

CHROMATOGRAFISCH ONDERZOEK NAAR DE SAMENSTELLING VAN DE POLYSACCHARIDEN UIT DE CELWAND IN VERBAND MET DE ANALYSE VAN RUWVOEDERS¹⁾

CHROMATOGRAPHIC CHARACTERISATION OF THE POLYSACCHARIDES OF THE CELL-WALL WITH REGARD TO THE ANALYSIS OF ROUGHAGES

door (by)

BLANCHE D. E. GAILLARD

(Laboratorium voor physiologie der dieren, Landbouwhogeschool, Wageningen)

(Ontvangen/Received 11.9.'54)

INHOUD¹⁾

HOOFDSTUK I. Probleemstelling en opzet van het onderzoek	116
Inleiding	116
De pectinestoffen	120
De hemicellulosen	120
Richtlijnen voor de gehaltebepaling	122
Historisch overzicht van de hemicellulosebepalingen tot dusver op veevoeders toege- past	123
Discussie	125
Doelstelling	125
HOOFDSTUK II. Het isoleren van de hemicellulosen, waarbij het materiaal op verschil- lende manieren wordt gedelignificeerd	126
De extractie met alcohol-benzeen	126
De extractie van de pectinestoffen	126
Het vrijmaken van de hemicellulosen uit de lignine	127
De extractie van de hemicellulosen	130
De beschrijving van de vier methoden, volgens welke de verschillende koolhydraat- fracties worden geïsoleerd	131
HOOFDSTUK III. Het hydrolyseren van de verschillende polysaccharidemengsels	134
HOOFDSTUK IV. De chromatografische methode	140
Inleiding	140
De apparatuur	140
Het papier	140
Het solvens	140
De indicator	141
Het verwijderen van eventueel storende stoffen uit de hydrolysaten	142
De identificatie van de suikers	144
De bepaling	144

¹⁾ Dit onderzoek werd verricht met steun van de Directie van de Landbouw in het kader van een der landbouwkundige projecten gefinancierd met MSA-gelden.

HOOFDSTUK V. De bepaling van de suikers, waaruit de celwandbestanddelen zijn samengesteld	151
Inleiding	151
De pectinestoffen	152
De in 5% kaliloog oplosbare hemicellulosen	154
De in 24% kaliloog oplosbare hemicellulosen	155
De celluloserestidus	155
Discussie	156
Vergelijking van het pentosegehalte, bepaald met methode III, met dat, berekend uit een furfuralbepaling	159
HOOFDSTUK VI. De bepaling van de celwandbestanddelen van ruwvoerders	161
Inleiding	161
De bepaling van de asbestanddelen en de eiwitachtige stoffen	161
De bepaling van de lignine	161
Resultaten	163
Discussie	163
HOOFDSTUK VII. Het ontwikkelen van een verkorte methode	165
Inleiding	165
De bepaling van de in water oplosbare koolhydraten	165
Het verkorten van de methode	166
Samenvatting	174
Summary	176
Literatuur	178

HOOFDSTUK I

PROBLEEMSTELLING EN OPZET VAN HET ONDERZOEK

INLEIDING

Reeds lang wordt ernaar gestreefd de voedingswaarde van de voedermiddelen voor het vee te berekenen op grond van de chemische analyse. Ofschoon dit streven voor verschillende voedermiddelen met succes bekroond werd, hebben de pogingen om hiertoe te geraken bij de celstofrijke nog steeds niet het gewenste resultaat opgeleverd.

Deze analyse omvat gewoonlijk de bepalingen van vocht, ruw vet, ruw eiwit, as, ruwe celstof en de overige koolhydraten (Rijkslandbouwproefstation voor Veevoederonderzoek [89]).

Van deze gegevens wordt gebruik gemaakt voor de berekening van de voedende waarde van een veevoeder en wel in de eerste plaats van de „algemene voedingswaarde”, waaronder men verstaat het vermogen van het voeder om de calorieën te leveren, die het dier in staat stellen in energetisch evenwicht te blijven en energierijke producten te vormen, zoals lichaamsvet en melk. Zowel eiwitten, vetten als koolhydraten kunnen daartoe dienen, mits in de juiste verhouding toegediend.

Er zijn in de diverse landen verschillende methoden in zwang om uit de analyse de algemene voedingswaarde van een voedermiddel te berekenen. De belangrijkste zijn die van de T.D.N. (total digestible nutrients) en die van de zetmeelwaarde (Z).

De berekening van de T.D.N. sluit min of meer aan bij die, welke in de voedingsleer van de mens wordt gebruikt om de calorische waarde te berekenen.

De uitkomst wordt echter niet in calorieën uitgedrukt, maar in de calorische waarde van 1 kg zetmeel, hetgeen overeenkomt met ca 4200 kcal.

Bij deze berekening worden de bij de analyse gevonden percentages aan organische bestanddelen vermenigvuldigd met de in dierproeven bepaalde verteringscoëfficiënten (d.w.z. de percentages der voederbestanddelen, die in het spijsverteringskanaal worden verteerd). Voor het vet wordt de gevonden waarde nog met 2,25 vermenigvuldigd, aangezien de energiewaarde van vet ongeveer 2,25 maal zo groot is als die van de koolhydraten en eiwitten. Als T.D.N. wordt dan opgegeven de som van deze waarden.

Het begrip zetmeelwaarde is ingewikkelder. Men heeft hierbij één vorm van dierlijke voortbrenging als maatstaf genomen, nl. de afzetting van lichaamsvet en verstaat nu onder de zetmeelwaarde van een voeder het aantal gewichtsdelen verteerbaar zetmeel, dat een zelfde hoeveelheid energie als lichaamsvet kan doen aanzetten als 100 gewichtsdelen van het voeder.

Niettegenstaande het probleem aldus sterk is vereenvoudigd, is de bepaling van de zetmeelwaarde met behulp van dierproeven een moeizame taak. Men is er echter in geslaagd langs half empirische weg een formule te vinden, met behulp waarvan een cijfer voor de zetmeelwaarde kan worden berekend, zodra de analysecijfers voor de eiwitten, vetten, ruwe celstof en de overige koolhydraten bekend zijn.

Hoewel het principe van de T.D.N.-berekening diepgaand verschilt van dat der zetmeelwaardeberekening blijken de uitkomsten bij de celstofarme voeders, zoals granen en veekoeke, goed met elkaar overeen te komen (zie tabel I). Bij de celstofrijke voeders, zoals hooi en stro, worden echter grote verschillen gevonden, die waarschijnlijk veroorzaakt worden door het onvoldoende bepaald zijn van de celwandbestanddelen door middel van de ruwe celstofbepaling.

TABEL 1. Zetmeelwaarde en T.D.N. voor enige voedermiddelen berekend uit een zelfde scheikundige analyse (volgens BROUWER [20]).

Starchequivalent and T.D.N. calculated for different feeds based on the same figures for total composition (according to BROUWER [20]).

	Z S.E.	T.D.N.
Mais (Maize)	81,5	82,9
Tarwevoermee (wheatoffals)	73,1	75,4
Cocoskoek (coconut cake)	76,5	76,5
Palmpittenkoek (palm kernel cake)	70,2	70,1
Grondnotenkeek (earth-nut cake)	77,2	82,0
Goed weidehooi (meadow hay)	30,9	48,3
Grassilage (grass silage)	10,4	16,4
Voederbieten (mangolds)	6,3	9,4
Haverstro (oat straw)	16,9	39,8
Wintergerstestro (winter barley straw)	10,6	35,3

Vocht, vet, eiwit en as zijn namelijk gemakkelijk en vrij nauwkeurig te bepalen, nl. het vocht door drogen bij 100 °C, het vet door extractie met aether, het eiwit door het bij een Kjeldahlbepaling gevonden stikstofgehalte met 6,25 te vermenigvuldigen en de asbestanddelen door verassen. Anders is het gesteld met de bepaling van de ruwe celstof en daarmee samenhangend van het gehalte aan de overige koolhydraten, dat indirect bepaald wordt door de som van de overige gehalten van 100 af te trekken. Onder de ruwe celstof wordt

dat gedeelte van het materiaal verstaan, dat, na achtereenvolgens koken met 1,25% zwavelzuur en 1,25% natronloog en daaropvolgend uitwassen met alcohol en aether, overblijft. De bepaling is volkomen empirisch en moet op nauwkeurig vastgestelde wijze worden uitgevoerd, wil men er vergelijkbare waarden mee verkrijgen. De bedoeling van de ruwe celstofbepaling is een indruk te krijgen van het onverteerbare gedeelte van het voeder. Uit dierexperimenten is echter gebleken, dat de verteerbaarheid van de ruwe celstof in vele gevallen nog vrij groot kan zijn en die van de overige koolhydraten kan evenaren, in sommige gevallen zelfs kan overschrijden (BROUWER en DIJKSTRA [21]; CRAMPTON en MAYNARD [29]). Van scheikundig standpunt bezien zijn de ruwe celstof en de groep van de overige koolhydraten slecht gedefinieerde grootheden. De ruwe celstof is hoofdzakelijk samengesteld uit de bestanddelen van de celwand als cellulose, lignine, hemicellulosen en pectinestoffen. Zij bevat echter slechts een deel van de in het voeder aanwezige cellulose, lignine, hemicellulosen en pectinestoffen, daar een gedeelte ervan bij de behandeling met zuur en loog in oplossing gaat en dus tot de overige koolhydraten gerekend wordt. Het percentage, dat van elk van deze stoffen in de ruwe celstof achterblijft, is voor ieder materiaal verschillend.

Door diverse auteurs is dan ook scherpe critiek uitgeoefend op deze analysemethoden. NORMAN (71) noemt het gebruik van de ruwe celstofbepaling ontoereikend, onbetrouwbaar en misleidend. THOMAS en ARMSTRONG (102) constateren ook, dat vrij algemeen de mening geuit wordt, dat het gehalte aan ruwe celstof een misleidende grootheid is.

Mogelijk zou men verder komen, wanneer de samenstelling van de ruwe celstof en van de overige koolhydraten (ook wel zetmeelachtige stof genoemd) beter bekend zou zijn en de physiologische waarde der samenstellende bestanddelen nader zou zijn onderzocht.

Een dergelijk onderzoek is van groot economisch belang, omdat de ruwe celstof en de overige koolhydraten niet minder dan $\pm 70\%$ van de droge stof van gras, hooi en stro uitmaken. Bedenkt men daarbij, dat meer dan de helft van de bebouwbare oppervlakte van Nederland uit grasland bestaat en dat voorts ook vele ruwvoerders van het akkerland voor veevoeding worden gebruikt, dan volgt daaruit wel, dat het hierbij om bestanddelen gaat, welke voor de voeding van de veestapel van essentieel belang zijn.

Dit proefschrift beoogt een bijdrage te leveren tot de analyse van de bestanddelen, die thans als „ruwe celstof” en de „overige koolhydraten” worden bepaald.

In de loop der jaren zijn reeds verschillende suggesties gedaan om tot een betere analysemethodiek te komen. In 1938 stelden CRAMPTON en MAYNARD (29) voor om in plaats van de ruwe celstof de gehalten aan lignine en cellulose te bepalen. Bij de overige koolhydraten komen dan naast de oplosbare koolhydraten alleen nog maar de pectinestoffen en de hemicellulosen voor. NORDT-FELDT, SVANBERG en CLAEISSON (68) bekijken het probleem van twee kanten. Indien men de ruwe celstofbepaling vervangt door een serie ingewikkelde en tijdrovende bepalingen, verliest de voederanalyse zijn waarde voor de praktijk. Bovendien worden talloze tabellen, die op het bestaande schema gebaseerd zijn, onbruikbaar. Nadat nl. in 1863 door HENNEBERG en STROHMANN (42) aan het proefstation te Weende de ruwe celstofbepaling (Weender methode) ontwikkeld werd, zijn door verschillende onderzoekers (KÜHN [58]; WOLFF [114]; DIETRICH en KONING [32]; POTT [81]; KELLNER [54]; KLING [57]; HUISMAN [48];

SCHNEIDER [92]; MORRISON [65]; DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTSGESELSCHAFT [31]) talloze tabellen opgesteld, waarin, voor practisch alle voedermiddelen, de gegevens omtrent de gehalten aan vocht, vet, eiwit, as, ruwe celstof en de overige koolhydraten zijn samengebracht. Het invoeren van een nieuwe voederanalyse zal het resultaat van het werk van een kleine honderd jaar gedeeltelijk onbruikbaar maken, terwijl men al dit analysewerk weer van voren af aan zal moeten beginnen. Bovendien zouden de talrijke, in dierproeven bepaalde, verteringscoëfficiënten van deze voeders (DIETRICH en KONING [32]; KELLNER [54]; KLING [57]; HUISMAN [48]; SCHNEIDER [92]; MORRISON [65]; DEUTSCHE LANDWIRTSCHAFTSGESELSCHAFT [31]) sterk aan waarde verliezen bij het overgaan naar nieuwe methoden. Het is dus zeer de vraag, of de practijk wel gebaat is met een ver doorgevoerde scheiding van de celwandbestanddelen. Uit een wetenschappelijk oogpunt gezien is het daarentegen uiterst nuttig naar een dergelijke scheiding te streven om zodoende een beter inzicht te krijgen in de voedende waarde van elk van deze bestanddelen. Tevens zal men dan moeten trachten de verschillende bepalingsmethoden op den duur voor het routineonderzoek geschikt te maken. THOMAS en ARMSTRONG (102) betwijfelen ook, of het overgaan op een nieuwe indeling op het ogenblik al raadzaam zou zijn. Indien men echter hiertoe over mocht gaan, dan zouden zij niet alleen de cellulose en de lignine afzonderlijk willen bepalen, maar ook een onderscheid willen maken tussen de koolhydraten zoals zetmeel, pectinestoffen en hemicellulosen. CHARLET-LERY, FRANÇOIS en LEROY (25) hebben voor een dertigtal voeders een dergelijke scheiding uitgevoerd. Hierbij werd de lignine volgens de 72% zwavelzuurmethode bepaald, de cellulose volgens KÜRSCHNER, de polysacchariden door hydrolyse met 2% zwavelzuur (de uitkomst werd als glucose berekend), de pentosen (het hoofdbestanddeel van de hemicellulosen) door middel van een furfuralbepaling, terwijl de pectinestoffen na extractie en precipitatie werden gewogen als pectine respectievelijk pectinezuur.

Al is deze voederanalyse zeker een stap vooruit op de goede weg, toch zijn enkele van de hierbij uitgevoerde bepalingen nog vrij gebrekkig, nl. de bepalingen van de polysacchariden en de pentosen. In de eerste plaats is het onjuist om het gehalte van de polysacchariden als glucose te berekenen, daar bij hydrolyse een mengsel van hexosen en pentosen vrijkomt. Bovendien is het mij uit proeven gebleken, dat door hydrolyseren zonder meer lang niet alle polysacchariden volkomen gesplitst worden in monosacchariden, zodat een te lage uitkomst verkregen wordt. De bepaling van de pentosen, berustende op een furfuralafsplitsing, is evenmin bijzonder nauwkeurig. Het is een bepaling, waarbij het rendement slechts 90% van de theoretische waarde is, zodat men voor de overige 10% wel een correctie aan moet brengen, terwijl bovendien ook andere stoffen dan pentosen furfural af kunnen splitsen en dus een te hoge uitkomst kunnen veroorzaken. De auteurs hebben zich echter faute de mieux met deze methoden moeten behelpen.

Hiermede zijn we tevens tot de kern van het probleem gekomen. Er bestaat momenteel geen directe en nauwkeurige methode om het mengsel van polysacchariden, dat naast lignine en cellulose in de celwand voorkomt, te bepalen. Voor de bepalingen van de oplosbare koolhydraten, de cellulose en de lignine zou men van de reeds lang ingevoerde gehaltebepalingen gebruik kunnen maken, de hemicellulosebepaling is echter nog in een experimenteel stadium.

Het kwam mij voor, dat het met behulp van de papierchromatografie mogelijk moest zijn een redelijke gehaltebepaling voor de hemicellulosen uit te

werken. Daartoe was het nodig eerst na te gaan, waaruit deze hemicellulosen bestaan en hoe zij in het celwandmateriaal voorkomen. In dit onderzoek werden tevens de pectinestoffen betrokken, aangezien daarin gelijksoortige stoffen voorkomen.

Hemicellulosen en pectinestoffen zijn mengsels van polysacchariden, welke bij de vorming van de celwand worden afgezet samen met cellulose en lignine. Hierbij ontstaat een zeer hechte dooreenstrengeling, daar deze stoffen praktisch allen in rechte ketens voorkomen en dus dicht naast elkaar afgezet kunnen worden. Door deze dichte opeenpakking is het bijzonder moeilijk om uit te maken, of deze stoffen onderling ook chemisch gebonden zijn, of dat het aaneengehecht zijn meer veroorzaakt wordt door ineengrijpen van gelijkvormige kristalskeletten. De meningen hierover in de literatuur lopen nogal uiteen. Voor het verdere onderzoek is het niet van belang te weten, op welke wijze deze stoffen aaneengehecht zijn; wel moet er rekening mee gehouden worden, dat zij zeer sterk aan elkaar gebonden zijn, waardoor zij moeilijk zijn te scheiden.

DE PECTINESTOFFEN

Dit is een verzamelnaam voor een mengsel van het eigenlijke pectine en de zogenaamde ballaststoffen arabaan en galactaan. Het pectine is een polygalacturonzuur, dat gedeeltelijk met methylgroepen veresterd is en gedeeltelijk aan calcium of magnesium gebonden kan zijn. Het pectine kan uit het plantenmateriaal geïsoleerd worden met een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing, waaruit het, na aanzuren, met drie volumina alcohol geprecipiteerd kan worden. Bij deze bewerking gaan het arabaan en het galactaan ook mee in oplossing en precipiteren gelijktijdig. Zo volkomen gelijk is het gedrag van deze polysacchariden, dat men geruime tijd gemeend heeft te doen te hebben met een verbinding, waarin galacturonzuur, arabinose en galactose voorkwamen. Door SCHNEIDER en FRITSCHI (94, 95) en SCHNEIDER en BOCK (93), maar vooral door het onderzoek van HIRST en JONES (45, 43) is aangetoond, dat het een mengsel is van drie polysacchariden, nl. een polygalacturonzuur, een arabaan en een galactaan. Ook de structuur van het arabaan en die van het galactaan werden door HIRST en JONES (43, 44, 45, 46) bestudeerd. Het arabaan is een rechte keten van arabinose-moleculen in furanosevorm, waar vermoedelijk om de andere arabinose-eenheid een enkel molecuul als zijketen aangehecht is, ook in furanosevorm. Door deze furanosevorm is het gemakkelijk te hydrolyseren, zelfs met zeer verdunde zuren. Het galactaan is een rechte keten van ongeveer 120 galactose-moleculen in pyranosevorm. Het is veel minder gemakkelijk te hydrolyseren dan het arabaan. Bij planten met een hoog xylaangehalte komt regelmatig wat xylaan bij de pectinestoffen voor, terwijl er bovendien laagmoleculaire vormen van polymeren van glucose in kunnen worden aangetroffen (KERTESZ [55]).

DE HEMICELLULOSEN

Hiermede wordt aangeduid een mengsel van polysacchariden, dat naast cellulose in de celwand voorkomt. Zij onderscheiden zich van cellulose door hun oplosbaarheid in loog, terwijl zij zich aan de andere kant van pectinestoffen onderscheiden door niet oplosbaar te zijn in een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing. Verder verschillen zij nog van cellulose, doordat zij gemakkelijk gehydrolyseerd kunnen worden.

Ofschoon door sommige onderzoekers afwijkende definities gegeven worden

van het begrip hemicellulosen, verstaat men er vrij algemeen onder het mengsel van plantenpolysacchariden, dat niet met water of ammoniumoxalaatoplossing uit het plantenmateriaal kan worden geëxtraheerd, maar wel met een loogoplossing.

Het is een gecompliceerd mengsel, waarvan weinig bekend is omtrent samenstelling en wijze van voorkomen. Men treft er zowel homogene als heterogene ketens in aan. Ook vertonen de polysacchariden van één soort onderling nog weer grote variatie in ketenlengte. Een scheiding tussen deze verschillende vormen te maken is ondoenlijk.

Het hoofdbestanddeel van de hemicellulosen is wel het xylaan. Dit kan voorkomen in de vorm van zuiver xylaan, dus in kortere of langere ketens, opgebouwd uit enkel xylosemoleculen, maar ook als heterogeen polysaccharide. Aan de uiteinden van de rechte xylaanketens komt dan een uronzuur, het glucuronzuur, voor (BISHOP [18]), terwijl soms hier en daar ook nog een arabinosemolecuul als zijketen aangehecht kan zijn (ADAMS [1]; ADAMS en CASTAGNE [8]). Naast deze drie vormen van xylaan (zuiver xylaan, xylaanketens met glucuronzuur en xylaanketens met glucuronzuur en arabinose) komen ook arabaan en galactaan regelmatig in hemicellulosemengsels voor. Tenslotte zijn nog de laagmoleculaire vormen van cellulose, β - en γ -cellulose, in loog oplosbaar, zodat zij ook in de hemicellulosemengsels voorkomen.

Al deze polysacchariden zijn betrekkelijk gemakkelijk te hydrolyseren. Zij gedragen zich echter verschillend wat hun oplosbaarheid betreft. Een gedeelte is bij kamertemperatuur reeds oplosbaar in 2-5% loog, een tweede gedeelte in 24-30% loog, terwijl een restant hardnekkig in de cellulose wordt vastgehouden, zelfs bij extractie met 30% loog. Dit verschil in oplosbaarheid is er niet van afhankelijk of een polymeer uit xylose of arabinose is samengesteld. Wel is het afhankelijk van de ketenlengte van de polymeren, terwijl ook de aanwezigheid van een uronzuur de oplosbaarheid bevordert. In de met 5% loog opgeloste hemicellulosen komen hoofdzakelijk de vormen met korte keten voor en enige langere, waar uronzuur aan gebonden is. Het aantal suikersoorten, dat in een hydrolysaat ervan voorkomt, is echter even groot als dat bij de in 24% loog oplosbare fractie. NORMAN (69) meent op grond van dit verschil in oplosbaarheid een onderscheid te moeten maken tussen beide fracties. Hij noemt de in 5% loog oplosbare fractie de polyuronide hemicellulosen, omdat hierin het merendeel van de uronzuren voorkomt, en de in 24% loog oplosbare fractie het cellulosaan. Hij meent, dat het cellulosaan een integrerend bestanddeel is van de natuurlijke cellulose, die dan zou zijn samengesteld uit zuivere cellulose en cellulosaan. Door andere auteurs wordt de in 24% loog oplosbare fractie ook wel xylaan genoemd, wat niet helemaal juist is, daar er naast xylaan nog andere polysacchariden in voorkomen. O'DWYER (34) maakt nog een andere indeling. Wanneer alle hemicellulosen eerst met sterke loog zijn opgelost, wordt daarbij het deel, dat bij neutraliseren precipiteert, hemicellulose A genoemd en het deel, dat na toevoegen van alcohol aan de geneutraliseerde oplossing precipiteert, hemicellulose B. Dit hemicellulose A zal wel zo ongeveer overeenkomen met het „xylaan” en het „cellulosaan”; en hemicellulose B met de „polyuronide hemicellulosen”, maar geheel elkaar dekken doen ze niet, aangezien de oplosbaarheid van deze polysacchariden groter is, nadat ze eenmaal geïsoleerd zijn. Er moet als het ware bij het oplossen een weerstand overwonnen worden, welke de oplosbaarheid ongunstig beïnvloedt. De oorzaak hiervan moet waarschijnlijk gezocht worden in de binding, die tussen de verschillende stoffen in de cel-

wand bestaat, en het feit, dat deze stoffen met elkaar afwisselend worden afgezet bij de opbouw van de celwand, waardoor sommige oplosbare stoffen worden ingesloten door minder goed oplosbare of onoplosbare stoffen, zoals cellulose en vooral ook lignine. Het zou te ver voeren om hier diep op deze ingewikkelde materie in te gaan. Alleen werd besproken, hetgeen voor een goed inzicht in de mogelijkheden voor een gehaltebepaling nodig is te weten.

De benamingen, die in de literatuur aan de verschillende celwandbestanddelen worden gegeven, lopen nogal uiteen. Ter voorkoming van verwarring zullen in dit proefschrift de hemicellulosemengsels genoemd worden naar de sterkte van de loog, waarmede zij geëxtraheerd werden, dus de „in 5 % KOH oplosbare hemicellulosen” en de „in 24 % KOH oplosbare hemicellulosen”. Onder cellulose wordt de zuivere cellulose verstaan, terwijl het mengsel van zuivere cellulose en cellulosaan zal worden aangeduid als natuurlijk cellulose-complex of CROSS-BEVAN-cellulose. Het mengsel van cellulose en hemicellulosen, dat overblijft, nadat uit het celwandmateriaal de pectinestoffen en de lignine verwijderd zijn, wordt holocellulose genoemd. Onder pectinestoffen wordt het mengsel van het eigenlijke pectine en de begeleidende polysacchariden als arabaan, galactaan, enz. verstaan. Voor een uitgebreide verhandeling over pectinestoffen en hemicellulosen zij verder verwezen naar KERTESZ (55) en WHISTLER en SMART (111).

RICHTLIJNEN VOOR DE GEHALTEBEPALING

Uit de gegevens, die hierboven opgesomd zijn, valt reeds een en ander over de gehaltebepaling op te maken.

De te bepalen celwandbestanddelen bestaan uit polysacchariden, welke na hydrolyse bepaald kunnen worden. Aangezien er in plantenmateriaal ook mono- en oligosacchariden voorkomen, moeten deze, om verwarring te voorkomen, tevoren verwijderd worden. Dit wordt gewoonlijk gedaan door extraheren met een azeotropisch mengsel van alcohol en benzeen, waarbij tevens kleurstoffen en andere storende stoffen (vetten) verwijderd worden. Aangezien in de ruwvoeders als hooi en stro practisch geen zetmeel voorkomt, behoeft aan de verwijdering hiervan geen aandacht besteed te worden.

De pectinestoffen worden niet tot de hemicellulosen gerekend en moeten dus ook eerst worden verwijderd, aangezien ook zij in het extractiemiddel voor de hemicellulosen oplosbaar zijn. Dit kan geschieden door oplossen in een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing. De polysacchariden uit deze fractie kunnen weer na hydrolyse bepaald worden.

De hemicellulosen kunnen niet zonder meer met loog volkomen aan het plantenmateriaal worden onttrokken, daar zij gedeeltelijk ingesloten zijn door of gebonden zijn aan lignine. Het is dus voor het verkrijgen van een optimale opbrengst gewenst deze lignine eerst te verwijderen of althans gedeeltelijk af te breken. Het verwijderen van de lignine komt tevens de zuiverheid van de daarna geïsoleerde hemicellulosen ten goede, aangezien een gedeelte van de lignine in loog oplosbaar is en de kans dus groot is, dat er lignine in de hemicellulosen terecht komt.

Ongelukkigerwijs worden door de reagentia, waarmede de lignine wordt afgebroken of verwijderd, ook de hemicellulosen in meerdere of mindere mate aangetast. Het gaat er hier dus om de gulden middenweg te bewandelen en alleen de lignine zo ver af te breken of te verwijderen, dat de hemicellulosen opgelost kunnen worden zonder deze al te zeer te beschadigen.

In de loop der jaren zijn door verschillende onderzoekers hemicellulosen geïsoleerd, waarbij op verschillende manieren de lignine werd afgebroken of verwijderd. De meeste methoden werden op diverse houtsoorten toegepast, enkele echter ook op minder sterk verhout materiaal zoals stro en grassen. In sommige gevallen is wel nagegaan, of er een verlies aan koolhydraten bij plaats vond. Als maatstaf voor het verlies aan koolhydraten wordt dan het verlies aan furfuralleverende bestanddelen genomen, uitgaande van de gedachte, dat het grootste gedeelte van de hemicellulosen uit pentosaan bestaat. Uit de aard der zaak worden hierbij dus fouten gemaakt, omdat de hemicellulosen naast pentosaan ook hexosaan bevatten, omdat er in het materiaal ook andere furfuralleverende stoffen aanwezig kunnen zijn (uronzuren) en omdat de furfuralbepaling op zichzelf geen erg betrouwbare bepaling is.

Zouden wij echter toch de verschillende gegevens uit de literatuur willen vergelijken, om na te gaan, op welke wijze de verwijdering van lignine het beste kan worden uitgevoerd, dan vinden wij, dat de percentages verlies aan furfuralleverende bestanddelen voor eenzelfde methode verschillend zijn bij toepassing op verschillend materiaal. Zo geeft een methode toegepast op houtsoorten een groter percentage verlies dan toegepast op stro. Het gehalte aan te verwijderen lignine speelt hierbij waarschijnlijk een rol.

Daar slechts een enkele methode op minder verhout materiaal werd toegepast, is het maken van een vergelijking op grond van gegevens uit de literatuur niet mogelijk. Hiervoor zou men eerst de verschillende methoden ter verwijdering van lignine op eenzelfde materiaal (b.v. stro) moeten uitvoeren.

Nadat de lignine uit het materiaal verwijderd is, kunnen de hemicellulosen door extractie met loog geïsoleerd worden. Door aanzuren van de loogoplossing met ijsazijn en toevoegen van drie volumina alcohol kunnen ze worden neergeslagen.

HISTORISCH OVERZICHT VAN DE HEMICELLULOSEBEPALINGEN TOT DUSVER OP VEEVOEDERS TOEGEPAST

Naast de bepalingen van reducerende bestanddelen na hydrolyse en pentosaanbepalingen door furfuralafplitsing, die nauwelijks als hemicellulosebepalingen beschouwd kunnen worden, zijn in de loop der jaren enkele methoden ontwikkeld, waarbij de hemicellulosen geïsoleerd en rechtstreeks bepaald werden.

Door BUSTON (24) werden van enige grassoorten de gehalten aan hemicellulosen bepaald. Na verwijderen van de pectinestoffen met een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing en van de lignine met een alcoholische loogoplossing, werden de hemicellulosen geëxtraheerd met 4 % natronloog, hetgeen achtereenvolgens bij kamertemperatuur en op het waterbad geschiedde. In een gedeelte van de oplossing werd het gehalte aan totaal hemicellulosen bepaald door precipiteren met alcohol na aanzuren; in een ander deel werden achtereenvolgens fracties A, B en C geprecipiteerd, nl. door aanzuren precipiteert fractie A, na toevoegen van een half volume aceton aan het filtraat van fractie A precipiteert fractie B en na toevoegen van nog meer aceton aan het filtraat van B precipiteert fractie C. De hemicellulosen werden gezuiverd door oplossen in natronloog en weer precipiteren. Enkele uitkomsten van het onderzoek zijn in tabel 2 samengevat.

TABEL 2. Gehalten aan hemicellulosen door BUSTON bepaald in enige grassoorten.
Hemicellulosecontents of different species of grass determined by BUSTON.

grassoort	grasspecies	pct. van de droge stof pct. of the dry matter			
		totaal hemicell.	hemicell. A	hemicell. B	hemicell. C
<i>Poa trivialis</i>		16,17	5,40	—	4,30
<i>Phleum pratense</i>		17,22	—	7,10	3,60
<i>Festuca pratensis</i>		18,47	3,95	9,16	5,41
<i>Lolium italicum</i>		17,60	5,26	—	2,90
<i>Dactylis glomerata</i>		17,90	7,81	5,31	3,76

Wanneer men de som van de gehalten van de fracties A, B en C vergelijkt met het totaal gehalte, dan krijgt men de indruk, dat het herhaald oplossen en precipiteren ter zuivering van de hemicellulosen met grote verliezen gepaard gaat. Om dezelfde reden mag men verwachten, dat het gevonden totaal gehalte aan hemicellulosen niet betrouwbaar is.

Na hydrolyse werden de suikers, waaruit deze hemicellulosen waren samengesteld, volgens klassieke methoden geïdentificeerd. Gevonden werden:

in hemicellulose A xylose en een spoor arabinose.

in hemicellulose B xylose, arabinose, galactose en een uronzuur.

in hemicellulose C xylose, arabinose, galactose en een uronzuur.

Door WEIHE en PHILIPS (104) werd het hemicellulosegehalte van tarwestro bepaald. De lignine werd hierbij verwijderd door chloreren en oplossen van de gevormde chloorlignine in aethanolamine. Vervolgens werden de hemicellulosen geïsoleerd door extraheren bij kamertemperatuur met 5% natronloog. Ook hier werden de hemicellulosen, na aanzuren, met alcohol neergeslagen. De opbrengst bedroeg 28%, na zuiveren door oplossen en weer precipiteren nog maar 23%. Bij gefractioneerde precipitatie werd geen hemicellulose A gevonden, hemicellulose B bedroeg 79,2% van de totaal hemicellulosen en fractie C 9%. Ook hier blijkt weer, dat het wegen van de hemicelluloseprecipitaten voor een gehaltebepaling geen betrouwbare uitkomsten geeft. Als samenstellende suikers werden gevonden xylose, arabinose en een uronzuur, terwijl tevens de aanwezigheid van niet geïdentificeerde suikers werd geconstateerd.

In latere jaren heeft men zich alleen nog maar bezig gehouden met het onderzoek naar de aard van de hemicelluloseketens. Daarnaast werd een onderzoek ingesteld naar een mogelijke binding van xylaan aan cellulose. Hierbij werden steeds de samenstellende suikers met behulp van de papierchromatografie geïdentificeerd.

ADAMS (1) en ADAMS en CASTAGNE (8) stelden voor tarwestro vast, dat polymeren van galactose en glucose in homogene ketens hierin voorkomen, terwijl arabinose voor een gedeelte aan het xylaanmolecuul gebonden is.

BISHOP (18) isoleerde een aldobiuronzuur samengesteld uit xylose en glucuronzuur, waarmee de aanwezigheid van glucuronzuur in de xylaanketen bewezen was.

De mogelijkheid van een binding tussen xylaan en cellulose werd reeds door NORMAN (69) naar voren gebracht. De meningen van de latere onderzoekers (MAZUMDAR en SARKAR [63]; ADAMS en BISHOP [2]; SARKAR, MAZUMDAR en BAL [91]; DAS, MITRA en WAREHAM [30]; SARKAR [90]) zijn hierover echter zeer verdeeld. Een definitief bewijs voor het al of niet chemisch gebonden zijn van deze stoffen werd niet gegeven.

DISCUSSIE

Bij de bepalingen van de gehalten aan hemicellulosen, door BUSTON (24) en WEIHE en PHILIPS (104) in grassen en stro uitgevoerd, vallen enkele dingen op, die niet geheel bevredigend zijn.

In de eerste plaats hebben de auteurs zich er niet van overtuigd, of de wijze, waarop door hen de lignine verwijderd werd, wel met zo gering mogelijk verlies aan koolhydraten gepaard gaat. Dit is inderdaad moeilijk vast te stellen, aangezien er geen standaardmethode is, waarmede de uitkomsten vergeleken kunnen worden. Het is alleen mogelijk door vergelijken van de verschillende methoden op eenzelfde materiaal uit te maken, op welke wijze het hoogste rendement aan hemicellulosen verkregen wordt. Indien men over een voldoende nauwkeurige methode beschikt om de gehalten aan xylose en arabinose in de geïsoleerde hemicellulosen te bepalen, zou het daaruit berekende pentosaan-gehalte eventueel nog vergeleken kunnen worden met dat, gevonden uit een furfuralbepaling.

Verder is de bepaling van de hemicellulosen door wegen zeer onnauwkeurig, daar de preparaten na eerste precipitatie nog met lignine en asbestanddelen verontreinigd zijn en er bij zuiveren verliezen optreden. Bovendien kunnen hemicellulosen van verschillende herkomst verschillend van samenstelling zijn. Het zou dus gewenst zijn om in plaats van het gehalte aan hemicellulosen de gehalten aan samenstellende suikers te bepalen.

Ook wordt niet nagegaan, of er eventueel nog hemicellulosen in het residu van de extractie zijn achtergebleven. Dit zou gemakkelijk kunnen gebeuren, indien een gedeelte van de hemicellulosen uit polysacchariden met bijzonder lange ketens zou zijn samengesteld, of indien er inderdaad een chemische binding zou bestaan tussen xylaan en cellulose.

Tenslotte zijn de bepalingen zeer tijdrovend; zij zouden in deze vorm nooit in aanmerking kunnen komen voor een routineonderzoek van veevoeders.

DOELSTELLING

Het hier beschreven onderzoek heeft tot doel de bepaling van het gehalte aan hemicellulosen op bovengenoemde punten te verbeteren en na te gaan of die tot een routinebepaling kan worden uitgewerkt.

Bij een monster tarwestro zullen enige manieren van delignificeren vergeleken worden, waarbij de voorafgaande extracties met alcohol-benzeen en met ammoniumoxalaatoplossing, als ook de uiteindelijke extractie van de hemicellulosen met loog op gelijke wijze zullen worden uitgevoerd.

In plaats van een gewichtsbepaling van de hemicellulosen zullen nu de samenstellende suikers ervan door middel van de papierchromatografie worden bepaald.

Ook de verschillende extractieresten zullen aan een hydrolyse worden onderworpen en de hierbij vrijkomende suikers eveneens papierchromatografisch worden bepaald.

Tenslotte zal getracht worden de tijdsduur van de bepaling tot het uiterste te bekorten, waarbij tevens onderzocht zal worden in hoeverre deze bepaling met bepalingen van de oplosbare koolhydraten, van cellulose en van lignine kan worden gecombineerd, om zodoende alle bestanddelen van de „ruwe celstof” en de groep van „de overige koolhydraten” in de analyse te betrekken.

In hoofdstuk II (blz. 126) zal eerst het isoleren van de hemicellulosen uit

tarwestro na verschillende manieren van delignificeren worden besproken. In de hoofdstukken III (blz. 134) en IV (blz. 140) zullen de wijze van hydrolyseren van de koolhydraatmengsels en de uitvoering van de chromatografische bepaling worden toegelicht, waarna in hoofdstuk V (blz. 151) de toepassing ervan voor de bepaling van de suikers uit de verschillende celwandbestanddelen zal worden behandeld. In hoofdstuk VI (blz. 161) zal vervolgens de toepassing van de uitgewerkte methode op verschillende hooi- en strosoorten worden besproken, waarna in hoofdstuk VII (blz. 165) de mogelijkheden om de methode te verkorten zullen worden behandeld.

HOOFDSTUK II

HET ISOLEREN VAN DE HEMICELULOSEN, WAARBIJ HET MATERIAAL OP VERSCHILLENDE MANIEREN WORDT GEDELIGNIFICEERD

DE EXTRACTIE MET ALCOHOL-BENZEEN

Zoals reeds in hoofdstuk I werd vermeld, kunnen de vetachtige stoffen, kleurstoffen en andere storende stoffen worden verwijderd met een mengsel van 1 deel alcohol en 2 delen benzeen (WHISTLER, BACHRACH en BOWMAN [109]). In de meeste gevallen is een tijd van 10 tot 30 uur nodig voor volledige extractie, afhankelijk van het te behandelen materiaal.

Om na te gaan welke extractietijd nodig zou zijn voor het te onderzoeken tarwestro, werd een fijngemalen monster hiervan in een Soxhlet-apparaat geëxtraheerd met het alcohol-benzeenmengsel. Na 15, 20, 25 en 30 uur werd het extract, na drogen, bepaald. Hierbij bleek, dat vóór 25 uur de extractie nog onvolledig was en dat de toename van het extract tussen 25 en 30 uur nog slechts gering was. De extractie met het alcohol-benzeenmengsel zal dus gedurende 30 uur moeten worden toegepast.

Het tarwestro ondergaat hierbij een gewichtsvermindering van 5%. Het gedroogde met alcohol-benzeen behandelde materiaal werd verder als „uitgangsmateriaal” genomen voor de bepalingen van de celwandbestanddelen.

DE EXTRACTIE VAN DE PECTINESTOFFEN

De pectinestoffen kunnen uit het „uitgangsmateriaal” worden verwijderd met een 0,5% ammoniumoxalaatoplossing. Hiervoor is de methode van WEIHE en PHILIPS (107) bijzonder geschikt.

Een G₃ filterkroes zonder steel wordt aan de onderkant met een gummistop gesloten. Door de stop wordt een U-vormig buisje aangebracht, waarvan het ene kortere uiteinde in de ruimte onder de filterbodem uitkomt en het andere langere langs de filterkroes omhoog loopt, waardoor het mogelijk is de filterkroes met vloeistof gevuld te houden (fig. 1). In de kroes wordt 2½ à 3 gram van het „uitgangsmateriaal” gewogen en deze verder met een 0,5% ammoniumoxalaatoplossing van 85 °C gevuld. Het geheel wordt in een bekerglas met water geplaatst, dat op 85 °C gehouden wordt. Het mengsel wordt regelmatig omgeroerd. Het uiteinde van de langere stijgbuis wordt verbonden met een erlenmeyer, waarin telkens na 2 uur de extractievloeistof door aanzuigen wordt overgeheveld. Het residu in de filterkroes wordt dan weer 2 uur behandeld met verse ammoniumoxalaatoplossing, enz. Hierbij blijkt, dat voor tarwestro 5 extracties van 2 uur nodig zijn om de pectinestoffen te verwijderen. Het residu wordt met

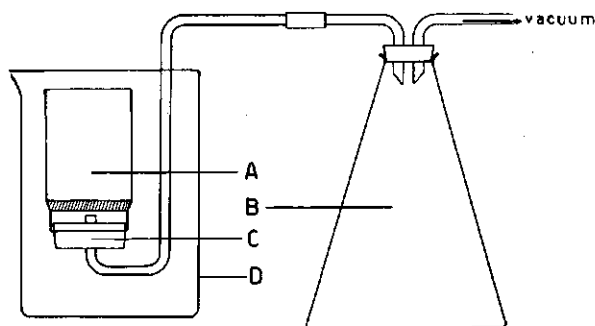


FIG. 1. Extractie van de pectinestoffen.

A = filterkroes 1G3

C = doorboorde gummistop

Extraction of the pectic substances.

A = filtercrucible 1G3

C = bored rubber stopper

B = verzamelerlenmeyer voor de filtraten

D = bekglas met water van 85 °C

B = recipient for the filtrates

D = beaker with water (85 °C)

water gewassen en hierop worden dan telkens de verschillende methoden ter verwijdering van de lignine toegepast. Het in de erlenmeyer verzamelde filtraat wordt juist zuur op lakmoes-papier gemaakt met verdund zoutzuur en uit deze oplossing worden de pectinestoffen geprecipiteerd door toevoegen van vier volumina alcohol. Het precipitaat wordt op een gewogen filterkroes verzameld en met alcohol, waaraan een weinig zoutzuur is toegevoegd, oxalaatvrij gewassen, waarna het water door achtereenvolgens doorzuigen van alcohol en aceton verwijderd wordt. Tenslotte wordt bij 100 °C gedroogd.

Het gehalte aan pectinestoffen blijkt bij tarwestro gemiddeld 1,6% te bedragen, berekend op de droge stof van het met alcohol-benzeen behandelde materiaal.

Na hydrolyse van de pectinestoffen kunnen de galactose, glucose, arabinose en xylose uit de begeleidende ballaststoffen met behulp van de papierchromatografie worden bepaald. Dit onderzoek wordt in hoofdstuk V behandeld.

HET VRIJMAKEN VAN DE HEMICELLULOSEN UIT DE LIGNINE

De lignine vormt wel het grootste obstakel voor een bepaling van de hemicellulosen. Wij zullen er niet over in discussie treden of er een chemische binding bestaat tussen de lignine en de hemicellulosen, of dat deze er slechts door worden ingesloten. De meningen lopen hierover sterk uiteen en bij gebrek aan bewijs voor één van beide theorieën is het laatste woord in deze nog niet gesproken. Bovendien zouden beide mogelijkheden naast elkaar voor kunnen komen. Hoe het ook zij, de koolhydraten moeten eerst uit de lignine vrijgemaakt worden, voordat zij geëxtraheerd kunnen worden.

De methoden, die worden toegepast om de hemicellulosen voor de extractie toegankelijk te maken, kunnen in twee groepen worden ondergebracht. Bij de ene groep wordt het materiaal behandeld met alcoholische kali, waarna de hemicellulosen geëxtraheerd kunnen worden. De lignine blijft hierbij voor het merendeel in het materiaal achter. Bij de andere groep wordt de lignine uit het materiaal verwijderd door chloreren, waarbij een oplosbaar chloorlignine ontstaat. Het residu bevat dan alleen de koolhydraten en een weinig asbestanddelen. Uit dit residu, de holocellulose, worden dan de hemicellulosen geëxtraheerd.

Het materiaal wordt voorbehandeld met alcoholische loog

NORRIS en PREECE (73) voeren deze behandeling uit met 1 % natronloog in 50 % vv alcohol gedurende twee achtereenvolgende perioden van 2 uur onder verwarmen aan een opstijgende koeler. De alcoholische loog wordt telkens afgefilterd en op het residu worden, na verwijderen van de alcohol, de hemicellulose-extracties uitgevoerd. Dat bij deze methode een verlies aan koolhydraten optreedt, wordt door PREECE (82) zelf reeds aangegeven, daar hij de aanwezigheid van furfuralleverende suikers in het filtraat constateert. Hij schrijft dit toe aan de aanwezigheid daarin van zogenaamde lignosacchariden. Over het algemeen wordt het risico, dat bij verwarmen tevens uronzuur-bevattende polysacchariden op zouden lossen, vrij groot geacht. PREECE (83, 84) geeft in latere publicaties dit verlies aan polysacchariden ook toe, onder vermelding, dat dit niet afhankelijk is van het alcoholgehalte van de gebruikte alcoholische kali, maar wel verschillend is voor ieder soort materiaal.

BUSTON (24) prefereert derhalve een behandeling bij kamertemperatuur en laat het materiaal gedurende een nacht in de alcoholische loog staan. Het is echter zeer de vraag of deze tijd wel voldoende lang is, aangezien beneden 25 °C het effect van de alcoholische loog sterk vermindert.

WEIHE en PHILIPS (105) brengen het materiaal dan ook gedurende drie perioden van 24 uur in contact met de alcoholische loog, waarbij telkens na 24 uur wordt afgefilterd en de loog wordt verversd.

NORMAN (70) waarschuwt tegen iedere alkalische behandeling, om het even of deze onder verwarmen dan wel bij kamertemperatuur wordt uitgevoerd, omdat er gevaar bestaat, dat hemicellulosen in de alkalische vloeistof gedeeltelijk oplossen. Naast de verliezen door oplossen schijnen echter ook nog door ontleding koolhydraten verloren te gaan, zoals blijkt uit een onderzoek van WEIHE en PHILIPS (106). Zij constateren, dat door een behandeling met 2 % natronloog in 60 % vv alcohol bij kamertemperatuur in het residu een verlies is ontstaan van 7,79 % van het oorspronkelijk gehalte aan furfuralleverende stoffen. Slechts 1,75 % werd in het filtraat teruggevonden, het overige gedeelte was vermoedelijk door destructie verloren gegaan.

Methoden, waarbij de lignine eerst verwijderd wordt

De methode is oorspronkelijk door SCHMIDT et al. (96, 97) uitgewerkt. Door een zeer langdurige behandeling van het materiaal met chloordioxyde in pyridine en water wordt de lignine verwijderd en blijft een kleurloos residu achter (de zogenaamde „Skeletsubstanzen”), dat nog de oorspronkelijke weefselstructuur bezit en praktisch alle koolhydraten bevat. RITTER en KURTH (86, 87) gaan op deze gedachte door en weten de tijd, welke nodig is voor de holocellulosebereiding, van een maand op enkele dagen terug te brengen. Zij gebruiken een alcoholische pyridineoplossing om de chloorlignine te verwijderen. Hieruit ontstaat na enige verbeteringen de methode van VAN BECKUM en RITTER (11, 12, 13, 14), welke ook als TAPPI standaard (101) door de papierindustrie in gebruik is genomen en met een kleine verandering in de werkwijze door WEIHE en PHILIPS (105) wordt toegepast. Het chloordioxyde is hierbij door chloor vervangen. Het materiaal wordt in een glazen filterkroes onder ijskoeling enkele minuten met chloorgas behandeld. De chloorlignine wordt weggenomen met een 3 % oplossing van aethanolamine in alcohol. Aangezien water nodig is bij het chloreren en de koolhydraten wel enigszins oplosbaar zijn in een waterige aethanolamine-

oplossing, maar niet in een alcoholische, wordt het gechloreerde materiaal eerst tweemaal uitgewassen met alcohol, waarbij naast het water tevens de overmaat chloor wordt weggenomen. Daarna wordt de aethanolamine-alcohol warm bij het residu gevoegd en er enkele minuten mee in contact gelaten, alvorens ze weer wordt afgezogen. Na een tweede wassing met aethanolamine-alcohol wordt het residu van aethanolamine bevrijd door wassen met alcohol, welke weer met water verwijderd wordt, waarna opnieuw gechloreerd kan worden enz., totdat het residu kleurloos is. Met deze methode wordt door sommige werkers een som verkregen van as, oplosbare stoffen, holocellulose en lignine van 99,9 tot 100,9 %. RITMAN (85) en WISE, MURPHY en D'ADDIECO (113) tonen echter aan, dat deze uitkomst wordt verkregen door een compensatie van fouten, o.a. retentie van aethanolamine in de holocellulose enerzijds en wel degelijk een verlies aan koolhydraten anderzijds. JAYME (50) vervangt bij het chloreren het chloorgas weer door chloordioxyde, aangezien dit een mildere werking heeft en hierdoor de kans om de koolhydraten te behouden groter is. De methode wordt in de uitvoering wat verbeterd door WISE, MURPHY en D'ADDIECO (113). Het chloordioxyde wordt gevormd uit natriumchloriet en ijsazijn, welke worden gevoegd bij een tot 60 °C verwarmde suspensie van het materiaal in water. Indien na twee uur het materiaal nog niet kleurloos is, worden zonder filtreren nieuwe hoeveelheden natriumchloriet en ijsazijn toegevoegd, tot het residu kleurloos is. De suspensie wordt dan in ijs gekoeld, gefiltreerd en met ijswater gewassen.

Bij het verwijderen van de lignine blijkt zowel bij de chloor- als bij de chloriet-methode, dat de laatste $\pm 4\%$ lignine hardnekkig worden vastgehouden, hetgeen doet vermoeden (COLDWELL en DE LONG [26]), dat dit gedeelte lignine chemisch gebonden is aan de koolhydraten. Wordt deze laatste 4% lignine op drastische wijze verwijderd, dan treden zeer hoge verliezen aan koolhydraten op. Volgens HOLMBERG (47) kan dit verlies bij sommige houtsoorten tot 47 % oplopen. Daar het voor de hemicellulose-extracties niet noodzakelijk is, dat alle lignine verwijderd wordt, kan men beter deze kleine rest laten zitten, om zodoende een zo hoog mogelijk rendement aan koolhydraten te verkrijgen. De verliezen, welke dan geconstateerd worden, zijn voor de chloormethode op hout toegepast $\pm 7\%$ (WISE, MURPHY en D'ADDIECO [113]) en voor de chloriet-methode op bladeren toegepast 2,9% (COLDWELL en DE LONG [26]) en op hooi en stro variërend van 0,9 tot 5% (BENNETT [15]). Vergelijkbaar zijn deze percentages niet, daar zij bij zeer verschillend materiaal zijn gevonden. Het is dus niet mogelijk op grond van deze gegevens uit te maken, met welke wijze van delignificeren het hoogste rendement aan koolhydraten verkregen kan worden. Het is waarschijnlijk, dat het verlies aan koolhydraten groter is bij een hoog ligninegehalte. Wanneer echter eenmaal de verschillende werkwijzen op eenzelfde materiaal vergeleken zijn, dan mogen wij verwachten, dat de methode, die hierbij de beste resultaten geeft, dit verhoudingsgewijs ook op ander materiaal zal doen, al is dan percentsgewijs het verlies aan koolhydraten voor ieder materiaal verschillend.

Voor dit vergelijkend onderzoek komen drie werkwijzen in aanmerking, nl.: de behandeling met alcoholische kali, de holocellulosebereiding met behulp van chloor en de holocellulosebereiding met behulp van chloordioxyde (chloriet). Alle drie methoden zijn door mij op het tarwestro toegepast. De voorschriften voor de behandeling met alcoholische kali volgens WEIHE en PHILIPS (105) en voor de holocellulosebereiding met natriumchloriet volgens WISE, MURPHY en D'ADDIECO (113) kunnen onveranderd uit de literatuur worden overgenomen.

Het lijkt mij echter, dat de holocellulosebereiding met chloor (TAPPI standaard) nog verbeterd zou kunnen worden door het materiaal niet direct met een vrij grote hoeveelheid chloorgas in contact te brengen, maar het chloor in een suspensie van het materiaal te ontwikkelen uit een mengsel van chloramine en azijnzuur. Door de zeer milde werking van het chloramine is afkoeling met ijs dan niet nodig, het lijkt mij zelfs beter bij 70 °C te werken.

Bij de bovengenoemde drie methoden wordt lignine verwijderd, vóórdat de hemicellulosen uit het materiaal worden geëxtraheerd. Daar echter een groot deel van de hemicellulosen direct geïsoleerd kan worden en het verlies aan koolhydraten juist bij de verwijdering van lignine plaats heeft, bestaat ook nog de mogelijkheid, dat de verliezen beperkt zouden kunnen worden door het chloreren uit te voeren op materiaal, waaraan eerst door verdunde loog een deel van de hemicellulosen is onttrokken, waarna het restant dan na het chloreren geëxtraheerd kan worden. De vóór het chloreren gewonnen hemicellulosen zullen dan waarschijnlijk onbeschadigd blijven. Daartegenover staat, dat deze fractie sterk met het in loog oplosbare deel van de in het materiaal aanwezige lignine verontreinigd zal zijn en daardoor waarschijnlijk minder gemakkelijk zal zijn te hydrolyseren, waarbij dan eventueel ontleding op kan treden. Om na te gaan of deze handelwijze een voordeel brengt, is ook volgens dit principe een voorschrift opgesteld, zodat ik tenslotte vier verschillende methoden voor het vrijmaken van de hemicellulosen uit lignine in mijn onderzoek heb betrokken. Een nauwkeurige beschrijving van de vier methoden wordt aan het eind van dit hoofdstuk gegeven.

DE EXTRACTIE VAN DE HEMICELLULOSEN

Over de uiteindelijke extractie van de hemicellulosen treft men in de literatuur geen meningsverschillen aan. De hemicellulosen zijn oplosbaar in loog, zodat die altijd als extractiemiddel gebruikt wordt. Wel wordt er een verschil van oplosbaarheid in verdunde (5%) kaliloog en in sterkere (17–24%) kaliloog geconstateerd. De benamingen, die aan deze hemicellulosefracties gegeven worden, zijn, zoals in hoofdstuk I reeds vermeld werd, niet erg nauwkeurig. Zij worden meestal door elkaar gebruikt voor min of meer gelijksoortige mengsels van koolhydraten, terwijl een nauwkeurige definitie daarbij meestal ontbreekt. Om verwarring te voorkomen zullen in dit proefschrift namen als xylaan of cellulosaan niet gebruikt worden en zullen de hemicellulosemengsels eenvoudig aangeduid worden met de sterkte van de loog, waarmee zij geïsoleerd werden, dus de „in 5% kaliloog oplosbare hemicellulosen” en de „in 24% kaliloog oplosbare hemicellulosen”.

Bij mijn onderzoek worden de hemicellulose-extracties bij kamertemperatuur uitgevoerd om ontleding te voorkomen en bovendien in gesloten erlenmeyers in een stikstofatmosfeer om oxydatie te voorkomen. De erlenmeyers worden door bevestiging aan een ronddraaiend wiel voortdurend in beweging gehouden. Telkens na 24 uur wordt de loog afgefiltreerd en door verse vervangen. Iedere extractie wordt gedurende vier maal 24 uur uitgevoerd, aangezien uit controleproeven gebleken is, dat eerst na vier maal 24 uur geen hemicellulosen meer worden opgenomen. De materialen, welke op de vier verschillende manieren zijn voorbehandeld, worden op deze wijze eerst met 5% kaliloog en daarna met 24% kaliloog geëxtraheerd. De verzamelde filtraten van iedere fractie worden met ijsazijn juist zuur op lakmoespapier gemaakt en met drie volumina alcohol

neergeslagen. De precipitaten worden op glazen filterkroezen verzameld, uitgewassen met een mengsel van drie delen alcohol en één deel water, daarna met alcohol en tenslotte met aceton. Ze worden – zo kort mogelijk – bij 100 °C tot constant gewicht gedroogd en gewogen. Aan kaliloog wordt in het algemeen voor de extractie de voorkeur gegeven boven natronloog, omdat het bij de neutralisatie gevormde kaliumacetaat beter in de alcoholische wasvloeistof oplosbaar is dan het natriumacetaat. Toch blijven de hemicellulosepreparaten nog sterk verontreinigd met acetaat. Dit kan volgens WISE, MURPHY en D'ADDIECO (113) 10–20 % bedragen. In de gevallen, waar de lignine bij de voorbehandeling verwijderd is, wordt het residu van deze extracties hoofdzakelijk door cellulose gevormd. De β - en γ -cellulose zijn in de loog oplosbaar en worden in de hemicellulosepreparaten aangetroffen.

DE BESCHRIJVING VAN DE VIER METHODEN, VOLGENS WELKE DE VERSCHILLENDE KOOLHYDRAATFRACTIES WORDEN GEÏSOLEERD

Zoals in de aanvang van dit hoofdstuk werd gezegd, is bij alle vier methoden uitgegaan van tarwestro, dat gedurende 30 uur in een Soxhlet-apparaat met een mengsel van 1 deel alcohol en 2 delen benzeen is geëxtraheerd. Het aldus behandelde stro is het „uitgangsmateriaal” genoemd.

Methode I (volgens WEIHE en PHILIPS [105])

In een G₃-filterkroes zonder steel wordt 2,5 à 3 gram van het „uitgangsmateriaal” gewogen. Met behulp van een doorboorde gummistop wordt een stijgbuis onder de kroes aangebracht. De kroes wordt dan gevuld met een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing van 85 °C, waarna het geheel geplaatst wordt in een bekersglas met water, dat op 85 °C gehouden wordt. Het mengsel in de kroes wordt af en toe omgeroerd. Na 2 uur wordt de stijgbuis verbonden met een erlenmeyer en wordt de vloeistof uit de kroes door aanzuigen in de erlenmeyer overgeheveld. De kroes wordt weer met verse ammoniumoxalaatoplossing van 85 °C gevuld, enz. Na vijf extracties van 2 uur wordt het in de erlenmeyer verzamelde filtraat met zoutzuur juist zuur op lakmoespapier gemaakt en worden de pectinestoffen door toevoegen van vier volumina alcohol neergeslagen. Het precipitaat wordt op een glazen filterkroes verzameld, met alcohol waaraan een weinig zoutzuur is toegevoegd oxalaatvrij gewassen, vervolgens gewassen met alcohol en aceton, waarna het bij 100 °C wordt gedroogd en ten slotte gewogen.

Het residu van deze extractie wordt met water gewassen en vervolgens wordt het ter bevordering van de extractie van de hemicellulosen in een gesloten erlenmeyer drie maal 24 uur bij kamertemperatuur, onder voortdurend omzwenken aan een wiel, behandeld met 2 % natronloog in 60 %vv alcohol. De alcoholische loog wordt telkens na 24 uur ververst. De filtraten worden weggegooid. Het materiaal wordt vervolgens in een porcelein schaalje op het waterbad van alcohol bevrijd en daarna overgebracht in een andere erlenmeyer. Dan wordt er zoveel 5 % kaliloog aan toegevoegd, dat het materiaal er ruim mee bedekt is. De zuurstof wordt uit de erlenmeyer verdrongen met stikstof, waarna de erlenmeyer met een gummistop gesloten wordt. Het mengsel wordt bij kamertemperatuur 24 uur aan een ronddraaiend wiel in beweging gehouden. De kaliloog wordt dan afgefilterd en door verse vervangen, waarna op dezelfde wijze wederom 24 uur wordt geëxtraheerd, enz. Na vier maal 24 uur wordt de

5 % kaliloog door 24 procentige vervangen en ook hiermee wordt op dezelfde wijze vier maal 24 uur geëxtraheerd. De filtraten van de extracties met 5 % kaliloog worden samengevoegd en aangezuurd tot juist zuur op lakmoespapier met ijsazijn, waarna drie volumina alcohol onder roeren worden toegevoegd, waarbij de hemicellulosen precipiteren. Na bezinken wordt eerst de heldere bovenstaande vloeistof door een gewogen G₃-kroes afgefiltreerd en tenslotte wordt het neerslag zelf ook op de kroes gebracht, waarna langzaam wordt afgezogen. Deze precipitaten zijn colloïdaal en verstoppem gemakkelijk de filters. Het neerslag wordt eerst enige malen gewassen met een mengsel van drie delen alcohol en één deel water, vervolgens met alcohol, waarna nog wat aceton wordt doorgezogen. Tenslotte wordt zo kort mogelijk bij 100 °C tot constant gewicht gedroogd en gewogen. Dit zijn dan de „in 5 % kaliloog oplosbare hemicellulosen”. Op gelijke wijze worden de „in 24 % kaliloog oplosbare hemicellulosen” uit de bijeen gevoegde filtraten van de extracties met 24 % kaliloog geïsoleerd. Het residu, dat na beide extracties overblijft, wordt met water uitgewassen en gedroogd. Het bevat nog zeer veel lignine.

Methode II (eigen methode)

Nadat uit 2,5 à 3 gram van het „uitgangsmateriaal” de pectinestoffen verwijderd zijn, wordt hieruit eerst een deel van de hemicellulosen geïsoleerd door vier extracties van 24 uur met 5 % kaliloog. De verwijdering van de pectinestoffen, alsook de extracties en het precipiteren van de hemicellulosen uit de filtraten worden uitgevoerd als bij methode I. De zo verkregen hemicellulosen worden genoemd de „in 5 % kaliloog oplosbare hemicellulosen vóór chloreren”. Vervolgens wordt uit het materiaal de lignine verwijderd. Hiertoe wordt het met 75 ml water overgebracht in een bekersglas van 250 ml. Het mengsel wordt op het waterbad tot 70 °C verwarmd en hieraan worden vervolgens toegevoegd 10 druppels ijsazijn en na omroeren 1 gram chloramine. Het bekersglas wordt met een horlogeglas afgedekt en het mengsel gedurende twee uur onder herhaald omroeren op het waterbad bij 70 °C gelaten. Hierna wordt het mengsel nog warm op een glazen filterkroes afgezogen, waarna het residu twee maal met alcohol wordt gewassen. Nu wordt een oplossing van 3 % aethanolamine in alcohol tot koken verwarmd en op het residu in de filterkroes gegoten. Na twee minuten, gedurende welke herhaaldelijk wordt omgeroerd, wordt de vloeistof afgezogen. Deze behandeling met aethanolamine in alcohol wordt één maal herhaald, waarna het residu twee maal met alcohol en vervolgens twee maal met water gewassen wordt. Deze gehele behandeling van chloreren, behandelen met aethanolamine en uitwassen wordt twee maal herhaald, waarna het residu nog slechts licht gekleurd is. Hierna wordt het materiaal weer drie maal 24 uur met 5 % kaliloog geëxtraheerd (zie methode I) en uit de verzamelde filtraten worden de „in 5 % kaliloog oplosbare hemicellulosen na chloreren” geïsoleerd. Vervolgens worden als bij methode I nog de „in 24 % kaliloog oplosbare hemicellulosen” gewonnen. Het residu van deze extracties wordt achtereenvolgens met water, alcohol en aceton gewassen en bij 100 °C tot constant gewicht gedroogd, waarna het gewogen wordt. Het bestaat in hoofdzaak uit cellulose. Naast de cellulose is er een kleine rest lignine in aanwezig en wat minerale bestanddelen.

Methode III (eigen methode)

Na de extractie (volgens methode I) van de pectinestoffen uit 2,5 à 3 gram van het „uitgangsmateriaal” wordt dit met 75 ml water overgebracht in een beker-

glas van 250 ml. Het mengsel wordt op het waterbad tot 70 °C verwarmd en hieraan worden vervolgens toegevoegd 10 druppels ijsazijn en na omroeren 1 gram chloramine. Het bekeerglas wordt met een horlogeglas afgedekt en het mengsel gedurende twee uur onder herhaald omroeren op het waterbad gelaten. Hierna wordt het mengsel nog warm op een glazen filterkroes afgezogen, waarna het residu twee maal met alcohol wordt gewassen. Nu wordt een oplossing van 3 % aethanolamine in alcohol tot koken verwarmd en op het residu gegoten. Na twee minuten, gedurende welke herhaaldelijk wordt omgeroerd, wordt de vloeistof afgezogen. Deze behandeling met aethanolamine in alcohol wordt één maal herhaald, waarna het residu twee maal met alcohol en vervolgens twee maal met water wordt gewassen. Deze gehele behandeling van chloreren, behandelen met aethanolamine en uitwassen wordt twee maal herhaald, waarna het residu nog slechts licht gekleurd is. De zo verkregen holocellulose wordt nog met aceton gewassen en daarna zo kort mogelijk bij 100 °C tot constant gewicht gedroogd en gewogen. Uit de holocellulose worden weer de hemicellulosen door extracties met 5 % en met 24 % kaliloog gewonnen (zie methode I). Het residu, de cellulose, wordt met water, alcohol en aceton gewassen, bij 100 °C gedroogd en gewogen.

Methode IV (volgens WISE, MURPHY en D'ADDIECO [113])

Nadat op dezelfde wijze als bij methode I de pectinestoffen uit 2,5 à 3 gram van het „uitgangsmateriaal” verwijderd zijn, wordt het residu met ± 90 ml water overgebracht in een bekeerglas van 400 ml.

Het mengsel wordt op het waterbad verwarmd en hieraan worden toegevoegd 10 druppels ijsazijn en na omroeren 10 ml van een 17 % oplossing van natriumchloriet. Het bekeerglas wordt met een horlogeglas afgedekt en het mengsel onder herhaald omroeren een uur op het waterbad gelaten. Vervolgens wordt het mengsel in ijs afgekoeld, op een glasfilter afgezogen en het residu goed met ijswater uitgewassen. De zo verkregen holocellulose wordt eerst weer met aceton gewassen en daarna zo kort mogelijk bij 100 °C tot constant gewicht gedroogd en gewogen. Uit de holocellulose worden de „in 5 % en in 24 % kaliloog oplosbare hemicellulosen” bereid als bij methode I is beschreven en wordt het celluloser residu achtereenvolgens met water, alcohol en aceton gewassen, bij 100 °C tot constant gewicht gedroogd en gewogen.

Resultaten

In tabel 3 zijn de gehalten van de met deze vier methoden in duplo geïsoleerde celwandbestanddelen bijeengebracht.

Voor de beoordeling van de methoden kunnen deze cijfers echter niet dienen, aangezien de preparaten alle min of meer met lignine en acetaat verontreinigd zijn. Hemicellulosen en pectinestoffen zouden door oplossen en weer precipiteren nog gezuiverd kunnen worden. Hierbij treedt altijd verlies op. Daar het ons echter in het bijzonder om de bepaling van de suikers, waaruit de verschillende fracties zijn samengesteld, te doen was, is het eenvoudiger de preparaten zonder verdere zuivering aan een hydrolyse te onderwerpen, waarbij de lignine als onoplosbare rest achterblijft. In het hydrolysaat kunnen dan de suikers met behulp van de papierchromatografie afzonderlijk bepaald worden. De minerale bestanddelen storen deze bepaling niet. Indien wij daarna de gevonden gehalten aan suikers berekenen op het gewicht van het met alcohol-benzeen behandelde

TABEL 3. Gehalten aan celwandbestanddelen, uit tarwestro geïsoleerd, nadat het materiaal op verschillende manieren is gedelignificeerd.

Methode I: delignificeren met alcoholische kali.

Methode II: delignificeren met chloramine en aethanolamine, nadat eerst een deel hemicellulosen is geïsoleerd.

Methode III: delignificeren met chloramine en aethanolamine.

Methode IV: delignificeren met chloordioxyde.

Contents of cell-wall constituents, isolated from wheatstraw, after different methods of delignification.

Method I: delignification with 60% ethanol containing 2% sodium hydroxyde.

Method II: delignification with chloramine and ethanolamine after previous isolation of part of the hemicelluloses.

Method III: delignification with chloramine and ethanolamine.

Method IV: delignification with chlorinedioxyde.

pct. van de droge stof van het „uitgangsmateriaal” pct. of the dry matter of the „starting material”								
methode (method)	I		II		III		IV	
pectinestoffen	1,42	0,95	0,98	1,12	2,02	1,11	1,71	1,09
pectic substances								
hemicellulosen:								
in 5% KOH oplosb.								
vóór Cl (before Cl)	—	—	22,37	21,19	—	—	—	—
vermeerdering van								
in 5% KOH oplosb.								
na Cl (after Cl)	—	—	5,05	5,86	—	—	—	—
in 5% KOH oplosb.	24,13	22,47	—	—	24,45	23,89	25,07	24,55
in 24% KOH oplosb.	5,78	4,74	5,22	4,56	4,97	5,40	5,44	5,30
celluloseresidu	—	55,00	40,08	44,89	45,24	42,04	39,45	39,79
holocellulose	—	—	—	—	82,31	81,77	79,44	80,20

en daarna gedroogde stro, hebben wij tevens waarden verkregen, op grond waarvan een vergelijking van de vier methoden mogelijk wordt.

HOOFDSTUK III

HET HYDROLYSEREN VAN DE VERSCHILLENDE POLYSACCHARIDEMENGSELS

Deze hydrolyse moet op zodanige wijze worden uitgevoerd, dat de splitsing van de polysacchariden volledig is, zonder dat daarbij ontleding van de vrijkomende suikers mag plaats hebben. Er moet dus worden nagegaan, welke de optimale voorwaarden zijn wat betreft de sterkte van het zuur, waarmee gehydrolyseerd wordt, de temperatuur, waarbij de hydrolyse plaats heeft en de tijd, gedurende welke deze wordt uitgevoerd.

Aangezien het merendeel van de te bepalen polysacchariden zich in de hemicellulosefracties bevindt, zullen in de eerste plaats voor de hydrolyse daarvan de juiste voorwaarden bepaald moeten worden; daarna kan dan worden nagegaan in hoeverre deze ook geschikt zijn voor het hydrolyseren van de overeenkomstige polysacchariden uit de pectinestoffen en uit het celluloseresidu.

In hoofdstuk I werd als onderdeel van de definitie van de hemicellulosen reeds vermeld, dat deze polysacchariden in tegenstelling tot cellulose betrekkelijk gemakkelijk te hydrolyseren zijn, o.a. met verdund zuur. In de literatuur zijn hierover nog enige gegevens te vinden.

Voor de identificatie van de suikers in hemicellulosen geïsoleerd uit grassen hydrolyseert BUSTON (24) deze polysacchariden gedurende vier uur met 3,5 % zwavelzuur (0,7 N).

PHILIPS (79) meent, dat het mogelijk is de hemicellulosen te hydrolyseren, zonder dat zij tevoren geïsoleerd zijn. Deze hydrolyse wordt door hem uitgevoerd door koken met 6 % zwavelzuur (1,27 N) gedurende 15 uur.

WHITING (112) hydrolyseert de polyuronide hemicellulosen uit vlasvezels gedurende 6 uur bij 100 °C met N zwavelzuur.

ADAMS en CASTAGNE (8) isoleren hemicellulosen uit tarwestro en identificeren de samenstellende suikers na hydrolyseren van 100 mg in 100 ml 1 % zwavelzuur (0,21 N). Hierbij merken zij op, dat er vermoedelijk een deel als aldobiuronzuur niet gehydrolyseerd achterblijft.

Bij het bestuderen van de invloed van vloeibare ammonia op de holocellulose van tarwestro verkrijgt BISHOP (17) o.a. enig polyuronide materiaal bestaande uit pentosen en uronzuur. De identificatie geschiedt na hydrolyseren van 0,55 gram met 50 ml 1 % zwavelzuur.

Bij zijn onderzoek naar de structuur van het xylaan uit tarwestro merkt ADAMS (1) op, dat door hydrolyse met 0,05 N oxaalzuur in 2 uur $\pm 92\%$ van de arabinose wordt afgesplitst en slechts $\pm 3,5\%$ van de xylose. Dit is in overeenstemming met de veronderstelling, dat de arabinose in furanosevorm voorkomt en de xylose in pyranosevorm. Met 0,05 N zwavelzuur wordt ook xylose afgesplitst. Er wordt niet bij vermeld of deze splitsing volledig is.

In de hier genoemde publicaties wordt dus voornamelijk zwavelzuur gebruikt voor het hydrolyseren, in sterkte wisselend van 0,21 tot $\pm 1,3$ N. De wat oudere publicaties spreken daarbij alleen over het hydrolyseren van de hemicellulosen in het algemeen. Uit latere publicaties komt duidelijk naar voren, dat het in de hemicellulosen aanwezige arabinose zelfs al met 0,05 N oxaalzuur afgesplitst kan worden. Ook xylose wordt voor een deel betrekkelijk gemakkelijk afgesplitst, nl. met 1 % zwavelzuur; er blijft daarbij een aldobiuronzuur ongesplitst achter.

Het is voor een goede hydrolyse echter nodig ook iets te weten over de afsplitsing van de hexosen. Hierover brengen WHISTLER en SMART (110) enige gegevens in hun verhandeling over depolymerisatie van polysacchariden. Zij merken op, dat polysacchariden, opgebouwd uit hexosen in pyranosevorm, meer resistent zijn tegen hydrolyse dan die, opgebouwd uit pentosen in pyranosevorm, maar dat zij toch wel gehydrolyseerd kunnen worden met 1 N zoutzuur bij 100 °C. Indien een polysaccharide onoplosbaar is bevelen zij aan eerst bij kamertemperatuur met sterk zuur (b.v. 72 % zwavelzuur) te behandelen en na enige tijd het zuur te verdunnen tot een concentratie van ± 1 N, waarna de hydrolyse onder verwarmen kan worden voortgezet. Ook hier wordt de aandacht gevestigd op het resistent zijn van aldobiuronzuur tegen hydrolyseren met zwak zuur. Om dit volledig te splitsen zou een hydrolyse met 4 % zuur bij 120 °C gedurende 24 uur moeten worden toegepast. Hierbij wordt verwezen naar de ervaringen, op dit gebied opgedaan door NELSON en PERCIVAL (67), door ANDERSON, RUSSELL en SEIGLE (10) en door MORELL, BAUR en LINK (64).

Ook door andere auteurs wordt een hydrolyseresistent aldobiuronzuur in

hemicellulosen beschreven. Zo geven ADAMS en CASTAGNE (7) aan, dat na een hydrolyse van $8\frac{1}{2}$ uur bij 120°C met 4% zwavelzuur uronzuur en xylose in dit aldobiuronzuur konden worden aangetoond. Over een kwantitatieve bepaling wordt echter niet gesproken. ROUDIER (88) beschrijft enige aldobiuronzuren in de hemicellulosen van tarwestro en van het hout van enige angiospermen. BISHOP (18) heeft een vrij uitvoerige studie gemaakt van de verbindingen, die uit een uronzuurhoudend xylaan van tarwestro bij hydrolyse ontstaan. Na hydrolyseren gedurende 9 uur bij 97°C met 2,5% zwavelzuur kan uit het hydrolysaat een verbinding geïsoleerd worden, bestaande uit tenminste drie xylosemoleculen en één uronzuurrest. Wanneer dit oligosaccharide verder gehydrolyseerd wordt met 5% zwavelzuur bij 97°C gedurende 12 uur, wordt xylose afgesplitst en blijft er een aldobiuronzuur achter, samengesteld uit één molecuul xylose en één molecuul glucuronzuur. Dit aldobiuronzuur kan na methyleren gesplitst worden door een behandeling van 16 uur met 8% zoutzuur in methanol. Deze geforceerde splitsing van het aldobiuronzuur wordt door de auteurs uitgevoerd met het doel de componenten ervan te identificeren. Er is dus geen aandacht aan geschonken of de vrijkomende koolhydraten bij deze behandeling gedeeltelijk ontleden. De kans, dat ontleding plaats heeft, is zeer groot. HEALD (41) heeft nl. bij een onderzoek naar de opname van xylaan uit gras door schapen nagegaan in hoeverre de bij hydrolyse vrijkomende xylose door het zuur wordt aangetast. Hij komt daarbij tot de conclusie, dat een hydrolyse van 3 tot 4 uur met 0,25 N zoutzuur de beste resultaten geeft; bij gebruik van 0,5 N zoutzuur treedt reeds ontleding van xylose in. Nu is zoutzuur volgens WHISTLER en SMART onder de minerale zuren het minst geschikt voor het hydrolyseren van polysacchariden, daar het aanleiding geeft tot furfuralvorming uit de pentosen en dus tot ontleding. Bij gebruik van zwavelzuur en van salpeterzuur heeft deze furfuralvorming niet plaats.

Uit deze gegevens uit de literatuur zijn de volgende conclusies te trekken:

1. Om een zo volledig mogelijke splitsing van alle polysacchariden in hexosen en pentosen te bereiken moet de hydrolyse met 1 N zuur worden uitgevoerd. Hierbij blijft een kleine rest aldobiuronzuur niet gehydrolyseerd achter.
2. Voor de hydrolyse kan het beste salpeterzuur of zwavelzuur gebruikt worden, omdat zoutzuur aanleiding geeft tot furfuralvorming uit de pentosen.
3. Het is niet zeker of de bij de hydrolyse vrijkomende suikers niet ontleed worden.
4. De gegevens omtrent tijd en temperatuur voor de hydrolyse variëren respectievelijk van enkele uren tot 24 uur en van 100°C tot 120°C . Deze groot-heden moeten dus nog nader worden vastgesteld.

De optimale tijd en temperatuur voor de hydrolyse zijn gemakkelijk aan de hand van proeven te bepalen. Enige van de hemicellulosepreparaten werden daarvoor gedurende verschillende tijden en bij verschillende temperaturen gehydrolyseerd met N zuur. Als zuur heb ik zwavelzuur gekozen, aangezien, zoals later besproken wordt, een zwavelzuurhydrolysaat gemakkelijker voor het chromatograferen geschikt is te maken dan een salpeterzuurhydrolysaat. Uit praktische overwegingen zijn de hoeveelheden hemicellulosen en zuur zo gekozen, dat de concentratie van de vrijkomende suikers in het hydrolysaat zodanig is, dat direct tot chromatograferen kan worden overgegaan. Wanneer nl. met 0,5 g hemicellulosen in 50 ml zuur gewerkt wordt, blijken de concentraties van de galactose en de glucose in het hydrolysaat te laag te zijn voor een bepaling, hetgeen met zich meebrengt, dat het hydrolysaat dan eerst geconcentreerd moet

worden. Bovendien zijn voor de chromatografische analyse slechts enkele druppels vloeistof nodig, zodat het overbodig is 50 ml hydrolysaat te maken. Een concentratie, die voor alle suikers in het hydrolysaat een bepaling mogelijk maakt zonder voorafgaand concentreren of verdunnen, blijkt te worden bereikt bij hydrolyseren van 40 tot 50 mg hemicellulosen met 1 ml N zwavelzuur. Voor het hydrolyseren bij 120 °C kan dit mengsel in een gesloten ampul van enkele ml in een autoclaaf verwarmd worden. De hydrolyse bij ± 100 °C kan gemakkelijk uitgevoerd worden door zacht koken van het mengsel in een reageerbuis, waarop een kleine koeler geplaatst is. Om te voorkomen, dat bij koken stukjes nog niet gehydrolyseerd polysaccharide, die tegen de wand van de buis kleven, verkolen, wordt de reageerbuis op een asbestplaatje geplaatst, waarin een opening is gemaakt, waarop de buis precies past. Onder het asbestplaatje wordt een draadgaas gelegd. De vlam wordt terzijde van de buis onder het asbest geplaatst, de warmte ervan wordt door het draadgaas overgebracht en kan door de afstand van de vlam tot de plaats van het draad, waarop de buis rust, geregeld worden.

Om nu de optimale tijd en temperatuur voor de hydrolyse vast te stellen zijn twee hemicellulosepreparaten op de hierboven beschreven wijze gehydrolyseerd, waarna de suikers in de hydrolysaten papierchromatografisch werden bepaald. De gevonden gehalten zijn in tabel 4 samengebracht.

TABEL 4. Suikers bepaald in hemicellulosen na verschillende tijden van hydrolyseren.
Sugars determined in hemicelluloses after different times of hydrolysis.

pct van hemicellulosen				
in 5% KOH oplosbare hemicellulosen geïsoleerd volgens: <i>in 5% KOH soluble hemicelluloses isolated by:</i>				
	xylose	arabinose	glucose	galactose
methode I (method I)				
hydrolyse bij 100 °C				
1½ uur (1½ hour) . .	68,4	9,0	2,9	0,9
2 uur (2 hours) . .	74,9	9,3	3,1	—
5 uur (5 hours) . .	75,7	—	3,3	—
6 uur (6 hours) . .	68,1	8,5	3,2	—
10 uur (10 hours) . .	67,1	8,1	3,0	1,2
15 uur (15 hours) . .	63,5	—	2,8	—
hydrolyse bij 120 °C				
5 uur (5 hours) . .	41,8	6,4	—	—
methode III (method III)				
hydrolyse bij 100 °C				
1½ uur (1½ hour) . .	75,3	8,9	3,5	—
3 uur (3 hours) . .	75,7	8,9	3,8	—
5 uur (5 hours) . .	58,3	—	—	—

Uit deze cijfers zijn de volgende conclusies getrokken: Ofschoon het gehalte aan galactose zo laag is, dat de bepaling ervan niet meer nauwkeurig is, krijgt men toch wel de indruk, dat de hydrolyse vrij spoedig volledig is en er na langere tijd geen ontleding optreedt. Ook bij glucose en arabinose nemen de waarden pas na 6 uur hydrolyseren iets af. Wat de xylose betreft zien wij, dat bij het hemicellulosepreparaat, waarbij de lignine niet grondig verwijderd is (methode

I), de hydrolyse na $1\frac{1}{2}$ uur nog niet volledig is, na 2 uur wel. Bij het preparaat, dat na het wegnemen van de lignine gewonnen werd (methode III), is na $1\frac{1}{2}$ uur volledige hydrolyse bereikt. Hierbij begint tussen 3 en 5 uur ontleding van xylose op te treden. Dit gebeurt bij het preparaat van methode I pas later.

Samenvattend kan dus worden vastgesteld, dat voor de preparaten, die met veel lignine verontreinigd zijn, zoals de hemicellulosen uit methode I en de daarmee analoge hemicellulosen vóór chloreren uit methode II, een hydrolyse van ten minste 2 en ten hoogste 5 uur het beste resultaat geeft. Voor de preparaten, waarin praktisch geen lignine aanwezig is, zoals de hemicellulosen uit methode III en de daarmee analoge hemicellulosen uit methode IV, is een hydrolyse van $1\frac{1}{2}$ tot 3 uur noodzakelijk, wil men een juist gehalte aan xylose vinden. De arabinose-, glucose- en galactosebepalingen komen in deze tijd ook tot betrouwbare waarden.

Men kan dus op alle hemicellulosepreparaten een hydrolyse van 2 tot 3 uur met 1 N zwavelzuur bij 100 °C toepassen, zonder dat de vrijkomende suikers worden ontleed. Zoals uit de literatuur bekend is, wordt de xylose uit het resterend aldobiuronzuur daarbij niet afgesplitst. Hydrolyse bij hogere temperatuur of gedurende langere tijd veroorzaakt ontleding van de vrijkomende xylose, zodat het niet mogelijk is deze rest gebonden xylose op deze wijze te bepalen. Dit is geen onoverkomelijk bezwaar, omdat het gehalte van het uronzuur en dus ook dat van de hieraan gebonden xylose zeer gering blijken te zijn.

In hoeverre deze wijze van hydrolyseren bruikbaar is bij de bepaling van de polysacchariden, die met de pectinestoffen geëxtraheerd worden, is gemakkelijk te voorspellen. Deze polysacchariden zijn in wezen gelijk aan die uit de hemicellulosen, nl. arabaan, galactaan, wat xyloaan en een glucosepolymeër. Daar de oplosbaarheid ervan groot is, mogen wij aannemen, dat ze wat kortere ketens hebben. Zij zullen dus op dezelfde wijze als de hemicellulosen gehydrolyseerd kunnen worden. Het pectine zelf wordt volgens KERTESZ (55) daarbij niet gesplitst; het kan niet na hydrolyse bepaald worden, daar bij krachtiger hydrolyse het vrijkomend galacturonzuur onmiddellijk gedecarboxyleerd wordt. Het pectine kan echter heel goed als calciumpectaat worden neergeslagen en gewogen. Voor het tarwestro heeft deze bepaling door het zeer lage gehalte aan pectinestoffen echter weinig zin.

Of de suikers uit de hemicellulosen, die in het celluloserestidu achterblijven, door middel van een hydrolyse van 2 tot 3 uur met N zwavelzuur bij 100 °C vrijgemaakt kunnen worden, valt niet zo maar te voorspellen. Indien dit achterblijven eenvoudig door niet oplossen ten gevolge van een grote ketenlengte wordt veroorzaakt, zullen de hemicellulosen zeker door deze hydrolyse gesplitst worden. De cellulose zelf wordt daarbij niet aangetast, zodat in het hydrolysaat alleen de suikers van de hemicellulosen afkomstig worden gevonden. Wanneer de hemicellulosen chemisch gebonden zijn aan de cellulose, is de kans ook groot, dat de suikers ervan door een eenvoudige hydrolyse worden afgesplitst. Wanneer zij echter door de cellulose ingesloten zijn, is de kans vrij klein, dat de suikers van de hemicellulosen afkomstig toch door hydrolyse uit de cellulose kunnen worden vrijgemaakt. Indien dit inderdaad niet mogelijk is, zal de cellulose zelf ook gehydrolyseerd moeten worden om de hemicellulosen te kunnen bepalen.

Dit kan bijvoorbeeld gebeuren door enkele uren bij kamertemperatuur te behandelen met 72% zwavelzuur en vervolgens, na verdunnen tot $\pm 3\%$, te verwarmen op een waterbad. Dit is de methode, die door WHISTLER en SMART

wordt aangegeven voor het hydrolyseren van onoplosbare polysacchariden en waarmee de cellulose wordt ontleed bij de veel toegepaste bepaling van de lignine volgens KLASON (56). ADAMS en BISHOP (2) passen deze methode toe bij het onderzoek naar de aanwezigheid van xyloaan in α -cellulose uit strosoorten. Nadelen van deze methode zijn, dat er in verhouding tot de te bepalen hoeveelheden xylose, arabinose en eventueel aanwezig galactose een zeer grote hoeveelheid glucose in het hydrolysaat komt, wat de bepaling van de suikers bemoeilijkt. Voorts dat er met zeer sterk zuur gewerkt wordt, zodat het risico om de xylose te beschadigen groot is en tenslotte, dat door het verdunnen van de vloeistof van 72 % tot 3 % zwavelzuur een concentratie ontstaat, die niet geschikt is voor het chromatograferen, zodat na neutraliseren van het zuur weer geconcentreerd moet worden. Een betere werkwijze wordt misschien gevonden in een door SCHRAMM en SCHLOMO (98) voorgestelde cellulosebepaling, waarbij de cellulose gehydrolyseerd wordt met $\pm 16\%$ zwavelzuur, nadat vooraf met azijnzuuranhydride acetolyse heeft plaats gehad. Het bezwaar van de overheersende hoeveelheid glucose in het hydrolysaat blijft hierbij bestaan; het risico van ontleding van de xylose is echter verminderd en de mogelijkheid bestaat, dat het hydrolysaat zonder voorafgaande concentratie voor het chromatograferen gebruikt kan worden.

Het ligt dus voor de hand om deze laatste methode, naast een eenvoudige hydrolyse met N zwavelzuur, op een celluloser residu toe te passen en de uitkomsten te vergelijken.

De hydrolyse met N zwavelzuur wordt hierbij uitgevoerd op de hierboven beschreven wijze.

De acetolyse en hydrolyse volgens SCHRAMM en SCHLOMO worden als volgt uitgevoerd:

Bij 50 mg van het residu in een reageerbuis worden gevoegd 0,25 ml azijnzuuranhydride, 0,25 ml ijsazijn en 0,012 ml geconcentreerd zwavelzuur. De buis wordt met een glazen bol afgesloten en gedurende 20 minuten in kokend water gehouden. De cellulose lost op deze wijze in het mengsel op, waarbij deze gedeeltelijk afgebroken wordt en daardoor gemakkelijker is te hydrolyseren. Het mengsel wordt nu afgekoeld en er wordt 0,5 ml van een mengsel van 1,5 vol. geconcentreerd zwavelzuur en 8,5 vol. water aan toegevoegd. Vervolgens wordt het mengsel nog 40 minuten in kokend water verwarmd, terwijl de buis weer met een glazen bol gesloten is. In het hydrolysaat worden daarna de vrijgekomen suikers bepaald. In aanmerking nemend, dat het hier om de bepaling van uiterst kleine hoeveelheden gaat, mag verwacht worden, dat de fout van de bepaling vrij groot kan zijn, zodat uitkomsten, die ongeveer 10–15 % van elkaar verschillen, nog als redelijk met elkaar overeenkomend beschouwd moeten worden. Bovendien zijn de suikers op het chromatogram nog slechts vaag waar te nemen. Om de fout in de bepaling zo klein mogelijk te houden is het beter om de arabinose en de xylose niet afzonderlijk te bepalen, maar in plaats daarvan de som van beide suikers.

In het celluloser residu van methode III zijn de volgende waarden gevonden, berekend op de droge stof van het „uitgangsmateriaal”.

hydrolyse	met N zwavelzuur	na acetolyse
arabinose + xylose	1,8 %	2,1 %

Hieruit blijkt dus, dat de methoden overeenstemmende uitkomsten geven. Daar bij de hydrolyse met N zwavelzuur, zoals wij reeds opmerkten, de glucose

uit de cellulose niet in het hydrolysaat komt, is deze methode te verkiezen boven de hydrolyse na acetolyse, aangezien door de afwezigheid van een grote hoeveelheid glucose de mogelijkheid wordt geboden om het hydrolysaat wat geconcentreerder op het chromatogram te brengen, waardoor de bepaling van de pentosen aan nauwkeurigheid wint. Deze hogere concentratie wordt bereikt door voor de hydrolyse niet van 50 mg uit te gaan, zoals bij de hemicellulosen en bij de pectinestoffen, maar van 100 mg, die dan verder op dezelfde wijze met 1 ml N zwavelzuur worden gehydrolyseerd.

HOOFDSTUK IV

DE CHROMATOGRAFISCHE METHODE

INLEIDING

Zowel voor de kwalitatieve als voor de kwantitatieve bepaling van suikers is de papierchromatografie een waardevol hulpmiddel gebleken.

De papierchromatografie, oorspronkelijk door CONSDEN, GORDON en MARTIN (27) op aminozuurmengsels toegepast, is door PARTRIDGE (75) verder uitgewerkt voor het onderzoek van suikermengsels. Sindsdien is door verschillende auteurs een groot aantal voorschriften voor de opstelling, het solvens en de indicator gepubliceerd. Een overzicht hiervan is reeds eerder gegeven (GAILLARD, [39]). Thans is nagegaan, welke van deze methoden het meest geschikt zijn voor de analyse van een suikermengsel, waarin naast xylose kleine hoeveelheden arabinose, galactose en glucose te verwachten zijn, daar dit de suikers zijn, die volgens ADAMS en CASTAGNE (8) in de hydrolysaten van de hemicellulosen van tarwestro voorkomen.

DE APPARATUUR

Aangezien het aantal te verwachten suikers gering is, kan met een eendimensionaal chromatogram volstaan worden. De looptijd voor suikerchromatogrammen is gewoonlijk lang en daar alleen de afdalende methode de mogelijkheid biedt om door afvloeien van het solvens de tijd van het chromatograferen onbeperkt te verlengen, is deze methode voor de chromatografie van suikers de meest geschikte. Indien de papierstroken van onderen tot een franje geknipt zijn, kan het solvens hiervan regelmatig afdruppelen.

In glazen cylinders van 17 tot 20 cm diameter worden glazen statieven aangebracht, waarop de cuvetten voor het solvens rusten. Aan beide zijden van het statief zijn glazen balkjes bevestigd, waarover de papierstroken naar beneden kunnen afhangen. In iedere cylinder is dus plaats voor twee chromatogrammen. De cylinders worden gesloten met glazen platen, welke er met een dun laagje vet luchtdicht op worden aangedrukt. In de sluitplaat is een kleine opening aangebracht, waardoor het solvens met behulp van een trechter met lange steel in de cuvet kan worden gebracht, nadat de stroken geacommodeerd zijn.

HET PAPIER

De stroken worden geknipt uit vellen filtreerpapier Whatman no 1 in de kwaliteit speciaal voor chromatografie.

HET SOLVENS

Verschuillende solventia zijn op hun bruikbaarheid voor het gestelde doel onderzocht. Over het algemeen blijken de mengsels, welke een alcohol als

hoofdbestanddeel bevatten, het meest te voldoen, hetgeen in overeenstemming is met de bevindingen van JEANES, WISE en DIMLER (51). Wel is waar geven de aethylacetaat bevattende mengsels (JERMYN en ISHERWOOD [53]) in kortere tijd een scheiding, de vlekken vertonen echter een neiging tot uitvloeien, hetgeen voor de identificatie niet zo bezwaarlijk is, maar waardoor het vaststellen van de zonegrenzen voor het kwantitatief werk zeer wordt bemoeilijkt. De uit n-butanol-pyridine-benzeen-water in verschillende verhoudingen bestaande solventia (BROWN [22]; ALBON en GROSS [9]) geven ook een goede scheiding. De resultaten ervan zijn echter niet beter dan die van de n-butanol-aethanol-water mengsels, terwijl deze laatste minder onaangenaam in het gebruik zijn. Een voordeel van een solvens als n-butanol-pyridine-benzeen-water 5-3-1-3 boven n-butanol-aethanol-water 4-1-5 is, dat het eerst genoemde in deze verhouding mengbaar is en er ook bij verlaging van de temperatuur waarbij gewerkt wordt geen waterdruppeltjes uit worden afgescheiden. Deze waterdruppeltjes ontstaan wel in het n-butanol-aethanol-water mengsel, nl. des nachts bij afkoeling. Dit nadeel kan echter door veranderen van de samenstelling worden opgeheven. Uit proeven is mij gebleken, dat een mengsel van n-butanol-aethanol-water 7-2-2 slechts één phase geeft, terwijl ook bij temperatuursverlaging de hinderlijke afscheiding van waterdruppeltjes achterwege blijft. De vier te verwachten suikers worden er goed mee gescheiden afhankelijk van de temperatuur na een looptijd van 65 tot 70 uur.

DE INDICATOR

Het aantal indicatoroplossingen, dat voor het aantonen van de suikers op het chromatogram gebruikt kan worden, is zeer groot. In de praktijk voldoen zij niet alle even goed.

De oorspronkelijk door PARTRIDGE (76) aanbevolen ammoniakale oplossing van zilvernitraat geeft donkerbruine vlekken op een lichtbruine achtergrond, waardoor het moeilijk is de zwakkere vlekken nog waar te nemen. Ook de modificaties van TREVELYAN (103), waarbij de vlekken met zwavelwaterstof zwart gemaakt worden en van JEANICKE (52), waarbij de kleur van de achtergrond door uitspoelen met een thiosulfaatoplossing voor een groot deel wordt weggenomen, geven nog niet het gewenste resultaat.

Een alkalische permanganaatoplossing (PASCU, MORA en KENT [78]) geeft goed waarneembare bruine vlekken tegen een paarse achtergrond. Heel spoedig echter gaat ook de achtergrond bruin verkleuren, zodat men de suikers direct af moet tekenen. Hierdoor krijgt men niet de gelegenheid het chromatogram rustig te bestuderen, waardoor zwakke vlekken gemakkelijk aan de aandacht kunnen ontsnappen.

Beide indicatoren hebben bovendien het bezwaar, dat zij met alle reducerende stoffen vlekken geven en dus niet specifiek voor suikers zijn.

Wel specifiek zijn de indicatoroplossingen, waarin anilinezouten voorkomen (PARTRIDGE [77]; BRYSON en MITCHELL [23]) of resorcinol en aanverwante verbindingen in zuur milieu (PARTRIDGE [76]; BRYSON en MITCHELL [23]; BEVENUE en WILLIAMS [16]). De anilinezouten geven duidelijke vlekken met de aldosen, terwijl de ketosen ongekleurd blijven; daarnaast worden de ketosen juist met resorcinol en aanverwante verbindingen gekleurd, waarbij de pentosen in het geheel niet of zwak of pas veel later kleuren. Het is dus mogelijk met deze indicatoren een onderscheid te maken tussen aldosen en ketosen.

Daar de suikers, die in de hydrolysaten verwacht kunnen worden, uitsluitend aldosen zijn, is een anilinezout als indicator hier dus bijzonder geschikt, temeer daar hexosen en pentosen er bovendien verschillend door gekleurd worden, nl. de pentosen rood en de hexosen bruin. Voor controle op een mogelijke aanwezigheid van ketosen wordt dan naast deze indicator ook éénmaal een resorcinoloplossing gebruikt, b.v. een 0,2% oplossing van naphthoresorcinol aangezuurd met een gelijk volume 0,2% trichloorazijnzuur. Na het besproeien wordt het papier bij 100 °C gedroogd, waarbij de bruine vlekken zichtbaar worden tegen een ongekleurde achtergrond. In het gebruik blijkt het anilinephosfaat (BRYSON et al. [23]) een sterkere kleur met de aldosen te geven dan het anilinephthalaat (PARTRIDGE [76]), zodat aan het fosphaat de voorkeur wordt gegeven.

Bij het bereiden van het anilinephosphaatreagens volgens het voorschrift van BRYSON (mengen van 1 volume 2 N aniline in butanol met 2 volumina 2 N fosforzuur in butanol) treedt telkens een hinderlijk uitkristalliseren op, soms direct bij het mengen, soms kort daarna in de verstuiwer, waardoor verstopping hiervan plaats heeft. Na enig experimenteren heb ik een gewijzigd voorschrift opgesteld, waarbij uitkristalliseren achterwege blijft en het reagens enkele weken houdbaar blijft.

Deze indicator wordt als volgt samengesteld:

0,278 gram aniline
0,36 ml fosforzuur 85%
30 ml met water verzadigde butanol

Los de aniline en het fosforzuur elk in de helft van de met water verzadigde butanol op. Voeg de fosforzuuroplossing druppelsgewijs bij de anilineoplossing onder krachtig schudden. Een eventueel optredende kristallisatie verdwijnt na enige ogenblikken schudden volkomen.

Nadat de stroken met deze indicator bestoven zijn, worden zij 10 minuten bij 100 °C in een stoof verwarmd.

HET VERWIJDEREN VAN EVENTUEEL STORENDE STOFFEN UIT DE HYDROLYSATEN

Aan het slot van zijn verhandeling over de papierchromatografie van suikers geeft PARTRIDGE (76) een kort overzicht van de stoffen, die hierbij storen en die dus uit de oplossing verwijderd moeten worden, voordat deze op het chromatografisch papier wordt gebracht.

Het zijn:

- andere reducerende stoffen, die met de indicator reageren.
- stoffen, die ongeveer gelijke R_F waarden hebben als de te bepalen suikers.
- anorganische zouten. Deze zouden zich volgens WESTALL (108) op het chromatogram splitsen in zuren en basen, die in bepaalde gevallen storend kunnen zijn.

De onder *a* en *b* genoemde stoffen bieden voor de te chromatograferen hydrolysaten geen moeilijkheden. De anilinephosfaatindicator is specifiek voor suikers en reageert niet met andere reducerende stoffen. Bovendien komen er geen andere organische verbindingen in de hydrolysaten voor.

De onder *c* genoemde stoffen zijn wel aanwezig. Wanneer namelijk een anorganisch zout stoort door splitsing in zuur en base, dan kan men verwachten, dat de aanwezigheid van het zuur van de hydrolyse ook ongewenst is. Dit zuur kan op twee manieren verwijderd worden.

1e Door filtreren over een ionenuitwisselaar.

Het spreekt van zelf, dat deze ionenuitwisselaar slechts zwak basisch mag zijn om ongewenste reacties met de suikers te voorkomen. Volgens HULME (49) passeren de suikers ongestoord een kolom van DOWEX 2, terwijl op een sterker basische kolom de suikers aangetast worden, waarbij melkzuur ontstaat, dat op de kolom wordt vastgehouden.

PHILIPS en POLLARD (80) beschrijven een soortgelijk geval, waarbij saccharose, glucose en fructose op een kolom van I R A 400 (OH) worden ontleed en vastgehouden.

2e Door de zuuranionen uit de oplossing te precipiteren.

Bij een zoutzuurhydrolysaat zou dit uitgevoerd kunnen worden met zilvercarbonaat. Bij salpeterzuur is een dergelijke precipitatie niet mogelijk, wat mede een van de redenen is, dat dit zuur meestal niet voor het hydrolyseren gebruikt wordt.

Het zwavelzuur, dat zoals wij gezien hebben het meest voor het hydrolyseren gebruikt wordt, kan eenvoudig met bariumcarbonaat uit de oplossing verwijderd worden. Deze methode vindt men vrij algemeen toegepast om de hydrolysaten sulfaatvrij te maken. ADAMS en CASTAGNE (8), WHITING (112) en BISHOP (17) neutraliseren de zwavelzure oplossing met bariumcarbonaat tot een pH 6,5 of tot neutraal op congopapier.

Toch schijnt ook bij deze werkwijze nog enig risico te zijn, nl. kans op conversie. LAIDLAW en REID (59) vinden, dat bij neutraliseren met bariumcarbonaat een omzetting van glucose in fructose plaats kan hebben, ook wanneer zeer zuiver bariumcarbonaat, dat dus geen bicarbonaat bevat, gebruikt wordt. Alleen bij gebruik van vers bereid bariumcarbonaat treedt volgens hen deze omzetting niet op.

Door het invoeren van het gebruik van vers bereid bariumcarbonaat voor het neutraliseren wordt het sulfaatvrij maken van de hydrolysaten wel een tijdrovende bezigheid. Naar aanleiding hiervan heb ik mij afgevraagd of het eigenlijk wel noodzakelijk is te neutraliseren en of de toepassing ervan niet eerder een gebruik is, dat, eenmaal ontstaan, gedachteloos door latere auteurs is overgenomen.

Waarop berust namelijk de storing van het zuur? Men kan zich voorstellen, dat de loop van de suikers er niet door beïnvloed wordt. Evenmin zullen deze stoffen er door worden aangetast. De storing moet dus gezocht worden in een inwerken op de indicator. Het is heel begrijpelijk, dat de oorspronkelijk door PARTRIDGE gebruikte ammoniakale zilvernitraatoplossing op de plaatsen, waar zuur aanwezig is, niet tot zijn recht kan komen. Men mag echter verwachten, dat een indicator met een lage pH zoals de phosphorzure anilineoplossing van het zwavelzuur geen invloed ondervindt.

Om dit na te gaan heb ik (GAILLARD [40]) chromatogrammen gemaakt van niet geneutraliseerde hydrolysaten en daarvan de één behandeld met ammoniakaal zilvernitraat als indicator en de ander met anilinephosphaat. Inderdaad komen op het met ammoniakaal zilvernitraat behandelde chromatogram witte vlekken voor en wel op de plaatsen van glucose en galactose; de andere suikers zijn normaal zichtbaar. Op het met anilinephosphaat behandelde chromatogram zijn alle suikers op de normale plaatsen aanwezig en duidelijk zichtbaar. Tevens heb ik onderzocht of ook de bepalingen van de verschillende suikers op chromatogrammen van niet geneutraliseerde hydrolysaten kunnen worden uitgevoerd. Hiertoe zijn van een oplossing van bekende hoeveelheden galactose, glucose, arabinose en xylose in N zwavelzuur de gehalten bepaald, nadat er een

chromatogram van was gemaakt zonder voorafgaande neutralisatie. Daarnaast zijn van een hemicellulosehydrolysaat de gehalten aan suikers bepaald, nadat er vóór en na neutraliseren met bariumcarbonaat chromatogrammen van waren gemaakt.

De uitkomsten zijn in tabel 5 samengebracht.

TABEL 5. Suikers bepaald na chromatograferen zonder voorafgaande neutralisatie.

Sugars determined by paperchromatography without previous neutralisation.

	oplossing van suikers in N zwavelzuur <i>sugars in N sulfuric acid solution</i>			hemicellulosehydrolysaat	
	mg toegevoegd	mg gevonden		zuur hydrolysaat <i>acid hydrolysate</i>	geneutraliseerd hydrolysaat <i>neutralised hydrolysate</i>
galactose	10,0	10,6	10,4	1,2	1,5
glucose	10,0	9,6	9,4	3,8	3,6
arabinose	20,0	20,2	19,8	8,7	8,6
xylose	40,0	39,8	39,0	67,1	65,6

Aan de hand van deze cijfers mag worden vastgesteld, dat een hydrolysaat, gemaakt met N zwavelzuur, zonder voorafgaand neutraliseren geschikt is voor de papierchromatografische bepaling van de suikers, mits een zuur reagerende indicatoroplossing gebruikt wordt voor de plaatsbepaling van de suikers.

DE IDENTIFICATIE VAN DE SUIKERS

Hiervoor wordt de basislijn van een strook filtreerpapier van 6 cm breedte in vier gelijke delen verdeeld, corresponderende met een gelijk aantal banen op de strook. Op één van de banen wordt een oplossing van 1 % galactose, glucose, arabinose en xylose in water gebracht. De druppel wordt met een platinaoogje op het papier geplaatst. Op de andere drie banen worden, ook met een platinaoogje, respectievelijk 1, 2 en 3 druppels van de te onderzoeken oplossing geplaatst. Wanneer meer dan één druppel op de basislijn gebracht wordt, worden de druppels na elkaar, telkens na drogen, op dezelfde plaats gezet. Zodoende komt op deze drie banen de onbekende in drie verschillende concentraties naast elkaar en naast de bekende te staan. Bij de baan, waar één druppel op de basislijn geplaatst is, zullen de vlekken van de componenten met zeer lage gehalten niet opvallen, terwijl de vlekken van de componenten met hoge gehalten hier niet zo groot zullen worden, dat ze in elkaar vloeien. Bij de baan, waar drie druppels op de basislijn zijn geplaatst, zal het omgekeerde het geval zijn. Op deze wijze kunnen op één chromatogram alle componenten worden aangetoond.

Na ontwikkelen van het chromatogram en drogen van de stroken in een luchtstroom (zonder verwarmen) worden de stroken met de indicator besproeid en 10 minuten op 100 °C verwarmd. De vlekken van de onbekende worden dan wat kleur en plaats betreft vergeleken met de bekende vlekken.

DE BEPALING

De methoden, waarbij de suikers op het papier bepaald worden door opmeten van de oppervlakte van de vlekken (FISHER et al. [37]) of door meten van de optische dichtheid ervan (McFARREN et al. [36]), geven niet de indruk bijzonder nauwkeurig te zijn. Daarom wordt de voorkeur gegeven aan een methode, waarbij

de suikers van het papier geëluëerd en vervolgens in het eluaat bepaald worden.

Daar de suikers zelf op het chromatogram niet gekleurd zijn, kan de plaats ervan alleen bepaald worden na behandeling met een indicator. Wanneer echter een suiker met indicator behandeld is, kunnen de gebruikelijke kwantitatieve bepalingen er niet meer op worden uitgevoerd. Daarom behandelt men alleen een smalle reep van het chromatogram met een indicator en bepaalt hiermee de plaatsen van de ermee corresponderende suikerzones op het overgebleven deel ervan, zodat deze suikerzones kunnen worden uitgeknipt.

Voor dit doel worden de stroken 7 cm breed genomen. Aan één van de zij-kanten wordt op de basislijn op een stuk van $1\frac{1}{2}$ cm breed, corresponderend met de indicatorbaan, een enkele druppel van het te onderzoeken mengsel gebracht. Op de overige $5\frac{1}{2}$ cm van de basislijn wordt voor de bepaling een groot aantal druppels (± 17) dicht naast elkaar geplaatst. Daar alle druppels met hetzelfde platinaoogje worden aangebracht en dus even groot zijn, zal de breedte van iedere uit te knippen suikerzone uit de baan van $5\frac{1}{2}$ cm even groot zijn als van de bijbehorende vlek van de druppel, welke afzonderlijk op de $1\frac{1}{2}$ cm van de indicatorbaan is aangebracht. Na chromatograferen en drogen van de stroken in een luchtstroom (zonder verwarmen om eventuele ontleding te voorkomen) worden de zijbanen van $1\frac{1}{2}$ cm er afgeknipt en met indicator behandeld. Hierna worden zij weer naast de stroken, waar zij van afgeknipt zijn, teruggelegd en worden met behulp hiervan de plaatsen van de te bepalen suikerzones op de stroken vastgesteld, zodat deze zones uitgeknipt kunnen worden (fig. 2). Deze zones worden met potlood gemerkt. Voor de blanco bepalingen worden even grote stukken papier uit de overblijvende delen van het chromatogram geknipt.

De suikers worden van het papier geëluëerd volgens FLOOD, HIRST en JONES (38). Hierbij wordt onderaan een kleine koeler een glazen haakje gemaakt. De uit het chromatogram geknipte zone wordt tot een klein pakje samengevouwen en aan het haakje gehangen (fig. 3). De koeler wordt op een Jena reageerbuis geplaatst en hierin wordt 2 ml water gedurende 20 minuten gekookt. Het uit de koeler terugvloeiende water lost de suikers uit het papier op en brengt deze over in de reageerbuis. Een voordeel van deze methode van elueren is, dat men met een afgemeten kleine hoeveelheid water kan werken, zodat het eluaat later niet behoeft te worden geconcentreerd. Bovendien bevindt de suikeroptlossing zich meteen in een reageerbuis, waarin de kwantitatieve bepaling kan worden uitgevoerd, zodat er geen verlies door overspoelen kan ontstaan, hetgeen bij het werken met kleine hoeveelheden wel een vereiste is.

Voor de uiteindelijke bepaling van de suikers in het eluaat wordt aan een colorimetrische bepaling de voorkeur gegeven boven

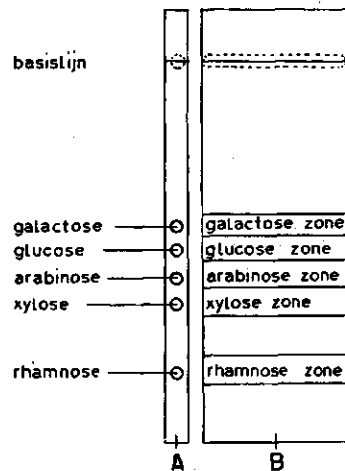


FIG. 2. Het uitknippen van de suikerzones.

A = indicatorstrook

B = strook, waar de zones worden uitgeknipt

Cutting out of the sugar zones.

A = indicatorstrip

B = strip with zones to be cut out

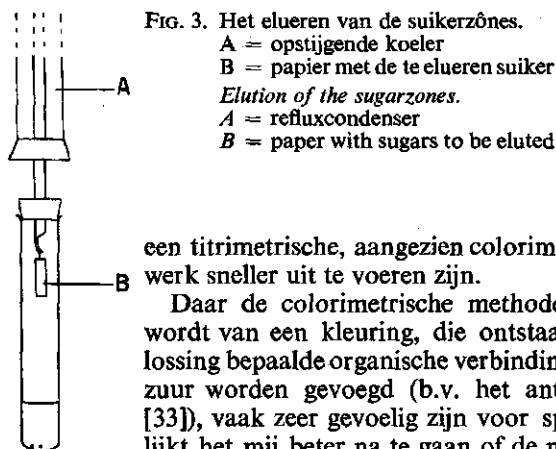


FIG. 3. Het elueren van de suikerzônes.

A = opstijgende koeler

B = papier met de te elueren suiker

Elution of the sugarzones.

A = refluxcondenser

B = paper with sugars to be eluted

een titrimetrische, aangezien colorimetrische bepalingen voor serie-werk sneller uit te voeren zijn.

Daar de colorimetrische methoden, waarbij gebruik gemaakt wordt van een kleuring, die ontstaat, wanneer bij een suikeroplossing bepaalde organische verbindingen en geconcentreerd zwavelzuur worden gevoegd (b.v. het anthronreagens van DREYWOOD [33]), vaak zeer gevoelig zijn voor sporen solvens in de oplossing, lijkt het mij beter na te gaan of de methode van SOMOGYI-NELSON voor dit doel geschikt is. Hierbij heeft eerst reductie plaats van het koperreagens van SOMOGYI, waarna het gevormde cupro-oxyde met het kleurreagens van NELSON in de oplossing een diepblauwe kleur van molybdeenblauw geeft, zodat een extinctiemeting mogelijk is.

De bepaling wordt als volgt uitgevoerd:

De reagentia

Reagens van SOMOGYI (100).

4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

24 g watervrij Na_2CO_3

16 g NaHCO_3

12 g seignettezout

180 g watervrij Na_2SO_4

Water tot 1000 ml

Los het carbonaat en het tartraat op in ongeveer 250 ml water. Voeg dan onder omschudden 40 ml 10 procentige kopersulfaatoplossing toe. Het natriumsulfaat wordt afzonderlijk in ongeveer 500 ml heet water opgelost, waarna deze oplossing even gekookt wordt om de lucht eruit te verdrijven. Na bekoelen worden de twee oplossingen gemengd en wordt tot een liter aangevuld. Het reagens is niet onbeperkt houdbaar en kan het beste eenmaal per week vers bereid worden.

Volgens de auteur kunnen met dit reagens hoeveelheden van 0,01 tot 0,6 mg suiker worden bepaald.

Reagens van NELSON (66).

Los op: 25 g ammoniummolybdaat in 450 ml gedestilleerd water, voeg hieraan toe 21 ml geconcentreerd H_2SO_4 en meng. Voeg vervolgens toe 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ opgelost in 25 ml water en meng wederom.

De oplossing wordt in een stoof gedurende 24 tot 48 uur op 37°C verwarmd, waarbij het reagens goudgeel gekleurd wordt.

Ook dit reagens wordt iedere week vers bereid.

De methode

Voor de bepaling wordt in een reageerbuis bij 2 ml van een suikeroplossing 2 ml van het koperreagens gevoegd. Het mengsel wordt 20 minuten in kokend water verwarmd en daarna snel in koud water afgekoeld. Na bekoelen wordt 2 ml van het reagens van NELSON toegevoegd en omgeschud. Vrijwel onmiddellijk ontstaat de blauwe kleur, die geruime tijd stabiel blijkt te zijn. De oplossing wordt tot een geschikt volume aangevuld, waarna de extinctie in de Beckman spectrophotometer kan worden gemeten bij $520 \text{ m}\mu$ en 0,03 mm spleetbreedte.

Deze methode vereist echter enige voorzorgen:

In de eerste plaats moeten de reageerbuizen, waarin de reductie plaats vindt, goed gereinigd zijn, omdat organische verontreinigingen storen.

In de tweede plaats is de bepaling zeer gevoelig voor omstandigheden zoals luchttoxydatie, volumeverandering en tijd van verwarmen.

Om de invloed van de luchttoxydatie tegen te gaan geeft NELSON aan om niet bij het absorptiemaximum, dat bij $660\text{ m}\mu$ ligt, te meten, maar bij $520\text{ m}\mu$, waardoor de bepaling iets minder gevoelig wordt. Verder beveelt hij aan het kopergehalte in het reagens zo laag mogelijk te houden. Oorspronkelijk was dit reagens namelijk als volgt samengesteld (SOMOGYI [99]):

70,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
 40 g seignettezout
 100 ml N NaOH
 80 ml CuSO_4 10 %
 180 g watervrij Na_2SO_4
 water tot 1000 ml

Door vermindering van het kopergehalte worden betere uitkomsten verkregen.

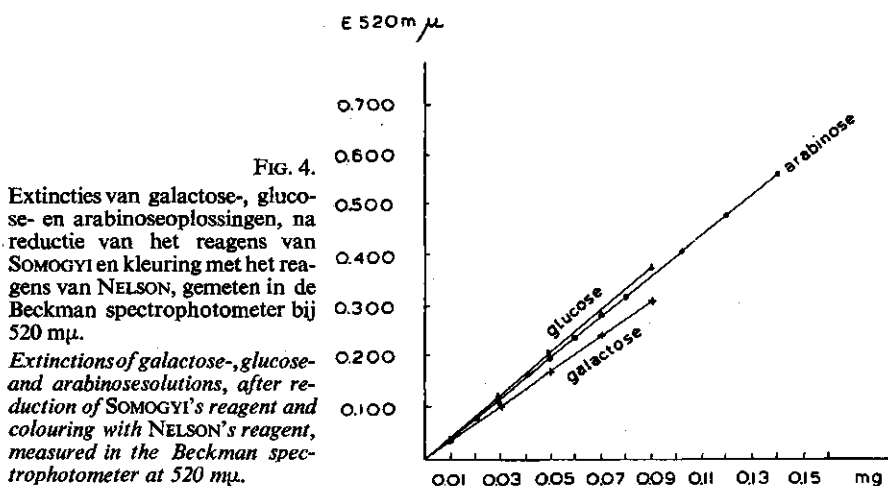
Een volumevermindering tijdens de reductie wordt tegengegaan door de buizen met een glazen bol af te sluiten gedurende het verwarmen.

De invloed van verschillende tijden van verwarmen kan worden geëlimineerd door tegelijk met de bepaling enige standaardwaarden mee te bepalen.

Voor de vier te bepalen suikers xylose, arabinose, glucose en galactose heb ik nagegaan of de bepaling, met inachtneming van de bovengenoemde voorzorgen, bevredigende resultaten geeft. Deze controleproeven zijn uitgevoerd op hoeveelheden van de suikers in dezelfde orde van grootte als in de hydrolysaten verwacht kunnen worden.

De uitkomsten van dit onderzoek zijn in tabel 6 (blz. 148) samengevat.

Uit deze cijfers blijkt, dat $E_{520\text{ m}\mu}^{1\text{ mg}}$ redelijk constant is (zie ook fig. 4 en 5). De bepaling van de suikers uit de hydrolysaten kan dus met de methode SOMOGYI-NELSON worden uitgevoerd.



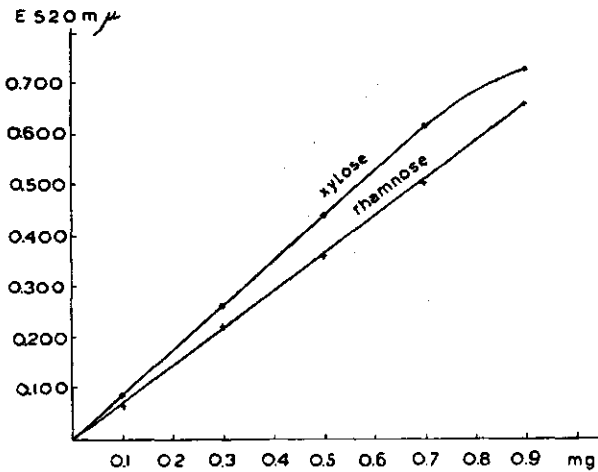


FIG. 5.

Extincties van xylose- en rhamnoseoplossingen, na reductie van het reagens van SOMOGYI en kleuring met het reagens van NELSON, gemeten in de Beckman spectrophotometer bij 520 mμ.

Extinctions of xylose- and rhamnosolutions, after reduction of SOMOGYI's reagent and colouring with NELSON's reagent, measured in the Beckman spectrophotometer at 520 mμ.

TABEL 6. Extincties van suikeroplossingen van verschillende concentratie na reductie van het reagens van SOMOGYI en kleuring met het reagens van NELSON, gemeten in de Beckman spectrophotometer bij 520 mμ.

Extinctions of sugarsolutions of different concentrations after reduction of SOMOGYI's reagent and colouring with NELSON's reagent, measured in the Beckman spectrophotometer at 520 mμ.

Extincties gemeten na aanvullen van de gekleurde oplossing tot 10 ml (xylose tot 50 ml).
Extinctions measured after filling the coloured solution up to 10 ml (xylose to 50 ml).

	mg	E	E 1 mg 520 mμ	mg	E	E 1 mg 520 mμ
galactose	0,01	0,035	3,50	0,03	0,110	3,50
	0,02	0,068	3,40	0,05	0,181	3,62
	0,03	0,106	3,53	0,07	0,251	3,59
	0,04	0,138	3,45	0,09	0,325	3,61
	0,05	0,177	3,44			
glucose	0,01	0,040	4,00	0,05	0,215	4,30
	0,02	0,084	4,20	0,07	0,292	4,17
	0,03	0,132	4,40	0,09	0,385	4,28
	0,04	0,178	4,28	0,11	0,437	4,30
	0,05	0,220	4,40			
arabinose	0,01	0,042	4,30	0,06	0,245	4,08
	0,03	0,120	4,00	0,08	0,326	4,07
	0,05	0,200	4,00	0,10	0,410	4,10
	0,07	0,277	3,96	0,12	0,494	4,12
	0,09	0,368	4,09	0,14	0,568	4,06
xylose (aangevuld tot 50 ml) (filled up to 50 ml)	0,10	0,088	0,88	0,40	0,355	0,89
	0,30	0,236	0,88	0,50	0,443	0,98
	0,50	0,442	0,88	0,60	0,540	0,90
	0,70	0,619	0,88	0,70	0,620	0,89
	0,90	0,748	0,83	0,80	0,680	0,85

Het gebruik van een interne standaard bij de bepaling van de suikers

Daar het suikermengsel niet uit een micropipet op de basislijn van het chro-

matogram wordt aangebracht, is de hoeveelheid van het mengsel, waarvan wordt uitgegaan, niet precies bekend. Om nu de op het chromatogram gevonden waarden voor de suikers op het polysaccharidemengsel te kunnen betrekken wordt bij de bepaling van een interne standaard gebruik gemaakt. Hiertoe wordt, nadat een bepaalde hoeveelheid (b.v. 50 mg) van een polysaccharidemengsel gehydrolyseerd is, hierbij als standaard 30 mg van een suiker, die niet in het hydrolysaat voorkomt, gevoegd. Van deze oplossing wordt dan het chromatogram gemaakt en vervolgens worden de daarop aanwezige hoeveelheden van de vier suikers en van de toegevoegde standaard bepaald. Uit de verhouding van de gevonden hoeveelheid van een suiker tot de gevonden hoeveelheid van de standaard kan berekend worden hoeveel mg van die suiker in de 50 mg polysaccharidemengsel aanwezig is. Indien b.v. gevonden worden:

In de galactosezone van het chromatogram 0,07 mg galactose,
 in de glucosezone van het chromatogram 0,10 mg glucose,
 in de arabinosezone van het chromatogram 0,15 mg arabinose,
 in de xylosezone van het chromatogram 0,40 mg xylose en
 in de zone van de standaardsuiker 0,52 mg standaardsuiker,
 dan was in de 50 mg van het polysaccharidemengsel aanwezig:

$$\frac{0,07}{0,52} \times 30 \text{ mg} = 4,04 \text{ mg galactose} = 8,1 \%$$

$$\frac{0,10}{0,52} \times 30 \text{ mg} = 5,77 \text{ mg glucose} = 11,6 \%$$

$$\frac{0,15}{0,52} \times 30 \text{ mg} = 8,65 \text{ mg arabinose} = 17,2 \%$$

$$\frac{0,40}{0,52} \times 30 \text{ mg} = 23,08 \text{ mg xylose} = 46,2 \%$$

Als interne standaard wordt bij voorkeur een suiker gebruikt, die op het chromatogram goed van de suikers uit het hydrolysaat gescheiden kan worden.

Daar er verband bestaat tussen de molecuulstructuur van een suiker en de plaats ervan op het chromatogram (JEANES, WISE en DIMLER [51]), geeft dit een richtlijn bij het zoeken naar een suiker, die als standaard kan dienen. De pentosen hebben namelijk een groter R_F dan de hexosen, de monosacchariden een groter R_F dan de disacchariden, terwijl methylgroepen de R_F waarden verhogen.

Op een suikerchromatogram vinden wij dus de disacchariden het dichtst bij de basislijn, dan volgen de hexosen en daarna de pentosen, terwijl de methylpentosen nog weer verder van de basislijn verwijderd zijn dan de pentosen. Er zijn dus twee mogelijkheden voor een standaardsuiker, die moet dienen voor de bepaling van een mengsel van hexosen en pentosen en wel een disaccharide, b.v. lactose of saccharose, of wel een methylpentose, als b.v. rhamnose.

Op grond van gegevens omtrent de R_F waarden van verschillende suikers uit de literatuur verkregen (CRAMER [28]), kan worden verwacht, dat rhamnose een geïsoleerde plaats naast de vier te bepalen suikers op het chromatogram zal innemen. Bij een proefneming is dit vermoeden bevestigd. Na chromatograferen van een mengsel van galactose, glucose, arabinose, xylose en rhamnose met het solvens n-butanol-aethanol-water 7-2-2 gedurende 67 uur bleken de volgende afstanden door de verschillende suikers te zijn afgelegd:

galactose 10,5 cm van de basislijn
 glucose 11,9 cm van de basislijn

arabinose 14,6 cm van de basislijn
 xylose 17,2 cm van de basislijn
 rhamnose 23,7 cm van de basislijn

Rhamnose is dus een zeer geschikte interne standaard voor dit onderzoek. Het laat zich ook met de methode SOMOGYI-NELSON zeer goed bepalen, zoals uit tabel 7 blijkt.

TABEL 7. Extincties van rhamnoseoplossingen van verschillende concentraties na reductie van het reagens van SOMOGYI en kleuring met het reagens van NELSON, gemeten in de Beckman spectrophotometer bij 520 m μ , na aanvullen van de gekleurde oplossing tot 50 ml.

Extinctions of rhamnose solutions of different concentrations after reduction of SOMOGYI's reagent and colouring with NELSON's reagent, measured in the Beckman spectrophotometer at 520 m μ , after filling the solutions up to 50 ml.

mg	E	E $\frac{1 \text{ mg}}{520 \text{ m}\mu}$	mg	E	E $\frac{1 \text{ mg}}{520 \text{ m}\mu}$
0,10	0,072	0,72	0,10	0,072	0,72
0,30	0,217	0,71	0,30	0,226	0,72
0,50	0,358	0,72	0,50	0,358	0,72
0,70	0,512	0,73	0,70	0,505	0,72
0,90	0,668	0,74	0,90	0,660	0,73

Tenslotte is nog een controleproef uitgevoerd op de hele kwantitatieve bepaling. Hiervoor is een mengsel gemaakt van 10 mg glucose en 40 mg xylose opgelost in 1 ml water. Hieraan is als interne standaard 30 mg rhamnose toegevoegd.

Van dit mengsel zijn twee kwantitatieve chromatogrammen gemaakt. De suikerzones en de bijbehorende blancostukken werden uit de chromatogrammen geknipt. De zones van één suikersoort werden gelijktijdig met de bijbehorende blanco's aan naast elkaar opgestelde koelers geëluëerd. Na het elueren werden de oplossingen in de reageerbuizen weer tot 2 ml aangevuld en werd aan iedere oplossing 2 ml van het koperreagens toegevoegd. Tevens werden vijf standaardoplossingen en 2 ml water op dezelfde wijze behandeld. Alle buizen werden tegelijk met een houder in kokend water geplaatst en na 20 minuten in koud water overgebracht. Na bekoelen werd aan de oplossingen 2 ml van het reagens van NELSON toegevoegd, omgeschud en na enige ogenblikken aangevuld, voor glucose tot 10 ml en voor xylose en rhamnose tot 50 ml. De extincties werden in de Beckman spectrophotometer gemeten bij 520 m μ en 0,03 mm spleetbreedte. Als blanco voor de standaardwaarden werd het op gelijke wijze behandelde gedestilleerde water gebruikt en als blanco voor de geëluëerde suikeroplossingen de eluat van de bijpassende stukken blanco papier.

Op deze wijze zijn gevonden:

op chromatogram . . .	I	II
in de glucosezone	0,125 mg	0,128 mg
in de xylosezone	0,513 mg	0,483 mg
in de rhamnosezone	0,382 mg	0,373 mg

Voor het oorspronkelijke mengsel wordt hieruit berekend:

$$\begin{array}{l} \text{glucose } \frac{0,125}{0,382} \times 30 = 9,8 \text{ mg en } \frac{0,128}{0,373} \times 30 = 10,3 \text{ mg} \\ \text{xylose } \frac{0,513}{0,382} \times 30 = 40,3 \text{ mg en } \frac{0,483}{0,373} \times 30 = 38,8 \text{ mg} \end{array}$$

Er is dus een fout van ten hoogste 3 % gemaakt, hetgeen voor het doel van het onderzoek geaccepteerd mag worden. Het spreekt vanzelf, dat de fout bij het bepalen van kleinere waarden onvermijdelijk groter zal zijn.

HOOFDSTUK V

BEPALING VAN DE SUIKERS, WAARUIT DE GEISOLEERDE CELWANDBESTANDDELEN ZIJN SAMENGESTELD

INLEIDING

In Hoofdstuk II zijn in tabel 2 de gehalten vermeld van de uit koolhydraten samengestelde celwandbestanddelen, die op vier verschillende manieren in tweevoud uit tarwestro zijn geïsoleerd. Deze mengsels van koolhydraten zijn zonder voorafgaande zuivering gewogen en dus kunnen de cijfers niet gebruikt worden voor een vergelijking van de vier methoden. Toch is het wel mogelijk een vergelijking te maken uitgaande van de percentages aan suikers, waaruit deze polysaccharidemengsels zijn opgebouwd. Deze suikers toch kunnen vrij nauwkeurig bepaald worden met de in hoofdstuk IV toegelichte chromatografische methode. Deze papierchromatografische bepaling van de suikers heeft vele voordelen boven de vroeger toegepaste methode, waarbij het gehalte aan koolhydraatmengsels na enige zuivering zonder verdere splitsing door weging werd bepaald.

In de eerste plaats kan het verlies, dat ontstaat bij de zuivering van de preparaten door herhaald oplossen en weer precipiteren, vermeden worden. Een voorafgaande zuivering van de preparaten is namelijk niet nodig, daar de er in voorkomende verontreinigingen, zoals lignine en kaliumacetaat, de bepaling niet storen. Bij de hydrolyse, die vóór de chromatografische bepaling wordt uitgevoerd, blijft de lignine als onoplosbare rest achter. Het kaliumacetaat gaat wel in oplossing, maar oefent geen storende invloed op het chromatogram uit.

Indien verder mocht blijken, dat bij een bepaalde methode een lager gehalte aan koolhydraten wordt verkregen dan bij een andere, kan nu worden nagegaan bij welk van de suikers dit tekort optreedt, daar met de chromatografische methode alle suikers afzonderlijk worden bepaald.

Ook kan worden nagegaan of de onderlinge verhouding en de samenstelling van de met 5 % kaliloog en de met 24 % kaliloog geïsoleerde fracties hemicellulosen bij de vier methoden gelijk zijn of dat hier verschillen in voorkomen. Men zou zich namelijk voor kunnen stellen, dat bij een bepaalde methode gedurende het delignificeren de polysacchariden aangetast worden en dat hierbij verkorting van de ketenlengte plaats vindt. Zo'n polysaccharide zou dan door het korter worden van de keten beter oplosbaar worden en daardoor in plaats van met 24 % kaliloog reeds met 5 % kaliloog kunnen worden geëxtraheerd. Er zou in dat geval dus een verschuiving naar de meer oplosbare vormen plaats hebben.

Zoals in de inleiding reeds werd vermeld, gaan bij de extractie van het pectine

ook verschillende polysacchariden mee, die eigenlijk tot de hemicellulosen behoren. Hoe groot het percentage van deze zogenaamde ballaststoffen bij tarwestro is, werd nooit nagegaan. WEIHE en PHILIPS (104) hebben er mee volstaan vast te stellen, dat bij een extractie met 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing 3,1 % „pectinestoffen” verkregen worden. Met behulp van de papierchromatografie is het nu mogelijk nauwkeurig na te gaan, welke koolhydraten – en hoeveel daarvan – reeds vóór het delignificeren door de extractie met ammoniumoxalaatoplossing aan het materiaal worden onttrokken.

Terwijl aan de ene kant een klein deel van de hemicellulosen voortijdig aan het materiaal onttrokken wordt, blijft aan de andere kant een deel ervan in het met kaliloog geëxtraheerde materiaal achter. Dit achterblijven van een deel van de hemicellulosen kan verschillende oorzaken hebben. Ook op dit punt zullen waarschijnlijk met behulp van de papierchromatografie enige gegevens kunnen worden verkregen. Indien bijvoorbeeld de lignine onvoldoende verwijderd is, kan hierdoor een deel van de hemicellulosen ingesloten zijn, dat dan niet mee geëxtraheerd wordt. In dat geval zou het gehalte der achterblijvende hemicellulosen verschillend moeten zijn voor de verschillende methoden, aangezien op verschillende manieren is gedelignificeerd. Een andere mogelijkheid is, dat de ketenlengte van deze hemicellulosen zo groot is, dat ze niet meer in loog oplosbaar zijn. In dat geval mogen wij verwachten, dat steeds een gelijk gehalte in het celluloseresidu wordt teruggevonden. Nog een mogelijkheid is, dat deze hemicellulosen niet door een restant lignine zijn ingesloten, maar door cellulose of dat zij aan cellulose gebonden zijn.

Uit het voorafgaande is het zonder meer duidelijk, dat het van belang is niet alleen van de beide hemicellulosefracties de samenstellende suikers te bepalen, maar ook van de pectinestoffen en van de celluloseresidus.

Daar hiervoor de polysaccharidemengsels zonder voorafgaande zuivering worden gehydrolyseerd, zijn de gehalten aan samenstellende suikers, die in de hydrolysaten worden gevonden betrekkelijk willekeurige waarden. Bij het isoleren van de polysaccharidemengsels wordt echter tevens door weging het gehalte bepaald van het niet gezuiverde mengsel berekend op het „uitgangsmateriaal”. Hierdoor is het mogelijk ook de gevonden gehalten aan samenstellende suikers voor ieder polysaccharidemengsel te berekenen op het „uitgangsmateriaal”. De zo verkregen waarden kunnen onderling worden vergeleken.

Op deze wijze zijn nu door mij de percentages aan samenstellende suikers bepaald van de bij de vier methoden verkregen:

1. pectinestoffen.
2. in 5 % kaliloog oplosbare hemicellulosen.
3. in 24 % kaliloog oplosbare hemicellulosen.
4. celluloseresidus.

DE PECTINESTOFFEN

Deze worden uit het plantenmateriaal geïsoleerd, voordat het delignificeren plaats vindt. Zodoende zijn de pectinestoffen van alle vier methoden op dezelfde wijze gewonnen. De bepaling van de samenstellende suikers beoogt hier dan ook niet een vergelijk te maken tussen de methoden onderling. Het doel is na te gaan welke polysacchariden met het pectine mee oplossen in de 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing.

Bij het isoleren van de pectinestoffen, volgens het voorschrift van WEIHE en

PHILIPS (zie hoofdstuk II) worden deze, nadat zij geprecipiteerd zijn, met zoutzure verdunde alcohol vrij van oxalaat gewassen. Het lijkt mij, dat hierin een gevaar schuilt, wanneer het er om gaat de polysacchariden te bepalen, die het pectine begeleiden. Om het precipitaat vrij van oxalaat te krijgen moet namelijk betrekkelijk lang met de zoutzure alcohol worden uitgewassen. De mogelijkheid bestaat dus, dat hierbij gemakkelijk oplosbare polysacchariden verloren gaan. In dat geval zou het beter zijn de geprecipiteerde pectinestoffen kort met water te wassen, daarna met alcohol en aceton en vervolgens te drogen, zoals dit bij de hemicellulosemengsels gebeurt. Het ammoniumoxalaat, dat in het precipitaat achterblijft, stoort de chromatografische bepaling niet.

Om na te gaan of er inderdaad koolhydraten verloren gaan bij het uitwassen met zoutzure alcohol, heb ik de gehalten aan samenstellende suikers bepaald in een mengsel pectinestoffen, dat met zoutzure alcohol vrij van oxalaat was gewassen en ook in een mengsel, dat alleen met wat water gewassen was en daarna met alcohol en aceton.

Hiertoe werd telkens 50 mg pectinestoffen met 1 ml N zwavelzuur gedurende 2 uur gehydrolyseerd (zie hoofdstuk III), waarna 30 mg rhamnose als interne standaard werd toegevoegd. Van het hydrolysaat werden twee kwalitatieve chromatogrammen gemaakt en vier kwantitatieve (zie hoofdstuk IV).

Uit de kwalitatieve chromatogrammen bleek, dat in het hydrolysaat aanwezig waren: weinig galactose, veel glucose, weinig arabinose en weinig xylose.

Van de uitkomsten van de vier kwantitatieve chromatogrammen werden de gemiddelde waarden genomen en werd de hoeveelheid suiker berekend op het mengsel van de pectinestoffen en vervolgens op het uitgangsmateriaal.

De uitkomsten zijn in tabel 8 vermeld.

TABEL 8. Suikers na hydrolyse bepaald in pectinestoffen van tarwestro.

Sugars determined after hydrolysis in pectic substances of wheatstraw.

	pct. van pectinestoffen <i>pct. of pectic substances</i>				pct. van uitgangsmateriaal <i>pct. of starting material</i>			
	niet met zoutzure alcohol uitgewassen <i>not washed with acid alcohol</i>		met zoutzure alcohol uitgewassen <i>washed with acid alcohol</i>		niet met zoutzure alcohol uitgewassen <i>not washed with acid alcohol</i>		met zoutzure alcohol uitgewassen <i>washed with acid alcohol</i>	
	1	2	1	2	1	2	1	2
pectinest. <i>pectic subst.</i>					2,0	2,6	1,3	1,3
galactose	2,4	2,8	4,1	6,9	0,05	0,07	0,05	0,07
glucose	50,3	36,3	16,6	15,8	1,00	0,94	0,22	0,21
arabinose	2,4	3,6	5,0	4,8	0,05	0,09	0,07	0,06
xylose	2,9	3,0	4,9	4,1	0,05	0,08	0,07	0,06

Uit deze cijfers blijkt, dat het galactaan, het arabaan en het xyloaan niet worden weggewassen bij het verwijderen van de ammoniumoxalaat uit de pectinestoffen met zoutzure alcohol. Wel is er een duidelijk verschil waar te nemen bij het glucosegehalte, dat door uitwassen van 0,97% tot 0,22% gedaald is. Er moet dus een gemakkelijk oplosbaar glucosepolymeer in het mengsel van de pectinestoffen aanwezig zijn.

Voor de bepaling van de polysacchariden in de pectinestoffen is het daarom beter deze niet met zoutzure alcohol vrij van oxalaat te wassen, terwijl de bepaling dient te worden uitgevoerd op het ongezuiverde mengsel.

DE IN 5% KALILOOG OPLOSBARE HEMICELLULOSEN

Deze zijn voor het merendeel na het delignificeren gewonnen (zie hoofdstuk II), zodat verwacht kan worden, dat hier wel verschillen in zullen optreden. De hemicellulosen volgens methode I geïsoleerd en die volgens methode II vóór chloreren zijn nog al sterk met lignine verontreinigd. De overige hemicellulosemengsels – die volgens methode III en IV en volgens methode II na chloreren zijn geïsoleerd – zijn verkregen, nadat de lignine vrij intensief verwijderd is. Zij zijn daardoor, zoals wij in hoofdstuk III hebben gezien, wat gemakkelijker te hydrolyseren. De met lignine verontreinigde mengsels werden daarom gedurende 2 uur gehydrolyseerd en de overige mengsels gedurende 1½ uur.

Van alle mengsels werd 50 mg gehydrolyseerd met 1 ml N zwavelzuur, waarna 30 mg rhamnose als interne standaard werd toegevoegd. Evenals bij de pectinestoffen werden van een hydrolysaat vier kwantitatieve chromatogrammen gemaakt, terwijl voor iedere methode vooraf ook eenmaal een kwalitatief chromatogram werd gemaakt.

In alle hemicellulosemengsels bleken aanwezig te zijn: veel xylose, wat arabinose en weinig glucose en galactose. Dit komt wel overeen met wat in de literatuur hierover te vinden is. Uit het werk van WEIHE en PHILIPS (104) was namelijk reeds bekend, dat in de hemicellulosemengsels van tarwestro xylose en arabinose voorkomen en bovendien enige niet geïdentificeerde suikers. ADAMS en CASTAGNE (7), die hun hemicellulosehydrolysaten papierchromatografisch onderzochten, stelden ook de aanwezigheid van galactose en glucose er in vast.

In de hydrolysaten van de verschillende „in 5% kaliloog oplosbare hemicellulosen” moeten nu dus de gehalten aan xylose, arabinose, glucose en galactose worden bepaald.

De uitkomsten zijn in tabel 9 vermeld. De cijfers in deze tabel zullen aan het slot van dit hoofdstuk nader worden toegelicht.

TABEL 9. Suikers na hydrolyse bepaald in de „in 5% KOH oplosbare hemicellulosen”, uit tarwestro geïsoleerd, nadat op vier verschillende manieren is gedelignificeerd (zie tabel 3).

Sugars determined in the hydrolysates of the „in 5% KOH soluble hemicelluloses”, isolated from wheat straw after four different methods of delignification (see table 3).

Methode	I		II vóór Cl before Cl		II na Cl after Cl		III		IV	
	pct. berekend op de hemicellulosen (pct. of hemicelluloses)									
galactose	1,8	2,4	2,7	2,8	3,0	3,9	1,2	2,1	1,3	1,3
glucose	2,8	3,6	3,4	3,2	10,5	8,5	3,4	3,3	3,1	3,9
arabinose	9,1	8,1	10,8	10,8	11,0	10,2	9,0	9,6	9,6	10,3
xylose	67,3	67,7	67,2	61,9	72,4	71,1	75,3	74,4	68,0	69,5
	pct. berekend op het uitgangsmateriaal (pct. of starting material)									
Hemicellulosen	24,13	22,47	22,37	21,19	5,05	5,86	24,45	23,89	25,07	24,55
galactose	0,4	0,5	0,6	0,6	0,2	0,2	0,3	0,6	0,3	0,3
glucose	0,7	0,8	0,8	0,7	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8	0,9
arabinose	2,2	1,8	2,4	2,3	0,6	0,6	2,3	2,3	2,4	2,5
xylose	16,2	15,2	15,0	13,1	3,7	4,2	18,4	17,8	17,0	16,8

DE IN 24% KALILOOG OPLOSBARE HEMICELLULOSEN

Daar bij de voorafgaande extractie met 5% kaliloog het in loog oplosbare deel van de bij methode I nog aanwezige lignine al is verwijderd, zijn de daarna met 24% loog geëxtraheerde hemicellulosen even gemakkelijk te hydrolyseren als de hemicellulosemengsels, die na voorafgaand chloreren geëxtraheerd zijn. Voor al deze hemicellulosemengsels kan dus met een hydrolysetijd van 1½ uur worden volstaan.

Evenals bij de „in 5% kaliloog oplosbare hemicellulosen” werd van deze mengsels 50 mg met 1 ml N zwavelzuur gehydrolyseerd, waarna 30 mg rhamnose als interne standaard werd toegevoegd.

Aan de hand van kwalitatieve chromatogrammen kon de aanwezigheid van galactose, glucose, arabinose en xylose in alle hydrolysaten worden vastgesteld, hetgeen trouwens kon worden verwacht, daar, zoals in hoofdstuk I werd uiteengezet, het verschil in oplosbaarheid van de hemicellulosen niet wordt veroorzaakt door verschil in samenstelling, maar door verschil in ketenlengte van de afzonderlijke polysacchariden.

De in de hydrolysaten gevonden percentages aan suikers zijn in tabel 10 vermeld. Ook op de cijfers in deze tabel kom ik in de discussie aan het eind van dit hoofdstuk terug.

TABEL 10. Suikers na hydrolyse bepaald in de „in 24% KOH oplosbare hemicellulosen”, uit tarwestro geïsoleerd, nadat op vier verschillende manieren is gedelignificeerd (zie tabel 3).

Sugars determined in the hydrolysates of the „in 24% KOH soluble hemicelluloses”, isolated from wheat straw after four different methods of delignification (see table 3).

Methode	I		II		III		IV	
	pct. berekend op de hemicellulosen (<i>pct. of hemicelluloses</i>)							
galactose	1,7	2,4	—	3,7	2,5	—	2,0	1,0
glucose	9,0	6,4	6,4	8,3	6,8	5,3	5,5	5,8
arabinose	7,9	8,8	6,4	6,3	9,3	9,2	7,7	6,3
xylose	63,7	68,5	70,7	78,8	67,7	70,8	70,1	73,1
	pct. berekend op het uitgangsmateriaal (<i>pct. of starting material</i>)							
hemicellulosen	5,78	4,74	5,22	4,56	4,97	5,40	5,44	5,30
galactose	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0	0,1	0,1
glucose	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
arabinose	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3
xylose	3,7	3,2	3,7	3,6	3,4	3,8	3,8	3,9

DE CELLULOSERESIDUS

Onder celluloser residu wordt hier het deel van het cellulosecomplex verstaan, dat na extractie met loog achterblijft. De β - en γ -cellulose zijn in loog oplosbaar en worden met de hemicellulosen mee geëxtraheerd.

De residu, die bij de vier methoden na de extracties met kaliloog achterblijven, bestaan niet alle uit enkel cellulose.

Bij methode I, waar eigenlijk alleen de band tussen de lignine en de koolhydraten verbroken is, terwijl de lignine voor een groot deel in het met loog te extraheren materiaal is achtergebleven, lost een deel van deze achtergebleven lignine in de loog op en komt als verontreiniging in de hemicellulosemengsels.

Het grootste deel van de lignine blijft echter in het residu van de extractie achter. Dit residu bevat dus naast de cellulose en de achtergebleven hemicellulosen nog een vrij grote hoeveelheid lignine.

Bij de methoden II, III en IV, waarbij de lignine vóór de extractie met 24% loog vrijwel geheel verwijderd is, bestaat het residu in hoofdzaak uit cellulose. Naast de cellulose komen er wat hemicellulosen in voor en bovendien een zeer geringe hoeveelheid lignine.

Zoals wij in hoofdstuk III hebben gezien, is het mogelijk om uit deze residus de suikers van de hemicellulosen door hydrolyseren met N zwavelzuur vrij te maken. De cellulose wordt daarbij niet aangetast en blijft als onoplosbare rest achter.

Daar het gehalte aan hemicellulosen in deze residus zeer laag is, moet voor de bepaling van de suikers van meer dan 50 mg worden uitgegaan om meetbare hoeveelheden op het chromatogram te krijgen. Bij de uitvoering van de bepaling blijkt het echter niet mogelijk te zijn meer dan 100 mg met 1 ml N zwavelzuur te hydrolyseren. Ook al is het niet mogelijk de concentraties van de oplossingen voor het chromatograferen te verhogen, toch bestaat er wel een mogelijkheid om de hoeveelheid van de suikers op het chromatogram te vergroten. Hiervoor wordt, nadat de druppels, die op de basislijn van het chromatogram werden gebracht, zijn opgedroogd, op dezelfde plaats een tweede serie druppels geplaatst. Op deze wijze komt een twee keer zo grote hoeveelheid van iedere suiker op het chromatogram, wat dus overeenkomt met het verdubbelen van de concentratie. Uiteraard wordt de hoeveelheid van de toegevoegde standaard-suiker eveneens verdubbeld, hetgeen echter niet gewenst is met het oog op de bepaling ervan. Daarom moet, indien het mengsel twee maal op het chromatogram gebracht wordt, slechts de halve hoeveelheid van de standardsuiker aan het hydrolysaat worden toegevoegd.

Van de verschillende residus werd nu dus 100 mg gehydrolyseerd met 1 ml N zwavelzuur gedurende twee uur, waarna 15 mg rhamnose als interne standaard werd toegevoegd. Het hydrolysaat werd vervolgens door een gewogen, klein glasfilter (12G3) gefiltreerd. Het onoplosbare gedeelte, de hydrolyserest, werd uitgewassen, gedroogd en gewogen.

Van het filtraat werd op de gebruikelijke wijze een kwalitatief chromatogram gemaakt. Bij het opzetten van de vier kwantitatieve chromatogrammen werd, na opdrogen van de eerste serie druppels, een tweede serie op de basislijn geplaatst.

In het hydrolysaat bleken aanwezig te zijn: glucose, arabinose en xylose. Op de plaats van galactose was een vage aanduiding waar te nemen. Mogelijk is dus ook wat galactose aanwezig. Dit is dan echter te weinig om te worden bepaald.

De gevonden percentages aan glucose, arabinose en xylose zijn in tabel 11 (blz. 157) vermeld.

DISCUSSIE

Om nu tot een vergelijking van de vier methoden te kunnen komen zijn de verkregen uitkomsten, berekend op het „uitgangsmateriaal”, in tabel 12 (blz. 157) bijeengebracht.

Wij zien dan, dat bij methode I, vergeleken bij de andere methoden, een vrij grote hydrolyserest van het celluloser residu overblijft. Dit wijst op de aan-

TABEL 11. Suikers na hydrolyse bepaald in het celluloserestitu, uit tarwestro geïsoleerd, nadat op vier verschillende manieren is gedelignificeerd (zie tabel 3).

Sugars determined in the hydrolysates of the cellulose-residue, isolated from wheat straw after four different methods of delignification (see table 3).

Methode	I		II		III		IV	
	pct. berekend op het celluloserestitu (<i>pct. of celluloseresidue</i>)							
glucose	3,6		6,1	2,4	5,7	5,2	5,5	5,4
arabinose	1,4		—	0,6	1,6	1,2	0,9	0,7
xylose	3,9		0,5	0,7	1,6	3,1	1,0	1,1
hydrolyserest . . .	74,8		88,4	78,6	85,3	86,4	90,7	88,2
<i>residue of hydrolysis</i>	pct. berekend op het uitgangsmateriaal (<i>pct. of starting material</i>)							
Hemicellulosen . .	55,00		40,08	44,89	45,24	42,04	39,45	39,79
glucose	2,0		2,4	1,1	2,6	2,2	2,2	2,2
arabinose	0,8		—	0,3	0,7	0,5	0,4	0,3
xylose	2,2		0,2	0,3	0,7	1,3	0,4	0,4
hydrolyserest . . .	41,2		35,4	35,3	38,6	36,3	35,8	35,1
<i>residue of hydrolysis</i>								

TABEL 12. Suikers, na hydrolyse bepaald in de celwandbestanddelen van tarwestro, welke op vier verschillende manieren zijn geïsoleerd.

Sugars determined after hydrolysis in the cell-wallconstituents of wheat straw, isolated by four different methods.

Methode	in pct. van het uitgangsmateriaal (<i>pct. of starting material</i>)							
	I		II		III		IV	
pectinestoffen <i>pectic substances</i>								
galactose	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
glucose	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
arabinose	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
xylose	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
in 5% KOH oplosb. hemicellulosen								
<i>in 5% KOH soluble hemicelluloses</i>								
galactose	0,4	0,5	0,8	0,8	0,3	0,6	0,3	0,3
glucose	0,7	0,8	1,3	1,2	0,8	0,8	0,8	0,9
arabinose	2,2	1,8	3,0	2,9	2,3	2,3	2,4	2,5
xylose	16,2	15,2	18,7	17,3	18,4	17,8	17,0	16,8
in 24% KOH oplosb. hemicellulosen								
<i>in 24% KOH soluble hemicelluloses</i>								
galactose	0,1	0,1	—	0,2	0,1	—	0,1	0,1
glucose	0,5	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
arabinose	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3
xylose	3,7	3,2	3,7	3,6	3,4	3,8	3,8	3,9
celluloseresidu <i>cellulose-residue</i>								
glucose		2,0	2,4	1,1	2,6	2,2	2,2	2,2
arabinose		0,8	—	0,3	0,7	0,5	0,4	0,3
xylose		2,2	0,2	0,3	0,7	1,3	0,4	0,4
hydrolyserest <i>residue of</i>		41,2	35,4	35,3	38,6	36,3	35,8	35,1
<i>hydrolysis</i>								
totaal								
galactose		0,7	0,9	1,1	0,5	0,7	0,5	0,5
glucose		4,1	5,0	3,7	4,7	4,3	4,3	4,4
arabinose		3,1	3,4	3,6	3,6	3,4	3,3	3,2
xylose		20,7	22,7	21,3	22,6	23,0	21,3	21,2
hexosen		4,8	5,9	4,8	5,2	5,0	4,8	4,9
pentosen		23,8	26,1	24,9	26,2	26,4	24,6	24,4

wezigheid van meer lignine in dit residu. Ook het gehalte aan xylose in het residu is bij deze methode hoger, terwijl de gehalten hieraan in de beide hemicellulosefracties lager zijn dan bij de andere methoden. Het totale gehalte aan suikers is ook lager. Uit alles blijkt, dat het delignificeren met 2% alkali in 60% alcohol onvoldoende is. Bovendien zijn de verschillen tussen de duplobepalingen bij deze methode zeer groot. De bepaling van de suikers wordt hier bemoeilijkt door de aanwezigheid van veel lignine in de hemicellulosemengsels, waardoor de methode niet goed reproduceerbaar is.

Bij methode II is de lignine waarschijnlijk wel vrij volledig verwijderd. De hydrolyserest van het celluloser residu vertoont bij deze methode namelijk veel overeenkomst met die bij methode IV, waarbij de lignine intensief verwijderd is. Dit blijkt bovendien uit het gehalte aan xylose na hydrolyse in dit residu gevonden. Men krijgt de indruk, dat het delignificeren hier voldoende is geweest, zodat er geen hemicellulosen door resten lignine zijn ingesloten, alhoewel ook hier, evenals bij methode IV, een deel van de hemicellulosen in het celluloser residu achterblijft. Het gehalte er aan is echter betrekkelijk constant, zodat men de indruk krijgt, dat er een chemische binding bestaat tussen deze hemicellulosen en de cellulose of dat de polysacchariden, waaruit deze hemicellulosen zijn opgebouwd, een bijzonder grote ketenlengte hebben, waardoor zij niet meer in de loog oplossen.

Ofschoon het delignificeren bij methode II op dezelfde wijze als bij methode III heeft plaats gehad, namelijk met chloramine, blijkt uit het hoger gehalte aan hydrolyserest en aan in de cellulose achtergebleven xylose, dat deze wijze van delignificeren bij methode III iets minder efficiënt is geweest. Waarschijnlijk heeft de voorafgaande extractie met 5% kaliloog bij methode II het materiaal beter toegankelijk gemaakt voor de behandeling met chloramine.

Als nadeel van methode II moet nog gelden, dat de methode niet goed reproduceerbaar is. De verschillen tussen de duplobepalingen, die hoofdzakelijk in het xylosegehalte worden gevonden, komen vooral voor bij de „in 5% kaliloog oplosbare hemicellulosen”, waarvan het grootste deel zonder voorafgaand delignificeren is gewonnen. De lignine, die als gevolg hiervan deze hemicellulosen verontreinigt, bemoeilijkt ook hier de hydrolyse van de polysacchariden. Het voordeel van methode II, namelijk dat het grootste deel van de hemicellulosen onbeschadigd zou kunnen worden geïsoleerd, wordt hierdoor te niet gedaan, zoals uit de wisselende uitkomsten voor de hoeveelheid xylose blijkt. Voor glucose wordt wel een duidelijk hoger gehalte gevonden, waaruit wij mogen concluderen, dat in de hemicellulosen, evenals bij de pectinestoffen, een vrij gemakkelijk oplosbaar glucosepolymeer voorkomt, dat bij het delignificeren wordt weggewassen. Het voordeel van deze winst aan glucose weegt echter niet op tegen het nadeel van het slecht reproduceerbaar zijn van de uitkomsten der xylosebepaling, omdat het xylaan juist het hoofdbestanddeel van de hemicellulosen vormt. Bovendien is methode II omslachtiger dan de andere methoden, omdat er 4 maal 24 uur langer met loog moet worden geëxtraheerd.

Bij methode III is, zoals reeds werd opgemerkt, het delignificeren iets minder ver voortgezet dan bij methode II en IV. Hierdoor is de hydrolyserest van het celluloser residu weer wat groter en blijft daar ook wat meer xylose in achter. Een bezwaar is dit laatste niet, daar toch ook met de andere methoden niet bereikt kan worden, dat er geen hemicellulosen meer in de cellulose achterblijven. Er moet dus toch altijd een bepaling van de suikers uit de hemicellulosen op het celluloser residu worden uitgevoerd.

Dat het delignificeren bij methode III wel voldoende ver is voortgezet, blijkt uit het feit, dat met deze methode het hoogste rendement aan pentosen – die toch de voornaamste componenten van de hemicellulosen vormen – wordt verkregen.

Bij methode IV is het gehalte aan pentosen weer lager (gedaald van gemiddeld 26,3 % tot gemiddeld 24,5 %). Daar de lignine met het chloriet vrij volledig verwijderd is, hetgeen blijkt uit de constante en lage hydrolyserest en uit het praktisch kleurloos zijn van de holocellulose, zijn de uitkomsten wel goed te reproduceren. Dat het pentosegehalte desondanks lager is dan bij methode III, moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan ontleding ervan door het chloordioxyde.

Methode III, waarbij de lignine door afwisselend behandelen met chloramine en aethanolamine verwijderd wordt, geeft dus het hoogste rendement aan pentosen. Hierbij is blijkbaar de lignine voldoende verwijderd om een bepaling van de suikers mogelijk te maken, terwijl de pentosen bij het delignificeren het minst worden aangetast.

Men krijgt overigens niet de indruk, dat delignificeren, volgens welke methode dan ook, verkorting van de ketenlengte van sommige polysacchariden tengevolge heeft, omdat de gehalten aan suikers, waaruit de „in 24 % kaliloog oplosbare hemicellulosen” zijn samengesteld, bij de verschillende methoden vrijwel gelijk zijn. Er heeft dus geen verschuiving naar de „in 5 % kaliloog oplosbare hemicellulosen” plaats gehad.

Het verlies aan koolhydraten door te sterk chloreren komt vooral in het xylosegehalte tot uiting. Evenals bij het hydrolyseren blijkt de xylose ook bij het delignificeren het meest kwetsbaar te zijn.

Tenslotte blijkt nog uit de cijfers voor xylose en arabinose, dat het gehalte aan hemicellulosen, die met de pectinestoffen worden geëxtraheerd, bij tarwestro niet hoog is. Met de mogelijkheid van het aanwezig zijn van deze polysacchariden in de pectinestoffen van andere voedermiddelen zal echter terdege rekening moeten worden gehouden.

VERGELIJKING VAN HET PENTOSEGEHALTE, BEPAALD MET METHODE III, MET DAT, BEREKEND UIT EEN FURFURALBEPALING

Aan de hand van de uitkomsten bij de verschillende methoden verkregen, is nu vastgesteld, dat met methode III het hoogste rendement aan koolhydraten wordt verkregen. De vraag blijft echter of de gevonden gehalten ook de juiste zijn. Op deze vraag is voorlopig niet met zekerheid een antwoord te geven. Er is namelijk, zoals in de inleiding reeds naar voren werd gebracht, geen standaardmethode ter vergelijking. De enige mogelijkheid is een bepaling van de pentosen door middel van furfuralafplitsing. Deze bepaling is op zichzelf niet zeer betrouwbaar, omdat ook andere stoffen dan pentosen, zoals uronzuren, furfural af kunnen splitsen. Bovendien wordt de uitkomst ook enigszins beïnvloed door de wijze van uitvoeren. Om aan dit laatste bezwaar tegemoet te komen, zijn de furfuralbepalingen uitgevoerd op een laboratorium, waar men een ruime ervaring met de methode heeft ¹⁾. Het furfuralgehalte werd bepaald volgens de methode van ADAMS en CASTAGNE (3) op een monster van het „uitgangsmateriaal”, op een monster holocellulose bereid volgens methode III, waarbij dus de

¹⁾ De furfuralbepalingen werden uitgevoerd door de scheikundige afdeling van het Centraal Instituut voor Landbouwkundig Onderzoek, waarvoor ik Dr DEUS hartelijk dank zeg.

lignine verwijderd is met chloramine en aethanolamine, en op een monster holocellulose bereid volgens methode IV, waarbij de lignine verwijderd is met chloordioxyde.

Theoretisch zou 64 mg furfural overeenkomen met 100 mg xylose. ADAMS en CASTAGNE vonden echter, dat slechts 90 % van deze theoretische hoeveelheid wordt gevormd. Daar dit percentage constant is, kan bij de berekening voor het tekort een correctie worden aangebracht.

Op deze wijze berekend werden de volgende gehalten aan pentosen gevonden:

in het „uitgangsmateriaal”	27,8 %
in holocellulose methode III	23,7 %
in holocellulose methode IV	25,4 %

Volgens de chromatografische methode is uit de som van de gehalten in de verschillende fracties gevonden:

volgens methode III	26,2 %
volgens methode IV	24,5 %

Het pentosegehalte, voor methode III uit het furfuralgehalte berekend (23,7 %), is belangrijk lager dan dat bij de chromatografische bepaling gevonden (26,2 %). Mogelijk bevindt zich in de holocellulose na het chloreren een stof, die de furfuralbepaling stoort. Hierin ligt een aanwijzing om de uitkomst van een furfuralbepaling met enige reserve te aanvaarden.

Vergelijken wij het gehalte bij methode III na chromatografische bepaling gevonden (26,2 %) met het gehalte in het „uitgangsmateriaal” uit het furfuralgehalte berekend (27,8 %), dan vinden wij een verschil van 1,6 %. Bij de chromatografische methode is echter een deel van de xylose niet mee bepaald, namelijk de xylose, die aan het glucuronzuur gebonden is (zie blz. 135). Volgens BISHOP (18) bedraagt het uronzuurgehalte van de hemicellulosen ongeveer 7,9 %. Wanneer aan ieder molecuul glucuronzuur één molecuul xylose gebonden blijft, zou dus het gehalte aan niet mee bepaalde xylose uit dit aldobiuronzuur 6,7 % van de hemicellulosen bedragen, dat is 1,6 % van het „uitgangsmateriaal”. Dit is juist het verschil tussen het pentosegehalte volgens de furfuralmethode in het „uitgangsmateriaal” bepaald en dat, volgens de chromatografische methode bepaald in de verschillende fracties, zoals deze volgens methode III werden geïsoleerd.

Hieruit kan de conclusie getrokken worden, dat bij het delignificeren volgens methode III geen koolhydraten verloren gaan. De bruikbaarheid van de methode wordt dus slechts beïnvloed door het gehalte aan glucuronzuur in de hemicellulosen, omdat dit een aequimoleculaire hoeveelheid xylose aan de bepaling onttrekt.

HOOFDSTUK VI

DE BEPALING VAN DE CELWANDBESTANDDELEN
VAN RUWVOEDERS

INLEIDING

In het voorafgaande is een methode uitgewerkt, waarmee de verschillende polysacchariden in het met alcohol-benzeen behandelde tarwestro kunnen worden bepaald.

Het doel van dit onderzoek is echter een methode te vinden, volgens welke deze polysacchariden bepaald zouden kunnen worden in veevoeders, in het bijzonder in de celstofrijke, de zogenaamde ruwvoeders. Het tarwestro wordt daarbij als uitgangsmateriaal gekozen, omdat het een geschikte representant is voor deze groep.

Er moet nu dus nog worden nagegaan of deze methode met goed gevolg ook op de andere ruwvoeders kan worden toegepast.

Tot de meest belangrijke ruwvoeders behoren wel de hooi- en strosoorten. Van de strosoorten heb ik behalve tarwestro nog het stro van haver, gerst en rogge in dit onderzoek betrokken. Tevens heb ik een monster hooi van een weide uit Friesland en één van een weide uit Limburg onderzocht en bovendien een monster kunstmatig gedroogd gras.

Het materiaal, waarvan bij de bepaling van de polysacchariden wordt uitgegaan, bestaat echter niet alleen uit polysacchariden. Bij de voorafgaande extractie met alcohol-benzeen zijn de oplosbare koolhydraten, de vetten en de kleurstoffen verwijderd. In het achtergebleven residu, het „uitgangsmateriaal”, komen naast de polysacchariden nog voor de asbestanddelen, de eiwitten en de lignine.

Voor het verkrijgen van een goed inzicht in de samenstelling van dit „uitgangsmateriaal” is het nodig ook deze bestanddelen te bepalen. Voor de hierboven genoemde ruwvoeders zijn dus de bepalingen van de polysacchariden aangevuld met die van de asbestanddelen, de eiwitachtige stoffen en de lignine.

DE BEPALING VAN DE ASBESTANDDELEN EN DE EIWITACHTIGE STOFFEN

De bepaling van de asbestanddelen wordt op de gebruikelijke wijze uitgevoerd. Het gehalte aan eiwitachtige stoffen wordt berekend door het stikstofgehalte van het „uitgangsmateriaal” te vermenigvuldigen met 6,25. Deze berekening geschiedt op grond van het internationale gebruik. Het stikstofgehalte wordt met de Kjeldahl-methode bepaald. De gehalten worden berekend als procent van het „uitgangsmateriaal”.

DE BEPALING VAN DE LIGNINE

Ofschoon de grondslag voor de ligninebepaling reeds in 1923 door KLASON werd gelegd, staan thans nog verschillende opvattingen over de uitvoering ervan tegenover elkaar. Deze tegenstrijdigheden vinden hun oorzaak in het feit, dat de structuur van lignine nog steeds niet is opgehelderd, hetgeen BRAUNS in 1952 doet opmerken, dat als gevolg daarvan een definitie voor lignine in kwantitatieve zin niet kan worden gegeven en hierdoor het uitwerken van een bevredigende bepalingsmethode niet mogelijk is.

Het is vrij zeker, dat bij het kwantitatief isoleren van de lignine veranderingen in de samenstelling ervan optreden. BRAUNS (19) constateerde daarbij een verlies van $\pm 8\%$ vergeleken bij lignine, die voor kwalitatieve doeleinden onder zeer milde omstandigheden was geïsoleerd. Sommige onderzoekers (CHARLET-LERY, FRANÇOIS en LEROY [25]) brengen een correctie voor dit verlies aan.

Aan de andere kant kan soms een te hoog cijfer voor het ligninegehalte worden gevonden, doordat pentosanen en eiwitten bij het isoleren van de lignine humificeren tot lignineachtige stoffen, die meebepaald worden.

Het principe van de KLASON-ligninebepaling berust op het verwijderen van alle andere bestanddelen uit het plantenmateriaal, waarna de lignine als rest wordt gewogen. De in de lignine achterblijvende minerale bestanddelen worden daarna door verassen bepaald en in mindering van het ligninegehalte gebracht.

Bij de bepaling worden eerst de vetten, de kleurstoffen en soortgelijke verbindingen geëxtraheerd met een organisch oplosmiddel. Daarna worden de koolhydraten en de eiwitten door hydrolyse verwijderd. Daar ook de moeilijk te hydrolyseren cellulose moet worden verwijderd, wordt deze hydrolyse uitgevoerd met sterk zuur. Bij de KLASON-ligninebepaling gebeurt dit met 72% zwavelzuur gedurende 2 uur bij kamertemperatuur. Omdat de omzetting van de pentosanen en de eiwitten in lignineachtige verbindingen juist bij deze behandeling met sterk zuur plaats heeft, moeten deze stoffen dus tevoren verwijderd zijn. De pentosanen kunnen gemakkelijk verwijderd worden door een voorafgaande hydrolyse met verdund zuur. De eiwitachtige stoffen blijken door een dergelijke voorbehandeling niet volledig te worden verwijderd. De lignine, die na de daaropvolgende hydrolyse met sterk zuur achterblijft, blijkt namelijk een zekere hoeveelheid stikstof te bevatten. Daar lignine zelf een stikstofvrije verbinding is, wordt de herkomst van deze stikstof toegeschreven aan resten van eiwitachtige stoffen. PALOHEIMO (74) stelde daarom voor een correctie van $N \times 6,25$ voor het achtergebleven eiwit aan te brengen. NORMAN en JENKINS (72) menen echter, dat, indien er eiwitachtige stoffen in de lignine achterblijven, deze gedenatureerd zijn, zodat door het aanbrengen van een correctie van $N \times 6,25$ een grotere fout zou worden gemaakt dan door het verwaarlozen van deze geringe hoeveelheid stikstofhoudende verbindingen. DE MAN en DE HEUS (61) komen bij een onderzoek van grassen daarentegen tot de slotsom, dat de N-houdende bestanddelen, die in de lignine worden gevonden, toch wel dezelfde samenstelling hebben als het oorspronkelijk graseiwit. CRAMPTON en MAYNARD (29) en ELLIS, MATRONE en MAYNARD (35) vinden, dat de eiwitten beter verwijderd kunnen worden door op het materiaal een digestie met pepsine en zoutzuur toe te passen. MANNING en DE LONG (62) en NORMAN en JENKINS (72) komen daarentegen tot de conclusie, dat een bewerking met pepsine de fout in de ligninebepaling wel doet verminderen, maar dat hetzelfde kan worden bereikt door hydrolyse met verdund zuur. Ook BRAUNS (19) vermeldt, dat pogingen om de eiwitachtige stoffen door middel van een biologische behandeling te verwijderen, niet succesvol waren.

Samenvattend kan dus worden gezegd, dat door een voorafgaande hydrolyse met verdund zuur het storend effect van de pentosanen en de eiwitten grotendeels kan worden voorkomen en dat het niet bewezen is, dat het aanbrengen van een correctie van $N \times 6,25$ voor resten eiwit in de lignine noodzakelijk is.

Bij de ligninebepaling wordt door mij daarom alleen een hydrolyse met verdund zuur als voorbehandeling toegepast, terwijl géén correctie voor het achtergebleven eiwit wordt aangebracht.

De bepaling wordt evenals de andere bepalingen uitgevoerd met het „uitgangsmateriaal”.

1 gram van het „uitgangsmateriaal” wordt dan in een erlenmeyer aan een opstijgende koeler gekookt met 150 ml 5% zwavelzuur, totdat het schuimen van de eiwitten heeft opgehouden. Dit duurt meestal ± 3 uur. Na affiltreren op een glasfilter wordt het residu overgebracht in een bekeerglas van 50 ml en wordt er 20 ml zwavelzuur van 72% aan toegevoegd. Het mengsel blijft bij kamertemperatuur 2 uur staan, terwijl herhaaldelijk wordt omgeroerd. Vervolgens wordt het mengsel uitgegoten in 75 ml water in een erlenmeyer en wordt het bekeerglas nagespoeld met nog 50 ml water, dat bij de eerste 75 ml wordt gevoegd. Na goed omschudden wordt het mengsel door een glazen filterkroes gefiltreerd, waarna het residu met 50 ml 3% zwavelzuur wordt overgebracht in een erlenmeyer, waarin het 2 uur aan een opstijgende koeler wordt gekookt. Het mengsel wordt nog warm door een filter met bekend asgehalte afgefiltreerd. Het residu wordt met water gewassen, bij 100 °C gedroogd en gewogen. Daarna wordt het met het filter verast. Het gewicht van het residu verminderd met het gewicht van de as is het gewicht van de lignine.

Het gehalte aan lignine wordt weer berekend als percentage van de droge stof van het „uitgangsmateriaal”.

RESULTATEN

In tabel 13 (blz. 164) zijn de uitkomsten bijeengebracht van deze bepalingen en van de percentages aan samenstellende suikers in de polysacchariden, geïsoleerd en bepaald volgens methode III.

Het gehalte aan pectinestoffen is in deze tabel opgegeven als de som van de pectine en de begeleidende polysacchariden. Uit een afzonderlijk onderzoek (zie tabel 14, blz. 164) was namelijk gebleken, dat de gehalten aan deze polysacchariden bij de onderzochte voeders zeer gering waren.

DISCUSSIE

Uit de in tabel 13 vermelde uitkomsten kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

De strosoorten vertonen onderling een grote overeenkomst wat hun samenstelling betreft. Eenzelfde onderlinge overeenkomst vinden wij bij de hooisoorten. Er is daarentegen een duidelijk verschil waar te nemen tussen de strosoorten en de hooisoorten.

In het stro zijn de percentages aan eiwitten en pectinestoffen lager, terwijl de gehalten aan lignine, xylose en cellulose aanmerkelijk hoger zijn dan bij de hooisoorten.

Het kunstmatig gedroogd gras, dat steeds in een jonger stadium wordt geoogst dan het hooi, heeft in dit geval zelfs een bijzonder hoog eiwitgehalte. Ook het gehalte aan pectinestoffen is hoger dan bij het hooi. Bij het ouder worden van het gewas nemen blijkbaar de gehalten aan eiwitten en pectinestoffen af. Dit gaat niet alleen gepaard met een stijging van het ligninegehalte maar ook met een stijging van de gehalten aan xylose en cellulose.

Om een indruk te krijgen of nu met de gevolgde analysemethode de belangrijkste bestanddelen van het „uitgangsmateriaal” van de onderzochte ruwvoeders zijn bepaald, is in de tabel ook het totaal van de bestanddelen, die werden bepaald, aangegeven.

TABEL 13. Samenstelling van het „uitgangsmateriaal” van enige hooi- en strosoorten.
Composition of the „starting material” of different kinds of hay and straw.

	pct. van het uitgangsmateriaal (pct. of starting material)						
	tarwestro wheat straw	haverstro oat straw	gerwestro barley straw	roggestro rye straw	hooi Friesland hay Friesland	hooi Limburg hay Limburg	kunstmatig gedroogd gras artificial dried grass
asbestanddelen <i>mineral matter</i>	9,0	9,3	8,7	6,3	9,2	12,4	13,1
eiwitachtige stof <i>proteins</i>	2,1	2,8	1,6	3,0	11,3	12,6	28,3
lignine <i>lignin</i>	13,0	14,1	12,3	14,1	10,8	8,5	6,4
pectinestoffen <i>pectic substances</i>	1,6	1,9	1,5	1,0	4,8	3,8	5,5
in 5% KOH oplosbare hemicellulosen <i>in 5% KOH soluble hemicelluloses</i>							
galactose	0,5	0,4	0,5	0,5	1,0	0,6	0,7
glucose	0,8	0,5	0,6	0,8	1,2	0,8	1,2
arabinose	2,3	2,6	2,3	2,6	2,9	2,9	2,4
xylose	18,1	16,2	18,3	18,5	13,9	13,1	6,2
in 24% KOH oplosbare hemicellulosen <i>in 24% KOH soluble hemicelluloses</i>							
galactose	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
glucose	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5
arabinose	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4
xylose	3,6	3,5	3,6	3,5	2,2	2,2	1,6
celluloseresidu <i>cellulose-residue</i>							
glucose	2,4	2,2	1,8	2,3	1,3	0,8	0,8
arabinose	0,6	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,2
xylose	1,0	1,0	0,8	1,2	0,8	0,9	0,3
hydrolyserest (in hoofdzaak cellulose) (mainly cellulose)	37,5	37,9	37,5	41,3	27,5	29,9	21,2
totaal	93,4	93,8	91,0	96,6	88,4	90,2	89,0

TABEL 14. Suikers na hydrolyse bepaald in de pectinestoffen van enige hooi- en strosoorten.
Sugars determined after hydrolysis in the pectic substances of different kinds of hay and straw.

	pct. van het uitgangsmateriaal (pct. of starting material)						
	tarwestro wheat straw	haverstro oat straw	roggestro barley straw	gergestro rye straw	hooi Friesland hay Friesland	hooi Limburg hay Limburg	kunstmatig gedr. gras artificial dried grass
galactose	0,07	0,16	—	0,23	0,23	0,18	0,26
glucose	0,94	0,39	—	0,13	0,13	0,09	0,20
arabinose	0,09	0,17	0,03	0,14	0,65	0,87	0,75
xylose	0,08	0,07	—	0,09	0,06	0,10	0,20

Voor de meeste onderzochte ruwvoerders blijkt de som van deze bestanddelen 90 tot 94% van het „uitgangsmateriaal” te bedragen. De overige 6 tot 10% worden gevormd door de methyl-, de acetyl- en de uronzuurgroepen (ADAMS en CASTAGNE [4, 6]), die aan de hemicellulosen en de cellulose gebonden zijn. Deze gaan bij de extractie met loog en bij de hydrolyse met zuur verloren. Voorts maakt ook de xylose uit het aldobiuronzuur, die, zoals wij gezien hebben, niet bepaald kon worden, een deel van deze 6 tot 10% uit.

Bij de hooisoorten en het kunstmatig gedroogd gras komt behalve de reeds genoemde bestanddelen nog 2 tot 5% fructosaan in het „uitgangsmateriaal” voor. Dit fructosaan is voor de voedingswaarde zeker van belang. In hoofdstuk VII wordt een gehaltebepaling ervoor aangegeven.

HOOFDSTUK VII

HET ONTWIKKELEN VAN EEN VERKORTE METHODE

INLEIDING

Ofschoon de door mij uitgewerkte methode om de verschillende polysacchariden uit het celwandmateriaal van hooi en stro te isoleren en te bepalen voor wetenschappelijke doeleinden goede uitkomsten blijkt te geven, is deze methode te tijdrovend om voor routineonderzoek in aanmerking te komen. Bovendien worden alleen maar de bestanddelen van de „ruwe celstof” er volledig mee bepaald. De groep van de „overige koolhydraten” bevat echter naast hemicellulosen, cellulose en lignine ook nog de in water oplosbare koolhydraten.

Thans zal worden nagegaan in hoeverre het mogelijk is de in het voorafgaande beschreven methode te verkorten en te combineren met een bepaling van de in water oplosbare koolhydraten.

DE BEPALING VAN DE IN WATER OPLOSBARE KOOLHYDRATEN

Tot deze koolhydraten behoren glucose, fructose, saccharose en enige andere oligosacchariden, die in zeer geringe hoeveelheden voorkomen, alsook fructosaan.

Bij de extractie met alcohol-benzeen gaan glucose, fructose en saccharose mee in oplossing. Het fructosaan blijft echter in het „uitgangsmateriaal” achter. Ofschoon in hooi en kunstmatig gedroogd gras fructosaan voorkomt, werd in de hydrolysaten van de verschillende uit het „uitgangsmateriaal” geïsoleerde fracties geen fructose gevonden. Vermoedelijk gaat het fructosaan verloren bij de bereiding van de holocellulose. Het moet dus evenals glucose, fructose en saccharose in het niet behandelde materiaal worden bepaald. Dit kan eenvoudig geschieden door het gemalen hooi eerst te extraheren met 90% alcohol, waarbij glucose, fructose en saccharose in oplossing gaan, om het fructosaan daarna uit het residu met kokend water op te lossen. Na verwijderen van de alcohol uit de oplossing van de mono- en disacchariden worden deze in water opgenomen, waarna de oplossing geklaard wordt. Vervolgens worden de gehalten aan suikers berekend uit het reducerend vermogen vóór en na hydrolyse (DE MAN en DE HEUS [60]). Indien men dit zou verkiezen kunnen de suikers ook papierchromatografisch in de geklaarde oplossing worden bepaald (LAIDLAW

en REID [59]). Met het door mij gebruikte solvens n-butanol-aethanol-water 7-2-2 kunnen fructose en glucose echter niet worden gescheiden. Men kan hier beter gebruik maken van het door LAIDLAW en REID aanbevolen solvens aethylacetaat-azijnzuur-water 3-1-3.

Het fructosaan wordt in de met kokend water verkregen oplossing na hydrolyse bepaald door middel van een kleuring met resorcinol, glycerol en zoutzuur. Deze kleuring wordt alleen door fructose gegeven, zodat kleine hoeveelheden arabinose, afkomstig van arabaan, dat ook in kokend water oplosbaar is, de bepaling niet storen (WYLAM [115]).

HET VERKORTEN VAN DE METHODE

De gehele bepaling volgens de onverkorte methode omvat zes handelingen:

1. De extractie met alcohol-benzeen, ter verwijdering van oplosbare koolhydraten, vetten en kleurstoffen.
2. De extractie met een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing, voor het isoleren van de pectinestoffen.
3. Het delignificeren met chloramine en aethanolamine, waardoor de holocellulose wordt verkregen.
4. Het isoleren van de „in 5 % kaliloog oplosbare hemicellulosen” uit de holocellulose.
5. Het isoleren van de „in 24 % kaliloog oplosbare hemicellulosen”, waarbij de cellulose als residu achterblijft.
6. De chromatografische bepalingen van de samenstellende suikers uit de bij 4 en 5 verkregen hemicellulosen.

Hiervan zijn de onder 4 en 5 genoemde bewerkingen het meest tijdrovend, daar de beide extracties met loog elk gedurende 4 maal 24 uur moeten worden uitgevoerd. Het afzonderlijk isoleren van de beide hemicellulosefracties en het celluloser residu is bij het beschreven onderzoek hoofdzakelijk uitgevoerd om de gevolgen van de verschillende manieren van delignificeren nauwkeurig te kunnen bestuderen. Voor een voederanalyse is het misschien voldoende om de totaalgehalten aan xylose, arabinose en hexosen te weten. In de holocellulose, die door het delignificeren verkregen wordt, zijn alleen nog maar de cellulose en de hemicellulosen aanwezig. Hiervan kunnen de hemicellulosen gehydrolyseerd worden met N zwavelzuur, waarbij de cellulose intact blijft.

Om na te gaan of inderdaad door hydrolyseren van de holocellulose dezelfde gehalten aan xylose, arabinose en hexosen worden gevonden als bij de bepaling van de suikers in de geïsoleerde hemicellulosefracties en het celluloser residu, heb ik van tarwestro 100 mg holocellulose gedurende 2 uur bij 100 °C gehydrolyseerd met 1 ml N zwavelzuur en in het hydrolysaat de suikers papierchromatografisch bepaald.

Daar het gehalte aan galactose bij de meeste voeders zeer laag is en dus de fout in de chromatografische bepaling ervan relatief hoog, leek het mij beter de som van glucose en galactose te bepalen. Dit is mogelijk, omdat beide suikers hexosen zijn en dus naast elkaar op het chromatogram voorkomen, terwijl ook het reductievermogen gelijk is, zodat bij de meting glucose als standaard voor het mengsel van galactose en glucose kan worden gebruikt.

De gevonden gehalten aan xylose, arabinose en hexosen waren lager dan de som van de gehalten bepaald in de twee hemicellulosefracties en het celluloser residu (zie tabel 15).

TABEL 15. Suikers bepaald in:

I Het hydrolysaat van de holocellulose.

II De hydrolysaten van de hemicellulosefracties en het celluloser residu.

*Sugars determined in:**I The holocellulosehydrolysate.**II The hydrolysates of the hemicellulosemixtures and the cellulose-residue.*

pct. van het uitgangsmateriaal (<i>pct. of the starting material</i>)		
	I	II
glucose + galactose	1,6	4,1
arabinose	2,8	3,4
xylose	16,4	22,7
hydrolyserest (in hoofdzaak cellulose) . .	53,7	37,5
residue (<i>mainly cellulose</i>)		
totaal	74,5	67,7

Uit deze cijfers blijkt, dat de polysacchariden minder gemakkelijk gehydrolyseerd worden in de holocellulose dan in de geïsoleerde hemicellulosefracties. De lignine is in de holocellulose niet meer aanwezig en kan dus geen belemmering voor de hydrolyse vormen. Naast de hemicellulosen komt alleen nog cellulose in de holocellulose voor. Men krijgt daarom de indruk, dat het de cellulose is, die in de holocellulose de volledige hydrolyse van de hemicellulosen verhindert. Het hoge gehalte aan hexosen en de geringe hydrolyserest, die na het isoleren van de hemicellulosefracties worden gevonden, wijzen erop, dat de cellulose door de langdurige behandeling met loog een verandering ondergaat, waardoor een deel ervan met verdund zuur kan worden gehydrolyseerd. Blijkbaar komen bij dit proces tevens hemicellulosen vrij, zoals uit de verhoging van de gehalten aan xylose en arabinose valt op te maken. Mogelijk kunnen dus meer overeenstemmende gehalten worden gevonden, wanneer de holocellulose eerst enkele uren met loog wordt behandeld, voordat de hydrolyse met verdund zwavelzuur wordt uitgevoerd.

Om dit te onderzoeken heb ik telkens 100 mg holocellulose eerst aan een opstijgende koeler respectievelijk met 5%, 10% en 24% loog gedurende 2 uur gekookt. Vervolgens werd aan de mengsels een hoeveelheid 72% zwavelzuur toegevoegd, waarmee de zuurgraad volgens berekening op 1 N kwam. Daarop werd nog 2 uur gehydrolyseerd, waarna de suikers papierchromatografisch werden bepaald.

De gevonden gehalten zijn in tabel 16 (blz. 168) samengebracht.

Uit deze cijfers blijkt, dat een korte tijd koken met loog niet dezelfde uitwerking op de cellulose heeft als een langdurige behandeling ermee bij kamertemperatuur, zoals die bij methode III werd toegepast. Wel stijgt het gehalte aan xylose iets bij gebruik van sterkere loog, terwijl de hydrolyserest in gewicht afneemt, het gehalte aan glucose + galactose blijft echter laag. Na de langdurige behandeling met loog bij kamertemperatuur is de hydrolyserest zeer klein. De daling van de hydrolyserest gaat hier niet alleen gepaard met een stijging van het gehalte aan xylose maar ook van dat aan glucose. Men krijgt de indruk, dat door de langdurige inwerking van de loog de oplosbaarheid van de cellulose uit de hydrolyserest toeneemt, waardoor ook de hemicellulosen daaruit vrij komen en oplossen. Deze opgeloste cellulose kan in tegenstelling tot de achterblijvende gemakkelijk worden gehydrolyseerd. Mogelijk wordt de cel-

TABEL 16. Suikers bepaald in de hydrolysaten van met loog behandelde holocellulose, in pct. van het „uitgangsmateriaal”.

Sugars determined in the hydrolysates of the holocellulose after treatment with caustic soda, in pct. of the „starting material”.

conc. loog alk. conc.	0 %	5 %	10 %	24 %	hemic. fracties + cell. residu, zie tabel 15 methode III
behandeling treatment	2 uur 2 hours	2 uur 2 hours	2 uur 2 hours	2 uur 2 hours	hemic. mixture + cell. residue, see table 15 method III
glucose + galactose	1,6	1,7	1,7	1,8	4,1
arabinose	2,8	2,8	3,4	3,1	3,4
xylose	16,4	15,2	19,5	18,9	22,7
hydrolyserest	53,7	47,5	42,7	43,9	37,5
residue of hydrolysis					
totaal	74,5	67,2	67,3	67,7	67,7

lulose door de langdurige behandeling met loog tot kortere ketenlengte afgebroken, waardoor een deel ervan oplosbaar wordt.

Men kan zich nu afvragen op welke wijze de hemicellulosen daarbij vrijkomen. Het is mogelijk, dat zij alleen maar door de cellulose waren ingesloten en door het oplossen daarvan vrijkomen. In dat geval heeft het zin om door een langdurige behandeling met loog de cellulose af te breken om de hemicellulosen te kunnen bepalen. Indien echter deze hemicellulosen chemisch gebonden zijn aan de cellulose, zou het misschien beter zijn het gehele complex als natuurlijke cellulose te beschouwen, zoals NORMAN dit doet. Door de langdurige behandeling met loog wordt deze natuurlijke cellulose beschadigd, zodat er een kunstmatige en betrekkelijk willekeurige scheiding van celwandbestanddelen plaats vindt. Het is voor een verkorte methode dan wellicht beter de oplosbare (niet gebonden) hemicellulosen te bepalen door hydrolyseren van de holocellulose met verdund zuur zonder voorafgaande behandeling met loog. Als hydrolyserest zou dan een cellulosecomplex overblijven, bestaande uit zuivere cellulose en daaraan gebonden hemicellulosen.

Of er inderdaad een chemische binding tussen cellulose en hemicellulosen bestaat, valt niet met zekerheid uit de literatuur op te maken, niettegenstaande verschillende onderzoekers zich reeds met dit probleem hebben bezig gehouden.

Voor jutevezels stelden SARKAR, MAZUMDAR en BAL (91) namelijk vast, dat de α -cellulose, uit chloriet-holocellulose bereid, geen xyloaan bevat. Zij kwamen tot die conclusie, omdat de α -cellulose van jute bij destillatie met zoutzuur niet méér furfural leverde dan zuivere katoencellulose en omdat na volledige hydrolyse van de α -cellulose met 72 % zwavelzuur chromatografisch geen xylose of andere suikers dan glucose konden worden aangetoond. DAS, MITRA en WAREHAM (30) toonden daarentegen aan, dat na hydrolyseren van de α -cellulose van jute gedurende twaalf minuten bij 135 °C met 85 % mierenzuur en chromatograferen van het hydrolysaat, behalve glucose ook xylose en arabinose duidelijk te zien waren. Bovendien namen zij enige vlekken waar van oligosacchariden, die na elueren en hydrolyseren uit xylose, arabinose en glucose bleken te bestaan, op grond waarvan zij tot een chemische binding tussen xylose en glucose besloten. MAZUMDAR en SARKAR (63) konden dit experiment echter niet bevestigen en bleven bij hun conclusie, dat de α -cellulose van jute geen xyloaan bevat.

ADAMS en CASTAGNE (8) onderzochten hemicellulosen van tarwestro. Door gefractioneerde precipitatie van geacetylerde hemicellulosen konden zij een

fractie verkrijgen, die alleen uit xylose en arabinose bestond. Hiermee was aangetoond, dat glucose en galactose in deze fractie niet aan het xylaan gebonden zijn. Later is door ADAMS (8) aangetoond, dat arabinose wel aan xylaan gebonden er in voorkomt. Met deze onderzoeken is mijns inziens alleen aangetoond, dat er xylaanketens voorkomen, waaraan geen glucose gebonden is. Er is echter niet mee bewezen, dat een chemische binding tussen xylose en glucose niet zou bestaan.

ADAMS en BISHOP (2) schonken ook hun aandacht aan de α -cellulose van het tarwestro en toonden aan, dat xylose en arabinose daarin voorkomen. Hiertoe werd de α -cellulose gehydrolyseerd met 72 % zwavelzuur. Na verdunnen en instellen van de juiste pH werd de glucose met deoxygenase verwijderd. Door chromatograferen van de oplossing werden daarna xylose en arabinose aangetoond. Zij vermoedden, dat dit xylaan, dat dus in de α -cellulose voorkomt, van hetzelfde type is als het door ADAMS (8) beschreven araboxylaan uit de hemicellulosen. Bij dit onderzoek werd in het midden gelaten of het xylaan chemisch gebonden is aan de cellulose of op een andere manier ermee is verbonden.

Het lijkt mij, gezien de ervaringen met het hydrolyseren van de holocellulose, niet onmogelijk, dat een deel van het xylaan, zoals ADAMS en CASTAGNE aan-toonden, vrij voorkomt en dat een ander deel van het xylaan aan cellulose gebonden is. Wanneer de holocellulose met verdunde loog wordt behandeld, gaat het oplosbare deel van de cellulose (waarschijnlijk een laagmoleculaire vorm) tezamen met de vrij voorkomende hemicellulosen in oplossing. Het xylaan, dat aan deze cellulose gebonden is, gaat mee in oplossing. Bij behandelen met sterke loog gaat weer een deel van de cellulose in oplossing en daarmee ook weer het daaraan gebonden xylaan. Tenslotte blijft de hoogmoleculaire cellulose over, waaraan ook nog enige xylaanketens gebonden zijn, die dus eveneens in het residu achterblijven. Blijkbaar is deze rest xylaan (volgens ADAMS en BISHOP araboxylaan) niet door cellulose ingesloten, daar het mogelijk is de xylose en de arabinose door eenvoudige hydrolyse met verdund zuur uit het cellulose-residu vrij te maken. Of deze vormen van cellulose met verschillende oplosbaarheid in loog gepreformeerd aanwezig zijn of dat zij gedeeltelijk ontstaan door de inwerking van de loog valt niet uit te maken. Opmerkelijk is in dit verband wel het verschil in glucosegehalte, dat na hydrolyse gevonden wordt in de verschillende fracties, die langdurig met loog behandeld waren (in totaal 4,1 %) en in de holocellulose, die slechts kort met loog behandeld was (1,8 %).

Indien mijn veronderstelling, dat er een chemische binding tussen xylaan en cellulose bestaat, juist is, zullen in de hemicellulosen waarschijnlijk ook xylaanketens voorkomen, die aan cellulose gebonden zijn. Om dit te onderzoeken heb ik deze hemicellulosen gedurende 10 minuten met 5 % oxaalzuur gedeeltelijk gehydrolyseerd en met het hydrolysaat enige kwalitatieve chromatogrammen gemaakt. Hierop waren behalve de vlekken van xylose en arabinose nog drie vlekken waar te nemen tussen de basislijn en de plaats van galactose. Deze vlekken waren afkomstig van oligosacchariden. Om zeker te zijn, dat zij niet door mengsels van twee stoffen gevormd waren, heb ik enkele van deze chromatogrammen beoordeeld na een looptijd van 300 uur. De vlekken vertoonden geen enkele neiging tot splitsen, zodat mag worden aangenomen, dat zij door enkelvoudige stoffen waren gevormd. Vervolgens heb ik van hetzelfde hydrolysaat enige chromatogrammen gemaakt, zoals zij voor kwantitatieve bepalingen worden gebruikt. De zones van de twee verst gevorderde vlekken werden uitgeknipt. De zones van elk van deze oligosacchariden werden tezamen in een

kleine hoeveelheid water geëluëerd. De twee eluaten werden vervolgens nog in vacuo geconcentreerd en door toevoegen van een berekende hoeveelheid 72 % zwavelzuur op ± 1 N zuur gebracht, waarna op de gebruikelijke wijze werd gehydrolyseerd. Van deze beide hydrolysaten werden weer kwalitatieve chromatogrammen gemaakt. Op beide chromatogrammen waren duidelijk de vlekken van xylose, arabinose en glucose waar te nemen. In de hemicellulosen komt dus inderdaad een araboxylaan voor, dat aan glucose gebonden is. Het is derhalve zeer goed mogelijk, dat het oorspronkelijk aan de cellulose verankerd was.

Hoe dit ook zij, het blijkt, dat het niet alleen de lignine is, die het isoleren en bepalen van de hemicellulosen bemoeilijkt. Wanneer deze eenmaal verwijderd is, blijft een deel van de hemicellulosen aan de cellulose gebonden en er door ingesloten.

Op grond hiervan zijn er twee manieren mogelijk om de uit koolhydraten samengestelde celwandbestanddelen te bepalen, namelijk volgens de in hoofdstuk II beschreven onverkorte methode III en volgens de in dit hoofdstuk beschreven verkorte methode. Bij de onverkorte methode worden alle hemicellulosen bepaald en blijft als hydrolyserest een zeer ver gezuiverde cellulose achter. Het is echter de vraag of deze hydrolyserest nog alle oorspronkelijk aanwezige zuivere cellulose bevat. Het is het alkaliresistente deel van de cellulose. Bij de verkorte methode wordt een deel van de hemicellulosen bepaald en blijft een cellulosecomplex over, bestaande uit zuivere cellulose en hemicellulosen. Of hierbij de hemicellulosen, die na hydrolyse bepaald worden, uitsluitend de vrij voorkomende hemicellulosen zijn, is niet met zekerheid vast te stellen. Het is heel goed mogelijk, dat het deel van de hemicellulosen uit het natuurlijke cellulosecomplex, dat niet door de cellulose is ingesloten, ook bij de hydrolyse wordt gesplitst.

Het is dus de vraag in hoeverre de hydrolyseresten bij de verkorte en de onverkorte methode verkregen overeenkomen met de twee vormen van cellulose, die ons uit de literatuur bekend zijn, namelijk CROSS-BEVAN-cellulose en zuivere cellulose.

Onder CROSS-BEVAN-cellulose wordt een cellulosecomplex verstaan, dat verkregen wordt door behandelen van het materiaal met chloorgas en vervolgens met natriumsulfiet. Hierbij wordt een residu verkregen, dat bestaat uit een mengsel van zuivere cellulose en hemicellulosen, dat volgens NORMAN overeenkomt met het natuurlijke cellulosecomplex. De zuivere cellulose wordt bepaald door berekening uit het gehalte aan α -cellulose door corrigeren voor de gehalten aan lignine en pentosaan.

Volgens ADAMS en CASTAGNE (5) kan het gehalte aan CROSS-BEVAN-cellulose ook worden gevonden door hydrolyseren van de holocellulose met zeer verdund zuur (0,1 N zwavelzuur). Het residu van deze hydrolyse vertoont grote overeenkomst met CROSS-BEVAN-cellulose; het bevat iets meer lignine en iets minder pentosaan.

Om te kunnen beoordelen in hoeverre het residu bij de verkorte methode verkregen overeenkomt met CROSS-BEVAN-cellulose, heb ik de holocellulose van het tarwestro gedurende 2 uur gehydrolyseerd met 0,1 N zwavelzuur. Het residu werd na uitwassen en drogen gewogen. Het gehalte eraan bedroeg 63,2 % berekend op het „uitgangsmateriaal”, d.i. $\pm 56,9$ % berekend op stro, hetgeen in overeenstemming is met het gehalte, dat ADAMS en CASTAGNE in tarwestro vonden (56,1 %). Daar de hydrolyserest bij de verkorte methode slechts 53,7 % van het „uitgangsmateriaal” bedroeg, kan hieruit worden opgemaakt, dat bij

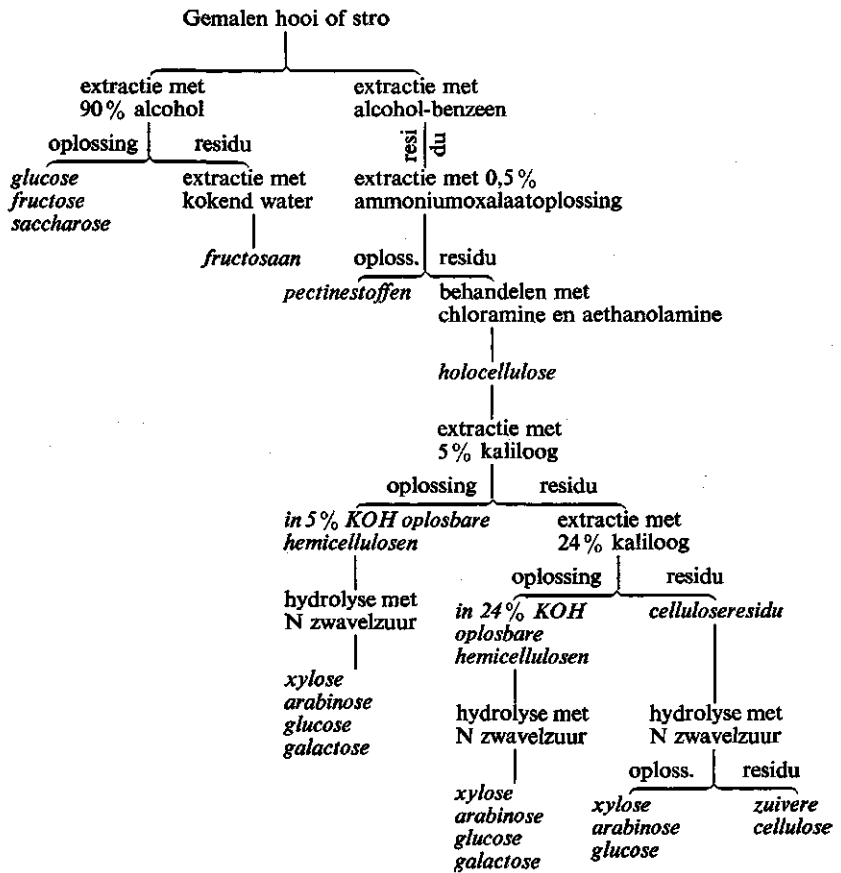
de hydrolyse met N zuur ook een deel van de hemicellulosen uit het natuurlijk cellulosecomplex wordt afgesplitst.

Het vervangen van de hydrolyse met N zuur in de verkorte methode door een hydrolyse met 0,1 N zuur teneinde als hydrolyserest de CROSS-BEVAN-cellulose te verkrijgen brengt enige moeilijkheden met zich mee. Bij hydrolyse met 0,1 N zuur worden de hemicellulosen namelijk onvolledig gesplitst, hetgeen bleek uit de chromatogrammen, die van het hydrolysaat gemaakt waren. Naast de vlekken van xylose en arabinose kwamen daarop nog vlekken voor van oligosacchariden. Om toch de suikers in zulk een hydrolysaat te kunnen bepalen zou men aan het hydrolysaat, nadat dit van het celluloserest is afgefiltreerd, zoveel 72 % zwavelzuur toe kunnen voegen, dat de zuurgraad 1 N wordt, waarop de hydrolyse nog een uur zou kunnen worden voortgezet. De interne standaard moet dan vóór de filtratie worden toegevoegd. Op deze wijze werden in het hydrolysaat gevonden 10,6 % xylose, 2,0 % arabinose en 0,8 % hexosen, berekend op het „uitgangsmateriaal”.

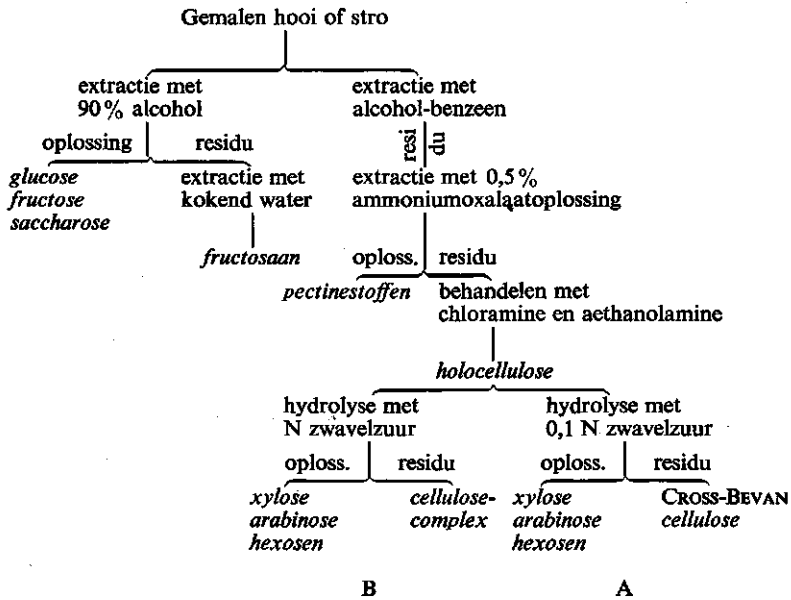
De hydrolyserest, die bij de onverkorte methode werd verkregen, komt goed overeen met het gehalte aan zuivere cellulose door ADAMS en CASTAGNE bepaald. De hydrolyserest, door mij gevonden, bedraagt 37,5 % van het „uitgangsmateriaal”, d.i. $\pm 35,6\%$ van het stro. ADAMS en CASTAGNE vonden 36,9 % zuivere cellulose in tarwestro.

Bij het hier beschreven onderzoek zijn dus verschillende mogelijkheden naar voren gekomen om de bestanddelen van de „ruwe celstof” en van de „overige koolhydraten” te bepalen. Of men hierbij de voorkeur moet geven aan de onverkorte methode (zie schema 1), waarbij alle hemicellulosen worden bepaald alsmede de zuivere cellulose, of aan een verkorte methode (zie schema 2A), waarbij door hydrolyse van de holocellulose met 0,1 N zwavelzuur de vrij voorkomende hemicellulosen en tevens CROSS-BEVAN-cellulose worden bepaald, of eventueel aan een andere verkorte methode (zie schema 2B), waarbij de holocellulose met N zuur wordt gehydrolyseerd, kan zonder meer niet worden beslist. Hiertoe zal eerst de bruikbaarheid van de gegevens, die met de verschillende methoden worden verkregen, met dierexperimenten moeten worden getoetst.

SCHEMA I. Onverkorte methode.



SCHEMA II. Twee verkorte methoden, door hydrolyse van de holocellulose met 0,1 N zwavelzuur (A) dan wel met 1 N zwavelzuur (B).



SAMENVATTING

Aangezien de onbetrouwbaarheid van de berekening der voedingswaarde van ruwvoerders uit de scheikundige analyse algemeen wordt toegeschreven aan het onvoldoende bepaald zijn van de celwandbestanddelen, werd naar een methode gezocht, waarbij deze (pectinestoffen, hemicellulosen, cellulose en lignine) afzonderlijk zouden kunnen worden bepaald. Dit onderzoek werd uitgevoerd met tarwestro.

Hierbij werd de lignine volgens de klassieke methode van KLASON bepaald. Voor de bepalingen van de pectinestoffen, hemicellulosen en cellulose werden nieuwe voorschriften opgesteld, waarbij de verschillende polysaccharidemengsels eerst worden geïsoleerd, waarna de suikers, waaruit zij zijn opgebouwd, na hydrolyse papierchromatografisch worden bepaald.

Na enige oriënterende proeven kon worden vastgesteld, dat met uitzondering van cellulose alle polysacchariden met N zwavelzuur bij 100 °C kunnen worden gehydrolyseerd en dat bij een hydrolysetijd van 2 tot 3 uur geen ontleding van de vrijkomende suikers plaats vindt.

Bij de papierchromatografische bepaling werd de afdalende methode gebruikt met als solvens een mengsel van n-butanol-aethanol-water (7-2-2) en als indicator anilinephosfaat, bij gebruik waarvan het niet nodig bleek te zijn de hydrolysaten vóór het chromatograferen te neutraliseren. De suikers werden na uitknippen van de desbetreffende zones en elueren bepaald met de methode SOMOGYI-NELSON.

Uit tarwestro, dat na een voorbehandeling met alcohol-benzeen (1-2) als „uitgangsmateriaal” diende, werden achtereenvolgens pectinestoffen, hemicellulosen en cellulose geïsoleerd.

DE PECTINESTOFFEN

Deze werden geëxtraheerd met een 0,5 % ammoniumoxalaatoplossing. Hierbij wordt een mengsel van pectine en begeleidende polysacchariden geïsoleerd, dat $\pm 1,6\%$ van het „uitgangsmateriaal” bedraagt. Om een beter inzicht in de samenstelling van dit mengsel te verkrijgen, werden na hydrolyse de suikers, waaruit de begeleidende polysacchariden zijn samengesteld, papierchromatografisch bepaald. In de hydrolysaten werden geringe hoeveelheden galactose, glucose, arabinose en xylose gevonden. Het pectine zelf echter kon op deze wijze niet worden bepaald, omdat het galacturonzuur bij de hydrolyse wordt gedecarboxyleerd. Bij pectinerijke voeders zou het na precipitatie als calciumpectaat kunnen worden bepaald.

DE HEMICELLULOSEN

Deze kunnen pas na verwijderen van de lignine worden geïsoleerd. Omdat sommige methoden van delignificeren verlies aan koolhydraten ten gevolge kunnen hebben, werd door mij nagegaan op welke wijze het beste gedelignificeerd kan worden. Hierbij werden enige manieren van delignificeren vergeleken nl. I behandeling met 2 % natronloog in 60 % alcohol (WEIHE en PHILIPS), II delignificeren met chloramine en aethanolamine, nadat eerst een deel van de hemicellulosen was geëxtraheerd (eigen methode), III delignificeren met chloramine en aethanolamine zonder voorafgaande extractie van een deel der hemicellulosen (eigen methode) en IV delignificeren met chloordioxyde (WISE,

MURPHY en D'ADDIECO). Uit de hemicellulosen, die vervolgens door extractie met 5 % en met 24 % kaliloog waren geïsoleerd, werden weer de suikers na hydrolyse papierchromatografisch bepaald.

Het bleek, dat het delignificeren met chloramine en aethanolamine volgens methode III het hoogste rendement aan koolhydraten geeft (0,5 % galactose, 1,1 % glucose, 2,8 % arabinose en 21,7 % xylose berekend op het „uitgangsmateriaal”) en dat hierbij geen koolhydraten verloren gaan. Ook heeft het delignificeren geen verkorting van de ketenlengte der polysacchariden ten gevolge.

HET CELLULOSERESIDU

Het residu, dat overblijft na extraheren van de pectinestoffen, verwijderen van de lignine en extraheren van de hemicellulosen, blijkt niet enkel uit zuivere cellulose te bestaan, maar uit een mengsel van cellulose (37,5 % van het „uitgangsmateriaal”) en polymeren van arabinose (0,6 % van het „uitgangsmateriaal”) en xylose (1,0 % van het „uitgangsmateriaal”).

De methode III, die voor het tarwestro goede uitkomsten bleek te geven, werd vervolgens toegepast op stro van haver, rogge en gerst, op twee soorten hooi en op kunstmatig gedroogd gras, waarbij behalve de pectinestoffen, de suikers uit de hemicellulosefracties en die achtergebleven in het celluloser residu en daarnaast de zuivere cellulose, die het hoofdbestanddeel van dit residu vormt, tevens werden bepaald: lignine, eiwitachtige stoffen en asbestanddelen. Bij al deze voeders bleek de som van de bepaalde bestanddelen 90 tot 96 % van het „uitgangsmateriaal” te bedragen, waarbij voor de hooisoorten en het kunstmatig gedroogd gras rekening is gehouden met de aanwezigheid van 2-5 % fructosaan. De overige 4-10 % worden gevormd door acetyl-, methyl- en uronzuurgroepen.

Tenslotte werden de mogelijkheden onderzocht om de methode te verkorten en te combineren met een bepaling van de oplosbare koolhydraten.

Mono- en oligosacchariden kunnen, na extractie van het gemalen voeder met 90 % alcohol, papierchromatografisch in het extract worden bepaald; het fructosaan na extractie met water door middel van een kleuring met resorcinol, glycerol en zoutzuur.

Uit proeven, waarbij getracht werd de methode te verkorten door de suikers van de hemicellulosen door direct hydrolyseren van de holocellulose (cellulose + hemicellulosen) met N zwavelzuur te bepalen, bleek, dat niet alleen de lignine maar ook de cellulose op de een of andere wijze een belemmering voor de hemicellulosebepaling vormt. Uit de verschillende percentages aan glucose en xylose, gevonden na hydrolyse van de holocellulose (resp. 1,6 % en 16,4 %) en na hydrolyse van de hemicellulosefracties, die door langdurige extractie met loog waren geïsoleerd (resp. 4,1 % en 22,7 %), werd namelijk de indruk verkregen, dat een deel van de hemicellulosen in het celluloseskelet is ingesloten en daaruit door de inwerking van de loog wordt vrijgemaakt.

Voorts gaven proeven met partiële hydrolyse een aanwijzing, dat daarnaast vermoedelijk een chemische binding tussen xylaan en cellulose bestaat.

Door deze omstandigheden is het niet mogelijk zonder voorafgaande extracties met loog alle hemicellulosen en als residu zuivere cellulose te bepalen. Wel kan door hydrolyse van de holocellulose met zeer verdund zuur het niet aan cellulose gebonden deel van de hemicellulosen worden bepaald, waarbij als residu de zgn. CROSS-BEVAN-cellulose overblijft.

SUMMARY

As the unreliability of the calculation of the feeding-value of roughages from the results of a chemical analysis must be due to an insufficient determination of the components of the cell-wall, it was tried to find out a method, making it possible to determine these components (pectic substances, hemicelluloses, cellulose and lignin) separately, in a more satisfactory way. Wheatstraw was a subject to this analysis.

Lignin was determined by Klason's classical method, whereas new methods were given for the determination of the pectic substances, the hemicelluloses and cellulose, first isolating these different polysaccharides and, after hydrolysis, analysing the sugar-components by chromatography.

After some informative experiments it turned out that, at a temperature of 100 ° C, N sulfuric acid gave a complete hydrolysis of all the polysaccharides except cellulose, whereas a 2-3 h. hydrolysis did not deteriorate the liberated sugars. In the paperchromatography of the sugars the descending method was chosen, using a mixture of n-butanol-ethanol-water (7-2-2) as a solvent and anilinephosphate as an indicator. Neutralising of the hydrolysates before the chromatographic analysis was unnecessary. After cutting out the appropriate zones, the sugars were determined, after elution, by the Somogyi-Nelson method. From wheatstraw, serving as a starting material after a pre-treatment with ethanol-benzene (1-2) the pectic substances, hemicelluloses and cellulose were successively isolated.

THE PECTIC SUBSTANCES

The pectic substances were extracted by a 0,5 w/v % solution of ammonium-oxalate. By this solvent a mixture of pectin and polysaccharides is isolated, which contains $\pm 1,6\%$ of the starting material. To gain a clear knowledge of the composition of this mixture, the sugars, components of the additive polysaccharides were - after hydrolysis - identified by paperchromatography. Small quantities of galactose, glucose, arabinose and xylose, were found. However, it was not possible to determine pectin in this manner, since galacturonic acid is decarboxylated by hydrolysis.

In fodders, being rich in pectin, it may be determined by precipitation as calciumpectate.

THE HEMICELLULOSES

Isolating the hemicelluloses is only possible after removing the lignin. Since several methods of delignifying may result in a loss in carbohydrates the most adequate method had to be devised by making a comparative analysis. Delignification was tried by:

- i) Treatment by 2 w/v % sodiumhydroxyde in 60 v/v % ethanol. (Weihe and Philips' method).
- ii) Treatment by chloramine and ethanolamine, after extracting part of the hemicelluloses.
(Method, proposed by the author).
- iii) Treatment by chloramine and ethanolamine, without previous extraction of the hemicelluloses.
(Method, proposed by the author).

iv) Delignification by chlorinedioxide.
(Wise, Murphy and d'Addieco's method).

Having isolated the hemicelluloses by extraction with 5% and with 24% potassiumhydroxyde, the sugars were estimated – after hydrolysis – by chromatography. It turned out that a delignification according to the method mentioned under III gave the best results as to the content of carbohydrates (0,5% of galactose, 1,1% of glucose, 1,8% of arabinose and 21,7% of xylose, calculated on the starting material) whereas no loss of carbohydrates was found, nor had the delignification any influence on the chain-length of the polysaccharides.

THE CELLULOSE-RESIDUE

The residue remaining after extraction of the pectic substances and removing of the hemicelluloses, is not pure cellulose, but a mixture of cellulose (32,5% of the starting material) and polymeres of arabinose (0,6%) and of xylose (1,0%).

The method III, giving good results on wheatstraw, was applied successively to oats, rye and barley, to two hay-species and to artificially dried grass. In addition to the determination of the pectic substances, of the sugars from the hemicellulose fractions, of those in the cellulose-residue as well as the pure cellulose – the principal constituent of the residue – an estimation was made of lignin, protein and ash.

Summing up the contents of the different components determined, figures between 90–96% were obtained.

In this calculation allowance is made for 2–5% fructosan, present in the hay-species as well as in the dried grass sample. The lacking 4–10% are due to acetyl-, methyl- and uronic acid-groups.

Finally an attempt was made to shorten the method and to combine with a determination of the soluble carbohydrates. After extraction of the ground fodder with 90% ethanol, mono- and oligosaccharides can be determined in the extract by paperchromatography, while after extraction with water, the fructosan is estimated by the colour reaction with resorcinol, glycerol and hydrochloric acid.

From experiments, aiming at a shortening of the method by hydrolysing with N sulfuric acid the holocellulose (cellulose and hemicellulose) and determining the sugar-components, it appeared that not only the lignin, but also the cellulose interfered in some way with the determination of the hemicelluloses. The figures for the percentages of glucose and xylose (resp. 1,6% and 16,4%) obtained after direct hydrolysis of the holocellulose and those obtained after hydrolysis of the hemicellulosefractions, prepared in the usual way after protracted extraction with sodiumhydroxide (resp. 4,1% and 22,7%) left the impression that part of the hemicelluloses is enclosed in the cellulose-skeleton and can only be liberated by the action of sodiumhydroxide.

It is not impossible that there is a chemical bond between xylan and cellulose; experiments on partial hydrolysis did give some support to this opinion. Under these circumstances it is not possible to determine all the hemicelluloses and the pure cellulose as the residue, without a preceding extraction with sodiumhydroxide.

By hydrolysis of the holocellulose with diluted acid (0,1 N) the part of the hemicelluloses that is not linked to the cellulose molecules can be determined, whereby the so called Cross-Bevan-cellulose as a residue is left.

LITERATUURLIJST

1. ADAMS, G. A., *Canad. J. Chem.* **30**, 698 (1952).
2. ADAMS, G. A. en C. T. BISHOP, *Nature* **172**, 28 (1953).
3. ADAMS, G. A. en A. E. CASTAGNE, *Canad. J. Res. B* **26**, 314 (1948).
4. ADAMS, G. A. en A. E. CASTAGNE, *Canad. J. Res. B* **26**, 332 (1948).
5. ADAMS, G. A. en A. E. CASTAGNE, *Canad. J. Res. B* **27**, 907 (1949).
6. ADAMS, G. A. en A. E. CASTAGNE, *Canad. J. Res. B* **27**, 924 (1949).
7. ADAMS, G. A. en A. E. CASTAGNE, *Canad. J. Chem.* **29**, 109 (1951).
8. ADAMS, G. A. en A. E. CASTAGNE, *Canad. J. Chem.* **30**, 515 (1952).
9. ALBON, N. en D. GROSS, *Analyst* **75**, 454 (1952).
10. ANDERSON, E.; F. H. RUSSELL en L. W. SEIGLE, *J. Biol. Chem.* **113**, 683 (1936).
11. BECKUM, W. G. VAN en G. J. RITTER, *Paper Trade J.* **104**, 49 (1937).
12. BECKUM, W. G. VAN en G. J. RITTER, *Paper Trade J.* **105**, 127 (1937).
13. BECKUM, W. G. VAN en G. J. RITTER, *Paper Trade J.* **108**, 27 (1939).
14. BECKUM, W. G. VAN en G. J. RITTER, *Paper Trade J.* **109**, 107 (1939).
15. BENNETT, E., *Anal. Chem.* **19**, 215 (1947).
16. BEVENUE, A. en K. T. WILLIAMS, *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 125 (1951).
17. BISHOP, C. T., *Canad. J. Chem.* **30**, 230 (1952).
18. BISHOP, C. T., *Canad. J. Chem.* **31**, 134 (1953).
19. BRAUNS, F. E., *The Chemistry of lignin*, New York (1952).
20. BROUWER, E., *Voeding* **10**, 8 (1949).
21. BROUWER, E. en N. D. DIJKSTRA, *Versl. Landbouwk. Onderz.* **45**, 43 (1939).
22. BROWN, R. J., *Anal. Chem.* **24**, 384 (1952).
23. BRYSON, J. L. en T. J. MITCHELL, *Nature* **167**, 864 (1951).
24. BUSTON, H. W., *Biochem. J.* **28**, 1028 (1934).
25. CHARLET-LERY, G.; A. FRANÇOIS en A. M. LEROY, *Ann. de l'I.N.R.A.* **3**, 54 (1952).
26. COLDWELL, B. B. en W. A. DE LONG, *Sci. Agric.* **32**, 99 (1952).
27. CONSDEN, R.; A. H. GORDON en A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).
28. CRAMER, F., *Papierchromatografie*, Darmstadt (1952).
29. CRAMPTON, E. W. en L. A. MAYNARD, *J. Nutr.* **15**, 383 (1938).
30. DAS, D. B.; M. K. MITRA en J. F. WAREHAM, *Nature* **171**, 613 (1953).
31. Deutsche Landwirtschafts Gesellschaft, *Futterwerttabellen*, Frankfurt/Main (1952).
32. DIETRICH, TH. en J. KONING, *Zusammensetzung und Verdaulichkeit der Futtermittel*, Berlin (1891).
33. DREYWOOD, R., *Ind. Eng. Chem. An. Ed.* **18**, 499 (1946).
34. O'DWYER, M. H., *Biochem. J.* **20**, 656 (1926).
35. ELLIS, G. H.; G. MATRONE en L. A. MAYNARD, *J. Anim. Sci.* **5**, 285 (1946).
36. MC. FARREN, E. F.; K. BRAND en H. R. RUTKOWSKY, *Anal. Chem.* **23**, 1146 (1951).
37. FISHER, R. B.; D. S. PARSONS en G. A. MORRISON, *Nature* **161**, 764 (1948).
38. FLOOD, A. E.; E. L. HIRST en J. K. N. JONES, *Nature* **160**, 861 (1947).
39. GAILLARD, B. D. E., *Pharm. Weekbl.* **88**, 629 (1953).
40. GAILLARD, B. D. E., *Nature* **171**, 1160 (1953).
41. HEALD, P. J., *Brit. J. Nutr.* **7**, 124 (1953).
42. HENNEBERG, W. en F. STROHMANN, *Beitrage zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer*, Braunschweig 362 (1863).
43. HIRST, E. L., *J. Chem. Soc.* **70** (1942).
44. HIRST, E. L. en J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.* 496 (1938).
45. HIRST, E. L. en J. K. N. JONES, *J. Chem. Soc.* 452, 454 (1939).
46. HIRST, E. L. en J. K. N. JONES, *Adv. Carbohydr. Chem.* **2**, 235 (1946).
47. HOLMBERG, C. V. en E. C. JAHN, *Paper Trade J.* **111**, 33 (1940).
48. HUISMAN, T. J., *Samenstelling en verteerbaarheid van voedermiddelen*, Wageningen (1939).
49. HULME, A. C., *Nature* **171**, 610 (1953).
50. JAYME, G., *Cellulosechemie* **20**, 43 (1946).
51. JEANES, A.; C. S. WISE en R. J. DIMLER, *Anal. Chem.* **23**, 415 (1951).
52. JEANICKE, L., *Naturwissensch.* **9**, 86 (1952).
53. JERMYN, M. A. en F. A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* **44**, 402 (1949).
54. KELLNER, O., *Die Ernährung der landwirtsch. Nutztiere*, Berlin (1905-1924).
55. KERTESZ, Z. I., *The pectic substances*, New York (1951).
56. KLASON, P., *Cellulosechemie* **4**, 81 (1923).
57. KLING, M., *Handelsfuttermittel*, Stuttgart (1928).

58. KÜHN, J., Die zweckmäßigste Ernährung des Rindviehes, Leipzig (1881-1906).
59. LAIDLAW, R. A. en S. G. REID, J. Sci. Food Agric. 3, 19 (1952).
60. MAN, TH. J. DE en J. G. DE HEUS, Rec. Trav. Chim. 68, 43 (1949).
61. MAN, TH. J. DE en J. G. DE HEUS, Rec. Trav. Chim. 69, 271 (1950).
62. MANNING, K. R. en W. A. DE LONG, Sci. Agric. 22, 69 (1941).
63. MAZUMDAR, A. K. en P. B. SARKAR, Nature 172, 1047 (1953).
64. MORELL, S.; L. BAUR en K. P. LINK, J. Biol. Chem. 105, 15 (1934).
65. MORRISON, F. B., Feeds and Feeding, New York (1949).
66. NELSON, N., J. Biol. Chem. 153, 375 (1944).
67. NELSON, W. A. G. en E. G. V. PERCIVAL, J. Chem. Soc. 58 (1942).
68. NORDFELDT, S.; O. SVANBERG en D. CLAESSON, Act. Agric. Suec. 3, 135 (1949).
69. NORMAN, A. G., The Biochemistry of cellulose, the polyuronides, lignin, etc., Oxford (1937).
70. NORMAN, A. G., Biochem. J. 31, 1579 (1937).
71. NORMAN, A. G., J. Amer. Soc. Agron. 31, 715 (1939).
72. NORMAN, A. G. en S. H. JENKINS, Biochem. J. 28, 2160 (1934).
73. NORRIS, F. W. en I. A. PREECE, Biochem. J. 24, 59 (1930).
74. PALOHEIMO, L., Biochem. Z. 165, 463 (1925).
75. PARTRIDGE, S. M., Nature 158, 270 (1946).
76. PARTRIDGE, S. M., Biochem. J. 42, 238 (1948).
77. PARTRIDGE, S. M., Nature 164, 443 (1949).
78. PASCU, E.; T. P. MORA en P. W. KENT, Science 110, 446 (1949).
79. PHILIPS, M., J.A.O.A.C. 23, 119 (1940).
80. PHILIPS, J. D. en A. POLLARD, Nature 171, 42 (1953).
81. POTT, E., Handbuch der tierischen Ernährung und der landwirtsch. Futtermittel, Berlin (1904-1914).
82. PREECE, I. A., Biochem. J. 25, 1304 (1931).
83. PREECE, I. A., Biochem. J. 34, 251 (1940).
84. PREECE, I. A., Biochem. J. 35, 659 (1941).
85. RITMAN, E. L., Publicatie Ned. Proefstation voor strobewerking, Groningen 2, 31 (1941).
86. RITTER, G. J. en E. F. KURTH, Ind. Eng. Chem. 25, 1250 (1933).
87. RITTER, G. J. en E. F. KURTH, J. Am. Chem. Soc. 56, 2720 (1934).
88. ROUDIER, A., C.R. Acad. Sci. Paris 13, 662 (1953).
89. Rijkslandbouwproefstation voor veevoederonderzoek, Methoden van Onderzoek, Wageningen (1931).
90. SARKAR, P. B., Nature 167, 357 (1951).
91. SARKAR, P. B.; A. K. MAZUMDAR en K. B. BAL, Nature 165, 897 (1950).
92. SCHNEIDER, B. H., Feeds of the World, Morgantown (1947).
93. SCHNEIDER, G. G. en H. BOCK, Ber. 70, 1617 (1937).
94. SCHNEIDER, G. G. en U. FRITSCHI, Ber. 69, 2537 (1936).
95. SCHNEIDER, G. G. en U. FRITSCHI, Ber. 70, 1611 (1937).
96. SCHMIDT, E.; K. MEINEL; W. JANDEBEUR en W. SIMSON, Cellulosechemie 13, 129 (1932).
97. SCHMIDT, E.; Y. C. TANG en W. JANDEBEUR, Cellulosechemie 12, 201 (1931).
98. SCHRAMM, M. en H. SCHLOMO, Biochem. J. 56, 163 (1954).
99. SOMOGYI, M., J. Biol. Chem. 160, 62 (1945).
100. SOMOGYI, M., J. Biol. Chem. 195, 19 (1952).
101. T.A.P.P.I. tentative standard T9m40, Paper Trade J. 110, 27 (1940).
102. THOMAS, B. en D. G. ARMSTRONG, Agriculture J. Minist. Agric. Engl. 57, 210 (1950-51).
103. TREVELYAN, W. E.; D. P. PROCTOR en J. E. HARRISON, Nature 166, 444 (1950).
104. WEIHE, H. D. en M. PHILIPS, J. Agric. Res. 60, 781 (1940).
105. WEIHE, H. D. en M. PHILIPS, J. Agric. Res. 64, 405 (1942).
106. WEIHE, H. D. en M. PHILIPS, J. Agric. Res. 72, 163 (1946).
107. WEIHE, H. D. en M. PHILIPS, J. Agric. Res. 74, 77 (1947).
108. WESTALL, R. G., Biochem. J. 42, 249 (1948).
109. WHISTLER, R. L.; J. BACHRACH en D. R. BOWMAN, Arch. Biochem. 19, 25 (1948).
110. WHISTLER, R. L. en C. L. SMART, Polysaccharide Chemistry, New York 55 (1953).
111. WHISTLER, R. L. en C. L. SMART, Polysaccharide Chemistry, New York 112 (1953).
112. WHITING, G. C., Nature 168, 833 (1951).
113. WISE, L. E.; M. MURPHY en A. A. D'ADDIECO, Paper Trade J. 122, 11 (1946).
114. WOLFF, E., Landwirtschaft. Fütterungslehre, Berlin (1888).
115. WYLAM, C. B., J. Sci. Food Agric. 5, 167 (1954).