

DIO:10.3724/SP.J.1238.2011.00206

离子色谱法测定水稻秸秆木质纤维素水解物单糖

张薇¹, 王明远¹, 苏小军², 熊兴耀^{2*}

(1. 湖南农业大学 理学院, 湖南 长沙 410128; 2. 作物种质创新与资源利用湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 采用离子色谱法测定辐照加酶处理水稻秸秆木质纤维素转化的单糖组成。用 γ 射线对水稻秸秆进行预处理, 再用水解酶进行水解, 用 20 mg/L 叠氮化钠水溶液(防腐抑菌)稀释水解溶液, 将溶液分别经过 0.22 μm 尼龙滤膜和 OnGuard II RP 柱(2.5cc, 经甲醇和水活化), 弃去初始 6 mL 后, 收集 1 mL 流出液, 应用离子色谱法测定各单糖组成。结果表明, 水稻秸秆木质纤维素水解物由木糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露糖、葡萄糖醛酸等单糖组成。测定方法的精密度 RSD 1.38%, 平均回收率达 96.6%。

关键词: 水稻秸秆; 木质纤维素; 离子色谱法; 单糖

中图分类号: O657.7⁺5 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0206-05

Measurement of composition of monosaccharide in lignocelluloses of rice straw by ion chromatography

ZHANG Wei¹, WANG Ming-yuan¹, SU Xiao-jun², XIONG Xing-yao^{2*}

(1. College of Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Germplasm Resources in Hunan Province and Innovation by Key Laboratory, Changsha 410128, China)

Abstract: Ion chromatographic was used to determine the monosaccharide composition in rice straw with enzymes irradiation samples of lignocelluloses. First of all, the ordinary rice straw needs to be set under gamma radiation with 1 500 kGY intensity as pretreatment, hydrolyzed with hydrolase and then diluted with 20 mg/L solution of sodium azide(antimicrobial preservative). Then, let the solution go through the 0.22 μm nylon membrane and OnGuard II RP column (2.5 cc, by methanol and water) respectively. 1 mL effluent can be collected after discarding the initial 6 mL solution. Finally, the composition of monosaccharide should be measured by ion chromatography. The result was that the lignocelluloses hydrolyzes of rice straw was composed of the xylose, glucose, rhamnase, mannose and glucuronic acid monosaccharide, etc.

Key words: rice straw; ion chromatography; lignocelluloses; monosaccharide

水稻秸秆由37%~40%的纤维素、27%~30%的半纤维素和5%~8%的木质纤维素紧密交联在一起而组成。研究表明, γ 射线辐照水稻秸秆^[1-3]后, 再用水解酶进行水解, 生成葡萄糖、木糖等糖类, 经

微生物发酵可转化为乙醇、丙酮、丁醇、乙酸^[4-6]等, 对于减轻环境污染、开发生物质能源和生物质材料均具有重大意义^[7-8]。笔者建立了水稻秸秆木质纤维素中几种单糖的离子色谱分离方法, 并对单

收稿日期: 2010-10-22

基金项目: 国家“973”计划项目(2009CB226108); 湖南省科学技术厅项目(2010NK3017); 湖南省教育厅项目(08C438)

作者简介: 张薇(1962—), 女, 江苏南京人, 教授, 主要从事应用化学研究, Zhangwei6261@hotmail.com; *通信作者, xiongxingyao@126.com

糖进行了组成分析。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

普通稻草。

主要试剂有：分析纯葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、葡糖醛酸、半乳糖、醛酸纤维二糖、果糖、蔗糖、麦芽糖，色谱纯木糖、鼠李糖，购于天津基准化学试剂有限公司；纤维素酶购于湖南鸿鹰祥生物工程公司。

主要仪器为离子色谱仪 ICS-3000(美国戴安公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准溶液1：准确称取葡萄糖、鼠李糖、半乳糖、木糖、甘露糖、果糖、纤维二糖、麦芽糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸各0.050 0 g，溶解后超纯水定容至100 mL。各取1.00 mL至100 mL容量瓶中，配制成5 mg/L的10种混合糖标准溶液。

标准溶液2：准确称取葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、蔗糖、木糖、甘露糖、果糖、纤维二糖、麦芽糖、半乳糖醛酸、葡萄糖糖醛酸各0.050 0 g，配制成5 mg/L的12种混合糖标准溶液。

1.2.2 水稻秸秆样品制备

普通稻草经 γ 射线照射处理后，粉碎，过孔径0.003 8 mm 筛，得水稻秸秆粉末。

准确称取2.000 0 g经辐照预处理的水稻秸秆粉末，置于250 mL锥形瓶中，加入100 mL水，加2 mL纤维素酶，调pH至5.0，振荡。调节转速100 r/min，温度55℃，于电热恒温鼓风干燥箱中加热48 h，过滤，取滤液，得到纤维素水解液样品。

1.2.3 精密度(重复性)试验

纤维素水解液样品，用20 mg/L叠氮化钠水溶液(防腐抑菌)稀释1 000倍，经过0.22 μ m尼龙滤膜

和OnGuard II RP柱(2.5 cc，经甲醇和水活化)，弃去初始6 mL后，收集20 mL流出液，作为精密度试验样品。

1.2.4 加样回收试验

纤维素水解液样品，稀释1 000倍，用20 mg/L叠氮化钠水溶液(防腐抑菌)稀释，将溶液分别经过0.22 μ m尼龙滤膜和OnGuard II RP柱(2.5 cc，经甲醇和水活化)，弃去初始6 mL后，收集2 mL流出液，作为加样回收试验样品。

1.2.5 离子色谱法测定条件

样品测定的难点在于需检测糖种类较多，且存在多组易干扰糖，很难在同一条件下完成所有待测糖类物质的分析。用不同梯度条件分离测定标准溶液1、标准溶液2，确定了2套梯度条件，可以解决干扰的问题并得到准确的结果。设置测定条件如下：戴安离子色谱仪ICS-3000，安培检测器波形：糖四电位波形。色谱柱类型及尺寸：CarboPac PA20分析柱，150 mm \times 3 mm，CarboPac PA20保护柱，30 mm \times 3 mm。电极：Au电极，Ag-AgCl参比电极。淋洗液组成及流速：NaOH/CH₃COONa 梯度1：0~15 min，NaOH 3 mmol/L；15~20 min，NaOH 3~100 mmol/L；30~40 min，NaOH 100 mmol/L，醋酸钠100 mmol/L；40.1~42.1 min，NaOH 200 mmol/L；42.2~46 min，NaOH 3 mmol/L NaOH/CH₃COONa。梯度2：0~15 min，NaOH 7 mmol/L；15~20 min，NaOH 7~100 mmol/L；30~40 min，NaOH 100 mmol/L，醋酸钠100 mmol/L；40.1~42.1 min，NaOH 200 mmol/L；42.2~46 min，NaOH 7 mmol/L 0.50 mL/min。柱温30℃。进样体积25 μ L。进样方式：自动进样。

2 结果

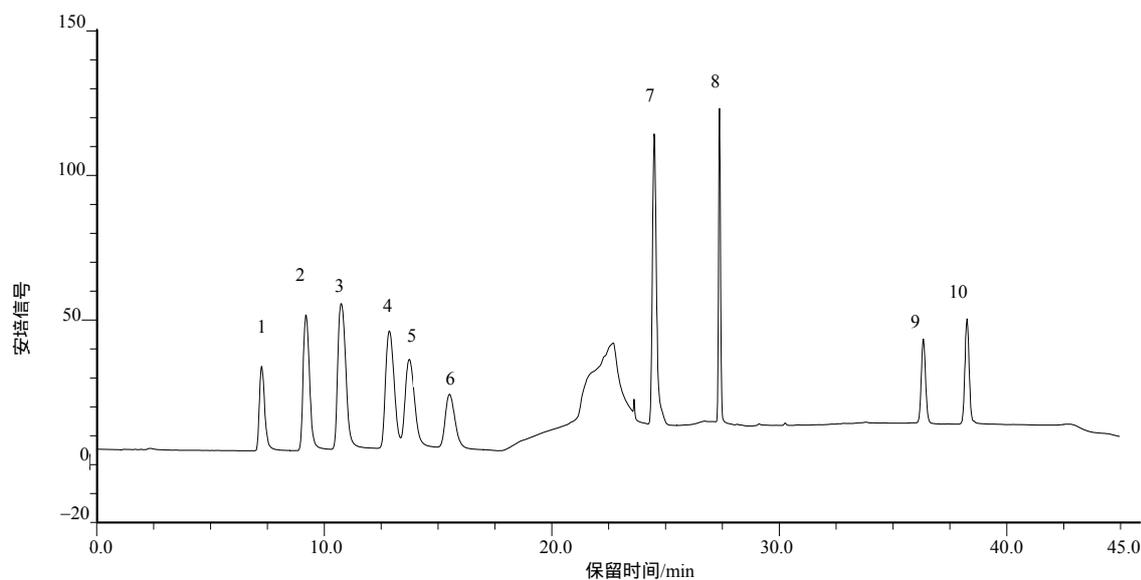
2.1 标准溶液的离子色谱

标准溶液1和标准溶液2经过0.22 μ m尼龙滤膜和OnGuard II RP柱，弃去初始6 mL后，收集1 mL流出液，标准溶液1在梯度1、标准溶液2

在梯度2直接进样分析。得到色谱图1、图2。

在梯度1下,鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、半乳糖醛酸、甘露糖、木糖和葡萄糖醛酸都能得到较好分离,可用于甘露糖与木糖的同时测定。而在梯度2下,鼠李糖、阿拉伯糖、葡萄糖和蔗糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸得到较好的分离,甘露糖和

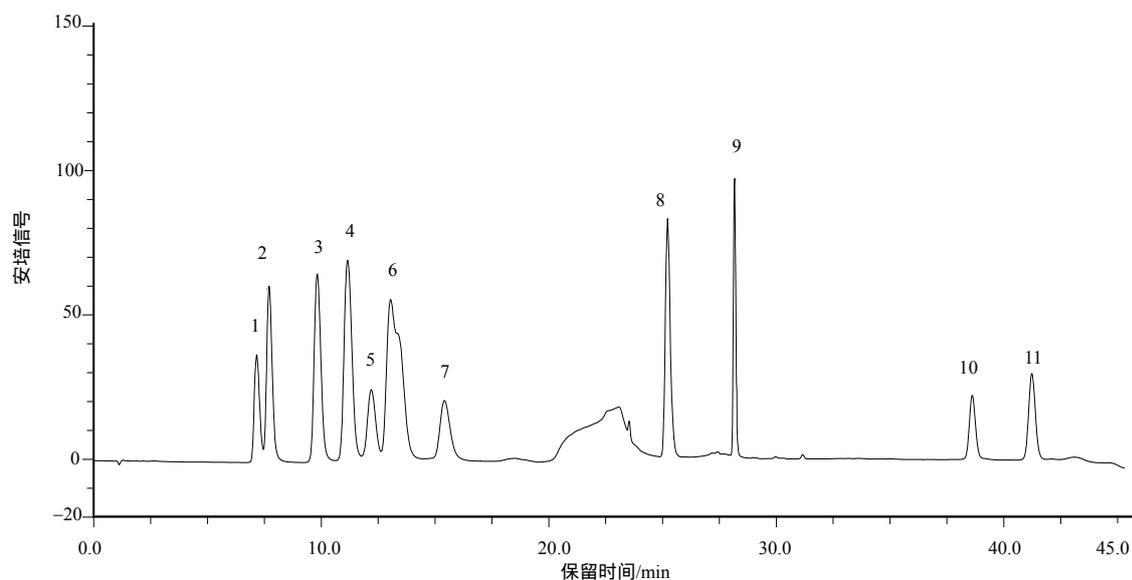
木糖则分离较差,甚至共淋洗。对半乳糖、果糖、纤维二糖、麦芽糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸分离则2套梯度均可用,但由于样品稀释倍数比较大,某些糖的含量特别低,因而相对差别也较大,但是基本都在同一个数量级。通过做标准曲线得线性方程及相关系数,线性范围为0.01~15 mg/L。



1 鼠李糖; 2 半乳糖; 3 葡萄糖; 4 木糖; 5 甘露糖; 6 果糖; 7 纤维二糖; 8 麦芽糖; 9 半乳糖醛酸; 10 葡萄糖醛酸。

图1 标准溶液1的离子色谱(梯度1)

Fig.1 Chromatogram of 10 kinds of sugar 5 mg/L mixed standard solution (gradient conditions 1)



1 鼠李糖; 2 阿拉伯糖; 3 半乳糖; 4 葡萄糖; 5 蔗糖; 6 木糖+甘露糖; 7 果糖; 8 纤维二糖; 9 麦芽糖; 10 半乳糖醛酸; 11 葡萄糖醛酸。

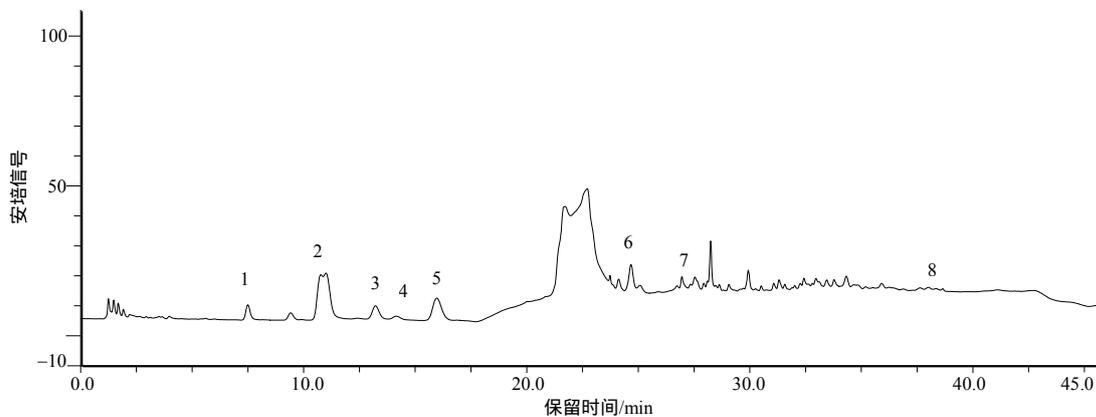
图2 标准溶液2的离子色谱(梯度2)

Fig.2 Chromatogram of 12 kinds of sugar 5 mg/L mixed standard solution (gradient conditions of 2)

2.2 水稻秸秆样品在不同梯度条件下的离子色谱

水稻秸秆纤维素水解液样品,用 20 mg/L 叠氮化钠水溶液(防腐抑菌)稀释 1 000 倍,溶液分别经过

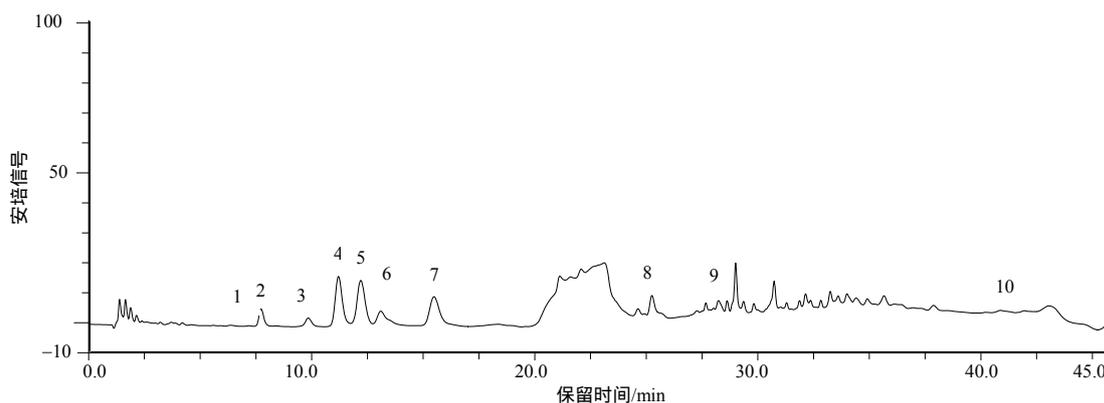
0.22 μm 尼龙滤膜和 OnGuard II RP 柱,弃去初始 6 mL 后,收集 1 mL 流出液,在梯度 1、梯度 2 直接进样分析,得到色谱图 3、图 4。



1 鼠李糖;2 葡萄糖;3 木糖;4 甘露糖;5 果糖;6 纤维二糖;7 麦芽糖;8 葡萄糖醛酸。

图 3 纤维素水解液离子色谱(梯度 1)

Fig.3 The ion chromatogram of cellulose hydrolyzes (gradient conditions 1)



1 鼠李糖;2 阿拉伯糖;3 半乳糖;4 葡萄糖;5 蔗糖;6 木糖+甘露糖;7 果糖;8 纤维二糖;9 麦芽糖;10 葡萄糖醛酸。

图 4 纤维素水解液离子色谱(梯度 2)

Fig.4 The ion chromatogram of cellulose hydrolyzes (gradient conditions 2)

从图 3、图 4 可看出,在纤维素液的样品测定中,同时分离了鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、果糖、纤维二糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖、葡萄糖醛酸,单糖之间的分离度均大于 1.5,实现了基线分离。

2.3 精密度(重复性)试验结果

梯度 1 的精密度(重复性)试验结果表明,样品中鼠李糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、果糖、麦芽糖、葡萄糖醛酸测定结果的 RSD 为 1.2%、0.039%、0.65%、0.54%、0.17%、0.68%、1.4%;梯度 2 的精密度(重复性)试验结果表明,样品中鼠李糖、葡

萄糖、果糖、麦芽糖、葡萄糖醛酸测定结果的 RSD 为 1.2%、0.039%、0.028%、0.18%、0.88%,都说明该方法重复性良好。

2.4 加样回收试验结果

共取 3 份加样回收试验样品,同时分别精密量取葡萄糖对照品溶液 0.20、0.25、0.30 mL,加入蒸馏水补足至 2 mL,直接进样分析,平均回收率达 96.6%。

3 讨论

目前对糖类化合物进行定性定量,除离子色谱

法外,还有液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法等^[9],这些方法在测定低含量的糖类化合物时,无一例外的需对样品进行柱前衍生或柱后衍生,操作步骤繁琐,所需时间较长,人力和物力成本较高,分离效果不理想。而离子色谱法使用了脉冲安培检测器,这种检测器可对糖类化合物直接进行检测,无需衍生,具有非常高的灵敏度,且具有选择性。测定结果表明,测定的精密度、回收率高。本试验中选择的2套梯度条件分别进行检测,可以较好地解决干扰的问题,达到较好的分离效果,综合这两套数据基本可以得到样品中所有待测糖类的准确测定结果,从而提供水稻秸秆木质纤维素的单糖组成基本信息。

参考文献:

- [1] 陈静萍,王克勤,熊兴耀,等. γ 射线对稻草纤维组织及酶解效果的影响[J].核农学报,2005,22(3):304-309.
- [2] 何源禄.植物纤维原料辐射水解研究进展[J].核技术,2008,7(5):7-10.
- [3] 彭维,向志明.水稻秸秆的纤维素酶水解研究[J].四川食品与发酵,2007,137(3):11-15.
- [4] 曲音波.纤维素乙醇产业化[J].化学进展,2007,19(7/8):1098-1108.
- [5] 孙多志,许庆利,王复,等.木质纤维素制取燃料乙醇水解工艺技术进展[J].河南化工,2008,25(4):114.
- [6] 龚大春,田毅红,李德莹,等.纤维素乙醇的研究进展[J].化学与生物工程,2007,24(1):4-6.
- [7] 韩鲁佳,闫巧娟,刘向阳,等.中国农作物秸秆资源及其利用现状[J].农业工程学报,2002,18(3):87-91.
- [8] 吴创之,马隆龙.生物质能现代化利用技术[M].北京:化学工业出版社,2003:173-196.
- [9] 马乃,许思昭,陈美洪.食品中糖类的测定方法探讨[J].现代食品科技,2006,22(1):139-142.
- [10] 都兴范,李亚杰,王林华,等.北冬虫夏草的研究发展现状[J].辽宁农业科学,2003(4):26-28.
- [11] 李祝,刘爱英,梁宗琦.虫草菌素的生物活性及检测方法[J].食用菌学报,2002,9(1):57-62.
- [12] 臧金平,连宾,袁生.简便易行的食用菌菌丝体基因组DNA提取法[J].食品科学,2005,26(3):66-68.
- [13] 郭大龙,吴正景.一种简单有效的去除植物DNA中多糖等杂质的方法[J].生物技术,2008,18(5):31-32.
- [14] 崔光红,唐晓晶,黄璐琦.含淀粉及多糖类中药材DNA的提取方法研究[J].中国中药杂志,2006,31(16):1365-1367.
- [15] 江树勋,邵碧英,陈文炳.15种常见食(药)用菌的3种总DNA提取方法比较研究[J].食品科学,2004,25(5):36-40.
- [16] Tesniere C, Vayda M E. Method for the isolation of high quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates[J]. Plant Mol Biol Rep, 1991(9): 242-251.
- [17] 张莉莉,张苓花,史剑斐,等.利用氯化苜蓿提取真菌基因组DNA及其分子生物学分析[J].大连轻工业学院学报,2000,19(1):36-39.
- [18] 米锐,王鹤,孟楠,等.北冬虫夏草基因组DNA提取方法的研究[J].辽宁农业科学,2008(5):56-57.
- [19] 陈莉,魏莉,周童,等.几种中药DNA提取方法的比较研究[J].广西植物,2007(1):137-139.
- [20] 曹文波,郑璐璐,谢文海.一种提取植物基因组DNA的方法——改良尿素法[J].华中师范大学学报,2008,42(3):448-451.
- [21] Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. Bio Techniques, 1992, 13: 52-56.
- [22] 罗志勇,周钢,陈湘晖,等.高质量植物基因组DNA的分离[J].湖南医科大学学报,2001,26(2):178-180.
- [23] 卓伟,余茂德,鲁成.PVP在桑叶总DNA提取中的应用[J].西南农业大学学报,2001,23(1):61-62.
- [24] 程运江,伊华林,庞晓明,等.几种木本果树DNA的有效提取[J].华中农业大学学报,2001,20(5):481-483.
- [25] 黄建安,黄意欢,罗军武,等.茶树基因组DNA的高效提取方法[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2003,29(5):402-407.
- [26] 王经源,郭明亮,林文雄.高多糖含量植物——莲DNA的提取方法[J].福建稻麦科技,2004(3):8-9.
- [27] 徐怀德.天然产物提取工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,2006:250.

责任编辑:罗慧敏
英文编辑:易来宾

(上接第149页)

责任编辑:罗慧敏
英文编辑:易来宾