

酶法制备大豆皮微晶纤维素及其理化特性

刘恩岐, 张建萍, 唐仕荣, 巫永华

(徐州工程学院 江苏省食品资源开发与质量安全重点实验室, 江苏 徐州 221008)

摘要: 采用纤维素酶水解法制备大豆皮微晶纤维素, 研究加酶量、酶解pH值、温度、时间、液料比等因素对大豆皮酶解产物中微晶纤维素(MCC)含量的影响, 确定了大豆皮微晶纤维素制备的最佳工艺条件: 料液比1:20(g/mL), 加酶量1%, 反应pH4.8, 酶解温度47℃, 酶解时间1h。通过理化特性和电镜扫描分析表明, 制备的大豆皮MCC的平衡聚合度、持水性和表观黏度等理化特性与台湾明台商品MCC接近, 且大豆皮MCC电镜扫描结构疏松, 比表面积较大, 从微观结构上解释了大豆皮MCC吸水后的溶胀体积较大, 对肠道产生的容积作用较强, 据此推断大豆皮MCC对加强肠蠕动、促进体内垃圾的排泄有更好的效果。

关键词: 大豆皮; 纤维素酶; 微晶纤维素; 理化性质

Enzymatic Preparation and Physicochemical Properties of Microcrystalline Cellulose from Soybean Husks

LIU En-qi, ZHANG Jian-ping, TANG Shi-rong, WU Yong-hua

(Jiangsu Key Laboratory of Food Resource Development and Quality Safety, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

Abstract: Microcrystalline cellulose (MCC) was prepared from soybean husks via cellulase hydrolysis. The effects of enzyme dosage, pH, time, temperature and solid-to-liquid ratio on the content of MCC in soybean husk hydrolysate were studied. The optimal conditions for MCC preparation were found to be hydrolysis at pH 4.8 and 47 °C for 1 h with an enzyme dosage of 1% and a solid-to-liquid ratio of 1:20 (g/mL). The prepared MCC had similar physicochemical properties such as average degree of polymerization (DP), water-holding capacity and apparent viscosity as a commercial MCC product, and showed a loose structure and a large specific surface area as shown by SEM observation. Microstructure analysis showed that the MCC obtained from soybean husks had a large swelling volume after water absorption, resulting in a good filling effect in the intestinal tract. Based on this, we speculated that MCC derived from soybean husks is more effective in enhancing peristalsis and promoting defecation.

Key words: soybean husk; cellulase; microcrystalline cellulose; physicochemical properties

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)24-0122-05

微晶纤维素(microcrystalline cellulose, MCC)是由天然纤维素经稀酸或酶水解达到极限聚合度的白色粉末状物质, 与人们日常摄入的纤维素组分相同, 是一种安全可靠的食物添加剂^[1], 得到了联合国粮农组织和世界卫生组织所属食品添加剂联合鉴定委员会的认可^[2-3], 我国GB 2760—2011《食品添加剂使用标准》已将微晶纤维素列为可在各类食品中按生产需要量使用的食品添加剂。微晶纤维素是一种功能性食用纤维, 具有诸多保健作用, 如加强肠蠕动, 防止便秘; 结合胆固醇, 预防动脉硬化; 吸附肠内毒素; 促进肠内好气性细菌增殖, 抑制腐败有害菌的产生, 预防肠癌; 外观形态似奶油, 用于奶制品和面包的脂肪代用品, 不被人体吸收, 有利减肥等^[4-5]。微晶纤维素作为重要的功能性食品基料, 具有广阔的开发应用前景。

天然纤维素是由D-吡喃型葡萄糖基经 β -1,4糖苷键联结而成的直链多糖, 直链状大分子纤维素折迭起来, 以氢键形成具有高结晶的基本构成单位。目前, 对纤维素的水解过程研究较多的是酸水解法, 高浓度强酸可有效水解纤维素, 但其腐蚀性对环境有害, 且所需工艺条件苛刻, 而用纤维素酶水解纤维素, 具有工艺条件温和、无污染等特点, 因此, 采用纤维素酶降解纤维素是目前纤维素利用研究中的热点^[6]。纤维素酶是将纤维素水解成纤维糊精、纤维二糖和葡萄糖的一组复杂酶系的总称, 根据其中各酶功能的差异, 主要分为3类: 葡聚糖内切酶(EG)、葡聚糖外切酶(CBH)和 β -葡萄糖苷酶(BG)。EG随机水解 β -1,4糖苷键, 将长链纤维分子切断, 产生大量非还原性末端的小分子纤维素; CBH作用于纤维素线状分子非还原性末端, 每次切下一个纤维二糖分子, 再由胰

收稿日期: 2012-06-07

基金项目: 徐州工程学院科研培育项目(xky2007225)

作者简介: 刘恩岐(1964—), 男, 教授, 研究方向为食品生物技术。E-mail: leq@xzit.edu.cn

高血糖素(GC)酶水解成2个葡萄糖^[7]。酶法制备微晶纤维素的理论依据主要基于EG酶随机水解切断无定形区的纤维素分子链,形成大量的结晶纤维素分子,最终水解至极限聚合度的微晶纤维素^[8]; Foster等^[9]采用Spezyme CP纤维素酶系(64FPU/mL)水解玉米穗纤维素制备微晶纤维素,取得了与酸水解法(1.0mol/L硫酸)相近的效果,但由于纤维素酶的组分复杂,在催化水解纤维素过程中的具体功能还不是特别清楚,对纤维素酶法制备微晶纤维素的降解机理还需深入研究。

大豆皮是大豆制品加工的副产物,约占大豆总质量的8%。大豆皮含粗蛋白11%、粗脂肪2%、果胶3%、纤维素40%、半纤维素20%、木质素2%,是制备食品级微晶纤维素的良好原料^[10]。本研究以大豆皮为原料,在蒸煮挤压降低豆皮纤维素聚合度^[11],化学法水解制备豆皮纤维素的基础上^[12],采用纤维素酶水解制备微晶纤维素,优化确定豆皮微晶纤维素制备的工艺技术条件,获得大豆皮微晶纤维素,并进一步研究大豆皮微晶纤维素的理化性质,为其在食品工业中的应用提供技术依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

大豆皮 江苏省徐州维维集团股份有限公司; 纤维素水解酶(10000FPU/g) 大连英斯特生物技术有限公司; 台湾明台MCC(M101) 上海运宏化工制剂辅料技术有限公司; 重铬酸钾 天津市福晨化学试剂厂; 氢氧化钠、次氯酸钠 上海苏懿化学试剂有限公司; 六水合硫酸亚铁铵、乙二醇 汕头市西陇化工有限公司。

1.2 仪器与设备

pHS-3C精密pH计 上海世义精密仪器有限公司; TDS32-II型双螺杆膨化食品机 济南赛信膨化机械有限公司; 毛细管黏度计 上海西域机电系统有限公司; NDJ-79型黏度计 上海昌吉地质仪器有限公司; TGL-20M高速台式冷冻离心机 湘仪离心机仪器有限公司; JSM-6490LV扫描电镜 日本JEOL公司; LGJ-18A型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆皮的预处理

将大豆皮清洗、烘干、粉碎,加20%的水,搅拌均匀,水平平衡1h后,使用双螺杆挤压机挤压处理豆皮粉,挤压处理的条件为:挤压温度150℃,螺杆转速210r/min,再经过烘干、粉碎得到挤压大豆皮粉。

1.3.2 纤维素酶水解制备微晶纤维素^[13-14]

取挤压处理后大豆皮粉100g,按1:10(g/mL)的比例加入质量分数为5%的NaOH溶液,加热煮沸1h,待冷却后分离固形物并用蒸馏水冲洗干净。按每克残留固形物加

2mL体积分数为5%的次氯酸钠溶液进行漂白处理,漂洗后再加入蒸馏水40mL,用醋酸调pH值至5.0,55℃水浴中处理1h,酸水解后的残留物用蒸馏水冲洗至中性,再用体积分数为95%的乙醇溶液洗涤除杂,最后水洗至无乙醇味,抽滤,烘干得大豆皮纤维素。

取大豆皮纤维素10g,放入500mL锥形瓶中,然后分别加入一定量的水和纤维素酶,调节pH值,将锥形瓶放入恒温水浴锅中在设定温度条件下水解,达到设定水解时间后,灭酶,调节水解液pH7.0,抽滤,残留物再用蒸馏水洗涤3次后干燥得到微晶纤维素。

1.3.3 MCC聚合度的测定

采用铜乙二胺-乌氏黏度计^[15]测定MCC聚合度。

1.3.4 MCC含量的测定^[16]

精确称取样品0.1250g,置锥形瓶中,加去离子水25mL,加重铬酸钾溶液(取重铬酸钾4.903g,用水定容至200mL)50mL,混匀,加入浓硫酸100mL,迅速加热至沸腾,冷却至室温,加水定容至250mL,摇匀。然后取50mL,加邻二氮菲指示液3滴,用硫酸亚铁铵溶液(0.1mol/L)滴定,并将滴定的结果用空白试验校正。每1mL硫酸亚铁铵滴定液(0.1mol/L)相当于0.675mg的微晶纤维素。

1.3.5 持水性测定^[17]

采用离心法:称取0.5g干燥后的微晶纤维素置于50mL离心管中,加30mL蒸馏水浸泡,摇匀,室温下静置1h,于4000r/min离心20min,弃去上清液,称量得到微晶纤维素湿质量,按式(1)计算持水能力。

$$\text{持水力}/\% = \frac{\text{样品湿质量}/\text{g} - \text{样品干质量}/\text{g}}{\text{样品干质量}/\text{g}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.6 溶胀性测定^[18]

称取干燥至恒质量的微晶纤维素粉末2.0g,置具塞刻度试管中,测定粉末的高度 h_1 ,加水10mL,振摇,10min后再振摇一次。静置48h,测定溶胀后的粉末高度 h_2 ,按式(2)计算溶胀体积比。

$$\text{溶胀体积比} = \frac{h_2}{h_1} \quad (2)$$

1.3.7 流动性测定

采用固定圆锥底法测定微晶纤维素粉末的休止角。取半径(r)为4.5cm的培养皿接受由漏斗自然流下的MCC粉末,直至粉末堆积至从培养皿上缘溢出为止。测量形成的粉末堆的高(H),按式(3)计算静止角 α 。

$$\text{tg}\alpha = H/r \quad (3)$$

1.3.8 黏度测定^[19]

把搅拌均匀的质量分数10g/L的微晶纤维素倒进测量瓶,于25℃条件下静置20min,将测定转子放进待测溶液中,用30~60r/min的转速测定黏度值。

1.3.9 MCC扫描电镜分析

采用扫描电镜(SEM)观察分析微晶纤维素形貌特征^[20]。

2 结果与分析

2.1 纤维素酶水解制备大豆皮微晶纤维素的单因素试验结果

2.1.1 加酶量对MCC含量的影响

在温度50℃、液料比1:20(g/mL)、pH4.8条件下,于纤维素酶添加量(质量分数)分别为0.5%、1%、1.5%、2%下酶解大豆皮纤维素90min,结果见图1。

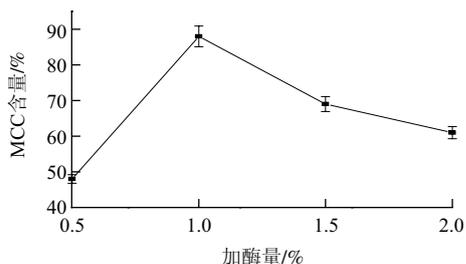


图1 加酶量对MCC含量的影响

Fig.1 Effect of enzyme dosage on MCC content

加入一定量的纤维素酶可以改变MCC的得率,从图1看出,当酶添加量小于1%时,随着纤维素酶的添加,MCC的得率逐渐增加,当添加量超过1%时,MCC的得率逐渐降低。分析其中原因,在MCC的制备过程中添加适量的纤维素酶,可以破坏纤维素的结构,使纤维素变成微晶纤维素,如果酶的添加量过大,就会使得纤维素进一步水解成糊精,纤维二糖或葡萄糖。因此,选择0.8%~1.2%作为进一步正交试验的纤维素酶添加量的因素水平。

2.1.2 pH值对MCC含量的影响

在温度50℃、液料比1:20(g/mL)、加酶量1%条件下,于pH值分别为4.6、4.8、5.0、5.2、5.5条件下酶解大豆皮纤维素90min,结果见图2。

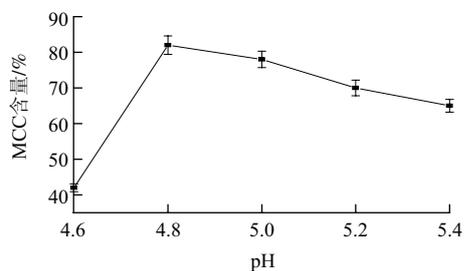


图2 pH值对MCC含量的影响

Fig.2 Effect of pH on MCC content

纤维素酶的最适pH值范围为3.5~5.5,由图2可知,当pH值为4.8时,MCC的得率最高,因此,选择pH 4.6~5.0作为进一步正交试验的因素水平。

2.1.3 料液比对MCC含量的影响

在温度为50℃、pH4.8、加酶量1%条件下,于料液

比(g/mL)分别为1:10、1:15、1:20、1:25、1:30酶解大豆皮纤维素90min,结果见图3。

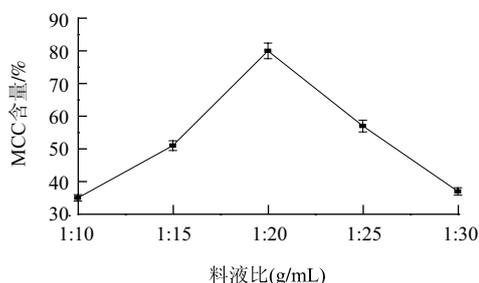


图3 料液比对MCC含量的影响

Fig.3 Effect of solid-to-liquid ratio on MCC content

由图3可看出,当料液比小于1:20(g/mL)时,MCC的得率随料液比的增大而增加,当料液比超过1:20(g/mL),MCC得率有所降低,这可能是由于料液比增大,降低了纤维素酶作用的底物浓度所致,因此选择料液比1:20(g/mL)较为合适。

2.1.4 酶解温度对MCC含量的影响

在加酶量1%、pH4.8、液料比1:20(g/mL)条件下,分别于温度为40、45、50、55、60℃条件下酶解大豆皮纤维素90min,结果见图4。

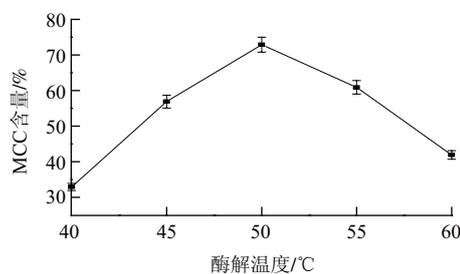


图4 酶解温度对MCC含量的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis temperature on MCC content

从图4可以看出,当提取温度低于50℃时,随着温度的升高,MCC得率逐渐上升;随着温度的持续上升,高于50℃以后得率下降。这说明以大豆皮纤维素为底物时,纤维素酶的最佳水解温度为50℃左右。因此,选用47~53℃作为进一步正交试验的因素水平。

2.1.5 酶解时间对MCC含量的影响

在加酶量1%、pH4.8、液料比1:20(g/mL)、温度50℃条件下,分别酶解大豆皮纤维素0.5、1、1.5、2、2.5h,结果见图5。

从图5可以看出,随着酶解时间的增加,MCC的得率逐渐降低,这说明当酶解时间1h以后,随着纤维素酶的作用,一部分纤维素已经被水解成糖类。所以,选择50~70min作为进一步正交试验的因素水平。

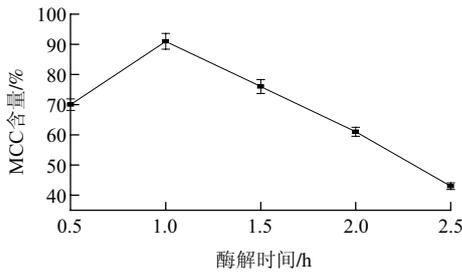


图5 酶解时间对MCC含量的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis time on MCC content

2.2 纤维素酶水解制备大豆皮微晶纤维素的正交试验结果
 根据单因素试验结果, 在料液比1:20(g/mL)的条件下, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表按表1进行正交试验, 试验结果见表2。

表1 纤维素酶水解制备大豆皮微晶纤维素正交试验因素与水平表
 Table 1 Factors and levels for orthogonal array design

水平	A加酶量/%	B酶解温度/°C	C酶解时间/min	D酶解pH
1	0.8	47	50	4.6
2	1.0	50	60	4.8
3	1.2	53	70	5.0

表2 纤维素酶水解制备大豆皮微晶纤维素正交试验结果
 Table 2 Orthogonal design array and results

试验号	A加酶量	B酶解温度	C酶解时间	D酶解pH	MCC含量/%
1	1	1	1	1	73.75
2	1	2	2	2	82.92
3	1	3	3	3	75.87
4	2	1	2	3	92.55
5	2	2	3	1	81.52
6	2	3	1	2	89.65
7	3	1	3	2	89.56
8	3	2	1	3	90.46
9	3	3	2	1	81.48
k_1	77.51	85.29	84.62	78.92	
k_2	87.91	84.97	85.65	87.38	
k_3	87.17	82.3	82.32	86.29	
R	10.4	2.99	3.33	8.46	

从表2可知, 各因素作用的主次顺序是加酶量(A) > 溶液pH(D) > 酶解时间(C) > 酶解温度(B), 制备MCC的适宜工艺条件为 $A_2B_1C_2D_2$ 。在此条件下从豆皮纤维素中提取MCC, 平行实验3次, 平均含量为93.10%, 高于正交试验表中最佳组合第4号的MCC含量, 因此确定大豆皮MCC最佳制备工艺参数为 $A_2B_1C_2D_2$, 即加酶量1%、酶解温度47°C、酶解时间1h、溶液pH4.8。

表3 大豆皮微晶纤维素与台湾明台商品微晶纤维素的理化特性比较

Table 3 Comparison of physicochemical properties between the prepared MCC and a commercial MCC

样品	MCC含量/%	平衡聚合度	持水力/%	溶胀体积比	流动性(静止角)/°	溶液表观黏度/(MPa·s)
台湾明台MCC(M101)	98.04	231	271	1.45	55.72	3.60
大豆皮MCC	93.10	221	248	2.11	60.60	3.50

2.3 大豆皮微晶纤维素的理化特性分析

台湾明台微晶纤维素是由纯木纸浆水解而得的部分解聚的纤维素, 广泛应用于医药及营养保健品。将制备的大豆皮微晶纤维素与台湾明台优质商品微晶纤维素(基本规格M101)的理化特性进行比较, 结果见表3, 纤维素酶水解制备的大豆皮MCC的平衡聚合度、持水性、流动性和表观黏度等理化特性都与台湾明台商品MCC接近, 且大豆皮MCC的溶胀体积比台湾明台商品MCC高, 即大豆皮MCC比质量相同的台湾明台商品MCC吸收5倍的水(g/mL)后的溶胀体积大45.5%, 说明大豆皮MCC对肠道产生的容积作用优于商品MCC, 更容易引起饱腹感, 加强肠蠕动, 从而促进肠道内腐生菌、胆汁酸等有害物随粪便的及时排泄, 起到清除体内垃圾、增进人体健康的作用。与台湾明台微晶纤维素相比较, 制备的大豆皮微晶纤维素MCC含量较低, 这是由于大豆皮中含有5%左右的果胶类物质, 在纤维素降解时被释放了出来, 而天然果胶中的原果胶不溶于水, 故在用蒸馏水洗涤时未被去除。一般商品微晶纤维素含量应大于97.0%(干基), 由于水不溶性的果胶可溶于六偏磷酸钠溶液, 因而可考虑在进一步试验中先采用六偏磷酸钠溶液洗涤, 再用纯水二次洗涤的方法去除大豆皮MCC中的果胶类物质, 使其达到商品化要求。

2.4 大豆皮微晶纤维素的电镜扫描分析

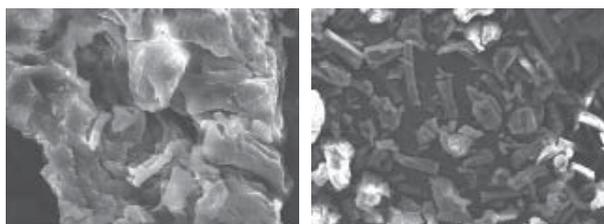
大豆皮MCC与台湾明台商品MCC放大500倍的电镜扫描图见图6, 从中可观察到, 大豆皮MCC多数呈短棒状的形态, 分子之间孔洞相对较小, 台湾明台商品MCC多数呈长棒状的形态, 分子之间孔洞相对较大。大豆皮MCC分子之间微观结构孔洞相对较小, 所能容纳的水分较少, 这在一定程度上可以解释大豆皮MCC持水力比台湾明台MCC低的原因。图7是大豆皮MCC与台湾明台商品MCC放大1500倍的电镜扫描图, 大豆皮MCC表面有较大的剥离现象, 表面出现凹坑, 结构疏松, 比表面积相对较大; 商品MCC表面结构平滑紧密, 表面沟痕、裂纹相对比较均匀, 因而可以从微观结构上对大豆皮MCC比质量相同的商品MCC吸水后的溶胀体积显著增加给出合理的解释。大豆皮MCC微观结构孔洞相对较小, 表面出现凹坑沟痕, 比表面积相对较大, 由此推断大豆皮MCC对肠道内有毒有害物的吸附包埋可能更为牢固。



a.大豆皮MCC

b.商品MCC

图6 放大500倍的微晶纤维素扫描电镜图片
Fig.6 SEM micrographs of MCC samples ($\times 500$)



a.大豆皮MCC

b.商品MCC

图7 放大1500倍的微晶纤维素扫描电镜图片
Fig.7 SEM micrograph of MCC samples ($\times 1500$)

3 结论

通过双螺杆蒸煮挤压、碱煮、酸解预处理得到大豆皮纤维素,采用纤维素酶水解大豆皮纤维素制备微晶纤维素,确定了大豆皮微晶纤维素制备最佳工艺参数:料液比1:20(g/mL)、加酶量1%、溶液pH4.8、温度47℃、酶解时间1h。大豆皮微晶纤维素产品平均聚合度、MCC含量、持水性、流动性和表观黏度等理化特性与台湾明台商品MCC接近,达到了商品微晶纤维素的一般技术要求。对大豆皮微晶纤维素与台湾明台商品MCC的电镜扫描分析表明,大豆皮MCC表面结构疏松,比表面积较大,从微观结构上解释了大豆皮MCC吸水后的溶胀体积较大,对肠道产生的容积作用优于商品MCC,有利于加强肠蠕动,据此推断大豆皮MCC对促进肠道内腐生菌、胆汁酸等体内垃圾的排泄有更好的效果。

参考文献:

- [1] 陆红佳, 郑龙辉, 刘雄. 微晶纤维素在食品工业中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(3): 141-145.
- [2] UESU N Y, PINEDA E A G, HECHENLEITNER A A W. Microcrystalline cellulose from soybean husk: effects of solvent treatments on its properties as acetylsalicylic acid carrier[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 206(1/2): 85-96.
- [3] EI-SAKHAWY M, HASSAN M L. Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 67(1/2): 1-10.
- [4] 张彩莉, 张鑫. 微晶纤维素的特性及应用[J]. 中国调味品, 2006(9): 46-48.
- [5] 何耀良, 廖小新, 黄科林, 等. 微晶纤维素的研究进展[J]. 化工技术与开发, 2010, 39(1): 12-16.
- [6] 汪维云. 纤维素科学及纤维素酶的研究进展[J]. 江苏理工大学学报: 自然科学版, 1998, 19(3): 20-28.
- [7] 闫训友, 史振霞, 张惟, 等. 纤维素酶在食品工业中的应用进展[J]. 食品工业科技, 2004, 25(10): 140-142.
- [8] 余兴莲, 王丽, 徐伟民. 纤维素酶降解纤维素机理的研究进展[J]. 宁波大学学报: 理工版, 2007, 20(1): 78-82.
- [9] AGBLEVOR F A, IBRAHIM M M, EI-ZAWAWY W K. Coupled acid and enzyme mediated production of microcrystalline cellulose from corn cob and cotton gin waste[J]. Cellulose, 2007, 14(3): 247-256.
- [10] 张绪霞, 陈卫梅, 董海洲, 等. 大豆膳食纤维的营养功能特性及开发前景[J]. 中国食物与营养, 2007(2): 49-51.
- [11] 徐树来. 挤压技术加工膳食纤维的研究进展[J]. 农机化研究, 2004(5): 49-50.
- [12] 张丽君, 李爱军, 蒋文明, 等. 酸解法制备大豆皮微晶纤维素的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 298-300.
- [13] 吕艳蓓. 利用大豆皮制备微晶纤维素的初步研究[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(6): 77-79.
- [14] ABDULLAH A B M. Production of jute microcrystalline cellulose[J]. Journal of Bangladesh Academy of Sciences, 1991, 15(2): 85-87.
- [15] 哈丽丹·买买提, 努尔买买提, 吾满江·艾力. 粘度法测定植物纤维素的聚合度[J]. 合成纤维工业, 2006, 29(1): 40-42.
- [16] 袁毅, 张黎明, 高文远. 穿龙薯蓣微晶纤维素的制备及其理化性质研究[J]. 生物质化学工程, 2007, 41(4): 22-26.
- [17] 苗敬芝, 冯金和, 董玉玮. 超声结合酶法提取生姜中水溶性膳食纤维及其功能性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(24): 120-125.
- [18] 席延卫, 黄桂华, 李爱国, 等. 不同原材料制备的微晶纤维素性能比较[J]. 山东大学学报: 医学版, 2006, 44(8): 860-864.
- [19] 高善民, 乔青安, 许璞, 等. 微晶纤维素的制备及性质研究[J]. 功能纤维, 2007, 38(A07): 2891-2894.
- [20] 林钧安. 实用生物电子显微术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1989: 27.