组织碎片以制备高纯度杜仲精胶,并提出相应的指导生产理论。在该理论的指导下,采用纤维素酶降解含胶细胞的细胞壁,形成杜仲橡胶与植物组织碎片之间的缝隙,但因木质素的存在不能充分降解杜仲橡胶表面附着的全部细胞壁,导致超声波纯化杜仲橡胶纯度不超过96%。由于氢氧化钠溶液属苛性碱,不适合用于规模化生产,筛选降解木质素的新酶种势在必行。

缝隙水分子层超声波空化理论不仅适用于酶解杜仲粗胶的纯化,也适用于多种被清洁件与表面附着不同类物质的清除,这对超声波实际应用具有指导意义。

超声波纯化在杜仲精胶的制备上是一种行之有效的物理途径,弥补了当前生物酶解提取杜仲橡胶的不足,改善了杜仲精胶生产的工艺技术,其实际应用安全可靠,生产环境优良,纯化的杜仲精胶纯度与有机溶剂纯化法相当,达到96%。

参考文献:

- [1] GIBBS V, COLED, SASSANO A. 超声物理基础必读[M]. 戴晴, 孟华, 译. 北京:人民军医出版社, 2013.
GIBBS V, COLED, SASSANO A. Ultrasound physics and technology: How, why and when[M]. DAI Q, MENG H (Translator). Beijing: People's Military Medical Press, 2013.
- [2] 李芳蓉, 刘淑梅, 刘凤霞, 等. 超声波清洗技术及其在中药材清洗中的应用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(1): 32-35.
LI F R, LIU S M, LIU F X, et al. Ultrasonic cleaning technology and its application in the cleaning of Chinese herbal medicines[J]. Journal

- of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2019, 38(1): 32–35.
- [3] 张海燕. 超声波清洗技术[J]. 现代物理知识, 2002(6): 36–37.
- ZHANG H Y. Ultrasonic cleaning technology[J]. Modern Physics Knowledge, 2002(6): 36–37.
- [4] 程欣. 超声波清洗技术发展研究[J]. 中国市场, 2016(49): 79–80.
- CHENG X. Research on the development of ultrasonic cleaning technology[J]. Chinese Market, 2016(49): 79–80.
- [5] 田兰馨, 卢敏, 胡正海. 杜仲含胶细胞发生和发育的研究[J]. 植物学报, 1990(1): 1–6, 85–86.
- TIAN L X, LU M, HU Z H. Study on the initiation and development of gutta-containing cells in *Eucommia ulmoides* oliv[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1990(1): 1–6, 85–86.
- [6] 阎伯旭, 齐飞, 张颖舒, 等. 纤维素酶分子结构和功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999(3): 40–44.
- YAN B X, QI F, ZHANG Y S, et al. Research progress on the molecular structure and function of cellulase[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1999(3): 40–44.
- [7] 赵红艳, 蒯芳, 王太霞. 杜仲胶在杜仲叶发育过程中的含量变化研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(18): 4065–4068.
- ZHAO H Y, LIN F, WANG T X. Study on the change of gutta-percha content in *eucommia ulmoides* leaves during growth[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(18): 4065–4068.
- [8] 何曼君, 张红东, 陈维孝, 等. 高分子物理(第三版)[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2007.
- HE M J, ZHANG H D, CHEN W X, et al. Polymer physics (third edition)[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2007.
- [9] 严瑞芳, 胡汉杰. 杜仲胶的研究与开发[J]. 中国科学基金, 1994(1): 55–59.
- YAN R F, HU H J. Research and development of eucommia gum[J]. Chinese Science Foundation, 1994(1): 55–59.
- [10] 李芳东, 杜红岩. 杜仲[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 182–280.
- LI F D, DU H Y. *Eucommia ulmoides*[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2001: 182–280.
- [11] 冯志博, 张继川, 张天鑫, 等. 杜仲橡胶的研究现状与发展前景[J]. 橡胶工业, 2017, 64(10): 630–635.
- FENG Z B, ZHANG J C, ZHANG T X, et al. Research status and development prospect of eucommia ulmoides gum[J]. China Rubber Industry, 2017, 64(10): 630–635.
- [12] 张乔. 杜仲橡胶的开发与利用[J]. 橡胶工业, 1996, 43(11): 690–693.
- ZHANG Q. Development and utilization of eucommia rubber[J]. China Rubber Industry, 1996, 43(11): 690–693.
- [13] 朱虹. 杜仲橡胶的研究进展[J]. 橡胶科技, 2020, 18(11): 605–610.
- ZHU H. Research progress of eucommia ulmoides gum[J]. Rubber Science and Technology, 2020, 18(11): 605–610.
- [14] 孙卓, 徐峰, 王蔚, 等. 中草药超声波清洗技术的理论分析[J]. 农业与技术, 2015, 35(1): 72–73.
- SUN Z, XU F, WANG W, et al. Theoretical analysis of ultrasonic cleaning technology of Chinese herbal medicine[J]. Agriculture and Technology, 2015, 35(1): 72–73

收稿日期: 2021-02-26

Preparation of High Purity Filament Eucommia Essence Rubber by Ultrasonic Water-based Purification Method

HE Yangjie¹, ZHANG Xuejun^{1,2}, XIE Ling¹, TAO Han¹, ZHANG Mengmeng², HAN Ling², HU Chuanyu²

(1. Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Ecomeya Biological Technology Co., Ltd, Guiyang 550002, China)

Abstract: The high-purity filament eucommia essence rubber was prepared by ultrasonic water-based purification method. This method used cellulase to degrade the cell wall of eucommia rubber colloidal cell to form the fine gap between the eucommia rubber and plant tissue fragments. The eucommia essence rubber prepared based on the ultrasonic cavitation effect of the thin slit water molecular layer did not change the original morphology of eucommia rubber, and it retained the filament and loose tow flocculent structure of eucommia filament, which was conducive to maintaining the inherent characteristics and functions of eucommia rubber.

Key words: eucommia rubber; ultrasonic; water-based purification; filament; plant fragment; cellulase; surfactant; slit