

木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序

王玉万

徐文玉

(本溪师范专科学校生物系,辽宁本溪)

(华侨大学化工系,福建泉州)

摘要 拟定了木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序。本程序是将中性洗涤剂法、2M 盐酸水解法、72% 硫酸水解法、地衣酚比色定糖法和蒽酮比色定糖法加以综合应用而成,在具有一般化学分析条件的实验室都可使用。本程序可以同时进行多个试样的分析。因此,对于进行对比性探讨发酵物中半纤维素、纤维素和木素的含量及其转化动力学的研究,本程序尤其实用。

关键词 纤维素;木素;定量分析

测定纤维废弃物的微生物发酵物中纤维素、半纤维素和木素含量的方法很多。如半纤维素的测定,一些研究报告中常采用的方法有:NaOH 溶液抽提法^[1,2],2M 盐酸水解法^[3],2% 盐酸水解法,还有将中性洗涤剂和酸性洗涤剂结合使用的洗涤剂法^[5-7]。测定纤维素常用的方法有:浓酸水解定糖法^[8,10],硝酸乙醇法^[9],氯化法^[9],还有近年为人们所普遍采用的 Van Soest 的酸性洗涤剂法^[6]。测定发酵物中木素含量的方法有浓酸水解法^[1,6,8-11],紫外分光光度法^[12,13],红外光谱定量分析法和同位素标记法^[14]。由于红外光谱法和同位素标记法的实验条件要求较高,因此应用并不普遍,普遍应用的仍是经典的浓酸水解法。本文所拟定的发酵物中木素、纤维素、半纤维素三种成分的系统定量分析程序,是将上述诸方法中几种不需昂贵仪器和复杂操作的方法加以综合应用而成。因此,具有一般化学分析条件的实验室都可使用。本系统分析程序可以同时进行多个试样的分析。因此,对于进行对比性探讨发酵物木素、半纤维素、纤维素的含量及其变化的研究,本分析程序尤其实用。

材料与方 法

(一) 材料

甘蔗渣由福建仙游糖厂提供,风干,粉碎,过 40 目筛。糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus* AS

5.42) 由中国科学院微生物研究所提供。

(二) 试剂

1. 中性洗涤剂:按 Van Soest 方法配制^[7]。
 2. 2M 盐酸溶液^[3]:167ml 浓盐酸(比重 1.19)用蒸馏水定容至 1000ml。
 3. 72% 硫酸溶液^[6]:665ml H₂SO₄(比重 1.84)加入 300ml 水中,冷至 20℃,补加水至 1000ml。
 4. 地衣酚试剂^[3]:0.1g FeCl₃溶于 100ml 37%的浓盐酸中,之后加入 0.2g 地衣酚,现用现配。
 5. 蒽酮试剂^[15]:0.2g 蒽酮溶于 100ml 浓 H₂SO₄(分析纯,比重 1.84)中,用时现配。
- 所采用的其他试剂按常规法配制。

(三) 培养

1. 斜面培养:菌种用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,在 25℃ 下培养。
2. 甘蔗渣固体发酵:向 200ml 三角烧瓶加入 10.000g 甘蔗渣、80mg CaCO₃和 35ml 矿质培养液^[4],拌匀,表面轻轻压平,中心打孔,于 121℃ 灭菌 30 分钟,冷至室温后每瓶接种糙皮侧耳的 PDA 培养物 2 块,在 25℃ 下培养 30 天。

(四) 发酵物中木质纤维素的测定

本文拟定的系统定量分析程序是将中性洗涤剂^[7]与 2M 盐酸水解法^[3]、地衣酚比色定糖法^[3]、72% 硫酸法和蒽酮定糖法^[15]综合应用,操

(1) 样品 0.5000g 置于 100ml 碘瓶中, 加入 50ml 中性洗涤剂, 之后放入已沸的高压蒸汽消毒器中, 100℃ 保温 1 小时, 取出用 3 号沙芯漏斗过滤, 残渣用水、丙酮洗

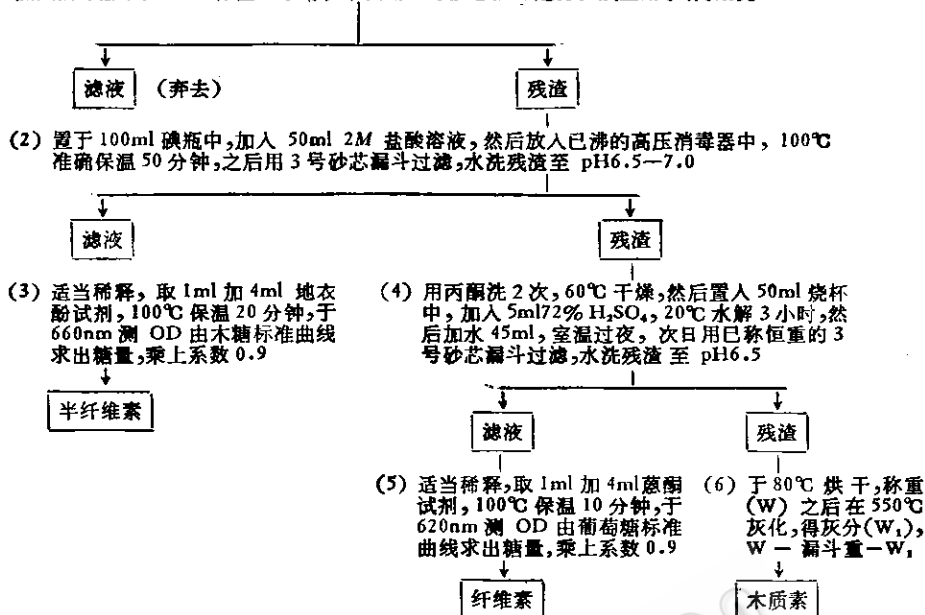


图 1 半纤维素、纤维素、木素的系统定量分析程序

作程序示于图 1。

为了验证系统分析程序所测结果的精确性, 本文中用几种单一组分分析法对同批样品进行了测定, 并对稀酸水解液与浓酸水解液中的单糖组分进行了定量纸层析。所用的单一组分分析法为硝酸乙醇法测定纤维素^[9], 2% 盐酸水解法测定半纤维素, Klason 法测定木素^[9]。定量纸层析以正丁醇: 醋酸: 水 (4:1:5) 为展开剂, 上行层析, 由层析谱上洗脱下来的木糖和葡萄糖分别用地衣酚法和酚-硫酸法进行定量测定。

结果与讨论

本系统分析程序在半纤维素水解前是采用中性洗涤剂来去除发酵物中干扰半纤维素测定的可溶性糖类, 然后用 2M 盐酸水解法水解半纤维素。从表 1 可知, 同批样品重复测定的相对误差不超过 5%; 从表 2 可知, 测定值和样品中真实含量的误差不超过 1.9% (在纤维素组分中残留的未被 2M 盐酸水解的半纤维素量), 并且其相对误差不超过 10%。因此, 作为对比性分析半纤维素含量时, 此法是可以应用的。

本程序对 2M 盐酸水解液进行定糖是用地衣酚法。因为甘蔗渣等多数纤维废弃物中的半纤维素主要是由戊聚糖组成, 己聚糖含量极少, 所以用地衣酚法测定戊糖量, 乘上换算系数 0.9 来代表半纤维素量是可以的。如果所用的植物材料其半纤维素组成中还含有相当量的己聚糖, 那么地衣酚定糖法将不适用, 可以考虑使用酚硫酸法或 3, 5-二硝基水杨酸法或 Somogyi-Nelson 法。

在纤维素测定方面, 系统分析程序是用 72% H₂SO₄ 法水解 2M 盐酸水解后所剩下的稀酸不溶性残渣, 之后用萘酚试剂测定水解液中的糖量, 将测得的糖量乘上换算系数 0.9 即为纤维素含量。测定结果表明, 比多数研究者常用的硝酸乙醇法测得值低 2—3% (表 1)。偏低的原因从水解液的纸层析结果可以得到满意的解释。因为硝酸乙醇纤维素和本系统分析中的纤维素组分中均残留有 2% 左右的半纤维素 (表 2); 而硝酸乙醇法实际上是用称重方法测定纤维素, 那么测得的纤维素含量必然包括着残留下来的 2% 左右的半纤维素量, 所以其测得值比样品中纤维素的实际含量最少偏高 2% (其

表1 糖皮侧耳的甘蔗渣固体培养物中木素、半纤维素、纤维素的含量测定结果

分析方法	培养时间(天)	测定次数	木素			半纤维素			纤维素		
			测定值(%)	平均值	相对误差(%) ⁽²⁾	测定值	平均值	相对误差(%)	测定值	平均值	相对误差(%)
系统分析程序	0	3	14.0		-2.1	22.5		+0.5	36.1		-0.3
			14.5	14.3	+1.4	22.0	22.4	-1.8	36.5	36.2	+0.8
			14.3		0	22.8		+1.8	36.1		-0.3
	8	3	13.2		+1.5	20.8		+1.5	36.2		-0.3
			13.0	13.0	0	20.1	20.5	-2.0	36.3	36.3	0
			12.9		-0.8	20.5		0	36.3		0
	30	3	8.6		0	14.3		-1.4	42.2		-0.2
			8.5	8.6	-1.2	14.8	14.5	+2.1	42.6	42.3	+0.7
			8.7		+1.2	14.1		-2.8	42.1		-0.5
单一组分分析法 Klason 方法	0	3	14.9		-2.0--+2.1						
	8	3	13.4		-0.6--+2.0						
	30	3	8.9		-1.1--+1.6						
2%盐酸水解法	0	3				22.2	-2.1--+1.1				
	8	3				20.0	-2.4--+1.6				
	30	3				14.1	-2.5--+1.3				
硝酸乙醇法	0	3						38.8		-1.0--+2.3	
	8	3						38.8		-0.4--+3.1	
	30	3						44.6		-0.9--+2.7	

(1) 以占培养物%表示, (2) 以平均值为标准计算相对误差

表2 酸水解液中糖组分的定量纸层析

分析方法	培养时间(天)	稀酸水解液 ⁽¹⁾		72% H ₂ SO ₄ 水解液 ⁽²⁾		
		木糖(mg)	葡萄糖(mg)	木糖(mg)	相当于半纤维素(%)	相对误差(%)
系统分析程序	0	240	微量	19	1.71	-5.0
	8	221	—	20	1.80	0
	30	154	—	21	1.89	+5.0
单一组分分析 2% 盐酸水 解法	0	240	—	21	1.89	-4.5
	30	156	—	23	2.07	+4.5
	硝酸乙醇 法 ⁽³⁾	0		22	1.98	0
	8		21	1.89	-4.5	
	30		23	2.07	+4.5	

(1) 1克样品的2M盐酸或2%盐酸水解液

(2) 2M盐酸或2%盐酸水解后所剩下的不溶物用72% H₂SO₄ 法水解

(3) 硝酸乙醇纤维素用72% H₂SO₄ 法水解, 纸层析测定半纤维素残留量

中还残留有少量木素); 而系统分析程序是用蒽酮比色法测定纤维素含量, 在本实验控制的条件下, 蒽酮试剂对葡萄糖显色较专一, 与葡萄糖等量的木糖的显色程度仅为葡萄糖的10%, 并很快褪色^[5]。因此水解液中微量的木糖的存在

对于测定葡萄糖几乎没有干扰。所以用蒽酮法所测定的纤维素量更接近样品中的纤维素实际含量。

在木素含量分析方面, 系统分析程序中采用了72%硫酸水解法, 与单一组分分析的72%硫酸水解法比较, 两者测定值几乎一致。这说明, 在系统分析程序中的前几步处理过程对于后续的木素含量的测定没有太大影响。但应当明确的是, 72%硫酸水解法所测得的木素含量, 严格的讲是酸不溶木素的含量。如果样品中含有相当量酸溶木素的话, 用72%硫酸法便不可靠。

从以上结果分析表明, 在不考虑酸溶木素含量和不需要了解培养物中木素、半纤维素、纤维素的绝对含量的话, 即如果搞对比性研究时, 本程序是可以放心使用的。应当提及的是, 在用2M盐酸水解半纤维素时, 水解时间和酸的用量应在预备实验时自行摸索一下, 因为不同植物材料的半纤维素组成与结构有一定差异, 因此水解的难易程度稍有不同。一般水解时间

控制在 45—55 分钟之间(从微沸时算起), 2M 盐酸溶液用量为样品的 100 倍即可。

参 考 文 献

- [1] Rajarathnam, S. et al.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8: 125—134, 1979.
- [2] Wankhede, D. B. et al.: *J. Agric. Food Chem.*, 24: 655, 1976.
- [3] 波钦诺克, X. H. (荆家海 丁钟荣译), 植物生物化学分析方法, 科学出版社, 第 173—177 页, 1981。
- [4] Khanna, P. et al.: *Mushroom Newsletter for the Tropics*, 5(3): 16, 1985.
- [5] Van Soest, P. J. et al.: *J. A. O. A. C.*, 50: 50, 1967.
- [6] Van Soest, P. J.: *J. A. O. A. C.*, 46: 829, 1963.
- [7] Playne, M. J.: *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 426, 1984.
- [8] Waksman, S. A. et al.: *Indust. and Engng. Chem. (Anal)*, 2: 167—173, 1930.
- [9] 北京造纸研究所: 造纸工业化学分析, 轻工业出版社, 第 44—59 页, 1979。
- [10] Rosenberg, S. L.: *Developments in Industrial Microbiol.*, 20: 133, 1979.
- [11] Zadrazil, F. et al.: *Eur. J. Appl. Microbil. Biotechnol.*, 9: 37, 1980.
- [12] Jansheker, H. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 130: 81, 1981.
- [13] Jansheker, H. et al.: *Arch. Microbiol.*, 132: 14, 1982.
- [14] Ronald, L. et al.: in *Lignin Biodegradation* (T. K. Kirk, et al. eds.), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 2: 6, 1980.
- [15] Brink, R. H. et al.: *Soil Sci.*, 89: 157, 1960.