

## 超音波法快速萃取及定量葉綠素

張上鎮<sup>1,2)</sup> 王升陽<sup>1)</sup> 葉汀峰<sup>1)</sup> 吳季玲<sup>1)</sup>

### 摘 要

爲了改良葉綠素萃取方法，本研究嘗試利用超音波法配合丙酮、DMF(Dimethylformamide)及DMSO (Dimethyl sulfoxide)三種有機溶劑萃取樟樹葉片之葉綠素，然後以紫外-可見光光譜儀分析，評估萃取方法與萃取溶劑對萃取效果之影響，並探討光譜曲線之變化，同時計算葉綠素之含量。試驗結果顯示，最佳的萃取方法係將葉片之粉末(小於0.7 mm)置於DMF溶劑中，並以超音波法取代傳統研磨法，萃取3分鐘後即可。此法操作簡易且萃取快速，除可獲得較佳的萃取效果外，並可增加試驗分析的準確性。與葉綠素在丙酮溶劑中的光譜特性吸收峰位置相比較，葉綠素的光譜特性吸收峰在DMF與DMSO兩種溶劑中顯現了向紅位移。以DMSO、80% 丙酮與DMF三種溶劑萃取出來之葉綠素含量分別爲1.765 mg/g、2.061 mg/g與3.628 mg/g。

關鍵詞：樟樹、葉綠素、萃取、研磨法、超音波法、離心機法、向紅位移。

張上鎮、王升陽、葉汀峰、吳季玲 1997 超音波法快速萃取及定量葉綠素。台灣林業科學 12(3) : 329-334。

## Rapid Extraction and Determination of Chlorophyll Using Ultrasonics

Shang-Tzen Chang,<sup>1,2)</sup> Sheng-Yang Wang,<sup>1)</sup> Ting-Feng Yeh<sup>1)</sup> and Chi-Lin Wu<sup>1)</sup>

### [ Summary ]

The purpose of this study is to establish a simple method for chlorophyll extraction using ultrasonics. The leaf chlorophyll of *Cinnamomum camphora* was extracted with acetone, DMF, or DMSO using ultrasonics. The chlorophyll extracts were analyzed with a UV-Visible spectrophotometer. The spectroscopic characteristics of 3 chlorophyll extracts were compared and chlorophyll content was quantified. The experimental results demonstrate that extraction of leaf powders (particle diameters smaller than 0.7 mm) with DMF by ultrasonics for 3 min is a rapid, convenient, and effective method for extracting chlorophyll. Compared with the absorption positions of chlorophyll in acetone, a bathochromic shift was observed at the absorption peaks of chlorophyll in DMF and DMSO. The chlorophyll contents extracted with DMSO, 80% acetone, and DMF were 1.765 mg/g, 2.061 mg/g, and 3.628 mg/g, respectively.

**Key words:** *Cinnamomum camphora*, chlorophyll, extraction, grinding method, ultrasonic method, centrifugation method, bathochromic shift.

Chang, S.-T., S.-Y. Wang, T.-F. Yeh, and C.-L. Wu. 1997. Rapid extraction and determination of chlorophyll using ultrasonics. Taiwan J. For. Sci. 12(3) : 329-334.

1) 國立臺灣大學森林學研究所，台北市羅斯福路4段1號 Dept. of Forestry, National Taiwan University, #1, Sec.4, Roosevelt Rd., Taipei, Taiwan, ROC.

2) 通訊作者 Corresponding author

1997年3月送審 1997年4月通過 Received March 1997, Accepted April 1997.

## 一、緒言

葉綠素之萃取為植物化學分析的基本項目之一，在探討生長環境或空氣污染或環境逆壓(stress)對林木生長、林木活性或生理機能等之影響時，葉綠素之萃取與分析為不可或缺之重要項目。Knudson等人認為最初研究人員以肉眼判視，估算植物組織變色之百分比來評估林木受空氣污染傷害之程度是不客觀的，且常隨人而異，他們認為客觀且正確的判斷標準應由植物組織中葉綠素含量之變化來決定(Knudson *et al.*, 1977)。與葉綠素萃取及分析有關之研究為數不少，早在1941年，Mackinney曾以80%丙酮水溶液萃取葉綠素並進一步分析(Mackinney, 1941)，隨後，許多研究均以類似的方法分析植物體的葉綠素。但是，以丙酮水溶液萃取葉綠素需要研磨、離心...等步驟，操作手續較為繁瑣且費時，較易產生誤差。於是，一些研究便以其他有機溶劑如：DMSO (dimethyl sulfoxide)或DMF (N,N-dimethyl formamide)萃取植物體的葉綠素，Shoaf與Lium的報告(1976)指出以DMSO萃取某些藻類葉綠素的效果比丙酮為佳，隨後，Hiscox與Israelstam的研究(1979)證實利用培養器(incubator)，以DMSO萃取裸子植物及被子植物葉子葉綠素的效果與丙酮萃取的一樣好，且DMSO萃取液的安定性比丙酮萃取液為佳，但是萃取所需的時間較長，萃取含有角質層葉片所需的時間為4至6小時。另外，Moran等人(Moran and Porath, 1980; Moran, 1982)的研究發現以DMF可將植物體的葉綠素完全萃取出來，亦可有效的萃取出低濃度的葉綠素，而80%丙酮水溶液卻無法完全萃取，且以DMF萃取出來後至光譜分析前之待測時間不若80%丙酮水溶液的那麼需要注意。Inskeep與Bloom(1985)的研究重新計算出葉綠素a與葉綠素b分別在DMF與80%丙酮水溶液的消光係數(extinction coefficients)，亦發現DMF為較方便使用之溶劑，可有效的完全萃取出植物體的葉綠素，且葉綠素在DMF的安定性相當好，分析時不但誤差少且十分方便。Barnes等人(1992)的報告亦指出傳統萃取葉綠素所用的方法，需要較複雜的研磨、離心...等步驟，較易產生誤差，他們的試驗結果證實以DMSO萃取葉綠素可以獲得正確的消光係數及求得正確葉綠素的濃度，同時DMSO萃取液的儲藏性十分良好，冷藏7天後對於葉綠素a與葉綠素b的定量分析幾乎沒有影響。

此外，由於球磨木質素(milled wood lignin, MWL)的分離需要相當長且繁雜的分離與純化手續，方能得到收率低的木質素，因此，國外許多研究人員便致力於尋求適當的方法以簡化分離手續及縮短分離所需之時間，其中，Wegener and Fengel曾探討超音波對球磨木質素分離效果之影響(Wegener and Fengel, 1977; 1978; 1979)，試驗結果證實以超音波法來分離球磨木質素可以有效的縮短萃取所需之時間，即二氧六圈萃取(dioxane extraction)所需之時間可由一般所用的14天縮短為14小時，且收率可以增加。關於竹皮葉綠素的萃取方法，並無文獻提及，僅筆者曾利用超音波法來從事竹材表皮葉綠素的萃取(張上鎮等，1994; Chang *et al.*, 1998)，試驗結果證實以超音波法可以快速的、有效的萃取竹材表皮之葉綠素。因此，本試驗筆者乃利用超音波配合丙酮、DMF及DMSO三種有機溶劑進行樟樹葉片葉綠素之萃取，評估葉綠素之萃取效果，期能尋得快速、簡單且正確的葉綠素萃取方法，此外，並探討各種葉綠素萃取液之光譜曲線變化，計算葉綠素之含量。至於葉綠素在三種溶劑之安定性與保存性將在後續之報告中討論。

## 二、材料與方法

### (一)試驗材料

本試驗所分析之材料為樟樹(*Cinnamomum camphora*，俗名為Camphor tree)之葉片。所使用之萃取溶劑共有三種：丙酮(acetone)，二甲基二醯胺(N,N-dimethyl formamide，簡稱DMF)及二甲亞磺酸(dimethyl sulfoxide，簡稱DMSO)。

### (二)試驗方法

#### 1. 葉綠素萃取

採集之葉片先以水清洗乾淨後，再以液態氮浸泡，然後磨成約0.7 mm細粉末。萃取分析前之粉末置於黑暗低溫的條件下儲藏。本試驗所使用之三種萃取方法如下：

##### (1) 研磨萃取法

40 mg葉片粉末及適量海砂(Sea Sand, Yakuri Pure Chemical Co.)置於冷凍之研鉢中，倒入25 mL之萃取溶劑(丙酮、DMF、DMSO)，研磨3分鐘。

##### (2) 超音波萃取法

40 mg葉片粉末及25 mL溶劑置於試樣瓶

中，以超音波洗淨器(Crest Co.)振盪1 min, 2 min及3 min, 超音波洗淨器維持低溫4°C。

(3)離心機萃取法

40 mg葉片粉末及25 mL溶劑置於離心管中，藉離心機(Hettichi Co.)高速離心時萃取溶劑可與葉片粉末充分作用，以達萃取之目的。離心機轉速為8000 rpm，離心時間為3 min及15 min。

萃取所得之綠色萃取液，利用濾膜過濾以除去萃取液中之葉片粉末。

2.葉綠素光譜分析

萃取液直接以紫外光-可見光光譜儀(Jasco, Model V-550)測其吸收光譜，並比較葉綠素特性吸收峰之強度。此外，亦利用光譜儀的二次微分(second derivative)功能檢測正確的吸收峰波長位置。

3.葉片顏色測量

葉片粉末的顏色係以Dr. Lange Micro Color色差計(Dr. Bruno Lange GmbH)測量，光源為D65，標準觀測角度10°，偵測器幾何設計為d/8°。顏色參數採用CIE L\*a\*b\*系統。

4.葉綠素定量分析

由萃取液光譜曲線中葉綠素位於662 nm附近(葉綠素a)與643 nm附近(葉綠素b)的兩個特性吸收峰之強度，依Table 1公式及葉綠素萃取液濃度計算出葉綠素a，葉綠素b與葉綠素全量。

三、結果與討論

(一)葉綠素萃取方法之比較

早期在萃取葉綠素時，常直接將具葉綠素之植物體(大部分不規定尺寸大小)與溶劑混合，置於研鉢中研磨以萃取出葉綠素。但以研磨的方式，常會因分析者的操作差異，而產生不同的結果，又對於具有革質的植物組織更不易將其葉綠素完全萃取出來。樟樹

為本省固有的樹種之一，亦為重要的行道樹之一，對於其革質葉片，如以傳統研磨葉片的方式萃取葉綠素恐難以萃取完全，故本試驗將葉片洗淨後，即以液態氮浸泡，使其固化以利於研磨成細粉末。本試驗除了將葉片粉末以傳統的研磨法萃取外，並嘗試以超音波法或以離心機高速離心的方式進行萃取。三種不同萃取液之紫外光-可見光光譜曲線如Fig. 1所示。樟樹葉片之丙酮萃取液的紫外光-可見光光譜曲線呈現葉綠素之特性吸收，即在662nm, 455 nm及434 nm位置有明顯的吸收峰，其中662 nm及434 nm為葉綠素a之吸收峰，而位於455 nm的吸收則為葉綠素b之特性吸收峰。事實上，葉綠素b應在643 nm處亦有吸收，但在Fig. 1中不易看出，這是因為它被葉綠素a之吸收峰所遮蔽，僅呈現肩帶(shoulder)的型態。為了使每個吸收峰均能清楚的呈現，本試驗將吸收圖譜作二次微分處理，如此，可由二次微分曲線之波谷位置標定吸收圖譜中吸收峰之正確位置。Fig. 2即為超音波法所得之丙酮萃取液之吸收圖譜(實線)與其二次微分曲線(虛線)之對照圖，由圖中即可清楚看出前面所提到的643 nm處，的確有葉綠素b的特性吸收峰存在。

比較Fig. 1中曲線中葉綠素a位於662 nm與434 nm兩處吸收峰之強度，得知以相同的時間進行萃取—即3 min，利用超音波法萃取的吸收強度(曲線a; 662 nm: 0.269, 434 nm: 0.523)大於離心機法萃取(曲線c; 662 nm: 0.247, 434 nm: 0.477)，更大於傳統研磨法所萃取(曲線d; 662 nm: 0.214, 434 nm: 0.398); 又經離心機離心15 min萃取的吸收強度(曲線b; 662 nm: 0.254, 434 nm: 0.503)稍大於離心3 min萃取(662 nm: 0.247, 434 nm: 0.477)，由此得知超音波法與離心機法萃取的結果均較傳統研磨法所萃取的為佳。此外，由葉片的顏色分析亦可以了解葉綠素萃取的效果，Table 2為萃取前葉片與以超音波法萃取後葉片粉末

Table 1. Equations for quantitative determination of chlorophyll extracted from the leaf of camphor tree (*Cinnamomum camphora*)

Solvent	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Reference
DMSO	14.85A <sub>666</sub> -5.14A <sub>643</sub>	25.48A <sub>643</sub> -7.36A <sub>666</sub>	7.49A <sub>666</sub> +20.34A <sub>643</sub>	Barnes <i>et al.</i> , 1992
80% Acetone	12.58A <sub>662</sub> -2.93A <sub>643</sub>	21.14A <sub>643</sub> -5.09A <sub>662</sub>	7.49A <sub>662</sub> +18.21A <sub>643</sub>	Barnes <i>et al.</i> , 1992
DMF	12.70A <sub>664</sub> -2.93A <sub>643</sub>	20.70A <sub>643</sub> -4.62A <sub>664</sub>	8.08A <sub>664</sub> +17.90A <sub>643</sub>	Inskeep and Bloom, 1985

Note: The wavelengths used here are the absorption maxima for chlorophyll a and chlorophyll b in the UV-visible spectra of the leaf extracts of camphor tree.

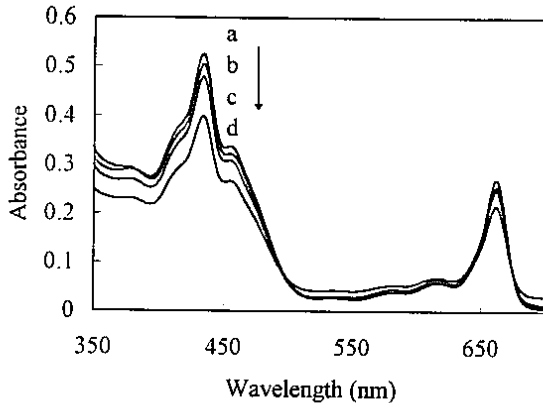


Fig. 1. UV-visible spectra of chlorophyll of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) leaf obtained by using ultrasonics (a); centrifugation for 15 min (b); centrifugation for 3 min (c); and grinding (d).

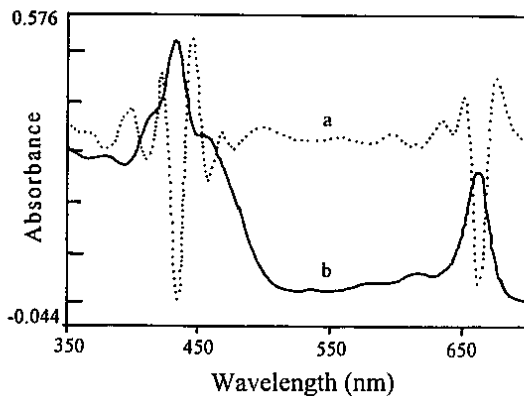


Fig. 2. UV-visible absorbance spectrum (a) and the second derivative spectrum (b) of chlorophyll of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) leaf using ultrasonics in acetone.

的顏色參數值變化，萃取前葉片的 $L^*$ ， $a^*$ ， $b^*$ 值為35.8，-4.8，12.4，黃色指數( $YI^*$ )為41.0，而經由超音波法萃取後葉片粉末的 $L^*$ ， $a^*$ ， $b^*$ 值變為51.9，11.1，21.4，黃色指數增大為73.5， $a^*$ 值由原來的-4.8變為11.1，很明顯的，由萃取前、後葉片的顏色變化亦可證實葉綠素已被完全萃取。這些試驗結果証實了以超音波法取代研磨法的可行性，又此法除了萃取所需之時間短外，且操作簡單，並可確立試驗的準確性。另外，本試驗所用的離心機萃取法亦較傳統研磨法為佳，不失為一良好的萃取方法。

## (二)不同溶劑萃取效果之比較

為了解不同溶劑對樟樹葉片葉綠素之萃取效果，將40 mg葉片粉末分別置於萃取植物體葉綠素常用的三種溶劑即丙酮，DMF及DMSO中以超音波萃取三分鐘，續以濾膜過濾萃取液，除去萃取液中之葉片粉末。三種溶劑萃取液之紫外光-可見光光譜曲線如Fig. 3所示。比較Fig. 3的光譜曲線得知，在662 nm附近的葉綠素a特性吸收峰的吸收強度(光密度)依序為：DMF (0.326) > 丙酮(0.241) > DMSO (0.203) (Table 3); 而455 nm附近之葉綠素b特性吸收峰的吸收強度依序亦為：DMF (0.452) > 丙酮(0.322) > DMSO (0.256)，Ronen與Galun的研究報告(1984)比較以DMSO與80%丙酮萃取苔蘚葉綠素之效果，亦指出DMSO萃取液位於665 nm附近之葉綠素a的吸收強度較80%丙酮的為強。由葉綠素a的吸收強度比較結果顯示DMF之萃取效果最佳。又此三種溶劑萃取液之光譜曲線的最大吸收峰位置略有差異(Fig. 3與Table 3)，以DMSO萃取的出現在較長波長處，以丙酮萃取的則出現在最短波長處，如以丙酮光譜曲線吸收所在之波長位置作為基準，計算另二種溶劑各波長的位移值(Table 3)，結果顯示除了643 nm吸收峰未產生位移外，其他三個葉綠素特性吸收峰均產生明顯的位移，其中，以DMSO萃取液的位移最大，即位於666 nm吸收峰之位移為4 nm，而在462 nm之位移更高達7 nm，這些都是因為溶劑效應所造成之向紅位移(bathochromic shift)。

## (三)樟樹葉片葉綠素之定量分析

綠色植物所含葉綠素的定量分析一直為植物化學家所關心，早期Arnon(1949)就依據Mackinney(1941)的葉綠素萃取方法，以80%丙酮萃取葉綠素，並由紫外光-可見光光譜曲線之特性吸收峰予以定量，即由葉綠素位於663 nm(葉綠素a的特性吸收)與645 nm(葉

Table 2. Changes in the color parameters of leaf of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) after chlorophyll extraction in acetone by ultrasonics

Specimen	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$YI^*$
Fresh leaf	35.8	-4.8	12.4	41.0
Extracted leaf powder	51.9	11.1	21.4	73.5

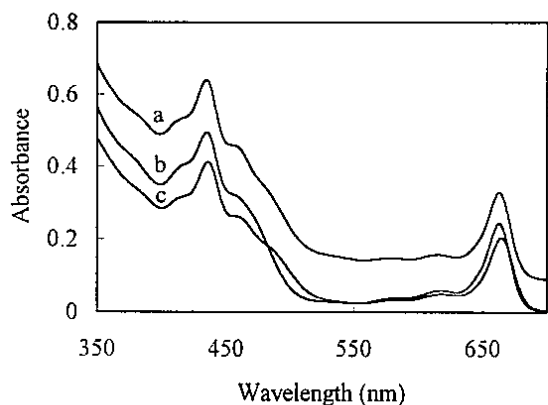
Note:  $L^*$ : value on white/black axis;  $a^*$ : value on red/green axis;  $b^*$ : value on blue/yellow axis;  $YI^*$ : value of yellowness index.

**Table 3. Effect of different solvents on the spectroscopic characteristics of chlorophyll extracted from leaf of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) by ultrasonics**

Solvent	Wavelength, $\lambda$ nm	Optical density	Shift ( $\Delta \lambda$ ) <sup>1)</sup> nm
Acetone	662	0.241	-
	643	0.082	-
	455	0.322	-
	434	0.493	-
DMF	664	0.326	+2
	643	0.177	-
	460	0.452	+5
	436	0.635	+2
DMSO	666	0.203	+4
	643	0.064	-
	462	0.256	+7
	437	0.409	+3

<sup>1)</sup> Compared with the related  $\lambda$  value in acetone.

綠素b的特性吸收)的吸收強度，分別計算葉綠素a含量，葉綠素b含量與葉綠素總含量。之後，許多研究(Moran and Porath, 1980; Moran, 1982; Inskeep and Bloom, 1985; Barnes *et al.*, 1992)探討以不同溶劑萃取各種植物體葉綠素後的定量分析，發現如將Arnon計算葉綠素丙酮萃取液含量所使用的消光係數(extinction coefficients)代入其他溶劑的定量公式中計算葉綠素含量，會使定量分析結果產生偏差，換言之，葉綠素在不同的溶劑應有不同的消光係數，因此，許多定量公式便被推導出來以供計算葉綠素a含



**Fig. 3. UV-visible absorbance spectra of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) leaf extracted by ultrasonics in DMF (a); acetone (b); and DMSO (c).**

**Table 4. Chlorophyll content of camphor tree (*Cinnamomum camphora*) leaf extracted by ultrasonics using different solvents**

Solvent	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Units: mg/g
			Total Chlorophyll
DMSO	1.679	0.086	1.765
80% Acetone	1.745	0.316	2.061
DMF	2.279	1.349	3.628

量、葉綠素b含量與葉綠素總含量。此外，Inskeep與Bloom的研究(1985)亦證實，計算葉綠素在不同溶劑萃取液之含量，必需選擇代表葉綠素a與葉綠素b最大吸收強度之波長，而不是使用固定波長。因此本試驗先以二次微分標定代表葉綠素a與葉綠素b位於662 nm與643 nm附近最大吸收強度之正確波長位置(Table 3)，再求其光密度。

本試驗利用Barnes等人研究(1992)所引用的兩種公式分別計算80%丙酮與DMSO萃取液的葉綠素含量，及Inskeep與Bloom(1985)研究報告所使用的公式計算DMF萃取液的葉綠素含量(Table 1)，其結果如Table 4所示，三種溶劑萃取所得之葉綠素含量，以DMSO的為最低，其次為80%丙酮萃取所得的，而以DMF萃取所得的為最高，即由DMSO萃取液計算的葉綠素a含量、葉綠素b含量與葉綠素總含量分別為1.679 mg/g, 0.086 mg/g與1.765 mg/g，由80%丙酮萃取液計算的葉綠素a含量、葉綠素b含量與葉綠素總含量分別為1.745 mg/g, 0.316 mg/g與2.061 mg/g，而由DMF萃取液計算的葉綠素a含量、葉綠素b含量與葉綠素總含量分別為2.279 mg/g、1.349 mg/g與3.628 mg/g。又比較三種溶劑萃取液中葉綠素b佔葉綠素總含量的百分比，計算得知在DMF萃取液中，葉綠素b所佔的百分比相當高，為37.2%，另外二種溶劑萃取液中葉綠素b所佔的百分比比較低，分別為4.9% (DMSO)與15.3% (80%丙酮)。關於葉綠素在三種溶劑之安定性與保存性將在後續之報告中討論。

#### 四、結論

本試驗以超音波法萃取樟樹葉片之葉綠素，以紫外光光譜儀分析其光譜曲線，探討其特性，並予以定量。試驗結果可綜合歸納成下列5點結論：

1. 以超音波法取代傳統研磨法，不但快速，且操作簡

易方便，可獲得較佳的萃取效果，並可確保試驗分析之準確性。

2. 離心機法萃取葉綠素的效果亦較傳統研磨法的為佳。
3. 比較三種溶劑萃取葉綠素的效果，以DMF為最佳，其次為丙酮，而DMSO萃取的較差。
4. 三種溶劑萃取之葉綠素的紫外光-可見光光譜曲線特性吸收峰會產生向紅位移，即葉綠素特性吸收峰的波長為DMSO > DMF > 丙酮。
5. 以DMSO溶劑萃取的葉綠素含量為1.765 mg/g，以80% 丙酮溶劑萃取的含量為2.061 mg/g，而以DMF溶劑萃取的含量為最多，3.628 mg/g。

### 引用文獻

- 張上鎮、王升陽、吳志鴻 1994 孟宗竹竹青葉綠素之萃取方法與光譜分析。中華林學會 83 年度年會及會員大會特刊。中華林學叢刊 945: 54。
- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24(1): 1-15.
- Barnes, J. D., L. Balaguer, E. Manrique, S. Elvira, and A. W. Davison. 1992. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. Envir. Exp. Bot. 32(2): 85-100.
- Chang, S.-T., S.-Y. Wang, and J.-H. Wu. 1998. Rapid extraction of epidermis chlorophyll of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) culm using ultrasonics J. of Wood Science 1(1): Accepted.
- Hiscox, J. D., and G. F. Israelstam. 1979. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. Can. J. Bot. 57: 1332-1334.
- Inskip, W. P., and P. R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. Plant Physiol. 77: 483-485.
- Knudson, L. L., T. W. Tibbitts, and G. E. Edwards. 1977. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. Plant Physiol. 60: 606-608.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem. 140: 315-322.
- Moran, R., and D. Porath. 1980. Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide. Plant Physiol. 65: 478-479.
- Moran, R. 1982. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide. Plant Physiol. 69: 1376-1381.
- Ronen, R., and M. Galun. 1984. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. Envir. Exp. Bot. 24(3): 238-245.
- Shoaf, T. W., and B. W. Lium. 1976. Improved extraction of chlorophyll a and b from algae using dimethyl sulphoxide. Limnol. Oceanogr. 21: 926-928.
- Wegener, G., and D. Fengel. 1977. Studies on milled wood lignins from spruce. Part I. Composition and molecular properties. Wood Sci. Technol. 11: 133-145.
- Wegener, G., and D. Fengel. 1978. Rapid extraction of lignin from ball-milled spruce wood by the use of ultrasonics. Ultrasonics. July. 105 pp.
- Wegener, G., and D. Fengel. 1979. Rapid ultrasonic isolation of milled wood lignins; fractionation and degradation experiments. Tappi. 62(3): 97-100.