

李昊,何传波,熊何健,等. 超声辅助碱性过氧化氢法提取琯溪蜜柚幼果纤维素的工艺优化及结构表征 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 249–257. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080287

LI Hao, HE Chuanbo, XIONG Hejian, et al. Optimization of Ultrasonic Assisted Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction and Structural Characterization of Cellulose from Young Fruit of Guanxi Honey Pomelo[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 249–257. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080287

· 工艺技术 ·

超声辅助碱性过氧化氢法提取琯溪蜜柚幼果纤维素的工艺优化及结构表征

李昊¹,何传波^{1,*},熊何健¹,魏好程¹,张福祥²,倪辉^{3,4,*}

(1.集美大学食品与生物工程学院,福建厦门 361021;

2.中宝(福建)食品科技有限公司,福建漳州 363700;

3.福建省食品微生物与酶工程重点实验室,福建厦门 361021;

4.厦门市食品生物工程技术研究中心,福建厦门 361021)

摘要:采用超声辅助碱性过氧化氢法对琯溪蜜柚幼果中的纤维素进行提取研究,在单因素实验基础上,以纤维素纯度作为指标,利用 Design-Expert 8.0 设计中心组合试验,采用响应面分析法优化纤维素的提取工艺,并对纤维素进行了红外光谱分析和扫描电镜分析。结果表明,超声功率的改变对纤维素纯度和得率的影响并不显著,水浴温度、超声时间、过氧化氢溶液体积分数、氢氧化钠溶液质量浓度均对纤维素纯度和得率影响显著;优化的最佳提取条件为:超声功率 200 W,超声时间 40 min,水浴温度 80 ℃,H₂O₂ 体积分数 0.9%,NaOH 质量浓度 9%。在此条件下纤维素纯度预测值为 88.48%,实测值为 88.95%,该模型理论预测值与实际值拟合效果良好,此条件下纤维素得率为 17.65%。红外分析表明纤维素制备成功,扫描电镜分析发现纤维素较处理前的琯溪蜜柚幼果表面结构疏松,沟壑较深,X-射线衍射分析表明纤维素具有 I 型结构,结晶度为 44.26%。本研究优化了琯溪蜜柚幼果纤维素的超声辅助碱性过氧化氢提取工艺,耗时短、纤维素纯度高,为琯溪蜜柚幼果的利用及食品源纤维素的开发提供参考。

关键词:琯溪蜜柚幼果,超声,响应面法,纤维素纯度,得率

中图分类号:TS255.3

文献标识码: B

文章编号:1002-0306(2022)08-0249-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080287

本文网刊:



Optimization of Ultrasonic Assisted Alkaline Hydrogen Peroxide Extraction and Structural Characterization of Cellulose from Young Fruit of Guanxi Honey Pomelo

LI Hao¹, HE Chuanbo^{1,*}, XIONG Hejian¹, WEI Haocheng¹, ZHANG Fuxiang², NI Hui^{3,4,*}

(1.College of Food and Marine Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2.Zhongbao (Fujian) Food Technology Co., Ltd., Zhangzhou 363700, China;

3.Fujian Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;

4.Xiamen Food Bioengineering Technology Research Center, Xiamen 361021, China)

Abstract: The extraction of cellulose from the young fruit of Guanxi honey pomelo was studied by ultrasonic assisted alkaline hydrogen peroxide method. On the basis of single factor experiments, taking the cellulose purity as the index, the combination experiment of Design-Expert 8.0 design center was used to optimize the extraction process of cellulose by response surface analysis, the cellulose was analyzed by IR and SEM. The results showed that the change of ultrasonic

收稿日期: 2021-08-26

基金项目: 福建省区域发展项目(2019N3012);国家自然科学基金海峡联合重点项目(U1805235);福建省科技厅星火项目(2020S0043)。

作者简介: 李昊(1997-),男,硕士研究生,研究方向:农产品加工及利用,E-mail: 13834702852@163.com。

*通信作者: 何传波(1978-),男,博士,副教授,研究方向:多糖物质及其综合利用,E-mail: hcbcc@jmu.edu.cn。

倪辉(1973-),男,博士,教授,研究方向:食品生物化学,E-mail: nihui@jmu.edu.cn。

power had no significant effect on the purity and yield of cellulose, but water bath temperature, ultrasonic time, volume fraction of hydrogen peroxide solution and mass concentration of sodium hydroxide solution had significant effects on the purity and yield of cellulose. The optimum extraction conditions were as follows: Ultrasonic power 200 W, ultrasonic time 40 min, water bath temperature 80 °C, H_2O_2 volume fraction 0.9%, NaOH mass concentration 9%. Under these conditions, the predicted value of cellulose purity was 88.48%, and the measured value was 88.95%, under this condition, the yield of cellulose was 17.65%. Infrared analysis showed that cellulose was successfully prepared. SEM analysis showed that the surface structure of cellulose was looser and the gully was deeper than that of Guanxi honey pomelo young fruit before treatment. X-ray diffraction analysis showed that cellulose had type I structure and the crystallinity was 44.26%. This experiment optimized the ultrasonic assisted alkaline hydrogen peroxide extraction process of cellulose from young fruits of Guanxi honey pomelo. It was an efficient and easy to popularize cellulose preparation method, which would provide a reference for the utilization of young fruits of Guanxi honey pomelo and the development of cellulose.

Key words: Guanxi honey pomelo young fruit; ultrasonic; response surface methodology; cellulose purity; yield

纤维素是地球上含量最丰富的聚合物,其具有良好的胶体形态、独特的晶体结构、表面电荷和润湿性质^[1-3]。纤维素可作为增稠剂、稳定剂、保水剂和功能性成分,在医药、化工等领域广泛应用纤维素^[4]。目前工业纤维素主要来源于棉花、秸秆、木材等木质纤维素原料^[5],不能满足食品方面的应用。可食用性材料如柑橘类果皮、甘蔗渣等来源广泛,含有丰富的纤维素和多种黄酮、多酚、果胶等活性物质^[6],在食品安全性及功能性方面要优于木质来源的纤维素。

纤维素的制备方法主要有机械法、化学法和生物法^[7]等,目前可食用来源的纤维素主要通过酸、碱、氧化等化学处理法获得,这些方法普遍耗时较长、过程繁琐、成本较高。过氧化氢在碱性介质中可以分离出羧自由基和超氧阴离子自由基($HO\cdot$ 和 $O_2^{\cdot-}$),两者对脱除木质素和增溶大分子半纤维素作用显著,在甘蔗渣、柚皮、金针菇等食品原料纤维素的提取中已经有较多的研究^[8]。同时有研究表明超声波处理具有特殊的空化作用,可以加快化学反应和促进各类成分的分离提取^[9],于各种功能活性物质的提取制备领域有越来越广泛的应用。因此采用超声辅助碱性过氧化氢法制备纤维素,有希望获得制备耗时短、步骤简单且纯度较高的可食用来源纤维素。

琯溪蜜柚是一种产于福建平和县的柑橘类水果,其年产量达到 150 万吨以上。在琯溪蜜柚种植过程中,每年由于梳果将产生 20~35 万吨的幼果,其中富含纤维素和果胶^[9],是一种潜在的食品工业纤维素原料。现已报道的柚皮纤维素的提取方法主要为酸法-碱法-氧化处理,即柚皮粉末依次经过酸处理脱除果胶、碱处理脱除半纤维素,氧化脱除木质素后得到纤维素,不但操作步骤繁琐,且耗时较长。刘爱璐等^[10]对上述提取方法进行了改进,使用碱性过氧化氢法直接处理成熟柚皮制备纤维素,简化了制备工艺,但耗时较长,且所得纤维素的纯度有待提高。基于此,本文以琯溪蜜柚幼果琯溪蜜柚幼果粉为原料,使用超声法结合碱性过氧化氢法制备纤维素,并采用单因素和响应面试验优化提取工艺,为开发利用安全、功能性优越、纯度较高且耗时较短的食品用纤维素提供技术参考,同时为琯溪蜜柚幼果的资源开发提供理论

依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

琯溪蜜柚幼果 2019 年 7 月采摘于漳州平和县。切片、65 °C 烘箱干燥 2 h、粉碎后过 80 目筛得到琯溪蜜柚幼果粉,其纤维素含量为 $28.85\%\pm 1.35\%$,半纤维素含量为 $11.76\%\pm 0.83\%$,木质素含量为 $6.39\%\pm 0.8\%$,水分含量为 $12.13\%\pm 0.87\%$,蛋白含量为 $3.51\%\pm 0.23\%$,灰分含量为 $3.74\%\pm 0.35\%$,脂肪含量为 $1.10\%\pm 0.07\%$;氢氧化钠、过氧化氢(30%)、EDTA、硫酸镁、浓硫酸(98%)、浓盐酸(36%) 分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

EL104 型分析天平 梅特勒-托利多有限公司;KBS-650 型超声波仪器 昆山市超声仪器有限公司;UV-8000 型紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司;SPH-110X12 型恒温水浴锅 世平国际有限公司;DHG-9146 型电热恒温干燥箱 上海精宏设备有限公司;PiLot3-6E 型真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 纤维素提取工艺 称取一定质量的琯溪蜜柚幼果粉,以原料质量 1:25(g/mL)的料液比加入到一定 H_2O_2 体积分数和 NaOH 质量分数的混合溶液中,加入一定量 EDTA 和硫酸镁(H_2O_2 稳定剂),在一定水浴温度和超声功率下提取一定时间,抽滤、洗涤、-40 °C 冷冻干燥 48 h,粉碎后得到琯溪蜜柚幼果纤维素。

1.2.2 单因素实验 称取 2 g 琯溪蜜柚幼果粉,按原料质量 1:25(g/mL)的料液比,加入到 H_2O_2 体积分数 1%(mL/mL)、NaOH 质量分数 5%(g/mL)的混合溶液中,以超声功率为变量(0、100、200、300、400 W)在水浴温度 80 °C 条件下提取 40 min,以纤维素纯度及得率为指标确定最佳超声功率。

以最佳超声功率在不同水浴温度(50、60、70、80、90 °C)条件下考察不同提取温度对纤维素纯度及得率的影响,确定最佳水浴温度。

以最佳超声功率、最佳温度在不同超声时间

(30、40、50、60、70 min)条件下考察不同超声时间对纤维素纯度及得率的影响,确定最佳超声时间。

以最佳超声功率、最佳温度、最佳超声时间在不同 H_2O_2 体积分数(0.3%、0.5%、0.7%、0.9%、1.1%)条件下考察不同 H_2O_2 体积分数对纤维素纯度及得率的影响,确定最佳 H_2O_2 体积分数。

以最佳超声功率、最佳温度、最佳超声时间、最佳 H_2O_2 体积分数在不同 NaOH 质量浓度(3%、5%、7%、9%、11%)条件下考察不同 NaOH 质量浓度对纤维素纯度及得率的影响,确定最佳 NaOH 质量浓度。

1.2.3 响应面试验设计 综合单因素实验结果,采用 Box-Behnken 试验设计,选择水浴温度、超声时间、 H_2O_2 体积分数、NaOH 质量浓度 4 个因素为自变量设计四因素三水平响应面试验表,因素与水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels for conducting the response surface analysis

水平	A: 超声时间 (min)	B: 水浴温度 (℃)	C: H_2O_2 体积分数 (%)	D: NaOH 质量浓度 (%)
-1	30	70	0.7	7
0	40	80	0.9	9
1	50	90	1.1	11

1.2.4 纤维素纯度及得率的测定 采用 NY/T 3030-2016 中蒽酮比色法^[11]进行测定提取产物中纤维素总量,提取物中纤维素量占提取物质量的百分率为纤维素的纯度;提取得到的纤维素总量占未提取前琯溪蜜柚幼果粉质量的百分率为纤维素得率。

1.2.5 红外光谱分析 使用溴化钾压片法,称取 2 mg 工艺优化后的纤维素与 2 g 溴化钾混合后研磨均匀,经压片后在红外光谱仪记录其 FT-IR 光谱,频率范围为 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 。琯溪蜜柚幼果粉命名为 PP,纤维素样品命名为 PP-C。

1.2.6 扫描电镜分析 取适量工艺优化后的纤维素样品固定在导电胶上,喷金 40 s,仪器电流设定为 10 mA,加速电压 3.0 kV,300、3000 倍扫描电镜下观察纤维素表观形态。琯溪蜜柚幼果粉命名为 PP,纤维素样品命名为 PP-C。

1.2.7 X-射线衍射分析 在 X 射线衍射仪(XRD)下观察纤维素的衍射图。工作电压为 40 kV,电流为 40 mA,设定以 $2^\circ/\text{min}$ 的角度在 2θ 为 $5^\circ\sim 40^\circ$ 的范围内扫描测试样品。根据 Segal 公式计算结晶度指数 CrI 值。公式如下所示:

$$\text{CrI} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中:CrI 代表结晶度; I_{002} 为 002 面($2\theta=22.6^\circ$)晶格衍射峰强度; I_{am} 为纤维素无定形区衍射峰强度($2\theta=18^\circ$)。

1.3 数据处理

每个试验重复三次,三次结果取平均值,以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示。响应面实验设计通过 Design-Expert.V8.0.6.1 软件进行,采用 SPSS18.0 软件进行数据的分析。

2 结果与分析

2.1 单因素结果

2.1.1 超声功率对纤维素提取的影响 受到生产条件和生产成本的影响,在实际生产中很难达到较高的超声功率,因此本文所试验的功率范围为 $0\sim 400\text{ W}$ 。本研究结果显示(图 1),超声功率从 0 提高至 100 W 时,得率从 15.49% 显著($P<0.05$)提升至 17.46%,而后超声功率继续增加,得率变化不显著。Bussemake 等^[12]发现适当的超声强度可以增强木质纤维素在生物炼制应用中的预处理能力,增强氧化过程,因此增加超声处理可以促进碱性过氧化氢溶液制备纤维素。当超声功率从 0 提高至 100 W 时,通过显著性分析发现纯度显著($P<0.05$)提升,从 75.52% 升高为 85.16%,这是由于超声产生的空化能量有效提高了纤维素在溶液中的分散程度,同时使碱性过氧化氢溶液分离半纤维素、木质素效率提升;当超声波功率从 100 W 提高到 400 W 时,超声功率变化对纤维素纯度影响并不明显,在 200 W 时纤维素纯度最大,达到 85.71%,这是因为在一定范围内提升超声功率所增加的空化能量不足以改变纤维素在溶液中的状态,因此该条件下增加超声功率对纤维素纯度及得率的影响较小。王淋靓等^[13]通过超声波辅助法从甘蔗渣中提取纤维素,发现超声功率从 200 W 提高到 500 W 后纤维素的纯度无明显变化,大量研究结果表明,超声处理在低功率阶段变化对提取物的得率及纯度影响并不大^[14-18],这与本文所得结果类似。

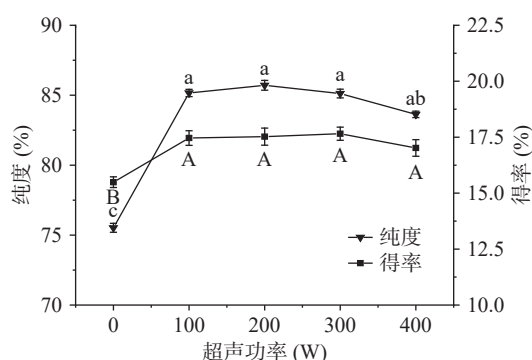


图 1 超声功率对琯溪蜜柚幼果纤维素纯度和得率的影响
Fig.1 Effects of ultrasonic power on purity and yield of Guanxi honey pomelo young fruit cellulose

注:同类相同字母代表差异显著, $P<0.05$,不同代表不显著, $P>0.05$;图 2~图 5。

2.1.2 水浴温度对纤维素提取的影响 本研究显示(图 2),随着温度的升高,纤维素得率先上升,在 80°C 时达到最大值,而后开始下降;而纤维素纯度先显著上升,在 80°C 时达到 89.18% 后小幅度下降。显著性分析表明随着温度的升高,纤维素得率和纯度变化

都较为显著, 80 ℃ 后变化不显著, 这是由于温度较低时, 纤维素与半纤维素、木质素的结合较为紧密, 难以溶出; 温度升高后, 琯溪蜜柚幼果粉植物组织结构会变得膨胀疏松, 在超声作用下更易被破坏, 同时 H_2O_2 分解产生的 $\text{HO}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 分解效率大幅度提高^[19-21], 因此温度对纤维素纯度有显著影响。该结果与相关研究表明温度对纤维素提取的影响规律有一定相似性, 同时表明 80 ℃ 左右的温度有利于纤维素纯度的提高。Sankhla 等^[22] 从甘蔗渣中提取纤维素, 发现最适温度下甘蔗渣热降解活化能提高了 115.2%, 纤维素纯度增加了 33%, 反应温度是纤维素纯度最主要影响的因素之一。

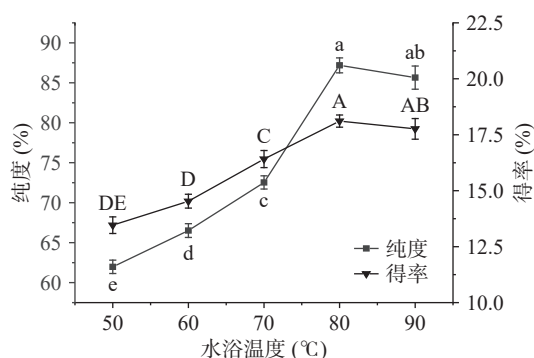


图2 水浴温度对琯溪蜜柚幼果纤维素纯度和得率的影响
Fig.2 Effects of water bath temperature on purity and yield of Guanxi honey pomelo young fruit cellulose

2.1.3 超声时间对纤维素提取的影响 本研究结果(图3)表明, 随着超声功率的增加, 半纤维素和木质素被逐渐去除, 纤维素得率上升, 但时间过长会导致纤维素降解, 使得率下降, 显著性分析表明得率受时间影响显著。纯度在 40 min 时达到最大值, 在 60 min 后显著($P<0.05$)下降, 整体呈现出先上升后降低的趋势, 这是由于反应时间较短时, 半纤维素、木质素不能被充分溶出, 此时得到的纤维素纯度较低, 这是由于超声对聚合物的降解模型为连续变量的分布动力学模型^[23-25], 聚合物降解需要长时间不间断的进行超声, 所以超声时间不足会导致聚合物降解不完全。随着反应时间的延长, 半纤维素、木质素与纤维素在超

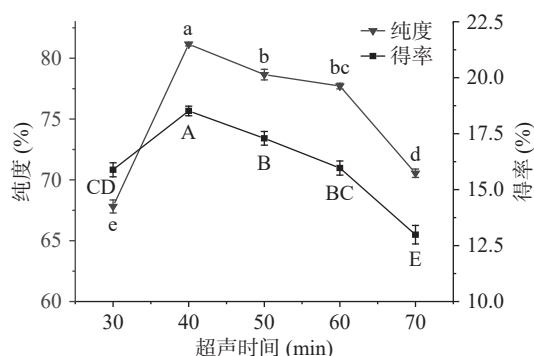


图3 超声时间对琯溪蜜柚幼果纤维素纯度和得率的影响
Fig.3 Effects of ultrasonic time on purity and yield of Guanxi honey pomelo young fruit cellulose

声及高温作用下逐渐分离, 在 40 min 时纤维素的纯度和得率达到最大值, 分别为 81.16% 和 18.11%。当反应时间过长时, 部分纤维素被降解, 导致纯度下降。薛刚等^[26] 利用超声法从银杏果壳中制备纳米纤维素, 发现纤维素的纯度在超声时间 25 min 时达到最大值, 而后因处理时间过长降解为葡萄糖而逐渐下降, 该结果与本文得到的规律相似。

2.1.4 H_2O_2 体积分数对纤维素提取的影响 本研究结果表明(图4), 随着 H_2O_2 体积分数的增加, 琯溪蜜柚幼果纤维素的得率呈逐渐下降趋势, 显著性分析起始下降并不显著, 但在 H_2O_2 体积分数达到 1.1% 时下降极为显著, 得率整体随 H_2O_2 体积分数变化不大。当 H_2O_2 体积分数增加至 0.9% 时, 纤维素纯度达到最高值 86.70%, 但当 H_2O_2 体积分数继续升高时, 纤维素纯度和得率均显著($P<0.05$)下降, 这是由于碱性条件下在一定范围内增加 H_2O_2 的浓度会增加分解产生 $\text{HO}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的浓度, 从而更有效的脱除木质素和半纤维素^[27], 但过量的 H_2O_2 在超声作用下会造成溶剂和反应物溢出且上下分层, 反应无法正常进行。王文侠等^[28] 使用碱性过氧化氢法从豆渣中提取半纤维素, 发现当 H_2O_2 体积分数超过 1.8% 后, 半纤维素的提取率因反应过于剧烈而下降。研究表明, 随着 H_2O_2 体积分数的增加, 半纤维素和木质素的脱除效果也逐渐增加^[29], 纤维素纯度上升, 得率减少。该结果与相关研究报道 H_2O_2 对纤维素提取的规律相似, 同时表明琯溪蜜柚幼果纤维素提取的 H_2O_2 体积分数在 0.9% 左右比较合适。

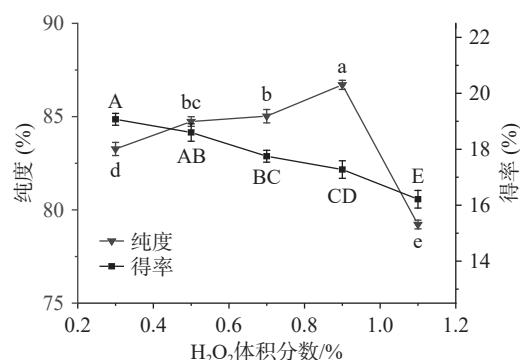


图4 H_2O_2 体积分数对琯溪蜜柚幼果纤维素纯度和得率的影响

Fig.4 Effects of H_2O_2 volume fraction on purity and yield of Guanxi honey pomelo young fruit cellulose

2.1.5 NaOH 质量浓度对纤维素提取的影响 NaOH 质量浓度对纤维素提取得率及纯度的影响如图5所示。随着 NaOH 质量浓度的增加, 纤维素纯度和得率均呈先增后减的趋势, 在 NaOH 质量浓度为 9%、7% 时分别获得纯度最高值 86.82% 和得率最高值 17.74%, 显著性分析表明纯度受 NaOH 质量浓度影响极显著, 而得率整体受影响较小, 这是由于 NaOH 质量浓度增加时, 植物组织中的黄酮类、蛋白质、色素等快速溶出, 同时羟自由基和超氧阴离子自由基对

半纤维素、木质素等物质的降解加快,纤维素的纯度随之增加^[10]。但过高的 NaOH 质量浓度会加快 H₂O₂ 的分解,并且抑制两种自由基的反应,从而使纤维素纯度降低。Owolabi 等^[8]使用碱性过氧化氢预水解油棕叶制备纤维素,对比不同梯度的氢氧化钠质量分数(8%、12.5%、15%)对纤维素制备效果的影响,发现当氢氧化钠质量分数为 12.5% 时,制备的纤维素纯度最高,过高的氢氧化钠浓度会导致制备效果下降。这与本文所得到的结果相一致。综合来看,选取 NaOH 溶液质量浓度为 9% 较为合适。

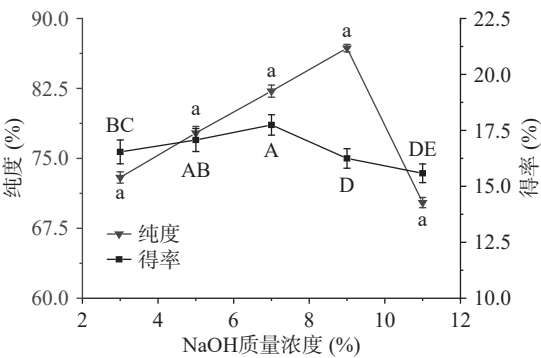


图 5 NaOH 质量浓度对琯溪蜜柚幼果纤维素纯度和得率的影响

Fig.5 Effects of NaOH concentration on purity and yield of Guanxi honey pomelo young fruit cellulose

2.2 响应面法优化纤维素提取工艺

2.2.1 响应面模型设计方案及试验结果 响应面法可以高效、快速的得到高精度的回归方程,从而找出整个区域上因素的最佳组合和最优响应值^[30]。单因素实验结果表明,超声功率对纤维素提取的得率和纯度影响较小,而超声时间、水浴温度、H₂O₂ 体积分数和 NaOH 质量浓度对琯溪蜜柚幼果纤维素提取纯度具有明显的影响,且纤维素纯度是其最重要的指标之一,与其结构、性质及应用密切相关,因此以纤维素纯度为评价指标,采用 Box-Behnken 设计,选取超声时间(A)、水浴温度(B)、H₂O₂ 体积分数(C)和 NaOH 质量浓度(D)为自变量,进行四因素三水平响应面优化试验,试验方案及结果如表 2 所示。

使用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 进行二次多元回归分析,根据各项的回归系数获得响应值与自变量的模型方程为:

$$Y=88.48-2.54A-2.98B+3.18C+0.68D-3.6AB+3.97AC+0.49AD+5.58BC+1.6BD-3.93CD-2.95A^2-4.24B^2-2.54C^2-7.25D^2$$

回归系数显著性检验结果如表 3 所示。从表 3 可知 Y 方程的回归模型 $P<0.01$, 模型极显著;失拟项 $P>0.05$, 影响不显著,模型决定系数 $R^2=0.98$, 因此回归模型可靠,能够较好地反应纤维素的纯度与自变量的关系。各因素中除超声时间和 NaOH 质量浓度的交互作用对响应值影响不显著($P>0.05$), NaOH 质量浓度影响显著($P<0.05$)外,其余各因素及两因素

之间的交互作用对响应值的影响均极显著($P<0.01$)。各因素对纤维素纯度的影响从大到小依次排列为:

表 2 琯溪蜜柚幼果纤维素纯度的 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box Behnken experimental design and response value of cellulose purity of Guanxi honey pomelo young fruit

实验号	A	B	C	D	Y: 纯度(%)
1	-1	-1	0	0	81.87±3.25
2	1	-1	0	0	86.33±3.34
3	-1	1	0	0	83.51±4.57
4	1	1	0	0	73.58±2.58
5	0	0	-1	-1	70.89±2.73
6	0	0	1	-1	84.68±4.75
7	0	0	-1	1	80.63±2.32
8	0	0	1	1	78.71±1.35
9	-1	0	0	-1	80.52±3.86
10	1	0	0	-1	74.01±3.52
11	-1	0	0	1	81.69±2.36
12	1	0	0	1	77.13±3.21
13	0	-1	-1	0	87.30±2.58
14	0	1	-1	0	70.31±1.73
15	0	-1	1	0	82.05±1.68
16	0	1	1	0	87.37±2.38
17	-1	0	-1	0	86.46±2.57
18	1	0	-1	0	72.06±2.67
19	-1	0	1	0	85.77±2.64
20	1	0	1	0	87.27±3.54
21	0	-1	0	-1	81.72±3.81
22	0	1	0	-1	72.05±3.64
23	0	-1	0	1	78.54±2.12
24	0	1	0	1	75.28±3.18
25	0	0	0	0	87.72±2.64
26	0	0	0	0	88.43±1.94
27	0	0	0	0	88.88±1.51
28	0	0	0	0	88.95±1.57
29	0	0	0	0	88.42±0.75

表 3 琯溪蜜柚幼果纤维素纯度的回归模型方差分析结果

Table 3 Analysis of variance of regression model for cellulose purity of Guanxi honey pomelo young fruit

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1024.70	14.00	73.19	79.55	<0.0001	**
A	72.21	1.00	72.21	78.48	<0.0001	**
B	106.33	1.00	106.33	115.57	<0.0001	**
C	121.49	1.00	121.49	132.04	<0.0001	**
D	5.49	1.00	5.49	5.96	0.03	*
AB	51.76	1.00	51.76	56.26	<0.0001	**
AC	63.16	1.00	63.16	68.65	<0.0001	**
AD	0.95	1.00	0.95	1.03	0.33	/
BC	124.38	1.00	124.38	135.19	<0.0001	**
BD	10.30	1.00	10.30	11.20	<0.0001	**
CD	61.67	1.00	61.67	67.02	<0.0001	**
A ²	56.57	1.00	56.57	61.48	<0.0001	**
B ²	116.69	1.00	116.69	126.82	<0.0001	**
C ²	41.87	1.00	41.87	45.51	<0.0001	**
D ²	340.56	1.00	340.56	370.14	<0.0001	**
残差	12.88	14.00	0.92			
失拟项	11.91	10.00	1.19	4.90	0.07	/
纯误差	0.97	4.00	0.24			
总和	1037.58	28.00				

注: **代表极显著, *代表显著, /代表不显著。

H_2O_2 体积分数(C)、水浴温度(B)、超声时间(A)、NaOH 质量浓度(D)。

2.2.2 响应面分析及优化 各自变量对纤维素纯度响应值影响的三维响应面图如图 6 所示。水浴温度、超声时间、NaOH 质量浓度及 H_2O_2 体积分数对纯度的影响趋势大致相同,均呈现出先增后降的趋势。三维图趋势显示除 NaOH 质量浓度和超声时间(AD)交互作用对纤维素纯度的影响不显著外($P>0.05$), H_2O_2 体积分数和水浴温度(BC)、 H_2O_2 体积分数和超声时间(AC)、NaOH 质量浓度和 H_2O_2 体积分数(CD)、水浴温度和超声时间(AB)、NaOH 质量浓度和水浴温度(BD)交互作用均对纤维素纯度有极显著影响($P<0.01$)。

通过建立的响应面回归模型方程,得出模型的中心点是最大点,所以预测出琯溪蜜柚幼果粉纤维素最佳制备工艺为:超声时间 40 min,水浴温度 80 $^{\circ}\text{C}$, H_2O_2 体积分数 0.9%,NaOH 质量浓度 9%,此时得到理论纯度为 88.48%。

在以上优化条件下进行 5 次平行试验,得到纤维素的实际纯度为 88.95%,与理论值相近,该模型有效,此条件下的纤维素得率为 17.65%。曾小峰等^[31]使用碱法从成熟琯溪蜜柚果皮中制备纤维素,发现在 NaOH 质量浓度为 9.4%、提取时间 77 min、提取温度 84 $^{\circ}\text{C}$ 时可以得到纯度为 63.12% 的纤维素;刘爱璐等^[10]利用碱性过氧化氢法从梅县柚子皮中提取纤维素,发现在 4% 质量分数氢氧化钠、0.9% 体积分数 H_2O_2 的混合溶液中 80 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h 后可以得到 77% 纯度的纤维素。与现有的方法相比,本研究采用超声辅助碱性过氧化氢法提取琯溪蜜柚幼果纤维素耗时更短,纤维素的纯度和得率明显提高,这一方面由于琯溪蜜柚幼果含有大量的纤维素,同时也因为超声波作用,超声波能量使空腔在水中快速形成、生长和剧烈坍塌,在声化学中由空化提供的能量约为 10~100 kJ/mol ^[32],该能量传递能有效提高纤维素在溶液中的分散程度与半纤维素、木质素的分离效率^[33],从而有效减少制备时间,同时提高纤维素的纯度。综上所述

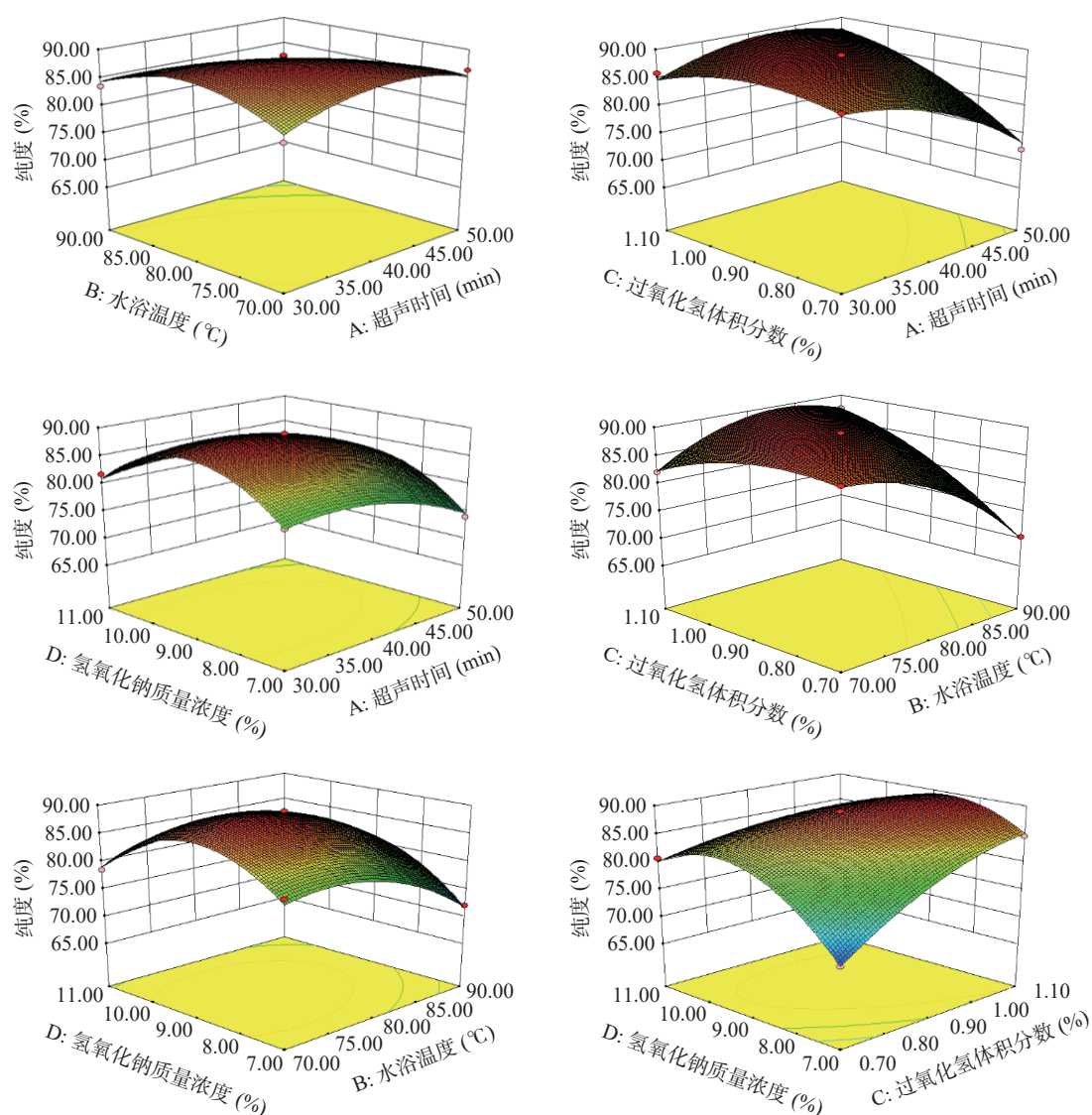


图 6 各因素交互作用对琯溪蜜柚幼果纤维素纯度的影响

Fig.6 Effects of interaction of various factors on cellulose purity of Guanxi honey pomelo young fruit

述,本研究采用超声辅助过氧化氢法提取琯溪蜜柚幼果纤维素是一种高效、原料来源稳定的可食性纤维素制备方法,为食品源纤维素的制备提供了原料和技术工艺参考。

2.3 红外光谱分析

如图 7 所示琯溪蜜柚幼果粉及其纤维素样品的红外光谱图。幼果粉在 1740 cm^{-1} 左右的峰值是由果胶(糖醛酸酯基团)和半纤维素中非共轭的酮、羰基以及酯中的 $\text{C}=\text{O}$ 非结合拉伸振动引起的^[10],而纤维素的红外图谱中该峰消失,表明大部分半纤维素和果胶已被去除。同时幼果粉光谱图还显示了木质素的两个特征峰,分别位于 $1520\sim 1510\text{ cm}^{-1}$ (苯环骨架伸缩振动)和 $1300\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ (羰基共轭芳香酮的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动)处。这些峰在纤维素光谱中的消失表明大部分木质素也已经被成功去除。纤维素样品在大约 3400 、 2900 、 1430 、 1370 、 890 cm^{-1} 附近显示出与纤维素(I 型)特性相关联的吸收峰^[4],因此,超声辅助碱性过氧化氢法成功从幼果粉中去除了大部分的半纤维素和木质素。

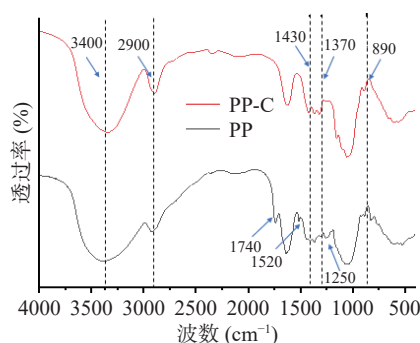


图 7 纤维素红外光谱图

Fig.7 Infrared spectra of cellulose

注: PP: 琯溪蜜柚幼果粉, PP-C: 纤维素; 图 8 同。

2.4 扫描电镜分析

琯溪蜜柚幼果中的纤维素分子周围紧密镶嵌着半纤维素和木质素,为了对比制备前后纤维素的微观结构变化,本实验采用扫描电镜法,在 1500 倍下对琯溪蜜柚幼果及其制备的纤维素进行结构分析,结果如图 8 所示。由图 8 可知未经处理的琯溪蜜柚幼果纤维结构较为完整,表明平滑且沟壑较少,而超声辅助碱性过氧化氢法制备的纤维素表层有较大孔隙,有较深的沟壑和卷曲结构,表面变得更加疏松,且出现了细小的纤维。这是由于碱性过氧化氢溶液去除了与纤维素密切连接的木质素和半纤维素,成功分离出纤维素,而超声处理对纤维素的聚集态结构及细纤化影响较大,其可减小纤维素的粒径,同时也更利于纤维素的进一步水解和改性。聚合物(如纤维素)的超声降解断链优先发生在链的中心部位,这与热降解反应的无规则链断裂不同^[24],所以超声法可以和碱性过氧化氢法相结合起到协同作用,对琯溪蜜柚幼果纤维素的提取非常有利。Liu 等^[29]使用扫描电镜对柚皮

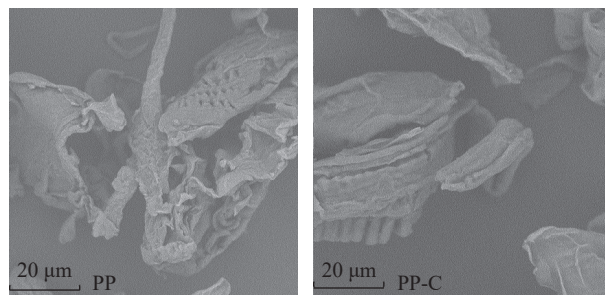


图 8 琯溪蜜柚幼果及纤维素扫描电镜图

Fig.8 SEM images of Guanxi honey pomelo young fruits and cellulose

和柚皮纤维素的微观形态进行对比分析,发现原始柚皮材料的表面较为光滑,水解为纤维素后内部结构被破坏,表面疏松多孔,与本文得到的结果相似。

2.5 X-射线衍射分析

如图 9 所示为琯溪蜜柚幼果纤维素的 X-射线衍射图。峰谱显示纤维素在约 16.5° 、 22.6° 和 34.2° 处分别显示出三个特征峰,分别对应于纤维素 I 晶格的(110)、(200)和(040)晶面,是一种典型的纤维素 I 型结构,经计算得出其结晶度为 44.26%。纤维素中有结晶区和无定形域,而半纤维素和木质素本质上属于无定形域,当柚皮中的木质素和半纤维素脱除后,结晶区在纤维素中的比例会增加,因此会导致纤维素的结晶度增加。Owolabi 等^[8]通过碱性过氧化氢法结合硝酸乙醇预处理制备柚皮纤维素,通过 X-射线衍射分析后得到其结晶度为 35.61%。本文所得纤维素结晶度较高,一方面可能是由于原料本身结晶区的差别,另一方面可能是因为超声波作用于纤维素分子时会产生局部温度高达 $5000\text{ }^\circ\text{C}$ 、压力 50 MPa 的空腔,空腔达到临界半径时会生爆炸而释放出大量能量,从而引起纤维素无定形区域的破坏^[27],因此去除半纤维素和木质素的效果更好。

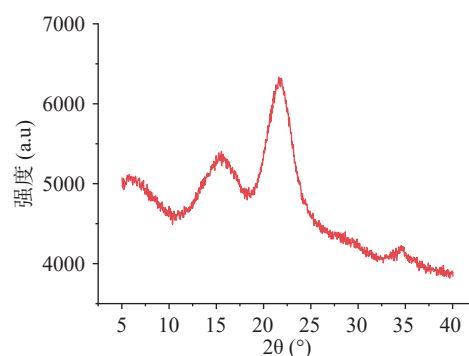


图 9 琯溪蜜柚幼果纤维素 X-射线衍射图

Fig.9 X-ray diffraction pattern of Guanxi honey pomelo young fruits cellulose

3 结论

本研究采用超声辅助碱性过氧化氢法提取琯溪蜜柚幼果纤维素,利用单因素和响应面分析法进行工艺优化。单因素实验结果表明超声功率的变化对纤维素纯度影响不大,随着超声时间、水浴温度、 H_2O_2

体积分数、NaOH 质量浓度的增加,纤维素纯度均先上升后下降,五种因素对纤维素得率的影响均不显著;响应面试验结果表明最佳提取条件为:超声功率 200 W,超声时间 40 min,水浴温度 80 ℃,H₂O₂ 体积分数 0.9%,NaOH 质量浓度 9%,五次平行实验发现纤维素纯度实测值为 88.95%,纤维素得率为 17.65%。该方法耗时短,所得纤维素纯度高,为琯溪蜜柚幼果的开发利用及纤维素的制备提供了理论依据。红外光谱分析表明超声辅助碱性过氧化氢法成功提取了琯溪蜜柚幼果纤维素,扫描电镜表明纤维素有较深的沟壑和卷曲结构,有利于进一步水解和改性,X-射线衍射分析表明纤维素具有 I 型纤维素结构,结晶度为 44.26%。

参考文献

- [1] HE X, LU W, SUN C, et al. Cellulose and cellulose derivatives: Different colloidal states and food-related applications[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 255: 117334.
- [2] CAZÓN P, VÁZQUEZ M. Bacterial cellulose as a biodegradable food packaging material: A review[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 113: 106530.
- [3] LIN D, LIU Z, SHEN R, et al. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 158: 1007–1019.
- [4] 沈佳莉. 不同原料制备微晶纤维素的工艺优化及其结构研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2019. [SHEN J L. Process optimization and structure study of microcrystalline cellulose prepared from different raw materials[D]. Lanzhou: Lanzhou University of technology, 2019]
- [5] 李健, 刘雅南, 刘宁, 等. 羧甲基纤维素的制备研究及应用现状[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(8): 379–382. [LI J, LIU Y N, LIU N, et al. Preparation, research and application status of carboxymethyl cellulose[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2014, 35(8): 379–382.]
- [6] LIU H, ZENG X, HUANG J, et al. Dietary fiber extracted from pomelo fruitlets promotes intestinal functions, both *in vitro* and *in vivo*[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 252: 117186.
- [7] 吕天艺, 张书敏, 陈媛, 等. 不同形态纳米纤维素的制备方法研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021: 1–10. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028527. [LV T Y, ZHANG S M, CHEN Y, et al. Research progress on preparation methods of different forms of nano cellulose [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021: 1–10. doi: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.028527]
- [8] OWOLABI A F, HAAFIZ M K M, HOSSAIN M S, et al. Influence of alkaline hydrogen peroxide pre-hydrolysis on the isolation of microcrystalline cellulose from oil palm fronds[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 1228–1234.
- [9] 胡阳, 晏幸, 伍菱, 等. 琯溪蜜柚幼果中柚皮苷含量变化规律[J]. *食品科学*, 2021, 42(12): 159–165. [HU Y, YAN X, WU L, et al. Variation law of naringin content in young fruit of Guanxi honey pomelo[J]. *Food Science*, 2021, 42(12): 159–165.]
- [10] 刘爱璐, 黄文. 碱性过氧化氢法提取柚皮纤维素的工艺研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(10): 1779–1784. [LIU A L, HUANG W. Study on the extraction process of pomelo peel cellulose by alkaline hydrogen peroxide[J]. *Research and Development of Natural Products*, 2017, 29(10): 1779–1784.]
- [11] NY/T 3030-2016 棉花中水溶性总糖含量的测定 蒽酮比色法[S]. 北京: 农业农村部, 2016. [NY/T 3030-2016 Determination of water soluble total sugar content in cotton-anthrone colorimetric method[S]. Beijing: Ministry of Agriculture and Rural Areas, 2016]
- [12] BUSSEMAKER M J, MU X, ZHANG D. Ultrasonic pretreatment of wheat straw in oxidative and nonoxidative conditions aided with microwave heating[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(35): 12514–12522.
- [13] 王淋靓, 张思原, 梁琼元, 等. 超声波辅助碱性双氧水法提取甘蔗渣纤维素最优工艺探讨[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(6): 1008–1013. [WANG L L, ZHANG S Y, LIANG Q Y, et al. Discussion on the optimal process of ultrasonic assisted alkaline dioxigen water extraction of bagasse cellulose [J] *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44 (6): 1008–1013.]
- [14] SRIBALA G, CHENNURU R, MAHAPATRA S, et al. Effect of alkaline ultrasonic pretreatment on crystalline morphology and enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. *Cellulose*, 2016(3): 1725–1740.
- [15] ZIANOR AZRINA Z A, BEG M D H, ROSLI M Y, et al. Spherical nanocrystalline cellulose (NCC) from oil palm empty fruit bunch pulp via ultrasound assisted hydrolysis[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 162: 115–120.
- [16] MORIANA R, VILAPLANA F, EK M. Cellulose nanocrystals from forest residues as reinforcing agents for composites: A study from macro- to nano-dimensions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 139: 139–149.
- [17] VELMURUGAN R, MUTHUKUMAR K. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: Optimization through response surface methodology[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 112: 293–299.
- [18] TRACHE Djalal, HUSSIN M Hazwan, HUI Chuin Caryn Tan. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 93: 789–804.
- [19] LI F, DENG C, LIU X, et al. SiO₂-modified biocarbon materials derived from shaddock peel for Li-ion batteries[J]. *Chemistry Select*, 2019(29): 8614–8620.
- [20] ZHAO Rongjun, WANG Zhezhe, YANG Y, et al. Pd-Functionalized SnO₂ nanofibers prepared by shaddock peels as bio-templates for high gas sensing performance toward Butane[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2019(1): 13.
- [21] LIN, YANG S, CHEN J, et al. Electro-adsorption of tetracycline from aqueous solution by carbonized pomelo peel and composite with aniline[J]. *Applied Surface Science*, 2016: 460–466.
- [22] SANKHLA S, SARDAR H H, NEOGI S. Greener extraction of highly crystalline and thermally stable cellulose micro-fibers from sugarcane bagasse for cellulose nano-fibrils preparation[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 251: 117030.
- [23] MADRAS G, KUMAR S, CHATTOPADHYAY S. Continu-

- ous distribution kinetics for ultrasonic degradation of polymers[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2000, 69(1): 73–78.
- [24] IMAI M, IKARI K, SUZUKI I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 17(2): 79–83.
- [25] BLAKEPERUTZ J R, SUSLICK K S, DIDENKO Y, et al. Acoustic cavitation and its chemical consequences[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 1999, 357(1751): 335–353.
- [26] 薛刚, 何易, 李小白, 等. 超声辅助硫酸水解法制备银杏果壳纳米纤维素及其特性表征[J]. *食品工业科技*, 2021: 1–15.
- [XUE G, HE Y, LI X B, et al. Preparation and characterization of Ginkgo pericarp nano cellulose by ultrasonic assisted sulfuric acid hydrolysis[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2021: 1–15.]
- [27] VENTURA-CRUZ S, FLORES-ALAMO N, TECANTE A. Preparation of microcrystalline cellulose from residual Rose stems (*Rosa* spp.) by successive delignification with alkaline hydrogen peroxide[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 324–329.
- [28] 王文侠, 宋春丽, 张晓静, 等. 碱性过氧化氢法提取豆渣半纤维素的研究[J]. *中国粮油学报*, 2010, 25(12): 117–121.
- [WANG W X, SONG C L, ZHANG X J, et al. Extraction of hemicellulose from soybean residue by alkaline hydrogen peroxide[J]. *Chinese Journal of Grain and Oil*, 2010, 25(12): 117–121.]
- [29] LIU Y, LIU A, IBRAHIM S A, et al. Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from pomelo peel[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 111: 717–721.
- [30] 张学刚. 一种改进响应面法结构可靠度计算方法[J]. *机械强度*, 2018, 40(6): 1382–1388. [ZHANG X G. An improved response surface method for structural reliability calculation[J]. *Mechanical Strength*, 2018, 40(6): 1382–1388.]
- [31] 曾小峰, 白小鸣, 盖智星, 等. 响应面试验优化超声辅助提取柚皮纤维素工艺[J]. *食品科学*, 2015, 36(14): 34–38. [ZENG X F, BAI X M, GAI Z X, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of cellulose from pomelo peel by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2015, 36(14): 34–38.]
- [32] CHEN W, YU H, LIU Y, et al. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83(4): 1804–1811.
- [33] LAN W, LIU C, YUE F, et al. Ultrasound-assisted dissolution of cellulose in ionic liquid[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86(2): 672–677.