

CENTRUM VOOR ACOBIOLOGISCH ONDERZOEK

Verslagen
nr. 10, 1977

Bepaling van lignine in plantenmateriaal

Vergelijking van de spectrofotometrische en
de gravimetrische methoden

door

195106

E.G. Pannebakker en N. Vertregt

<u>Inhoud</u>	<u>Blz.</u>
1. Inleiding	5
2. Bepalingsmethoden	5
3. Toegepaste analysemethoden	9
3.1. Gravimetrische ligninebepaling	9
3.2. Spectrofotometrische ligninebepaling	10
4. Resultaten	11
5. Conclusies	15
6. Literatuur	16

1. Inleiding

Lignine is het bestanddeel van de celwand dat herhaaldelijk genoemd wordt als bepalend voor en als maat van de verteerbaarheid van de celwand voor herkauwers. Volgens de nieuwere inzichten bestaat het uit phenylpropane-eenheden, hoofdzakelijk polymeren van coniferyl- en syringylalcohol; het heeft geen duidelijk gedefinieerde moleculaire samenstelling. Hierdoor en door zijn nauwe associatie met de celwand, speciaal met de hemicelluloses, blijft een specifieke en juiste bepaling van lignine in feite onmogelijk. Het is echter de vraag of een bepaling van het ware gehalte in verband met de beoordeling van de verteerbaarheid nodig is en of niet met een voldoende reproduceerbare analyse kan worden volstaan. Evenwel, lignine heeft in verschillende planten (b.v. grassen, leguminosen) of in verschillende ouderdomsstadia (vers jong gras, hooi) niet geheel dezelfde samenstelling en is fysisch in meer of mindere mate aan de celwand gebonden.

De uitkomst van de ligninebepaling wordt mede beïnvloed door andere bestanddelen van het materiaal, die door de nauwe binding van lignine met de celwand nooit kwantitatief te verwijderen zijn. In verband met de wisselende samenstelling van de te analyseren materialen is deze invloed niet steeds even groot, wat de onderlinge vergelijking van verschillende produkten via de ligninebepaling bemoeilijkt.

Daar er in de literatuur vele methoden voor bepaling van lignine beschreven zijn, die onderling slechts in details verschillen, zijn de literatuurverwijzingen bij dit verslag beperkt tot enkele karakteristieke voorbeelden.

2. Bepalingsmethoden

De twee meest gebruikelijke methoden worden hieronder besproken:

- a. Ligninebepaling volgens de gravimetrische methode van Klason (1, 3, 12). Hierbij wordt lignine bepaald als dat deel van het monster dat onoplosbaar is in 72% H_2SO_4 . Cellulose, hemicellulose en eiwit lossen in dit reagens wél op. Het gewogen residu wordt verast; het gewichtsverlies is afkomstig van lignine.

Van deze methode bestaan vele varianten (1, 3, 10, 12). Hierbij kunnen verschillen in voorbereiding van de monsters verschillen in uitkomst geven. Bij het oplossen van een gedroogd en gemalen monster in 72% H_2SO_4 zonder extractie van storende stoffen ontstaan namelijk uit vele plantenbestanddelen condensatieproducten, die evenals lignine onoplosbaar zijn in 72% H_2SO_4 . Om storende stoffen te verwijderen extraheert men met alcohol-benzeen (lipiden, flavonen e.d.) en verwijdert men de eiwitten met pepsine-HCl (4).

Soms wordt na de behandeling met 72% H_2SO_4 nog een hydrolyse met verdund zuur toegepast om herprecipitatie van eiwitbrokstukken en van hemicellulose tegen te gaan. Is de voorbehandeling onvoldoende dan ontstaan bij deze hydrolyse opnieuw condensatieproducten. Ondanks al deze voorzorgen is het niet mogelijk om lignine vrij van stikstofverbindingen te isoleren (1), waarschijnlijk is de stikstof in hoofdzaak in de vorm van eiwit aanwezig. In de geïsoleerde lignine kan afhankelijk van het materiaal en van de voorbehandeling 1-4% N voorkomen. Men kan een stikstofcorrectie toepassen door in een parallelbepaling stikstof te bepalen volgens Kjeldahl en de gevonden waarde om te rekenen op eiwit en af te trekken (12).

Bij de gravimetrische ligninebepaling is het resultaat dus sterk afhankelijk van de gevolgde methodiek, speciaal van de voorbehandeling. Als voorbeeld: Ellis e.a. vinden met verschillende methodische varianten in een monster jonge snijhaver een ligninegehalte van 2,5-5,7% en in een monster Lespedeza hooi een gehalte van 12,1-14,3%.

Een ligninebepaling is tevens mogelijk in het geprepareerde celwandmateriaal verkregen volgens methoden Neutral Detergent Residue (NDR) en Acid Detergent Residue (ADR) volgens Van Soest (9,10). NDR isoleert in principe de celwanden, uit het ADR zijn tevens de hemicellulosen verwijderd. Een verdere voorbehandeling wordt in dit geval niet uitgevoerd, daar storende stoffen door de detergentia grotendeels verwijderd zijn. Men vindt lagere waarden dan bij analyse van het oorspronkelijke materiaal (in ADR lager dan in NDR), dit wordt geweten aan de oplosbaarheid van lagermoleculaire ligninen in detergentia. Zelfs lignine

uit ADR (ADR is in principe cellulose + lignine) bevat stikstof; dit wijst op een sterke binding van een deel van de stikstofhoudende verbindingen aan het celwandmateriaal.

- b. Bij de spectrofotometrische bepaling van lignine wordt gebruik gemaakt van het absorptiemaximum bij 280 nm van geacetyleerde lignine. Daar ook andere stoffen waaronder fenolen, aromatische aminozuren en nucleïnezuren een sterke UV absorptie vertonen, moet men deze stoffen vooraf verwijderen. Deze bepalingsmethode is door Johnson e.a. (6) uitgewerkt voor hout. Hij ontsluit en acetyleert zijn monsters met acetylbromide-ijsazijn. Vooraf wordt het hout van storende stoffen gezuiverd door een extractie met alcohol-benzeen. Ter bepaling van de absorptiecoëfficiënt van lignine wordt in houtmonsters de volgens de acetylbromide methode gevonden extinctie bepaald en tevens in dezelfde monsters lignine volgens de voor hout voorgeschreven gravimetrische methode (Tappi Standards T 12 M 59 en T 13 M 54). Voor verschillende houtsoorten (18-29% lignine) vindt hij een extinctie voor 1 g lignine/liter van 22,3 tot 24,8 cm^{-1} (gemiddelde van alle waarnemingen 23,45). Bij gebruik van een enzymatisch bereide lignine als standaard vindt hij 20,9 en 22,5. Deze bepaling blijkt dus bruikbaar te zijn voor de ligninebepaling in hout. Door Morrison (8,9) is deze methode bewerkt voor plantenmateriaal (gras), dat echter minder lignine en bovendien meer potentieel storende stoffen bevat. Hij past vooraf een extractie toe met achtereenvolgens: water bij 65 °C, ethanol, aceton en ether. Na deze behandeling vindt hij nauwelijks storing door eiwit, dat bij zijn werkwijze in de meetoplossing bezinkt. Dit neerslag werd door Bosman (CABO) niet opgemerkt, misschien ten gevolge van de droogmethode van het materiaal (Morrison 100-110 °C, CABO 70 °C). Morrison (8) neemt dus aan dat de gevonden absorptiewaarden hoofdzakelijk toe te schrijven zijn aan lignine. Zou deze veronderstelling juist zijn, dan kan men voor de berekening van zijn gegevens de extinctie van 1 g lignine/liter (enzymatisch bereide houtlignine), gevonden door Johnson, gebruiken. In dit geval geldt, wanneer E de extinctie is voor een concentratie van 1 g d.s./liter, na voorzui-
vering en reactie met acetylbromide:

% lignine op d.s. = 4,61 E.

Gebruikt men de extinctie voor 1 g houtlignine per liter meetoplossing, dan geldt: % lignine op d.s. = 4,26 E. Morrison berekent echter een regressievergelijking tussen de met zijn methode gevonden extincties en de gravimetrische ligninegehalten in dezelfde monsters volgens de gewijzigde methode van Ellis e.a. (3,12). Hij vindt dan voor verschillende materialen (7,8):

gras: % lignine (op o.s.) = 3,36 E - 1,11

% lignine (op d.s.) = 3,37 E - 1,05

holocellulose: % lignine (op o.s.) = 2,47 E - 0,36

leguminosen : % lignine (op o.s.) = 5,12 E - 0,74

Opmerkelijk is het dat door Morrison voor verschillende materialen onderling totaal verschillende regressievergelijkingen worden gevonden, die in geen geval overeenkomen met de theoretisch juiste vergelijking van Johnson: % lignine = 4,61 E.

Morrison motiveert zijn methode van berekening met het niet beschikbaar zijn als standaard van zuivere graslignine en wijt de verschillen tussen de diverse produkten aan verschillen in eigenschappen van de lignines van gras en van leguminosen. Als enige oorzaak van zo grote verschillen lijkt dit erg onwaarschijnlijk. De aanwezigheid van storende stoffen met een UV absorptie bij 280 nm (bij welke golflengte praktisch alle ringstructuren absorberen) is ondanks de voor- extractie zeker niet uitgesloten. Hierop wijst ook de constante aftrekpost, die in de regressievergelijkingen voorkomt. Overigens kan ook de gravimetrische ligninebepaling volgens Ellis e.a. niet als absolute standaard gelden, temeer daar geen eiwitcorrectie werd toegepast.

Voor beoordeling van de toepassing van de spectrofotometrische ligninebepaling, zoals die door Morrison ontwikkeld is, zou aanvullend onderzoek moeten worden verricht. Uit enkele grasmonsters van het CABO is getracht een indruk te krijgen van de aard van de stoffen die na behandeling met acetylbromide de absorptie bij 280 nm kunnen verhogen. De conclusies van dit onderzoek gelden uiteraard alleen voor gras.

3. Toegepaste analysemethoden

3.1. Gravimetrische ligninebepaling

- 3.1.1. Ligninebepaling zoals toegepast te Aberysthwyth (1, 4, 5). Weeg 1 g gedroogd en gemalen monster in een filterpapierje, extraheer 8 uur in een Soxlet apparaat met ethanol-benzeen (1:1 v/v). Breng het residu over in een 100 ml buis voeg toe 50 ml pepsine 0,2% in 0,1 N HCl, incubeer 24 uur bij 40 °C. Filtreer over een sinterglaskroesje K505 Pl (5 cm doorsnede), was uit en droog. Breng het residu over in een kolf en kook het met 200 ml N H₂SO₄ gedurende 1 uur onder reflux (af en toe schudden), breng over op het filterkroesje, was uit, droog één nacht bij 100 °C. Breng het residu over in een bekglas, behandel met 20 ml 72% H₂SO₄ gedurende 2 uur bij kamertemperatuur (af en toe schudden), verdun met water tot 100 ml, laat 2 uur bij kamertemperatuur staan, voeg wat celite toe en breng aan de kook; filtreer heet door een Goochkroes met asbest. Was met heet water tot zuurvrij, droog bij 100-105 °C gedurende 4 uur, weeg en veras bij 700 °C gedurende ongeveer 2 uur en weeg opnieuw. Het gewichtsverlies is lignine.
- 3.1.2. Voor de ligninebepaling in het ADR volgens Van Soest verwijzen we naar de betreffende literatuur (10). Na bereiding van het ADR wordt lignine zonder enige voorbehandeling bepaald als het in 72% H₂SO₄ onoplosbare deel van het ADR.
- 3.1.3. Ligninebepaling volgens Ellis e.a. (gewijzigd door Armstrong 3,12). Weeg af 1 g luchtdroog materiaal (gemalen tot 40 mesh) in een grof poreus alundum extractiehulsje en extraheer met ethanol-benzeen (35-65 vol/vol), was tweemaal en zuig af met achtereenvolgens 95% ethanol en met ether, droog bij 45 °C in een explosievrije oven, breng over in een 50 ml Erlenmeyer met glazen stop, voeg toe 40 ml 1% pepsine in 0,1 N HCl en incubeer 1 nacht bij 40 °C, na enkele keren schudden. Filtreer (Whatman gehard filter no. 52) in een Büchner trechter, was uit met heet water, breng over in 150 ml 5% H₂SO₄ w/w, kook onder reflux gedurende 1 uur, was

met water, ethanol en ether, damp de ether af in een explosievrije oven. Breng het droge residu over in een weegflesje, voeg toe 20 ml 72% H₂SO₄, schud 30 seconden krachtig, laat 10 minuten staan, schud weer krachtig en plaats 1 uur bij 20 °C, schud en laat nog 1 uur bij 20 °C staan, voeg daarna water toe, filtreer het residu in een Gooch- of alundumkroesje, was met heet water tot zuurvrij, droog bij 105-110 °C, weeg, en veras bij 600 °C, het gewichtsverlies is lignine.

3.2. Spectrofotometrische ligninebepaling

3.2.1. Acetylbromide methode volgens Morrison (8)

Verhit 2 g gedroogd en gemalen monster met 150 ml aqua dest. bij 60-65 °C gedurende 30 minuten, schud af en toe. Filtreer heet over een Whatman no. 52 filter. Was het residu met water, ethanol, aceton en diethylether tot het filtraat niet meer gekleurd is (niet meer dan 200 ml van elk oplosmiddel gebruiken). Droog het extractieresidu gedurende 1 nacht bij 47 °C. Bepaal opbrengst en droge-stofgehalte. Verhit een gewogen submonster van 40-45 mg in een reageerbuis met glazen stop met 5 ml acetylbromide in ijsazijn gedurende 30 minuten bij 70 + 0,1 °C. Koel af tot 20 °C en breng over in een maatkolf van 250 ml waarin 4,5 ml 2 N NaOH en 25 ml ijsazijn, was na met ijsazijn, vul aan tot ongeveer 200 ml met ijsazijn, voeg toe 8 ml 0,5 M hydroxylamine-HCl en vul aan tot 250 ml met ijsazijn. Schud om en laat 1 uur staan om een eventueel neerslag te laten bezinken. Meet de extinctie bij 280 nm in een 1 cm kwarts cuvet. Voer bij iedere serie een blanco van de reagentia uit, die niet boven 0,05 mag komen. Bereken de extinctie als volgt:

$$E = \frac{E_m - E_b}{c} \text{ cm}^{-1}$$

waarbij c is de concentratie van de afgewogen hoeveelheid droge stof, berekend als g/liter meetoplossing, E_m de gemeten extinctie van het monster en E_b die van de blanco.

3.2.2. Het als in 3.2.1. gezuiverde residu behandelen met pepsine-HCl als in 3.1.1., verder volgens 3.2.1.

4. Resultaten

- In tabel 1 zijn vermeld de uitkomsten verkregen met:
- I spectrofotometrische methode Morrison (3.2.1.) berekend met de door hem opgegeven regressievergelijking: % lignine op d.s. = $3,37 E - 1,05$,
 - II gravimetrische methode voor lignine zoals in gebruik te Aberysthwyth (3.1.1.) en
 - III gravimetrisch ligninebepaling in ADR volgens Van Soest (3.1.2.)

Tabel 1

monster no.	lignine % op d.s.			
	I	II	I-II	III
3133	6,40	6,23	+ 0,17	4,03
3134	6,48	6,66	- 0,18	4,37
3135	6,38	7,05	- 0,67	4,54
3136	7,76	8,04	- 0,28	5,58
3137	6,00	6,31	- 0,31	3,74
3138	6,59	6,63	- 0,04	4,22
3140	6,68	7,51	- 0,83	4,19
3142	6,02	5,61	+ 0,41	3,21
3144	5,42	5,45	- 0,03	3,91
3145	6,66	5,10	+ 1,56	3,48
3149	7,25	7,63	- 0,38	4,06
3150	11,54	11,31	+ 0,23	7,74
gem. alle monsters	6,93	6,96	- 0,03	4,42

De eerste twee kolommen geven gemiddeld dezelfde uitkomst, de door Morrison gegeven regressievergelijking komt goed overeen met onze analyses.

Methode III, de lignine in ADR blijkt duidelijk op een lager niveau te liggen. Zoals boven vermeld wordt de verklaring hiervoor gezocht in de oplosbaarheid van de lager moleculaire ligninen in de detergentoplossing.

Van de bovenstaande monsters zijn tevens bepaald het stikstofgehalte van het volgens 3.2.1. geëxtraheerde residu, en bovendien het stikstofgehalte van dit residu na behandeling met pepsine-HCl. Van beide residuen werd de extinctie volgens de spectrofotometrische ligninemethode bepaald. Dit verschaft gegevens om door vergelijking van het stikstofverlies van het residu met de afname van de extinctie de invloed van de stikstofhoudende verbindingen vast te stellen.

Deze cijfers zijn samengevat in tabel 2.

Tabel 2. Invloed N gehalte van het residu op de extinctie verkregen bij de spectrofotometrische ligninebepaling.

monster no.	1	1a	2	kolom 2a	3	3a	3b
3133	2,212	1,60	1,592	0,55	0,620	1,05	0,590
3134	2,238	1,45	1,770	0,50	0,466	0,95	0,491
3135	2,205	1,47	1,832	0,62	0,373	0,85	0,439
3136	2,615	0,91	2,258	0,45	0,357	0,46	0,776
3137	2,092	1,45	1,738	0,57	0,354	0,88	0,402
3138	2,268	1,44	1,990	0,54	0,278	0,90	0,309
3140	2,295	1,32	1,888	0,54	0,407	0,78	0,522
3142	2,098	1,24	1,575	0,41	0,523	0,83	0,630
3144	1,920	2,26	1,362	0,56	0,558	1,70	0,328
3145	2,290	2,00	1,548	0,53	0,742	1,47	0,505
3149	2,462	1,06	2,122	0,48	0,340	0,58	0,586
3150	3,438	1,40	2,982	0,40	0,456	1,00	0,456
gem. alle waarne- mingen	2,344	1,47	1,888	0,51	0,456	0,95	0,503

- kolom 1: extinctie volgens spectrofotometrisch bepaling 1 g droge stof/liter (3.2.1.)
- kolom 1a: % N in voorgezuiverde droge stof;
- kolom 2: als kolom 1, materiaal na een extra pepsine-HCl (3.2.2.) behandeling;
- kolom 2a: % N in voorgezuiverde droge stof na pepsine-HCl;
- kolom 3: kolom 1 - kolom 2, afname extincties door N verwijdering;
- kolom 3a: N verlies door pepsine - HCl behandeling in de vóórgezuiverde d.s.
- kolom 3b: extinctie afname voor 1% N afname in het residu.

Het gemiddelde van kolom 3 b geeft de gemiddelde extinctie-afname voor 1% N in het voorgezuiverde residu. Hieruit volgt een stikstofcorrectie voor de spectrofotometrische ligninebepaling. Bij een concentratie van 1 g droge stof in de meetoplossing bedraagt de extinctievermindering voor 1% N in het voorgezuiverde residu 0,503.

Uit deze tabel blijkt dat de invloed van het stikstofgehalte op het resultaat van bepaling 3.2.1. in tegenstelling met de resultaten van Morrison niet te verwaarlozen is. Het is nu echter mogelijk voor stikstofverbindingen gecorrigeerde extincties te berekenen, die dan volledig door het ligninegehalte zouden moeten worden verklaard. Om na te gaan of dit inderdaad het geval is hebben we de gevonden extincties gecorrigeerd en berekend met de door Johnson gegeven formules voor "native lignin", % lignine = $4,61 \times E$ respectievelijk voor houtlignine, % lignine = $4,26 \times E$.

De hierbij gevonden waarden worden vergeleken met de waarden gevonden uit de regressievergelijking (voor gras) van Morrison.

Tabel 3. monster no.	tabel 2 kolom 1 en 2 voor N gewij- zigd gemiddeld	lignine op d.s.			
		4,61 x F	4,26 x E	I tabel I	II tabel I
3133	1,340	6,18	5,71	6,40	6,23
3134	1,516	6,99	6,46	6,48	6,66
3135	1,506	6,94	6,42	6,38	7,05
3136	2,063	9,51	8,79	7,76	8,04
3137	1,429	6,59	6,08	6,00	6,31
3138	1,674	7,72	7,13	6,59	6,63
3140	1,620	7,47	6,90	6,68	7,51
3142	1,396	6,44	5,95	6,02	5,61
3144	1,006	4,64	4,29	5,42	5,45
3145	1,282	5,91	5,46	6,66	5,10
3149	1,893	8,73	8,06	7,25	7,63
3150	2,770	2,77	11,80	11,54	11,31
gemiddeld	1,625	7,49	6,92	6,93	6,96

Uit deze resultaten wordt aannemelijk dat de voor de aanwezige stikstofverbindingen gecorrigeerde extincties hoofdzakelijk aan lignine moeten worden toegeschreven. Dit zou bewezen kunnen worden door de extinctie van een zuivere graslignine te bepalen, die echter niet te verkrijgen is. Een door ons uit de NDR van gras met 72% H_2SO_4 bereide lignine bleek niet meer bruikbaar voor de spectrofotometrische bepaling. Deze lignine was bijna niet oplosbaar in het reagens. Bovendien was het karakteristieke spectrum in de oplossing afwezig. Blijkbaar waren de eigenschappen van de lignine door de behandeling met 72% H_2SO_4 te zeer veranderd.

De extinctie van de stikstofhoudende fractie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door aromatische aminozuren en door nucleinezuren. Om deze invloed te kunnen schatten werden de spectra van de volgende stoffen bepaald: tyrosine, tryptofaan en adenine in ijsazijn voor en na behandeling met acetylbromide. Na de behandeling met het reagens had tyrosine geen meetbare extinctie bij 280 nm, in tegenstelling met tryptofaan en adenine.

1 g tryptofaan per liter: E 280 nm 19,9 cm^{-1} ;

1 g adenine per liter : E 280 nm 33,8 cm^{-1} .

1% N in de stof zou overeenkomen met 7,29% tryptofaan resp. met 1,93% adenine. Zou het materiaal 1% stikstof als tryptofaan bevatten, dan is de daardoor verkregen extinctie voor een concentratie van 1 g droge stof per liter: $0,079 \times 19,9 = 1,45$; is stikstof aanwezig als adenine: $0,0193 \times 33,8 = 0,65$. Daar deze stoffen slechts een fractie zullen uitmaken van alle aanwezige stikstofverbindingen, lijkt de correctie van 0,5 zoals berekend in tabel 2 kolom 3 nogal hoog.

Van de stikstofvrije ringverbindingen, die ook absorptie in het UV zouden kunnen hebben, zoals koffiezuur, chlorogeenzuur en looizuur nemen we aan dat die bij de zuivering verwijderd worden, hoewel geen zekerheid bestaat dat dit volledig het geval is. Speciaal looizuur zou nog een grote invloed op de extinctie kunnen hebben. Voor 1 g looizuur (galloylglucose) per liter is de extinctie bij 280 nm na reactie met acetylbro-mide = $14,8 \text{ cm}^{-1}$.

Daar looistoffen zeer algemeen in planten voorkomen, zich niet snel laten extraheren en zich aan eiwit kunnen binden is het niet uitgesloten dat de door ons gevonden eiwitcorrectie ook tevens een verkapte looizuurcorrectie is, daar samen met het eiwit de looistoffen in oplossing zouden kunnen gaan.

5. Conclusies

Het is niet zonder meer mogelijk lignine specifiek te bepalen met de door Morrison gewijzigde spectrofotometrische methode van Johnson. De methode wordt in aanzienlijke mate beïnvloed door aromatische organische stikstofverbindingen (eiwitten, nucleinezuren) en door stikstofvrije aromatische verbindingen die niet geheel door voorafgaande extractie zijn te verwijderen.

De conclusie van Morrison, dat deze ligninebepaling door eiwitten nauwelijks wordt gestoord, is onjuist gebleken. Dientengevolge moet deze bepaling voor ieder type monster steeds geïjkt worden met een gravimetrische ligninebepaling. De door ons uitgewerkte correctie voor stikstofverbindingen is even-

eens zeer tijdrovend, bovendien is niet zeker of de gevonden correctiewaarde ook voor andere materialen dan gras geldt. Een voordeel van de spectrofotometrische methode is de kleine hoeveelheid materiaal die voor de uiteindelijke bepaling benodigd is. Deze zou dus toegepast kunnen worden voor series monsters van een zelfde produkt, wanneer slechts een kleine hoeveelheid materiaal beschikbaar is, mits de methode voor dit type monster geïjkt is door middel van een deugdelijke gravimetrische methode. Behalve een iets eenvoudiger procedure, (afgezien van de noodzakelijke, zeer tijdrovende ijking) heeft de spectrofotometrische ligninebepaling volgens Morrison verder geen voordelen. Het gebruik van vrij grote hoeveelheden van het dure en giftige acetylbromide en ijsazijn zijn bijkomende nadelen.

Ten slotte merken we op dat de uitkomst zowel van de spectrofotometrische als van de gravimetrische ligninebepaling afhankelijk is van de gevolgde procedure. Men mag dan ook nooit de uitkomsten van een bepaalde methode gebruiken voor de beoordeling van de verteerbaarheid, wanneer de grondslag voor de berekening van de verteerbaarheid verkregen uit een ligninebepaling volgens een andere, afwijkende methode. Bovendien is het afleiden van de verteerbaarheid uit zeer lage ligninegehalten en uit ligninebepalingen van zeer afwijkende materialen zonder verder onderzoek niet verantwoord.

6. Literatuur

1. Bosman, M.S.M. Med. IBS 349. Jaarboek 1967, 97-100.
2. Bosman, M.S.M. Med. IBS 413, 1970, 15 pp.
3. Ellis, G.H., G. Matrone and L.A. Maynard. J. anim. Sci. 5 (1946), 285-296.
4. Griffith, G. ap, and D.I.H. Jones. J. Sci. Fd. Agric. 16 (1965), 689-690.
5. Griffith, G. ap, and D.I.H. Jones. J. Sci. Fd. Agric. 6 (1963), 330-385.
6. Johnson, D.B., W.E. Moore and L.C. Zank Tappi 44, (1961), 793-798.
7. Moon, F.E. and A.K. Abou-Raya. J. Sci. Fd. Agric. 3, (1952) 399-406.

8. Morrison, I.M. J. Sci. Fd. Agric. 23 (1972), 455-463.
9. Morrison, I.M. J. Sci. Fd. Agric. 23 (1972), 1463-1469.
10. Soest, P.J. van, J.A.O.A.C. 46 (1963), 829-835.
11. Soest, P.J. van and R.H. Wine. J.A.O.A.C. 50 (1967),
50-55.
12. Waite, R., M.J. Johnston and D.G. Armstrong. J. agric. Sci.
Camb. 62 (1964), 391-398.