

Hemicelulózy mladých vetvičiek vrby bielej (*Salix alba* L.) (I) Izolácia a charakterizácia hrubých frakcií hemicelulóz drevnej časti

V

P. KOVÁČ, F. RENDOŠ

*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied,
 Bratislava*

*Venované prof. inž. Františkovi Kozmálovi, členovi korešpondentovi SAV,
 k 65. narodeninám*

Postupnou extrakciou holocelulózy dreva vrbových vetvičiek roztokmi: 2,5 %-ný NH_4OH , 4,5 %-ný NaOH , 8 %-ný NaOH s prídavkom 4 % H_3BO_3 a 0,05 N-HCl sa získali kvalitatívne značne rozdielne frakcie hemicelulóz. V ich hydrolyzátoch sa sledovalo kvantitatívne zastúpenie monosacharidov.

V predloženej práci sme aplikovali metódu frakčnej extrakcie na izoláciu a charakterizáciu hemicelulóz dreva vetvičiek vrby bielej. Cieľom nášho štúdia bolo dosiahnuť určité rozdelenie hemicelulózových frakcií už počas samotnej extrakcie, keďže jednostupňová extrakcia celého hemicelulózového podielu je spojená so značnými ťažkosťami pri nasledujúcej frakcionácii a purifikácii jednotlivých hemicelulózových frakcií.

Experimentálna časť

Východiskovým materiálom boli mladé vetvičky vrby bielej, ktoré narástli začiatkom vegetačného obdobia (do 30. júna 1964). Dezintegráciou drevnej časti sa pripravili piliny, ktoré sa extrahovali zmesou benzén—etylalkohol (3 : 1). Potom nasledovala extrakcia pilín 15 % etylalkoholom 24 hodín pri laboratórnej teplote. Vákuovým odparením extraktu sme získali frakciu, ktorú sme označili DV. Z vyextrahovaných pilín sme Klau-ditzovou metódou [1] pripravili holocelulózu. Analýzu dreva vrbových vetvičiek uvádzame v tab. 1 a analýzu holocelulózy v tab. 2.

a) Frakčná extrakcia hemicelulóz

Postupnou extrakciou vzduchosuhej holocelulózy sme pripravili tieto frakcie hemicelulóz:

1. DA; extrakciou holocelulózy 2,5 % roztokom amoniaku,
 2. DH1; extrakciou holocelulózy, ktorá ostala po amoniakálnej extrakcii, 4,5 % roztokom NaOH ,
 3. DH2; extrakciou holocelulózy, ktorá ostala po predehádzajúcej extrakcii, roztokom, ktorý obsahoval 8 % NaOH a 4 % H_3BO_3 ,
 4. DH3; extrakciou zvyšnej holocelulózy pomocou 0,05 N-HCl.
- Extrakcie 1—3 sa robili 24 hodín pri laboratórnej teplote; váhový pomer látky k roz-

púšťadlu bol 1 l5. Extrakcie roztokmi líhu sa uskutočnili v dusíkovej atmosfére. Extrakcia s 0,05 N-HCl sa robila 2 hodiny pri 80 °C. Medzi každou nasledujúcou extrakciou sa holocelulóza odfiltrovala, premyla extrahovadlom a destilovanou vodou.

Tabuľka 1
Analýza dreva vrbových vetvičiek

Zložka	% na absolútne suché drevo
popol	2,6
BA-extrakt	2,4
extrakt 15 % etylalkoholom	7,0
lignín	20,8
—OCH ₃ v dreve	5,0
—OCH ₃ v ligníne	17,5
dusík	1,6
holocelulóza	85,9

Tabuľka 2
Analýza holocelulózy dreva vrbových vetvičiek

Zložka	% na absolútne suchú holocelulózu
popol	1,55
lignín	0,6
celulóza	45,5
dusík	0,67
—OCH ₃	2,51
amoniakálny extrakt (DA)*	25,6
frakcia hemicelulóz (DA)**	6,2
extrakt s 4,5 %-ným NaOH*	22,4
frakcia hemicelulóz (DH1)**	17,8
extrakt s 8 %-ným NaOH s prídavkom 4 % H ₃ BO ₃ *	5,5
frakcia hemicelulóz (DH2)**	4,1
frakcia hemicelulóz (DH2/1)**	1,8
frakcia hemicelulóz (DH2/2)**	2,3
extrakt s 0,05 N-HCl*	1,0
frakcia hemicelulóz (DH3)**	0,6
celkove vyextrahované*	54,5
izolované hemicelulózy**	28,7

* Počítané z úbytku na váhe holocelulózy.

** Počítané vážením izolovanej frakcie hemicelulóz.

b) Spracovanie extraktov

1. Extrakt s 2,5 %-ným NH₄OH

Extrakt sme vákuovo odparili na polovičný objem a hemicelulózy sme vyžrážali štvornásobným množstvom etylalkoholu. Zrazeninu sme odfiltrovali, premyli 70 % etylalkoholom, acetónom a éterom. Získala sa frakcia DA.

2. Extrakt s 4,5 %-ným NaOH

Extrakt sme zneutralizovali kyselinou octovou a hemicelulózy sme vyžrážali štvornásobným množstvom etylalkoholu. Zrazeninu hemicelulóz sme spracovali, ako je uvedené ad 1. Získala sa frakcia DH1.

3. Extrakt s 8 %-ným NaOH s prídavkom 4 % H_3BO_3

Extrakt sme zneutralizovali kyselinou octovou a hemicelulózy sme vyžrážali etylalkoholom. Zrazeninu sme spracovali ako v predchádzajúcich prípadoch. Získala sa frakcia DH2.

4. Extrakt s 0,05 N-HCl

Z extraktu sme po ochladení vyžrážali hemicelulózy štvornásobným množstvom etylalkoholu a spracovali ako v predchádzajúcich prípadoch. Získala sa frakcia DH3.

Po všetkých extrakciách sme získali snehobiely celulózu, ktorá už neobsahovala lignín ani dusík. Obsah metoxylových skupín bol 0,272 %. Po úplnej hydrolyze celulózy sme v hydrolyzáte identifikovali D-glukózu a D-xylózu v molárnom pomere 29 : 1 a v stopách D-manózu. Z kyslých zložiek sme identifikovali 4-O-metyl-glukuronozylxylózu. Hemicelulózy získané extrakciou 2,5 % amoniakom (DA) sme neodsoľovali. Všetky ostatné frakcie hemicelulóz sme odsoľovali elektrodiályzou. Hemicelulózy DH2 sa dali po odsolení rozdeliť na dve časti, a to vo vode nerozpustnú DH2/1 a vo vode rozpustnú DH2/2. Všetky frakcie hemicelulóz sme získali vo forme bieleho prášku, s výnimkou hemicelulóz DA, ktoré boli hnedé.

c) Analýza jednotlivých frakcií hemicelulóz

V izolovaných frakciách hemicelulóz sme stanovili popol, lignín [2], skupiny $-OCH_3$ [3], dusík [3] a molárny pomer monosacharidov v hydrolyzátoch hemicelulóz. Kyselinu D-galakturónovú sme identifikovali redukciou jej metylestermetylglykozidu s $LiAlH_4$ [4] a papierovou chromatografiou. Papierovú chromatografiu neutrálnych monosacharidov sme uskutočnili na papieri Whatman 1 zostupnou technikou v sústave etylacetát—pyridín—voda (8 : 2 : 1). Papierovú chromatografiu kyslých zložiek hydrolyzátu sme po predchádzajúcej elúcii neutrálnych monosacharidov vykonali v sústave etylacetát—kyselina octová—kyselina mravčia—voda (18 : 3 : 1 : 4). Detekciu sme uskutočnili anilíniom-hydroftalátom. Na kvantitatívne stanovenie monosacharidov sme použili denzitometrickú metódu [5]. Pri frakciách DH1, DH2/1 a DH2/2 sme stanovili optickú otáčavosť a elektroforetickú homogenitu. Na stanovenie optickej otáčavosti sme použili 1 % roztok hemicelulóz v 2 % roztoku NaOH. Voľnú elektroforézu sme robili na prístroji pre mikroelektroforézu KERN LK 30 v borátovom tlmivom roztoku pri pH 11, 150 V, 5,6 mA, pri koncentrácii vzorky 1 %.

Je známe, že mladé vetvičky sú bohaté na dusíkaté látky [6], ktoré sa v použitých extrahovadlách viac-menej rozpúšťajú a môžu znečistiť izolované hemicelulózy. Stanovením obsahu dusíka sme zistili, do akej miery sú izolované hemicelulózy znečistené dusíkatými látkami.

Výsledky analýzy získaných frakcií hemicelulóz sú zhrnuté v tab. 3.

Tabuľka 3
Analýza izolovaných hemicelulóz

Vzorka	Popol	Lignín	Dusík	—OCH ₃	[α] _D ²⁰	Molárny pomer monosacharidov	Kyslé sacharidy
DV	23,8	4,2				Gal : Glc : Xyl : Ara = 2,5 : 2 : 1 : 1 stopy Man a Rha	Stopy GalUA
DA	4,1	2,5	2,04	3,95		Xyl : Gal : Glc : Ara = 60 : 2 : 1 : 1 stopy Rha	4-O-MeGlcUA-Xyl; 4-O-MeGlcUA GalUA
DH1	1,2	0,5	stopy	1,97	—56,2°	Xyl : Glc : Gal : Ara = 190 : 11 : 2 : 1 stopy Rha	4-O-MeGlcUA-Xyl; 4-O-MeGlcUA stopy GalUA
DH2/1	0,4	0,3	stopy	1,58	—45,2°	Xyl : Glc : Man = 17 : 2,5 : 1 stopy Gal, Ara a Rha	4-O-MeGlcUA-Xyl; GalUA stopy 4-O-MeGlcUA
DH2/2	0,25	0,3	stopy	1,03	—21,8°	Xyl : Man : Glc : Gal = 10 : 7 : 6 : 1 stopy Ara	GalUA; 4-O-MeGlcUA-Xyl; 4-O-MeGlcUA
DH3			0,26	0,47		Glc : Gal : Ara : Xyl : Rha = 14,5 : 11 : 1 : 1 : 0,8	GalUA

Diskusia

V dreve vrbových vetvičiek (tab. 1) je vysoký obsah popola a dusíka. Je pozoruhodné, že postupnou extrakciou sa z holocelulózy vyextrahuje až 54,5 % látok, pričom celkové množstvo vyzrážaných hemicelulóz je iba 28,7 %. Nápadne malé množstvo hemicelulóz sa vyzráža etylalkoholom z amoniakálneho extraktu (tab. 2). Extrakciou dreva 15 % etylalkoholom prechádza do roztoku značné množstvo minerálnych látok. V hydrolyzáte tohto extraktu prevládajú hexózy a z kyslých sacharidov sa identifikovala kyselina D-galakturónová. Amoniakálnou extrakciou sa z holocelulózy odstráni okrem malého množstva xylánu zmes látok [7], ktoré by prešli do extraktu s 4,5 % roztokom NaOH a tým znečistili túto frakciu hemicelulóz. Hemicelulózy DA obsahujú značné množstvo dusíkatých látok a obsah skupín OCH₃ je v porovnaní s ostatnými frakciami hemicelulóz pomerne vysoký. Do extraktu prešla totiž určitá časť lignínu, ktorá sa pri zrážaní etylalkoholom dostala do zrazeniny hemicelulóz pravdepodobne vo forme lignín-sacharidového komplexu. V hydrolyzáte hemicelulóz DA prevláda D-xylóza, v menšom množstve sú prítomné D-galaktóza, D-glukóza a L-arabínóza. Z kyslých sacharidov sa zistila 4-O-metylglukuronozylxylóza, kyselina D-galakturónová a kyselina 4-O-metylglukurónová. Podobné sacharidické zloženie má aj frakcia hemicelulóz DH1 s tým rozdielom, že z hexóz prevláda D-glukóza.

Pri alkalickej extrakcii za prítomnosti kyseliny boritej sa vo väčšej miere extrahujú hexózany. Väčšie pomerné zastúpenie D-glukózy, D-galaktózy a D-manózy vo frakciách DH2/1 a DH2/2 naznačuje prítomnosť galaktoglukomanánu. Zaujímavé sú rozdiely týchto dvoch frakcií čo do obsahu kyslých sacharidov. Zatiaľ čo frakcia DH2/1 obsahuje viac 4-O-metylglukuronozylxylózy, frakcia DH2/2 obsahuje viac kyseliny D-galakturónovej. V oboch vzorkách sa zistila kyselina 4-O-metylglukurónová. Posledná frakcia hemicelulóz (DH3) obsahuje v hydrolyzáte prevažne D-glukózu a D-galaktózu popri malých množstvách L-arabínózy, D-xylózy a L-ramnózy. Je pozoruhodné, že v tejto frakcii nie je prítomná D-manóza, i keď v hydrolyzáte „celulózy“ sa D-manóza zistila. Z kyslých sacharidov sa v tejto frakcii nachádza kyselina D-galakturónová.

Voľná elektroforéza poukazuje na to, že jednotlivé frakcie hemicelulóz. i keď sa pripravili frakčnou extrakciou, nie sú homogénne. Na to isté možno usudzovať i z veľkého rozptylu optických otáčavostí [8]. Pre štruktúrálny výskum jednotlivých frakcií bude potrebné urobiť ďalšie operácie za účelom získania homogénnej frakcie.

Záver

Uvedené charakteristiky izolovaných hemicelulóz poukazujú na to, že holocelulóza vrbových vetvičiek obsahuje zložitú zmes polysacharidov. I keď sa na izoláciu hemicelulóz použila frakčná extrakcia, nepodarilo sa pripraviť homogénne frakcie polysacharidov, hoci z výsledkov hydrolýzy a chromatografickej analýzy izolovaných frakcií hemicelulóz vidieť, že frakčnou extrakciou možno izolovať hemicelulózy kvalitatívne značne rozdielne. Tento poznatok možno využiť pri príprave čistej frakcie niektorého typu hemicelulóz. Oproti dosiaľ používaným postupom má frakčná extrakcia nesporné výhody. Ak sa totiž vyextrahujú naraz všetky hemicelulózy, je veľmi obťažné izolovať z nich určitý typ homogénnych hemicelulóz zrážaním napríklad s $\text{Ba}(\text{OH})_2$ [9], Fehlingovým roztokom [10] alebo kvartérnymi amónnymi soľami [11, 12].

Chromatografický rozbor izolovaných frakcií hemicelulóz ukázal, že drevo vrbových vetvičiek obsahuje hemicelulózy, ktoré možno zaradiť medzi xylány a glukomanány. Časť xylánu je ľahko extrahovateľná, a to 2,5 % roztokom amoniaku. Popri hlavnom podiele xylánu, ktorý sa extrahuje 4,5 % roztokom NaOH, obsahuje holocelulóza vrbových vetvičiek i xylán, oveľa rezistentnejší voči extrakcii, ktorý pri nasledujúcej extrakcii lúhom s prídavkom kyseliny boritej znečisťuje frakciu hemicelulóz bohatú na glukomanán. O rezistentnosti určitej časti xylánu svedčí aj jeho prítomnosť v „celulóze“, ktorá ostáva po všetkých extrakciách. Zaujímavý je poznatok, ktorý sa dosiahol rozdelením frakcie bohatej na glukomanán DH2. Časť tejto frakcie (DH2/2), rozpustná vo vode, obsahuje viac glukomanánu, kým časť DH2/1. nerozpustná vo vode, je bohatšia na xylán.

ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗЫ МОЛОДЫХ ВЕТОЧЕК ВЕТЛИ (*Salix alba* L.) (I) ИЗОЛЯЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУБЫХ ФРАКЦИЙ ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗ ДРЕВЕСИНЫ

И. Ковач, Ф. Рендош

Химический институт Словацкой академии наук,
Братислава

В приведенной работе описана постепенная экстракция голоцеллюлозы молодых веточек ветли (*Salix alba* L.) различными экстракционными реагентами.

Гидролизат гемицеллюлоз, которые из аммиачного экстракта голоцеллюлозы осаждаются этиловым спиртом содержат D-ксилозу, D-галактозу, D-глюкозу и L-арабинозу в молярном соотношении 60 2 1 1.

Гемицеллюлозы, которые осаждаются этиловым спиртом из экстракта голоцеллюлозы с 4,5 % раствором NaOH дают после гидролиза D-ксилозу, D-глюкозу, D-галактозу и L-арабинозу в молярном соотношении 190 11 2 1.

Фракция гемицеллюлоз, содержащая большое количество маннана была получена

экстракцией голоцеллюлозы раствором, который содержал 8 % NaOH и 4 % H₃BO₃ и осаждением экстракта этиловым спиртом. Водорастворимая часть этой фракции гемицеллюлоз содержит D-ксилозу, D-маннозу, D-глюкозу и D-галактозу в молярном соотношении 10 : 7 : 6 : 1. Молярное соотношение моносахаридов в водонерастворимой части этой фракции гемицеллюлоз является Xyl : Glc : Man = 17 : 2,5 : 1.

Гемицеллюлозы, которые из голоцеллюлозы экстрагируются 0,05 N-HCl дают гидролизат с молярным соотношением Glc : Gal : Ara : Xyl : Rha = 14,5 : 11 : 1 : 1 : 0,8.

Preložil M. Fedoroňko

HEMICELLULOSES FROM THE YOUNG TWIGS OF WHITE WILLOW
(*Salix alba* L.) (I)
ISOLATION AND CHARACTERISATION OF THE ROUGH FRACTIONS
OF THE WOOD-PART HEMICELLULOSES

P. Kováč, F. Rendoš

Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences,
Bratislava

In the presented paper the step-wise extraction of holocellulose of the young twigs from white willow (*Salix alba* L.), using different solvents for extraction is described.

A hydrolysate of hemicelluloses, precipitable from an ammonia extract with ethanol contained D-xylose, D-galactose, D-glucose and L-arabinose in the molar ratio 60 : 2 : 1 : 1.

Hemicelluloses precipitable with ethanol from a holocellulose extract with 4.5 % NaOH, after hydrolysis afforded D-xylose, D-glucose, D-galactose, and L-arabinose in the molar ratio 190 : 11 : 2 : 1.

A mannan-rich fraction of hemicelluloses was prepared by the holocellulose extraction with a solution containing 8 % NaOH and 4 % H₃BO₃ and subsequent precipitation with ethanol. The water-soluble part of this fraction contained D-xylose, D-mannose, D-glucose and D-galactose in the molar ratio 10 : 7 : 6 : 1. The molar ratio of the monosaccharides in the water-insoluble part of this fraction of hemicelluloses was Xyl : Glc : Man = 17 : 2.5 : 1.

Hemicelluloses, extracted from holocellulose by 0.05 N-HCl yielded hydrolysate with the molar ratio of monosaccharides Glc : Gal : Ara : Xyl : Rha = 14.5 : 11 : 1 : 1 : 0.8.

Preložil I. Kompiš

LITERATÚRA

1. Klauditz W., *Holzforschung* **11**, 110 (1957).
2. Sieber R., *Die Chemisch-Technischen Untersuchungs-Methoden der Zellstoff- und Papier-Industrie*, 146. Springer-Verlag, Berlin 1951.
3. Jureček M., *Organická analýza II*, 336. Nakladatelství ČSAV, Praha 1957.
4. Adams G. A., Bishop C. T., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2842 (1956).
5. Rendoš F., *Chem. zvesti* **17**, 916 (1963).
6. Rendoš F., *Drevársky výskum* **2**, 57 (1964).

7. Nikitin V. M., *Chémia dreva a celulózy*, 281. Slovenské vydavateľstvo technickej literatúry, Bratislava 1956.
8. Marchessault R. H., Holava H., Timmell T. E., *Can J. Chem.* **41**, 1612 (1963).
9. Browning B. L., *The Chemistry of Wood*, 197. Interscience Publishers, New York 1963.
10. Dutton G. G. S., *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2505 (1956).
11. Jones A. S., *Biochem. Biophys. Acta* **10**, 607 (1958).
12. Bouweng H. O., Lindberg B., *Acta Chem. Scand.* **12**, 144 (1958).

Do redakcie došlo 8. 3. 1966

V revidovanej podobe 12. 7. 1966

Adresa autorov:

Inž. Pavol Kováč, inž. František Rendoš, CSc., Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.