

紫苏饼粕微晶纤维素酶法制备及表征

郭誉嵘, 李会珍*, 张志军, 韩婉毓, 王彦博

(中北大学化学与化工学院, 中北大学晋中产业技术创新研究院, 山西晋中 030600)

摘要: 该文优化了紫苏饼粕微晶纤维素 (*Perilla* Seed Meal Microcrystalline Cellulose, PSM-MCC) 酶法制备工艺, 并对其结构与性能进行表征。以紫苏饼粕纤维素 (*Perilla* Seed Meal Cellulose, PSM-CL) 为原料, 通过响应面法优化酶法制备微晶纤维素的最佳工艺, 并对其理化性质及功能特性进行研究。采用傅里叶红外光谱、X射线衍射、热重分析和扫描电子显微镜对 PSM-MCC 进行表征。纤维素酶法制备 PSM-MCC 最佳工艺为: pH 值 5.0、PSM-CL 和水的料液比 1:20 g/mL、加酶量的质量分数为 0.4%、酶解温度 55 °C、酶解时间 3 h。在此工艺下, PSM-MCC 得率为 90.74%, 聚合度 134。PSM-MCC 去除了木质素等杂质, 结晶度从 49.39% 增加到 61.37%。与 PSM-CL 相比, 纤维素酶水解制备的 PSM-MCC 具有更好的热稳定性, 其直径较小, 为 48.26 μm, 表面呈多孔和层状结构。该研究通过生物酶水解制备的 PSM-MCC 各项性能优异且符合国家标准, 有望被应用在食品、制药和复合材料等多个领域。

关键词: 紫苏饼粕; 纤维素酶; 微晶纤维素; 形态结构; 热性能

文章编号: 1673-9078(2024)05-189-198

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.5.0733

Enzymatic Preparation and Characterization of Microcrystalline Cellulose from *Perilla* Seed Meal

GUO Yurong, LI Huizhen*, ZHANG Zhijun, HAN Wanyu, WANG Yanbo

(School of Chemistry and Chemical Engineering, North University of China, Jinzhong Institute of Industrial Technology and Innovation, Jinzhong 030600, China)

Abstract: The enzymatic preparation of *Perilla* seed meal microcrystalline cellulose (PSM-MCC) was optimized, and its structure and properties were characterized. Response surface methodology was used to determine the optimal conditions for enzymatic preparation of PSM-MCC from *Perilla* seed meal cellulose (PSM-CL). The physicochemical and functional characteristics of PSM-MCC were studied. PSM-MCC was characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy, X-ray diffraction, thermogravimetric analysis, and scanning electron microscopy. The optimum conditions for preparing PSM-MCC using cellulase are as follows: pH at 5.0, PSM-CL to water ratio of 1:20 g/mL, enzyme addition of 0.4% (*m/m*), hydrolysis temperature at 55 °C, and reaction time of 3 h. Under these conditions, the yield of PSM-MCC equals 90.74%, and the degree of polymerization reaches 134. Impurities such as lignin in PSM-MCC are removed, with an increase in crystallinity from 49.39% to 61.37%. Compared with PSM-CL, PSM-MCC prepared through hydrolysis by cellulase exhibits better thermal stability, with a smaller diameter of 48.26 μm. In addition, its surface is porous and shows a layered structure. PSM-MCC

引文格式:

郭誉嵘,李会珍,张志军,等.紫苏饼粕微晶纤维素酶法制备及表征[J].现代食品科技,2024,40(5):189-198.

GUO Yurong, LI Huizhen, ZHANG Zhijun, et al. Enzymatic preparation and characterization of microcrystalline cellulose from *perilla* seed meal [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(5): 189-198.

收稿日期: 2023-06-16

基金项目: 山西省重点研发计划项目特优农业技术创新专项 (2022ZDYF123)

作者简介: 郭誉嵘 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源开发利用, E-mail: 1023491235@qq.com

通讯作者: 李会珍 (1974-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 植物功能成分提取及高效利用, E-mail: hzli@nuc.edu.cn

prepared through enzymatic hydrolysis has excellent properties and meets national standards, and it is expected to be used in many fields, such as food, pharmaceuticals, and composite materials.

Key words: *Perilla* seed meal; cellulase; microcrystalline cellulose; morphology and structure; thermal properties

紫苏 (*Perilla frutescens* L.) 是一种药食同源的一年生植物, 具有抗氧化、抗炎和抗癌等生物活性, 其主要分布于中国、日本和韩国等亚洲国家^[1]。在以往的研究中, 紫苏籽主要用于获取富含不饱和脂肪酸的油脂^[2], 而紫苏籽压榨后产生大量的紫苏饼粕 (*Perilla Seed Meal*, PSM) 副产品常被用作动物饲料或直接丢弃。研究表明, PSM 中含有大量的矿物营养和植物化学物质, 其中粗蛋白质含量为 32.33%, 粗纤维含量为 35.49%^[3]。近年来, PSM 的综合利用已成为研究热点。其中, Kim 等^[4]采用多种蛋白酶对 PSM 进行水解, 发现其水解物具有很强的抗氧化活性。Hwang 等^[5]使用酶水解法从 PSM 中提取的水溶性多糖具有良好的理化性质和生物活性。

纤维素 (Cellulose, CL) 是由葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的大分子多糖。通过化学、物理和生物等方法将 CL 加工成更小的颗粒, 如微晶纤维素、纳米纤维素等, 可有效改善其高吸水性和低热稳定性等缺点, 从而扩大其应用范围^[6]。深度共熔溶剂 (Deep Eutectic Solvent, DES) 是一种绿色环保的溶剂, 是由氢键供体和氢键受体组成的低温共晶混合物, 具有一定的摩尔比, 研究发现由氯化胆碱和尿素组成的 DES 可有效去除植物中的木质素和半纤维素, 制得 CL。微晶纤维素 (Microcrystalline Cellulose, MCC) 是从 CL 中利用化学、物理或生物法分离出的一种白色、无味、部分结晶的粉末, 主要制备方法有酸水解化学法、机械挤压法和酶水解生物法。其中, 酸水解后废液处理不经济环保, 机械挤压法会破坏 CL 的结构, 降低结晶度, 而酶水解过程条件温和、污染小, 可将木质素、半纤维素等水解, 能够有效提高 CL 纯度, 使其热稳定性更高, 且结构不被改变^[7]。李小红等^[8]采用酶水解法制得的甘蔗渣 MCC 具有粒度小、均匀性好等优点, 但缺乏疏松多孔结构。MCC 直径通常为 50~500 μm , 结晶指数在 55%~80% 左右^[9], 具有表面积大、聚合度 (Degree of Polymerization, DP) 低、绿色无毒、优异的刚性和热稳定性高等优点, 被广泛应用于制药、食品和复合材料等领域。在食品中, MCC 可作为膳食纤维和食品添加剂。例如, 在牛肉

饼中加入 MCC 充当脂肪替代品, 可降低脂肪含量, 还能抑制杂环芳香胺的形成^[10]。将 MCC 添加到烘焙食品中, 可改善其产品质地和感官特性^[11]。此外, Ahsan 等^[12]发现使用 MCC 作为稳定 Pickering 乳液的天然乳化剂, 能够提高其在贮藏过程中的稳定性。MCC 在食品中的应用日渐广泛, 因此, 制备原料安全、过程环保、可食用的 MCC 逐渐成为研究热点。

以往对 PSM 蛋白质及多糖的研究已较为完善, 但对 MCC 的了解仍有不足。PSM 作为绿色无毒的副产物, 所制备的 PSM-MCC 可被用于食品领域。本研究以 PSM 为原料, DES 制备紫苏饼粕纤维素 (*Perilla Seed Meal Cellulose*, PSM-CL), 探究纤维素酶法制备紫苏饼粕微晶纤维素 (*Perilla Seed Meal Microcrystalline Cellulose*, PSM-MCC) 的最佳工艺, 测定其理化性质, 对其微观结构、形貌、结晶度和热稳定性进行表征, 以期为紫苏废弃物的综合利用提供一定的理论依据和技术支撑, 有助于拓宽 MCC 的原料来源, 为纤维素酶法制备 PSM-MCC 提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

紫苏饼粕由中北大学晋中产业技术创新研究院提供。

纤维素酶 (酶活: 100 000 U/g, 酶活温度 50~60 $^{\circ}\text{C}$), 山东隆科特酶制剂有限公司; 氢氧化铜 (纯度 $\geq 95\%$), 天津市北辰方正试剂; 乙二胺 (分析纯), 天津市巴斯夫化工有限公司; 盐酸、氢氧化钠 (分析纯), 天津市恒兴化学试剂制造有限公司。

1.2 仪器与设备

HH-2 数显恒温水浴锅, 金坛市杰瑞尔电器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SB-5200DTDN 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; HZK-FA210 精密电子天平 (万分之一), 福建华志电子科技有限公司; 78HW-1 恒温磁力搅拌器, 金坛市正基仪器有限公司; CTL550 低速离心机, 湖南湘立仪器有限公司; ZYCGF-III-20T 超

纯水制备系统, 四川卓越水处理设备有限公司; 水分测定仪, 博纳科技有限公司; PB-10 酸度计, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; 1835 型乌氏粘度计, 上海良品玻璃仪器厂; iS20 傅里叶红外光谱仪, 美国赛默飞世尔科技; Empyrean X 射线衍射仪, 荷兰帕纳科公司; TG/DTA 6300 热重仪, 日本日立公司; MIRA LMS 扫描电子显微镜, 捷克泰思肯公司。

1.3 实验方法

1.3.1 紫苏饼粕纤维素的制备

参考叶童妹等^[13]方法, 氯化胆碱与尿素以摩尔比 1:2 混合, 90 °C 下保温并磁力搅拌至均匀透明溶液, 得到 DES。一定量的 PSM 与 DES 以料液比 1:20(g/g) 混匀, 120 °C 油浴加热 4 h, 5 000 r/min 离心 20 min 后多次洗涤沉淀, 于 105 °C 烘箱中干燥至恒重, 制得 PSM-CL。

1.3.2 紫苏饼粕微晶纤维素的制备

1.3.2.1 超声辅助酸水解制备紫苏饼粕微晶纤维素

参考阴艳华等^[14]方法并进行改进, PSM-CL 与质量分数为 6% 盐酸以料液比 1:20 g/mL 均匀混合, 在功率为 240 W 条件下超声 10 min。反应结束后抽滤并水洗至中性, 于 105 °C 烘箱干燥 6 h, 研磨后过 100 目筛, 制得 PSM-MCC。

1.3.2.2 纤维素酶法制备紫苏饼粕微晶纤维素及得率测定

PSM-CL 中加入纤维素酶和去离子水, 调节 pH 值, 在设定温度下酶解, 达到设定时间后于沸水浴处理 6 min 灭酶, 并水洗至中性, 105 °C 烘箱干燥 6 h 至恒重, 研磨后过 100 目筛, 制得 PSM-MCC。PSM-MCC 得率由以下公式可得:

$$Y = \frac{m_2}{m_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y —得率, % (质量分数);

m_1 —PSM-CL 的质量;

m_2 —制得 PSM-MCC 的质量。

1.3.2.3 单因素试验

在进行每个因素水平试验时, 其余因素固定为 pH 值 5.0、加酶量 (质量分数) 0.3%、温度 45 °C、料液比 1:20、时间 3 h, 分别考察 pH 值 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0; 加酶量 (质量分数) 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%; 温度 35、40、45、50、55 °C; 料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30; 时间 1、2、3、4、5 h 对

PSM-MCC 得率和聚合度的影响。

1.3.2.4 响应面法优化

在单因素试验的基础上, 采用中心组合设计, 以 PSM-CL 为原料, pH 值 5.0, 料液比 1:20, 确定加酶量 (X_1)、温度 (X_2) 和时间 (X_3) 3 个自变量对 PSM-MCC 得率 (Y) 的影响, 设计 3 因素 3 水平进行响应面试验。

1.3.3 紫苏饼粕微晶纤维素理化性质的测定

1.3.3.1 聚合度

参照 GB/T 1548-2016 《纸浆铜乙二胺 (CED) 溶液中特性粘度值的测定》^[15], 采用乌氏粘度计^[16] (毛细管内径为 0.8~0.9 mm), 于 25 °C 测定 PSM-MCC 的聚合度, 由以下公式计算:

$$[\eta] = \frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{\eta_{sp}}{0.05} = \frac{t_1 - t_0}{0.05 t_0} \quad (2)$$

$$D = \frac{[\eta]}{K} = \frac{[\eta]}{0.04421} \quad (3)$$

式中:

$[\eta]$ —特性粘度;

η_{sp} —增比粘度;

C —PSM-MCC 在铜乙二胺溶液中的质量分数, g/mL;

t_1 —PSM-MCC/铜乙二胺溶液的流出的时间, s;

t_0 —铜乙二胺溶液流出的时间, s;

D —聚合度;

K —乌氏粘度计常数, 0.044 21。

1.3.3.2 持水力

根据 Zhao 等^[17]的方法, 准确称取 MCC m_0 g 于平皿 (m_1 g) 中, 20 °C 去离子水中浸泡 1 h 后滤纸滤干, 称其总质量 m_2 g, 计算公式如下:

$$W = \frac{m_2 - m_1 - m_0}{m_0} \quad (4)$$

式中:

W —持水力;

m_0 —MCC 质量, g;

m_1 —平皿质量, g;

m_2 —吸水后平皿和 MCC 总质量, g。

1.3.3.3 溶胀性

参照魏成前等^[18]的方法, 精确称取 MCC m g 于具塞刻度试管中并记录其体积 V_1 , 加水 10 mL 充分振荡, 于室温下静置 24 h, 测定 MCC 体积 V_2 , 计算公式如下:

$$S = \frac{V_2 - V_1}{m} \quad (5)$$

式中:

S —溶胀性, mL/g;

m —MCC 质量, g;

V_1 —加水前 MCC 体积, mL;

V_2 —吸水后 MCC 体积, mL。

1.3.3.4 pH 值

按照 GB 1886.103-2015《食品安全国家标准食品添加剂微晶纤维素》^[19]的方法测定 PSM-MCC 的 pH 值。

1.3.3.5 持油力

参照邵信儒等^[20]的方法,准确称取 m_1 g MCC 于 50 mL 离心管中,加入玉米油并静置 1 h。离心后弃去上清液,用滤纸将壁上残留的油滴吸干,称其质量, m_2 。

$$O = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad (6)$$

式中:

O —持油力;

m_1 —MCC 质量, g;

m_2 —吸油后 MCC 质量, g。

1.3.3.6 水分

取一定量 PSM-MCC 于水分测定仪的测试台中,等待仪器测量完成后显示水分含量。

1.3.3.7 粒度

参考覃荣灵等^[21]方法,精确称取 10 g MCC 于 200 目筛中,振荡 2 min 后称量截留 MCC 质量,计算其质量百分率。

1.3.4 紫苏饼粕微晶纤维素的结构表征

1.3.4.1 傅里叶红外光谱

使用傅里叶红外光谱 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR) 研究 PSM-MCC 制备过程中的化学结构及官能团的变化。在 4 000~400 cm^{-1} 的范围内对 PSM、PSM-CL 和 PSM-MCC 连续扫描 32 次,分辨率为 4 cm^{-1} , 2 mg 样品与 100 mg 溴化钾粉末混匀并在红外灯下研磨成粉末,将其制成透明片在仪器中扫描,获得每种样品的红外光谱^[22]。

1.3.4.2 X 射线衍射

将样品研磨并过 200 目筛,应用 X 射线衍射 (XRD) 在 5~90°, 以 2°/min 的扫描速度进行分析,测试靶材为铜靶,获得 PSM-CL 和 PSM-MCC 的 XRD 光谱。根据 XRD 光谱的积分面积和结晶峰面积的比值计算样品的结晶度指数^[23](CrI), 计算公

式如下:

$$B = \frac{I_{(002)} - I_{am}}{I_{(002)}} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

B —结晶度指数 (CrI), %;

$I_{(002)}$ —(002) 峰 (约 $2\theta=20^\circ \sim 22^\circ$) 的强度;

I_{am} — $2\theta=18^\circ$ 峰对应的强度。

1.3.4.3 热重分析

使用热重仪,通过热重分析 (Thermogravimetric Analysis, TGA) 及其相应的导数热重分析 (Derivative thermogravimetry, DTG) 来评估样品的耐热性能。该测试在 20~800 °C 的温度范围,在氮气流动的条件下,以 10 °C/min 升温速度进行。TGA 曲线以质量损失百分比与温度的关系表示,通过对 TGA 曲线一阶偏微分可得 DTG 曲线^[24]。

1.3.4.4 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscopy, SEM) 用于检查每种样品的形态,样品须充分干燥,均喷金处理以提高样品导电性,观察不同放大倍率下每种样品的微观结构和表面形态并进行比较^[25]。

1.4 数据统计与分析

本研究所有定量数据均测定 3 次,使用 Excel 2019 进行初步数据处理,结果表示为平均值 ± 标准偏差,Origin 2021 作图。方差分析 $P < 0.05$ 被认为显著,通过 SPSS Statistics 26 软件进行分析确定。采用 Design-Expert.V 8.0.6.1 进行响应面试验。

2 结果与讨论

2.1 紫苏饼粕微晶纤维素纤维素酶法制备工艺

2.1.1 单因素试验结果

从图 1a 可以看出,随着 pH 值的增加,PSM-MCC 得率也随之增加,这是由于酶会将 CL 中糖苷键水解,得到 PSM-MCC。当 pH 值达到 5.0 时,PSM-MCC 得率达到最大值 92.93%。随着 pH 值继续增大,导致酶活性降低,PSM-MCC 得率随之降低。当得率达到最大值时,DP 为 124,符合中华人民共和国药典^[26]规定 ($DP \leq 350$),在 pH 值为 4.0~6.0 范围内,DP 呈逐渐减小趋势,可能是由于在酶的最适 pH 值范围 (4.0~5.5) 内水解剧烈,促使 CL

分子的糖苷键断裂, CL 分子量减小; 而 pH 超出最适范围时反应受到限制, 无法将无定形区域全部水解, DP 趋于稳定。所以选择 pH 值为 5.0 进行后续试验。

由图 1b 可知, 随着酶添加量的增大, DP 逐渐减小。当加酶量为 0.1% 时, 由于酶量不足以将 CL 无定形区全部水解, 因此分子量较大。随着加酶量的增大, PSM-MCC 得率逐渐增加, 在加酶量的质量分数为 0.4% 时 PSM-MCC 得率达到最大值 94.38%, 此时酶主要用于无定形区域, PSM-CL 已基本被酶水解为 PSM-MCC, DP 为 121, 符合国家标准。当酶量的继续增大时, CL 中大分子链逐渐断裂, 酶同时作用于无定形区和结晶区, CL 被水解成小分子, 导致得率和 DP 都降低。因此, 确定 PSM-MCC 的最佳加酶量的质量分数为 0.4%。

从图 1c 可以看出, 随着料液比的增大, PSM-MCC 得率总体呈现先升高后降低的趋势, DP 逐渐降低。料液比 1:20 g/mL 之前, PSM-CL 与酶难以充分混合, 不能完全反应, 得率较低。当料液比为 1:20 g/mL 时, 酶作用于 CL, 被水解成小分子, PSM-MCC 得率达到 93.90%, 此时 DP 为 126。当水继续增多时, 相当于稀释作用, PSM-MCC 得率降低, DP 基本不变。因此, 确定 PSM-MCC 最佳料液比为 1:20 g/mL。

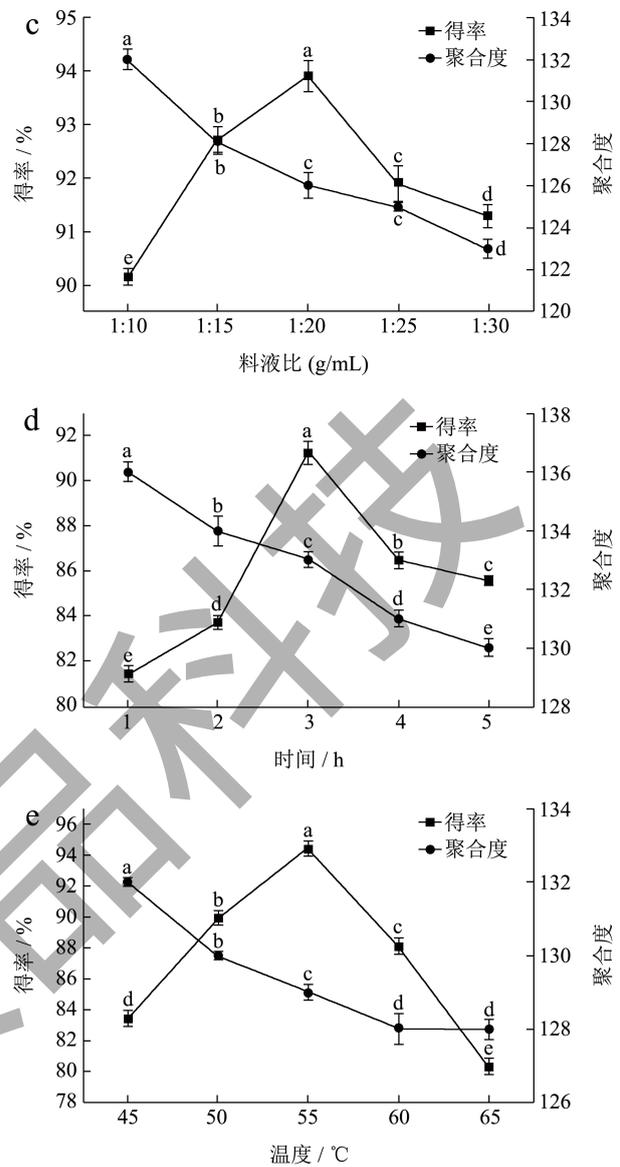
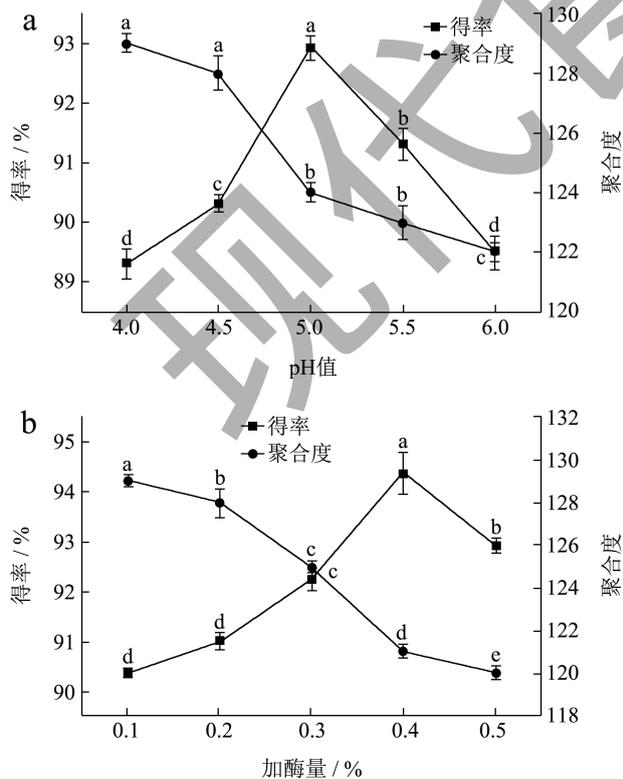


图 1 各因素对 PSM-MCC 得率和聚合度的影响

Fig.1 Influence of various factors on the yield and degree of polymerization of PSM-MCC

一般来说, 较长的提取时间有利于 PSM-MCC 得率的增大。提取时间对 PSM-MCC 得率的影响如图 1d 所示。当时间较短时, PSM-CL 与酶反应不充分, DP 较大。随着提取时间的延长, PSM-MCC 得率逐渐增加, 在时间为 3 h 时得率达到 91.26%, DP 为 133。随着提取时间进一步增加, 得率和 DP 都降低。这种现象可归因于 PSM-CL 已被基本酶解, 而产物的积累也在一定程度上抑制 PSM-MCC 的生成; DP 降低是由于反应时间过长导致 PSM-MCC 部分水解, 使得分子量减小。因此, 3 h 是 PSM-MCC 的最佳提取时间。

由图 1e 可看出, PSM-MCC 的得率在 45~55 °C

的温度范围内增加，这是由于酶活性随温度的升高而增大，促进 CL 糖苷键的断裂，使 DP 逐渐减小。当提取温度高于 55 °C 时，PSM-MCC 的得率不断下降，DP 变化不大，可能是由于高温使酶活性降低导致。因此，选择 55 °C 为最佳温度。此时 PSM-MCC 的得率为 94.42%，DP 为 128。

对五种单因素试验结果得率进行 ANOVA 显著性分析，其 *F* 值比较结果如下，*F* 值越大，说明差异越显著。因此选择加酶量、时间和温度进行响应面优化试验。

表 1 五种因素的单因素 ANOVA 显著性分析

Table 1 Single factor ANOVA significant analysis of the five factors

因素	pH 值	加酶量	料液比	时间	温度
<i>F</i> 值	120.17	128.75	80.07	314.81	386.86
显著性	**	**	**	**	**

注：* 表示差异显著 ($P < 0.05$)；** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

试验号	试验因素			得率/%
	X_1 (加酶量)/%	X_2 (温度)/°C	X_3 (时间)/h	
1	0.3	50	3	84.75
2	0.5	50	3	86.19
3	0.3	60	3	84.19
4	0.5	60	3	85.18
5	0.3	55	2	86.03
6	0.5	55	2	86.08
7	0.3	55	4	87.70
8	0.5	55	4	85.66
9	0.4	50	2	86.08
10	0.4	60	2	85.86
11	0.4	50	4	87.57
12	0.4	60	4	86.51
13	0.4	55	3	92.63
14	0.4	55	3	89.29
15	0.4	55	3	90.53
16	0.4	55	3	90.82
17	0.4	55	3	90.67

2.1.2 响应面优化试验

利用 Design-Expert 对表 2 的数据进行回归分析，以 PSM-MCC 的得率为响应值，构建纤维素酶法制备 PSM-MCC 最佳工艺的回归方程如下： $Y = +90.79 + 0.056X_1 - 0.36X_2 + 0.42X_3 - 0.11X_1X_2 - 0.52X_1X_3 - 0.21X_2X_3 - 2.92X_1^2 - 2.79X_2^2 - 1.50X_3^2$

表 3 响应面试验回归方程方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis of regression equation in response surface test

来源	离差平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值	显著性
模型	90.22	9	10.02	8.48	0.005 1	**
X_1	0.025	1	0.025	0.021	0.889 2	
X_2	1.03	1	1.03	0.87	0.381 5	
X_3	1.43	1	1.43	1.21	0.307 1	
X_1X_2	0.051	1	0.051	0.043	0.841	
X_1X_3	1.10	1	1.10	0.93	0.367 2	
X_2X_3	0.18	1	0.18	0.15	0.711	
X_1^2	36.00	1	36.00	30.46	0.000 9	**
X_2^2	32.67	1	32.67	27.64	0.001 2	**
X_3^2	9.43	1	9.43	7.98	0.025 6	*
残差	8.27	7	1.18			
失拟项	2.55	3	0.85	0.59	0.652	
纯误差	5.73	4	1.43			
总和	98.49	16				
相关系数 (R^2)	0.916 0					
调整系数 (R^2_{adj})	0.808 0					
离散系数 (C.V.%)	0.495 6					
信噪比	7.347					

注：* 表示差异显著 ($P < 0.05$)；** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

对该方程做响应面试验回归方程方差分析，结果见表 3。由表 3 可知，模型呈显著 ($P < 0.01$)，说明 PSM-MCC 的得率与加酶量、温度和时间关系显著；失拟项 $P = 0.652 > 0.05$ ，不显著 ($P > 0.05$)，说明构建的回归模型成功；模型相关系数 $R^2 = 0.916 0$ ，调整系数 $R^2_{adj} = 0.808 0$ ，说明该模型能够解释 80.80% 的响应值的变化，试验误差小；信噪比 $= 7.303 > 4$ ，说

明该模型很适合 PSM-MCC 最佳工艺的预测；离散系数 =0.475 5，该数值较小，说明试验的精确度高且可靠性强。显著性分析表明，二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对 PSM-MCC 得率影响显著 ($P < 0.05$)， F 值越大，说明影响越强，对 PSM-MCC 得率影响的强弱顺序为时间 > 温度 > 加酶量。

由图 2a 可知，加酶量和温度交互作用的响应面图较平缓，表明两者交互作用对 PSM-MCC 得率影响较小；图 2b 中加酶量和时间的响应面图较陡，对 PSM-MCC 得率的影响最大；同理，图 2c 中 PSM-MCC 得率随温度和时间的增加呈现先上升后下降趋势，两因素间交互作用均不显著 ($P > 0.05$)，说明三个因素对 PSM-MCC 得率产生独立影响，与表 3 方差分析结果一致。

根据回归方程求得 PSM-MCC 最佳工艺条件为：加酶量 0.4%、酶解温度 54.65 °C、酶解时间 3.15 h，考虑到试验的可行性，将工艺参数调整为：加酶量 0.4%，酶解温度 55 °C，酶解时间 3 h。3 次平时试验验证其稳定性，PSM-MCC 得率为 90.74%，接近模型预测值 90.83%，说明获得的 PSM-MCC 最佳工艺条件可行。

2.2 紫苏饼粕微晶纤维素理化性质

根据酶法最佳工艺制得的 PSM-MCC，对其进行理化性质检测，并与 PSM-CL 和超声辅助酸水解 PSM-MCC 进行比较，结果见表 4。PSM-MCC 的聚合度和 pH 值都在国标范围内，其持水力均高于 PSM-CL，可能是由于制备过程使亲水基团暴露；酶法 PSM-MCC 的溶胀性相对超声辅助酸水解 PSM-MCC 更好，可能由于纤维素酶的作用使 PSM-CL 无定形区域被水解，结构疏松，应用于食品中有增强饱腹感、促进消化等优势^[27]；此外，酶法 PSM-MCC 的粒度大于超声辅助酸水解 PSM-MCC 的粒度，分布

更均匀，水分含量少，便于保存。

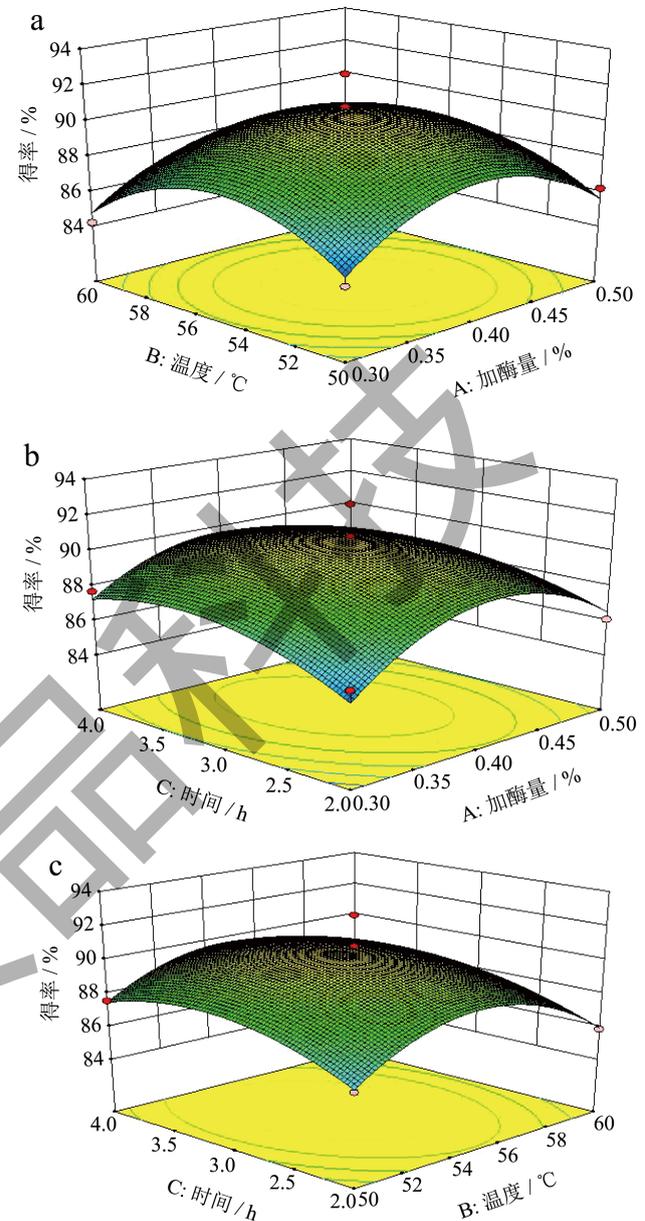


图 2 各因素两两交互作用对 PSM-MCC 得率影响的响应面

Fig.2 Response surface of the influence of pairwise interaction of various factors on PSM-MCC yield

表 4 PSM-MCC 的理化性质

Table 4 Physicochemical properties of PSM-MCC

理化性质	得率/%	聚合度	持水力	溶胀性/(mL/g)	pH 值	持油力	水分/%	粒度 (<75 μm) %
PSM-CL	—	963	3.51 ± 0.05	3.20 ± 0.14	6.6	1.08 ± 0.10	2.15 ± 0.17	83.32 ± 0.35
超声辅助酸水解 PSM-MCC	83.50	150	7.13 ± 0.20	3.56 ± 0.29	5.8	2.66 ± 0.24	3.33 ± 0.02	96.88 ± 0.56
纤维素酶制备 PSM-MCC	90.74	134	6.96 ± 0.18	4.85 ± 0.33	6.3	2.52 ± 0.25	1.06 ± 0.02	98.38 ± 0.28

2.3 紫苏饼粕微晶纤维素的表征与分析

2.3.1 傅里叶变换红外光谱

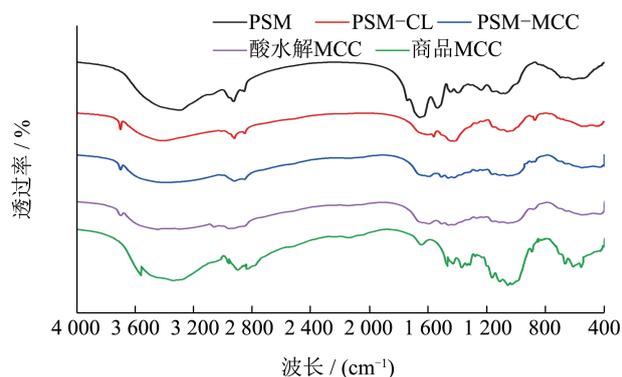


图3 不同样品的 FT-IR 图谱

Fig.3 FT-IR patterns of different samples

图3显示了PSM、PSM-CL、PSM-MCC、酸水解MCC和商品MCC的FT-IR光谱。其中，PSM-CL、PSM-MCC和酸水解MCC显示出几乎相似的光谱模式，意味着化学功能不受制备过程的显著影响。CL和MCC的吸收峰在约3698、3400、2921、2854、1512 cm^{-1} 处可观察到，与纤维素的典型官能团有关^[28]。在所有样品光谱中观察到的位于3400、2900和1600 cm^{-1} 附近的吸收带是归因于OH伸缩振动基团。CH₂基团的C-H键伸缩振动和吸附水的H-O-H弯曲振动分别与纤维材料的亲水性有关。值得注意的是，PSM在3282 cm^{-1} 处的宽吸收峰在经过提取CL和MCC后略移动到3400 cm^{-1} 附近，这表明通过处理增加了纤维素区的暴露。在1500 cm^{-1} 附近波段对应于C-H弯曲（芳香族化合物）或C=C=C伸缩（烯烃），MCC光谱图中没有出现这一峰，表明MCC中木质素含量减少，这是由于纤维素酶使CL中的木质素发生了水解。此外，1250 cm^{-1} 附近波段在三种MCC光谱中也不存在，进一步证实PSM中的木质素被去除。

2.3.2 X射线衍射

由图4可得，CL、PSM-MCC和酸水解MCC在 $2\theta=18^\circ$ 、 22° 和 37° 附近均出现明显的峰，表明CL酶解和酸水解所得的MCC都保持了天然纤维素I型结构特征，是具有 β 型结构的多晶型。同时，PSM-MCC在 $2\theta=26.49^\circ$ 和 29.25° 的尖峰与其晶体结构域相关，并且强度很高，与市售MCC有类似的峰。此外，与原始CL（49.39%）相比，PSM-MCC的CrI较高，为61.37%，这可能是由于酶水解过程可以消除主要的残留化合物，如木质素和半

纤维素，而糖苷键的裂解使纤维素晶体能够对齐，从而提高CrI并锐化XRD的峰，去除非晶态区域，FT-IR分析也证实木质素被水解。最终产生了高刚性的CL晶体结构，有望提高CL结构的韧性及抗拉强度。与CL相比，MCC具有稳定而坚固的CL结构。这些结果与先前的研究非常吻合，来自不同原料的MCC的CrI都较高，竹子MCC^[29]的CrI为82.6%，白酒丢糟MCC^[30]的CrI为62.47%，这可能是由于制备MCC的原料及其工艺不同。另一方面，XRD图显示，CL比MCC具有更宽的X射线衍射峰，证实MCC具有更小的晶粒尺寸。结果表明，本研究中分离到的PSM-MCC的CrI在商业MCC的范围（55%~80%）内。

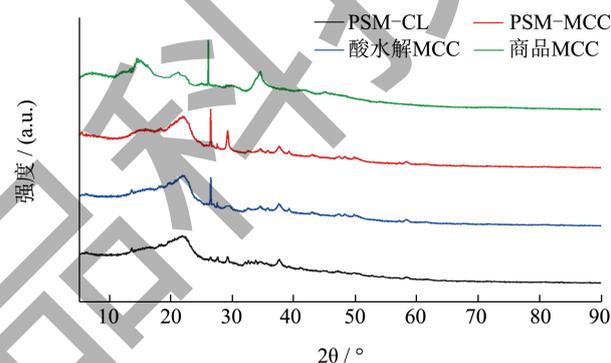


图4 不同样品的 XRD 图谱

Fig.4 XRD patterns of different samples

2.3.3 热重分析

MCC的热稳定性是评价该材料性能及其在不同行业应用的关键因素。图5显示了PSM-CL、PSM-MCC、酸水解MCC和商品MCC的TGA和DTG曲线。四种样品在30~140 $^\circ\text{C}$ 的温度范围内重量均略有下降，显示出初始分解步骤，这表明它们应该释放相同的物质，如水和挥发性化合物等。水分主要从无定形区域被去除，不同的质量损失主要取决于样品的初始含水率。在下一个降解阶段，PSM-MCC的初始热裂解温度为224 $^\circ\text{C}$ ，商品MCC为205 $^\circ\text{C}$ ；PSM-MCC的最大失重率温度为294 $^\circ\text{C}$ ，商品MCC为291 $^\circ\text{C}$ 。相比之下，CL的初始热解温度为180 $^\circ\text{C}$ ，最大失重率温度为254 $^\circ\text{C}$ 。CL较低的热稳定性可能是由于半纤维素、木质素和其他非纤维素片段的的存在造成的，这些片段充当CL纤维之间的粘合剂，能促进热分解过程。由于酶水解后杂质被去除，所制备的MCC的结晶结构极大地提高了对高温的耐热性。在图5b中，三种MCC的DTG曲线陡，呈现出尖锐的峰型，表明其CL纯

度较高,也证实了酸水解和酶水解后杂质的去除。TGA的这些发现表明,来自PSM的MCC在工业应用中具有很高的热稳定性。

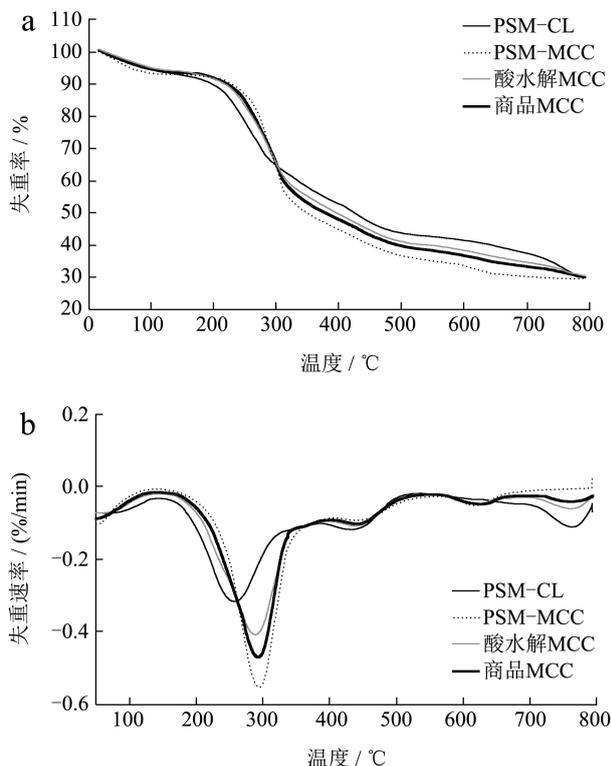


图5 不同样品的TGA和DTG比较

Fig.5 Comparison of TGA and DTG of different samples

注:(a) 样品TGA图;(b) 样品DTG图。

2.3.4 扫描电子显微镜

通过SEM研究了CL和MCC的形态特征并进行比较。如图6a所示,原始CL的SEM图像显示,其表面粗糙,有长纤维和一些小颗粒,直径约为 $129.07\ \mu\text{m}$ 。这种粗糙度是由于非纤维素成分的存在,半纤维素、木质素等杂质覆盖在CL的表面^[31]。此外,CL在低放大倍率下观察到大束纤维,较高放大倍率下观察到高度交织的纤维,这也表明木质素的存在,木质素与CL形成连接,并充当CL纤维的粘合剂。经过酶水解后,由于杂质被去除,可由图6b看出,MCC表面更光滑,平均直径减小到 $48.26\ \mu\text{m}$ 左右,在MCC标准范围内。而且大束CL纤维转化为较小的单个纤维,这种转换同样表明酶水解减少了木质素,进而转化为不规则形状的MCC。这一结果与FT-IR结果一致,表明其余杂质已去除。与市售MCC(图6d)相比,PSM-MCC存在疏松多孔结构,其比表面积较大,使纤维更具有活性。图6c可看到MCC存在片状结构。

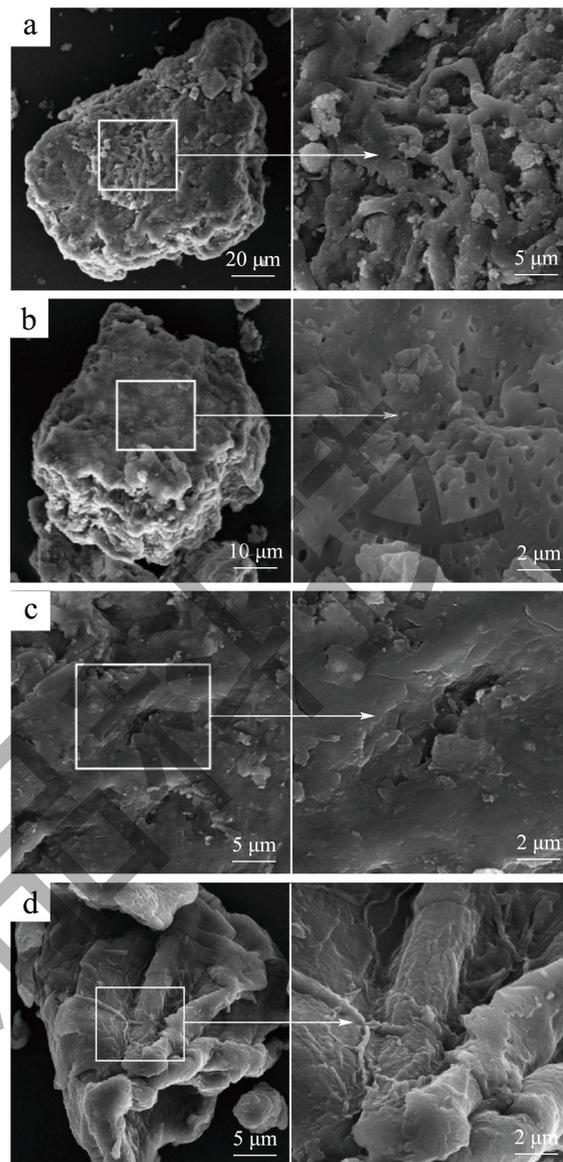


图6 不同样品的SEM图

Fig.6 SEM diagrams of different samples

注:(a) PSM-CL放大500倍和2000倍图;(b) PSM-MCC放大500倍和2000倍图;(c) PSM-MCC放大2000倍和5000倍图;(d) 市售MCC放大2000倍和5000倍图。

3 结论

研究表明,纤维素酶法制备PSM-MCC最佳工艺为:pH值5.0、料液比1:20 g/mL、加酶量0.4%、酶解温度 $55\ ^\circ\text{C}$ 、酶解时间3 h,在此制备工艺下的PSM-MCC得率为90.74%,聚合度为133.75。其溶胀性相对较好,为 $4.85\ \text{mL/g}$;粒度($<75\ \mu\text{m}$)为98.38%,分布均匀。对酶法PSM-MCC进行结构分析表明,其化学结构无变化,但木质素等杂质被去除,结晶度指数提高到61.37%,具有稳定而坚固的

纤维素结构,直径小,比表面积增大,热稳定性显著提高。总之,本研究通过生物酶水解制备的紫苏微晶纤维素各项性能优异,符合国家标准,有望被应用在食品、制药和复合材料等多个领域。

参考文献

- [1] PARK JY, SEO HB, LA JW, et al. Chemical profiles of heated perilla meal extracts and their antioxidant activities [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2021, 56(10): 5130-5238.
- [2] ZHAO B, FU S, LI H, et al. Chemical characterization of Chinese perilla seed oil [J]. *Journal of Oleo Science*, 2021, 70(11): 1575-1583.
- [3] 朱国君.紫苏饼粕蛋白质的分离提取及其功能特性研究[D].重庆:西南大学,2008.
- [4] KIM J M, YOON K Y. Functional properties and biological activities of perilla seed meal protein hydrolysates obtained by using different proteolytic enzymes [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2020, 29: 1553-1562.
- [5] HWANG Y J, KIM J M, YOON K Y J C-J O F. Characteristics of water-soluble polysaccharides extracts produced from perilla seed meal via enzymatic hydrolysis [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2020, 18(1): 653-661.
- [6] XIANG L Y, MOHAMMED M A, BAHARUDDIN A S. Characterisation of microcrystalline cellulose from oil palm fibres for food applications [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 148: 11-20.
- [7] TAO P, ZHANG Y, WU Z, et al. Enzymatic pretreatment for cellulose nanofibrils isolation from bagasse pulp: transition of cellulose crystal structure [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 214: 1-7.
- [8] 李小红,黄薇薇,王润东,等.甘蔗渣微晶纤维素制备及其性能研究[J].*中国食品添加剂*,2017,11:58-63.
- [9] TRACHE D, HUSSIN M H, CHUINC T H, et al. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application-A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 789-804.
- [10] GIBIS M, WEISS J. Inhibitory effect of cellulose fibers on the formation of heterocyclic aromatic amines in grilled beef patties [J]. *Food Chemistry*, 2017, 229: 828-836.
- [11] GÓMEZ M, MORALEJA A, OLIETE B, et al. Effect of fibre size on the quality of fibre-enriched layer cakes [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2010, 43(1): 33-38.
- [12] AHSAN H M, ZHANG X, LI Y, et al. Surface modification of microcrystalline cellulose: Physicochemical characterization and applications in the stabilization of pickering emulsions [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 132: 1176-1184.
- [13] 叶童妹,李会珍,张志军,等.深度共熔溶剂提取紫苏秸秆纤维素的研究[J].*中国食品添加剂*,2023,34(3):164-171.
- [14] 阴艳华,郑碧微,李海玲,等.微波水解法制备稻草微晶纤维素及能效分析[J].*化学与生物工程*,2010,27(10):44-46.
- [15] GB/T 1548-2016.纸浆铜乙二胺(CED)溶液中特性粘度值的测定[S].
- [16] 侯人月.微晶纤维素的制备及其产品研究[D].沈阳:沈阳理工大学,2016.
- [17] ZHAO H, ZHANG K, RUIS, et al. Study on microcrystalline cellulose/chitosan blend foam gel material[J]. *Science and Engineering of Composite Materials*, 2020, 27(1): 424-432.
- [18] 魏成前,苏伟,宋玉,等.酶法制备竹笋壳微晶纤维素及其理化性质分析[J].*山地农业生物学报*,2018,37(4):30-35,44.
- [19] GB 1886.103-2015.食品安全国家标准食品添加剂微晶纤维素[S].
- [20] 邵信儒,王金阳,于雅萱,等.山葡萄梗微晶纤维素的性质及其表征[J].*食品工业*,2019,40(9):158-162.
- [21] 覃荣灵,黄爱民,黄祖强,等.蔗渣微晶纤维素的制备及性能测定[J].*中国食品添加剂*,2012,6:250-253.
- [22] ZHU P, FENG L, DING Z, et al. Preparation of spherical cellulose nanocrystals from microcrystalline cellulose by mixed acid hydrolysis with different pretreatment routes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18): 10764.
- [23] ADELEYE O A, BAMIRO O A, ALBALAWI D A, et al. Characterizations of alpha-cellulose and microcrystalline cellulose isolated from cocoa pod husk as a potential pharmaceutical excipient [J]. *Materials*, 2022, 15(17): 5992.
- [24] HACHAICHI A, KOUINI B, KIAN L K, et al. Extraction and characterization of microcrystalline cellulose from date palm fibers using successive chemical treatments [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2021, 29: 1990-1999.
- [25] SZYMAŃSKA-CHARGOT M, CHYLIŃSKA M, GDULAK, et al. Isolation and characterization of cellulose from different fruit and vegetable pomaces [J]. *Polymers*, 2017, 9(10): 495.
- [26] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [27] NSOR-ATINDANA J, CHEN M, GOFF H D, et al. Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 172: 159-174.
- [28] KIAN L K, JAWAID M, ARIFFIN H, et al. Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from roselle-derived microcrystalline cellulose [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 54-63.
- [29] RASHEED M, JAWAID M, KARIM Z, et al. Morphological, physicochemical and thermal properties of microcrystalline cellulose (MCC) extracted from bamboo fiber [J]. *Molecules*, 2020, 25(12): 2824.
- [30] 任海伟,李金平,张轶,等.白酒丢糟制备微晶纤维素工艺优化及结构特性[J].*现代食品科技*,2013,29(10):2461-2468.
- [31] ZHAO H, KWAK J H, ZHANG Z C, et al. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68(2): 235-241.