

张文博,贺建龙,蒋浩,等.木质纤维物质中纤维素和半纤维素含量的测定[J].江苏农业科学,2017,45(5):281-284.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.073

木质纤维物质中纤维素和半纤维素含量的测定

张文博¹,贺建龙²,蒋浩¹,熊鹏^{1,2}

(1.南京林业大学化学工程学院,江苏南京 210000; 2.淮安市百麦绿色生物能源有限公司,江苏淮安 223001)

摘要:以稻草秸秆为样品,通过美国国家可再生能源实验室(NREL)方法水解得到液体成分,采用苔黑酚比色法和蒽酮比色法测定其五碳糖(5C)和六碳糖(6C)的含量。结果表明,液体成分中5C和6C达到一定浓度比例时,会互相干扰测定的准确度。对已有测定纤维素、半纤维素含量的方法进行综合应用并加以改进,分析测定液体中5C和6C在不同波长下互不干扰的最大浓度和可测范围。结果发现,在620 nm波长下准确测定水解液中6C含量时,要同时满足 $[5C] < 0.0709 \text{ g/L}$ 和 $[5C]/[6C] < 16$;在660 nm波长下准确测定液体中5C含量时,要同时满足 $[6C] < 0.0233 \text{ g/L}$ 和 $[6C]/[5C] < 24$ 。在可测范围内,可以通过稀释法达到测定要求,此法适用于混合液中5C和6C含量的测定,与高效液相色谱(HPLC)法进行对比,测定结果相对误差的绝对值小于统计学上规定的5%,表明该法适用于木质纤维物质中纤维素和半纤维素含量快速、准确的测定。

关键词:美国国家可再生能源实验室(NREL);纤维素;半纤维素;稻草秸秆;定量分析

中图分类号:TK61 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)05-0281-03

木质纤维素的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,3种组分含量的多少及变化是木质纤维素原料综合利用的重要依据,因此,准确测定木质纤维素中纤维素、半纤维素及木质素的含量十分必要^[1]。目前常用72%浓硫酸法^[2]测定木质素含量,硫酸与重铬酸钾氧化法^[3]、硝酸乙醇法^[4]、差重法^[5]等测定纤维素含量,碱液提取法^[6]、2 mol/L盐酸水解法^[7]等测定半纤维素含量,它们的主要缺点是操作复杂、耗时长且无法进行批量测样。其中用2 mol/L盐酸水解半纤维素时,难以控制水解程度,此法仅适用于对比性研究,应用领域受到局限^[7]。美国国家可再生能源实验室(NREL)方法^[8]是用72%浓硫酸和4%稀硫酸2步水解样品,得到滤液,然后用高效液相色谱(HPLC)法测定滤液中的单糖含量,虽然HPLC法测定结果较准确,但是单位时间所测样品有限,测定速度相对较慢,不适合批量测定。HPLC色谱柱一般采用的基质相对脆弱且价格昂贵,批量测样会很快损坏色谱柱。为了降低成本,方便、快速地测定木质纤维物质中纤维素和半纤维素的含量,以稻草秸秆为样品,先用NREL法处理样品得到滤液,然后分别用苔黑酚比色法^[7]和蒽酮比色法^[9]测定滤液中五碳糖(5C)和六碳糖(6C)的含量。在试验中发现,测定滤液中5C和6C含量时会出现相互干扰现象,从而影响了测定结果的准确性。因此本研究考察了滤液中5C和6C在不同波长下互不干扰测定结果的最大浓度和可测范围,并与HPLC法^[8]的测定结果进行对比验证。

收稿日期:2016-01-11

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31370572);国家林业局“948”项目(编号:2014-4-37);江苏高校优势学科建设工程(PAPD);淮阴师范学院生物质能源与酶技术重点实验室资助。

作者简介:张文博(1991—),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事生物质能源与酶方面的研究。E-mail:920751290@qq.com。

通信作者:熊鹏,博士,教授,博士生导师,主要从事生物质能源与酶技术方面的研究。E-mail:xiangpeng@bio-ge.com。

1 材料与与方法

1.1 仪器、试剂与材料

9FZ-42型系列农作物秸秆粉碎机;UV752紫外-可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司);XFH-50CA电热式压力蒸汽灭菌锅(浙江新丰医疗器械有限公司);SHB-3循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂);HH-4数显恒温水浴锅(金坛市鸿科仪器厂);分析天平(上海越平科学仪器有限公司)。

72% H₂SO₄溶液^[9]:665 mL浓H₂SO₄(汕头化工有限公司,分析纯)加入300 mL蒸馏水中,冷却至20℃,补加蒸馏水至1000 mL。苔黑酚试剂^[7]:A试剂,0.1 g FeCl₃(天津市巴斯夫化工有限公司,分析纯)溶于100 mL 37%浓HCl(上海振企化学试剂有限公司,分析纯)中;B试剂,6 g 苔黑酚(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)溶于100 mL无水乙醇(天津基准化学试剂有限公司)中,现用现配。蒽酮试剂^[10]:0.2 g 蒽酮(国药集团化学试剂有限公司,分析纯)溶于100 mL浓H₂SO₄(汕头化工有限公司,分析纯)中,现用现配。葡萄糖(天津市大茂化学试剂厂,分析纯);D-木糖(国药集团化学试剂有限公司,分析纯);所采用的其他试剂按常规法配制。稻草秸秆:产自江苏省淮安市,原料粉碎至1~2 cm,80℃烘干备用。

1.2 测定方法

本试验拟定的系统定量分析程序是将NREL法与苔黑酚比色法和蒽酮比色法的综合应用并加以改进。以粉碎干燥后的稻草秸秆作为样品,用72%浓H₂SO₄和4%稀H₂SO₄2步水解样品,样品中的纤维素、半纤维素被水解成单糖,然后分别采用苔黑酚比色法和蒽酮比色法进行定量,操作流程如图1所示^[1,10]。

1.3 不同波长下吸收曲线的绘制

用蒽酮定糖法测定葡萄糖和木糖在不同波长下的吸光

- (1) 准确称取样品 0.800 0 g, 移入 250 mL 蓝盖试剂瓶(SEBC)中, 加入 8 mL 72% 浓 H_2SO_4 , 摇匀, 30 °C 水浴 1 h。
- (2) 加入 224 mL 蒸馏水, 摇匀, 将蓝盖试剂瓶放入电热式压力蒸汽灭菌锅中, 121 °C, 准确保温 1 h。

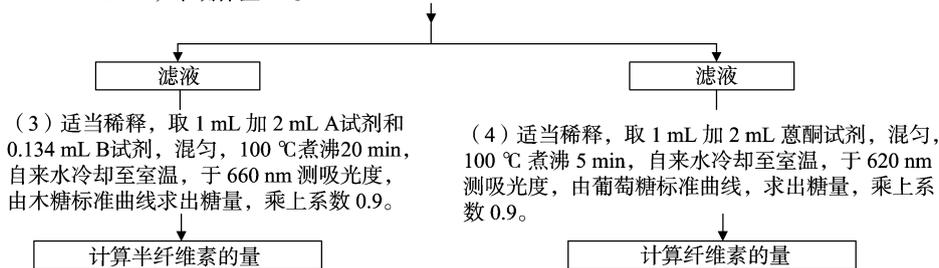


图1 纤维素和半纤维素的系统定量分析程序

度:取 3 支洗净烘干的 20 mL 具塞刻度试管, 其中 1 支为空白, 配制 0.05 g/L 葡萄糖标准溶液和 0.1 g/L 木糖标准溶液, 分别取 1 mL 标准溶液于另 2 支试管中, 1 mL 蒸馏水于空白试管中, 再分别加入 2 mL 蒽酮试剂, 混匀, 100 °C 下煮沸 5 min, 自来水冷却至室温, 用 10 mm 玻璃比色皿, 分别于 520 ~ 700 nm(波长间隔 10 nm)波长下测定吸光度, 绘制葡萄糖和木糖标准溶液在 520 ~ 700 nm 波长下的吸收曲线。

用苔黑酚比色法定糖法测定葡萄糖和木糖在不同波长下的吸光度:取 3 支洗净烘干的 20 mL 具塞刻度试管, 其中 1 支为空白, 配制 0.02 g/L 木糖标准溶液和 0.10 g/L 葡萄糖标准溶液, 分别取 1 mL 标准溶液于另 2 支试管中, 1 mL 蒸馏水于空白试管中, 再分别加入 2.000 mL A 试剂和 0.134 mL B 试剂, 混匀, 100 °C 下煮沸 20 min, 自来水冷却至室温, 用 10 mm 玻璃比色皿, 于 580 ~ 760 nm(波长间隔 10 nm)波长下测定吸光度, 绘制木糖和葡萄糖标准溶液在 580 ~ 760 nm 波长下的吸收曲线。

2 结果与分析

2.1 混合液中 5C 和 6C 之间相互干扰的分析

用本试验方法测定纯净单糖时, 结果准确, 但实际上所接触到的往往是某些糖的混合溶液, 例如预处理稻草秸秆后得到的预处理液和固体水解液。用本试验方法处理稻草秸秆得到的滤液就是一种同时存在 5C 和 6C 的混合溶液。由图 2 和图 3 可知, 不同浓度的葡萄糖和木糖标准溶液在同一波长下用同一种方法测定时, 都会呈现不同的吸光度, 也就是说当测定滤液中某一单糖的吸光度时, 另一种单糖也会有吸光度。因为吸光度具有加和性, 所以 2 种糖之间必然会存在某种程度的干扰。若滤液中一种单糖的浓度减小, 那么所测吸光度也会相应减小, 当该糖该浓度下的吸光度减小到可以忽略不计而又不影响另一种单糖正常测定时, 便可以消除干扰。

2.2 测定 6C 含量时, 5C 的最大干扰浓度和可测范围

配制不同浓度梯度的木糖标准溶液, 用蒽酮比色法测定木糖的吸光度, 采用 5 点法作图。因为 6C 与蒽酮反应生成的有色物质在可见光区吸收峰为 620 nm, 所以以 620 nm 波长为中心, 绘制 580 ~ 650 nm 波长下的木糖标准曲线。

选取所用紫外-可见分光光度计读数的最小可信值为 0.05, 那么 6C 的吸光度 ≥ 0.05 时, 视为可信的吸光度, 根据 620 nm 波长下葡萄糖的标准曲线 ($y = 13.090x - 0.006$, $r^2 = 0.9999$, y : 吸光度; x : 浓度, g/L) 可以得到吸光度为 0.05 时

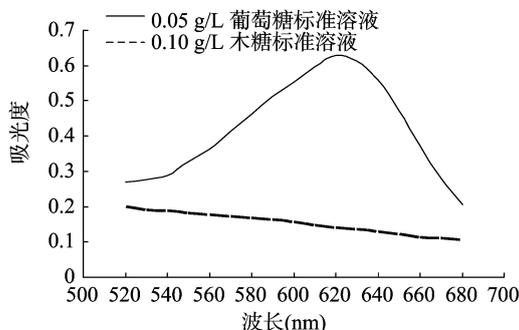


图2 蒽酮比色法测葡萄糖和木糖在不同波长下的吸收度

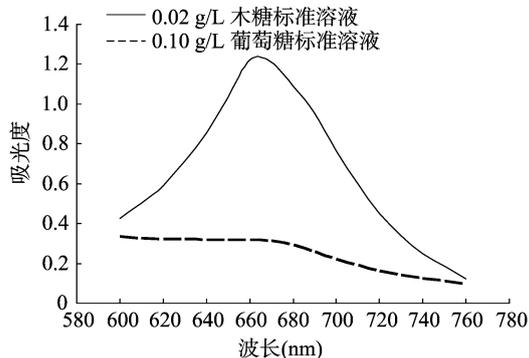


图3 苔黑酚比色法测木糖和葡萄糖在不同波长下的吸收度

6C 的浓度为 0.004 3 g/L, 此浓度即为 6C 的最小可测浓度。同理, 5C 的吸光度 < 0.05 时, 不会影响 6C 的吸光度, 根据不同波长下木糖的标准曲线可以得到吸光度为 0.05 时 5C 的浓度, 只有混合液中 5C 小于此浓度时, 才不会干扰 6C 的测定结果, 此时的 5C 浓度即为不干扰 6C 测定的最大浓度。因此, 测定 6C 含量时, 5C 的浓度要小于最大干扰浓度, 6C 的浓度要大于最小可测浓度 (0.004 3 g/L), 即 5C 与 6C 浓度的比值会恒小于某个数。由 5C 和 6C 浓度的比值可以得到不同波长下的可测范围 (表 1)。

从表 1 可以看出, 在 580 ~ 650 nm 波长下, 大致可测范围: $[5C]/[6C] < 15$ 。当混合液中 $[5C]/[6C] < 15$ 时, 可以通过控制 5C 的干扰浓度测得的 6C 准确结果。因为蒽酮比色法测定 6C 的最大吸收波长为 620 nm, 而且此波长下的可测范围最大 (16.48), 所以选取 620 nm 为蒽酮比色法测定 6C 的最适宜波长, 此时 5C 不干扰 6C 的准确测定, 要同时满足 $[5C] < 0.0709$ g/L 和 $[5C]/[6C] < 16$ 。

表1 5C在不同波长下对测定6C的最大干扰浓度和可测范围

波长 (nm)	浓度 (g/L)	[5C]/[6C]值
580	0.069 2	16.090 0
590	0.069 4	16.130 0
600	0.069 6	16.180 0
610	0.070 1	16.300 0
620	0.070 9	16.480 0
630	0.070 7	16.440 0
640	0.068 2	15.860 0
650	0.065 3	15.180 0

2.3 测定5C含量时,6C的最大干扰浓度和可测范围

配制不同浓度梯度的葡萄糖标准溶液,用苔黑酚比色法测定葡萄糖的吸光度,采用5点法作图。因为苔黑酚比色法测定木糖在660 nm波长下有最大吸光度,所以以660 nm波长为中心,绘制620~690 nm波长下的葡萄糖标准曲线。

选取所用紫外-可见分光光度计读数的最小可信值为0.05,5C的吸光度 ≥ 0.05 时,视为可信的吸光度,根据660 nm波长下木糖的标准曲线($y = 62.870x - 0.012$, $r^2 = 0.9999$, y :吸光度; x :浓度, g/L)可以得到吸光度为0.05时5C的浓度为0.986 mg/L,此浓度即为5C的最小可测浓度。同理,6C的吸光度 < 0.05 时,不会影响5C的吸光度,根据不同波长下葡萄糖的标准曲线可以得出吸光度为0.05时6C的浓度,只有混合液中的6C小于此浓度时,才不会干扰5C的测定结果,此时6C的浓度即为不干扰5C测定的最大浓度。因此,测定5C含量时,6C的浓度要小于最大干扰浓度,5C的浓度要大于最小可测浓度(0.986 mg/L),即6C与5C浓度的比值会恒小于某个数。由5C和6C浓度的比值可以得到不同波长下的可测范围(表2)。

表2 6C在不同波长下对测定5C的最大干扰浓度值和可测范围

波长 (nm)	浓度 (g/L)	[6C]/[5C]值
620	0.018 6	18.350 0
630	0.018 6	18.860 0
640	0.021 2	21.510 0
650	0.020 7	21.040 0
660	0.023 7	24.070 0
670	0.023 3	23.710 0
680	0.023 1	23.420 0
690	0.023 2	23.520 0

由表2可知,在620、630 nm波长下,可测范围:[6C]/[5C] < 18 ;在640~690 nm波长下,大致可测范围:[6C]/[5C] < 21 。当混合液中6C与5C浓度比值满足可测范围时,可以通过控制6C的干扰浓度测得5C的准确结果。因为苔黑酚比色法测定5C的最大吸收波长为660 nm,而且此波长下的可测范围最大(24.07),所以选取660 nm为苔黑酚比色法测定5C含量的最适宜波长,此时6C不干扰5C的准确测定,要同时满足[6C] < 0.0233 g/L和[6C]/[5C] < 24 。

2.4 样品分析结果

本研究以稻草秸秆为样品,按照图1的定量分析程序进行样品分析,结果如表3和表4所示。

从表3中可以看出,当滤液稀释倍数 ≥ 30 时,通过计算

得到的6C浓度基本恒定。同理,从表4中可以看出,当滤液稀释倍数 ≥ 100 时,5C的浓度基本恒定,而此时它们的浓度均小于最大干扰浓度,浓度比值满足可测范围,说明所测结果没有受到相互干扰。取3次准确测定结果的平均值:纤维素含量为38.74%、半纤维素含量为21.84%。从表4中可以看出,当滤液稀释40倍时,滤液中[6C] ≈ 0.035 g/L,[5C] ≈ 0.022 g/L,虽然[6C]/[5C] $= 1.59 < 24$,满足可测范围,但[6C] ≈ 0.035 g/L > 0.0233 g/L,所以测定5C含量时没有消除6C的干扰,结果不准确。

表3 纤维素含量测定结果

试验次数 (次)	滤液稀释倍数 (倍)	吸光度	6C浓度 (g/L)	纤维素含量 (%)
1	30	0.676	1.406	38.67
2	40	0.507	1.411	38.80
3	50	0.404	1.409	38.75

表4 半纤维素含量测定结果

试验次数 (次)	滤液稀释倍数 (倍)	吸光度	5C浓度 (g/L)	半纤维素含量 (%)
1	40	1.521	0.878	24.14
2	100	0.543	0.794	21.85
3	120	0.451	0.795	21.87
4	150	0.357	0.792	21.79

验证本系统分析程序的准确性,此法同样适用于其他木质纤维素原料中纤维素和半纤维素含量的测定。用该方法测定稻草秸秆中纤维素、半纤维素的干质量含量分别为38.74%、21.84%。HPLC方法^[5]测定结果为纤维素含量37.45%、半纤维素含量21.31%。相对误差分别为纤维素3.44%、半纤维素2.49%,绝对值均小于统计学上规定的5%,说明本系统分析程序可以用来测定纤维素和半纤维素的含量。

3 结论与讨论

本试验所采用的方法操作简便,成本低,测定结果准确,可以进行多个试样的分析,在具有一般化学分析条件的实验室内都可以使用。用本法准确测定混合液中6C含量时,需要同时满足[5C] < 0.0709 g/L和[5C]/[6C] < 16 ;准确测定5C含量时,需要同时满足[6C] < 0.0233 g/L和[6C]/[5C] < 24 。在测定混合液中5C和6C含量时,可以通过稀释的方法控制浓度大小,通过标准曲线计算得到的糖浓度符合表1和表2所列的互相不干扰范围,即认为测定结果准确。用本法测定稻草秸秆中纤维素含量38.74%、半纤维素含量21.84%,与HPLC法测定结果一致。此方法对测定木质纤维素原料中纤维素和半纤维素的含量提供了帮助,也为进一步利用木质纤维素这一宝贵的资源提供了资料。

参考文献:

- [1] 张红漫,郑荣平,陈敬文,等. NREL法测定木质纤维素原料组分的含量[J]. 分析试验室,2010,29(11):15-18.
- [2] 陈启钊,朱茜,张桂兰. 造纸原料酸不溶木素含量的测定: GB/T 2677.8—1994[S]. 北京:中国标准出版社,1995.
- [3] 李春光,王彦秋,李宁,等. 玉米秸秆纤维素提取及半纤维素与木质素脱除工艺探讨[J]. 中国农学通报,2011,27(1):199-202.

乔 帅,王梦姣,邓百万,等. 轮作区水稻根际土壤钙镁离子含量、含水量和酸碱度变化趋势[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):284-288.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.074

轮作区水稻根际土壤钙镁离子含量、含水量和酸碱度变化趋势

乔 帅¹, 王梦姣^{1,2,3}, 邓百万^{1,2}, 陈小华^{1,3}, 彭 浩^{1,2}, 罗壮志¹, 张选明⁴

(1. 陕西理工大学生物科学与工程学院, 陕西汉中 723000; 2. 陕西理工大学陕西省食用菌工程技术研究中心, 陕西汉中 723000; 3. 陕西理工大学陕西省资源生物重点实验室, 陕西汉中 723000; 4. 陕西省水稻研究所/汉中市农业科学研究所, 陕西汉中 723000)

摘要: 为保证水稻品质并避免过度使用钙、镁肥对土壤胶体造成的破坏, 利用电感耦合等离子体发射光谱法对陕南水稻—油菜轮作区的不同水稻品系在其不同生长时期的根际土壤中钙、镁含量进行分析。通过研究发现, 在轮作区4个采样地(安康市及汉中的城固县、汉台区、宁强县)不同品种水稻根际土壤钙元素含量都随水稻生长发育过程的进行而逐渐升高(含量范围分别为1 303.5~5 040.5, 2 541.1~6 517.3, 2 600.0~4 194.7, 1 664.0~5 265.8 mg/kg), 而镁元素含量随着水稻生长发育过程的进行先升高后降低(含量范围分别为6 101.3~30 021.3, 10 382.7~13 738.4, 9 956.3~10 490.1, 8 583.5~10 140.0 mg/kg)。经分析发现, 这些地区的根际土壤中所含的钙、镁元素含量均能满足水稻生长发育需求, 不用另外施加肥料。土壤含水量随水稻生长过程逐渐增加, 增幅甚至超过50% [安康K优082孕穗期土壤含水量(63.08±2.69)%, 城固K优082孕穗期土壤含水量(54.18±2.11)%], 符合水稻生长特点。土壤酸碱度测定结果表明, 安康地区土壤偏弱酸性(pH值5.5~6.5), 城固、汉台地区土壤偏中性(pH值6.5~7.5), 宁强地区土壤酸碱度跨度较大(pH值5.5~7.5), 但均适合水稻生长。

关键词: 水稻根际土壤; 钙离子; 镁离子; 土壤流失; 土壤含水量; 土壤酸碱度; 土壤胶体

中图分类号: S153.6⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)05-0284-05

钙、镁离子均对水稻的生长发育具有重要作用, 其中的钙元素是水稻必需的营养元素, 能够稳定植物细胞膜、细胞壁, 调节植物体内阴阳离子平衡^[1-2], 水稻缺钙会导致水稻根系生长差, 茎和根尖的分生组织受损, 根尖细胞腐烂、死亡等^[3-4]。研究植物的镁离子螯合酶的催化动力学及其作用机制, 对于阐明叶绿素代谢途径的调控、叶绿体与细胞核反向信号及叶绿体脱落酸(ABA)信号途径具有重要意义^[5]。水稻

一旦发生缺镁的状况, 其叶尖、叶缘出现色泽褪淡变黄, 叶片下垂, 穗枝梗基部不实粒增加, 导致减产^[3-4]。因此, 对作物适当施以钙、镁肥能够帮助作物良好生长, 达到高质高产的目的^[6]。

作物能够直接吸收利用的钙元素主要来源于土壤胶体表面的吸附钙^[7]; 同时, 作为作物利用的主要有效镁, 代换态镁(能够被一般代换剂代换出来的镁元素)一般吸附在土壤胶体表面^[8]。而作为植物能够利用的钙、镁元素主要存在介质土壤胶体, 具有保持土壤黏度结构、含蓄水分、保持土壤肥力等特点, 在水土保持过程中起重要作用。人为改变土壤含水量、土壤酸碱度会直接影响土壤胶体表面能及胶体带电性, 使土壤胶体固有的凝集作用发生变化, 导致土壤结构剧烈变化, 较原始土壤更易出现水土流失现象。由于钙肥的主要成分是石灰, 镁肥的主要成分是磷酸镁铵, 因此过度使用钙、镁肥, 会破坏土壤胶体与土壤溶液及作物间的钙、镁平衡, 改变土壤含水量、酸碱度等, 直接影响土壤胶体表面能及胶体带电性, 使土壤胶体固有的凝集作用发生变化, 导致土壤结构剧烈变化, 较原始土壤更易出现水土流失现象。

收稿日期: 2016-08-22

基金项目: 陕西省教育厅重点科学研究计划(编号: 15JS021); 陕西理工大学人才启动项目(编号: SLGKYQD2-19); 陕西理工大学研究生创新基金(编号: SLGYCX1618); 陕西省大学生创新创业训练计划(编号: UIRP15021)。

作者简介: 乔 帅(1992—), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事植物、微生物与土壤相互关系研究。E-mail: 1094220244@qq.com。

通信作者: 王梦姣, 博士, 讲师, 主要从事植物、微生物与土壤相互关系研究。E-mail: amy133253@126.com。

[4] 北京造纸研究所. 造纸工业化学分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1979: 44-59.

[5] 杜甫佑, 张晓昱, 王宏勋. 木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 46-48.

[6] 林 姐, 彭 红, 余紫苹, 等. 半纤维素分离纯化研究进展[J]. 中国造纸, 2011, 30(1): 60-64.

[7] 波钦诺克, 荆家海. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 173-177.

[8] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. NREL laboratory analytical procedure/determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [R]. NREL, 2012.

[9] van Soest P J, Robertson J B, Lewis B A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal production[J]. J Dairy Sci, 1991, 74: 3583.

[10] 王玉万, 徐文玉. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木质素的定量测定分析程序[J]. 微生物学通报, 1987(2): 82-84.