

*Research Article***Preparation and Characterization of Microcrystalline Cellulose from Lucerne (*Medicago sativa L.*) Waste Fibers as Food Additive****Zaker Bahreini^{1*}, Mohammad Abedi^{2*}, Davood Sadeghi Fateh³**

1. Associate professor, Organic and Pharmaceutical Industries Group, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
2. Associate professor, Inorganic and Catalyst Industries Group, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Inorganic and Catalyst Industries Group, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

(Received 19 September 2022, Received in revised form 25 October 2022, Accepted 28 October 2022)

Introduction: Cellulose is a fibrous and natural carbohydrate polymer, found abundantly in plants, producing about 50 billion tons annually. One of cellulose derivatives is microcrystalline cellulose (MCC), due to these specifications, MCC is widely used in food and pharmaceutical industries as excipients, anti-caking agents, emulsifiers, binders, disintegrating agents, dispersants, emulsion stabilizers, thermal stabilizers and carriers for fast drying and tableting agents. In this study, MCC was prepared from dried Lucerne (alfalfa) waste fibers (powdered to mesh 80), the pigments of which were already extracted as food colorants. This cheap and renewable raw material was converted to MCC by conventional methods including dewaxing, de-lignification, bleaching and acid hydrolysis. Commercial microcrystalline cellulose (Avicel PH-101) was used as reference compound for comparative studies.

Materials and methods: In order to delignify, purify and separate alpha cellulose, 50 g of the above-mentioned alfalfa waste powder (80-mesh) was treated with 500 ml of 17.5% NaOH (w/v) solution at a ratio of 1:20 and stirred in beaker at 80 °C for 3 hours with continuous agitation. After filtering with a nylon filter cloth and then rinsed with distilled water to remove impurities and finally a neutral pH was achieved. The yellow-colored cellulosic residue was then dried at room temperature for 48 hours. The main components of the raw waste cellulosic fibers and the produced MCC are listed in Table 1. For bleaching, the dry delignified compound was treated with 15% sodium hypochlorite at a ratio of 1:20 at 80 °C for 90 minutes. Then the bleached fiber waste powder (50.0 g) was treated with 250 ml of 2.5 M hydrochloric acid for 90 minutes at 80 °C. After hydrolysis, the resulting microcrystalline cellulose was filtered and washed with distilled water until the pH of the effluent reached 7.0. Then the resulting precipitate was dried at 60 °C and homogenized. 32.0 g of white microcrystalline cellulose with 85% purity was obtained (64% yield).

Results and discussion: For characterization of prepared MCC, first particle size analysis was achieved. The results of the particle size analysis of the standard and the prepared MCC are shown in Fig. 1. The mean particle size of the prepared sample is approximately 26 μm with broad particle size distribution (1-110 μm) and cumulative particle size distribution of $x_{10} = 3.87$, $x_{50} = 26.29$, $x_{90} = 59.17$ and $x_{99} = 109.60$ μm. From the particle size distribution graph, it can be seen that the average particle size of prepared MCC is approximately 26 μm (Fig. 1. a) compared to the particle size of the commercial MCC that is 20 μm (Fig. 1. b). Then, Fourier Transform Infrared spectroscopy was carried out. The FT-IR spectra are illustrated in Fig. 2. This showed that the infrared spectra of the prepared MCC (Fig. 2a) were similar to those of the infrared spectra of the commercial MCC (Fig. 2b). The characteristic peaks related to cellulosic structure appeared at 666, 896, 1062, 1159, 1260, 1326, 1372, 1425 and 1643 cm^{-1} . Thermogravimetric analysis (TGA) of the prepared MCC in comparison to that of the commercial MCC is shown in Fig. 3. In the TGA curve of the prepared MCC (Fig 3a), three main stages of weight change are observed. The first stage is in the temperature range of 53-93 °C, which

* Corresponding author email: bahreiniz@irost.org, mabedi@irost.ir

is attributed to the evaporation of associated moisture (approximately 3.0%). The second degradation stage started at temperature of 273-353 °C and the third at 403-533 °C, respectively. The maximum weight loss rate was at 320 °C (75%), which can be attributed to the dehydration, decarboxylation, and depolymerization and carbonization of the glycosidic bonds and finally the third step which is the ashing processes (20%). As it is shown in Fig. 3b, TGA curve of the commercial MCC also has three steps of weight loss similar to the prepared MCC. The first degradation stage occurred approximately at 45-85 °C (5.6%) which is attributed to evaporation of water. The second degradation stage was at temperature range of 275 –355 °C (82.7%) and the third step at 405-515 °C (11.4%). To study the crystallinity of Lucerne (alfalfa) MCC, X-ray diffraction (XRD) analysis was carried out. Fig. 4 shows the X-ray diffraction patterns of prepared MCC (Fig. 4a) and those of the commercial MCC (Fig. 4b). Peaks were observed at around $2\theta=14.9^\circ$ and 22.2° for both samples corresponding to cellulose I type structure. The peak intensity near 22.2° is the highest indicating high crystallinity in both MCC types and attributed to the removal of amorphous compounds during acid hydrolysis. Furthermore, similar patterns of X-ray diffraction demonstrated that hydrolysis did not change the cellulose structure of MCC, which was in accordance with the results of FTIR analysis. Based on Segal equation (equation 1) and XRD patterns (Fig. 4), and ignoring the contribution of amorphous cellulose in the intensity recorded at $2\theta = 18^\circ$ and comparing the ratio of the pure peak intensity of alfalfa MCC to the pure peak intensity of commercial MCC sample, the relative crystallinity index of prepared alfalfa MCC was calculated 92%. Also by using Scherrer equation (equation 2) the approximate crystallite size perpendicular to the 200 plane was calculated for both MCC. For prepared MCC and commercial MCC the approximate crystallite size was 29.1 and 45.0 Å respectively. Fig. 5 shows the SEM images of Lucerne (alfalfa) and the commercial MCC. The result of SEM analysis shows that microcrystals of both MCC are similar, which is evidence for the synthesis of MCC in alfalfa biocomposite. Based on SEM analysis, it can be seen that the shortening of fibers occurred and flack-shaped MCC with rough surfaces was formed. The differences in MCC and the standard morphology may be due to differences in raw material source and MCC preparation methods. In comparison, the commercial MCC exhibits a rough surface with irregular morphology due to the chemical treatment during the delignification and bleaching process. The prepared MCC has an irregular, agglomerated, and elongated morphology which resembles that of the commercially available MCC used for food and pharmaceutical excipients applications.

Conclusions: In this study, microcrystalline cellulose was isolated from Lucerne (alfalfa) waste fibers using a conventional procedure. The properties of alfalfa MCC were compared with those of the commercial type. The results of MCC characterization indicate that it has cellulose type I crystalline structure. The powder was fine, odorless, tasteless, and a little less white compared to reference, particle size distribution 26 μm , pH 6.88. The results obtained from FT-IR analysis confirmed that the chemical structure of the cellulosic fragments is not influenced by the acid hydrolysis. The temperature of thermal decomposition and its degree of crystallization are slightly different from those of the commercial type. SEM analysis showed that microcrystals were characterized by irregular and agglomerated morphology which resemble that of the commercially available MCC. Overall, the properties of the prepared MCC are comparable to those of the commercial type, and can be used as food additive.

Keywords: Microcrystalline cellulose, Lucerne fibers, Alfalfa waste, biopolymer, Food additive.

How to cite this article:

Bahreini, Z., Abedi, M., Sadeghi Fateh, D., (2022). Preparation and Characterization of Microcrystalline Cellulose from Lucerne (*Medicago sativa L.*) Waste Fibers as Food Additive. *Innov. Food Technol.*, 10(1), 87-99.



مقاله پژوهشی

تهیه و شناسایی میکروکریستالین سلولز از پسماند الیاف یونجه (*Medicago sativa L.*) به‌عنوان افزودنی مواد غذایی

ذاکر بحرینی^{۱*}، محمد عابدی^{۲*}، داود صادقی فاتح^۳

۱. دانشیار، گروه صنایع آلی و دارویی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه صنایع معدنی و کاتالیست‌ها، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران،

تهران، ایران

۳. استادیار، گروه صنایع معدنی و کاتالیست‌ها، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران،

تهران، ایران

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۶/۲۸، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۶)

چکیده

در این پژوهش ترکیب میکروکریستالین سلولز از پسماند یونجه باقیمانده پس از استخراج رنگدانه‌های طبیعی کلروفیل و کاروتن، سنتز و با نمونه استاندارد مقایسه شده است. در فرآیند سنتز این ترکیب، واکنش‌های شیمیایی شامل واکس‌زدایی، لیگنین‌زدایی، سفیدگری و هیدرولیز اسیدی بر روی الیاف یونجه انجام شد. نمونه‌های تهیه شده همراه با نمونه استاندارد (Avicel PH101) با آنالیزهای طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوری (FTIR)، تجزیه حرارتی وزنی (TGA)، پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و تعیین اندازه ذرات (PSA)، مشخصه‌یابی شد. طیف مادون‌قرمز نمونه تهیه‌شده با نمونه استاندارد همخوانی مطلوبی را نشان داد. نمونه‌ها خواص الیافی نمونه اصلی را حفظ نموده‌اند. طرح پراش اشعه ایکس نمونه آزمایشگاهی شاخص شبکه بلوری $\text{CrI}=78\%$ را داراست. این نمونه‌ها حالت انباشت رشته‌های بی‌نظم و مشابه مواد افزودنی کمکی رایج مصرفی در داروها را نشان می‌دهند. پودر حاصل به‌طور نسبی نرم، بی‌بو، بی‌مزه است و سفیدی رنگ آن مطلوب می‌باشد. اندازه ذرات آن $26\ \mu\text{m}$ و pH آن $6/88$ می‌باشد. آنالیز حرارتی آن پایداری دمایی مناسبی را نشان می‌دهد. این پژوهش پسماند الیاف یونجه رنگ‌بری شده را به‌عنوان یک منبع قابل استفاده جهت تهیه میکروکریستالین سلولز به‌عنوان ماده افزودنی غذایی معرفی می‌نماید.

کلید واژه‌ها: میکروکریستالین سلولز، الیاف یونجه، پسماند یونجه، بیوپلیمر، ماده افزودنی غذایی.

۱. مقدمه

[۱۹]، الیاف گیاه فودر [۲۰]، الیاف کنف هندی [۲۱]، پوسته سویا [۲۲]، کنف معمولی [۲۳]، بامبو [۲۴]، مزوکارپ نارنجی [۲۵]، بلال ذرت [۲۶]، باگاس [۲۷]، الیاف نارگیل [۲۸]، جلبک قهوه‌ای [۲۹]، پسماند چای [۳۰]، پسماند هسته زیتون [۳۱] و غیره.

در این پژوهش میکروکریستالین سلولز (MCC) از پسماند الیاف خشک یونجه (پودر مش ۸۰) که رنگدانه کلروفیل آن قبلاً به‌عنوان رنگ خوراکی استخراج شده است، تهیه گردید. یونجه (*Medicago sativa L.*) گیاهی گلدار چند ساله از تیره گیاهان لگومی است. این گیاه برای غذای دام به‌وفور در بسیاری از مناطق جهان کاشته می‌شود. این منبع ارزان و تجدیدپذیر با فرایندهای واکنش‌زایی، لیگنین‌زدایی، سفید کردن و هیدرولیز اسیدی به میکروکریستالین سلولز تبدیل گردید. با عنایت به منابع علمی در دسترس تاکنون تهیه میکروکریستالین سلولز از پسماند الیاف خام یونجه گزارش نشده است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد مصرفی

الیاف خام یونجه در این پژوهش از ضایعات خشک یونجه مصرفی (مش ۸۰) در تهیه رنگ خوراکی به دست آمد. میکروکریستالین سلولز تجاری (Avicel PH101) به‌عنوان شاهد استاندارد استفاده شد. هیدروکسید سدیم (۹۸٪)، هیدروکلریک اسید (۳۷٪)، محلول سدیم هیپوکلریت (۲۵٪) از شرکت کلران سمنان تهیه گردید. پراکسید هیدروژن (۳۰٪ وزنی-وزنی) و اسیدسولفوریک (۹۸٪ وزنی-وزنی) از شرکت مرک آلمان خریداری و استفاده شد.

۲.۲. تهیه میکروکریستالین سلولز

میکروکریستالین سلولز از پسماند یونجه براساس روش‌های اعمال‌شده توسط دیگر پژوهشگران [۲۶، ۲۴-۶]، بر پایه فرآیند باتیستا [۳۲]، شامل سه مرحله لیگنین‌زدایی، سفید کردن و هیدرولیز اسیدی به شرح ذیل تهیه گردید.

۱.۲.۲. لیگنین‌زدایی

به‌منظور لیگنین‌زدایی، خالص‌سازی و جداسازی آلفا سلولز،

سلولز یک بیوپلیمر فیبری و کربوهیدرات طبیعی است، که به‌وفور در گیاهان یافت شده و سالیانه حدود ۵۰ بیلیون تن تولید می‌شود. سلولز دارای زنجیرهای بلند از واحدهای بتا-دی-گلوکوپیرانوز است که از راه پیوند ۴،۱-گلوکوزید به هم متصل شده‌اند. یکی از مشتقات سلولز ترکیب میکروکریستالین سلولز (سلولز ریزبلوری، MCC) است که دامنه کاربردی وسیعی دارد. در این کاربردها، اندازه ذرات پودر MCC در حد میکرومتر می‌باشد (۱-۱۰۰ μm) [۴-۱]. میکروکریستالین سلولز در واقع سلولزی است که در اثر واکنش با اسیدهای معدنی به‌صورت جزئی پلیمرزدایی شده است. این ترکیب پودری سفید، بی‌بو، غیررسمی، زیست‌تخریب‌پذیر و بلورین با دانسیته پایین، مقاومت مکانیکی بالا و سطح زیاد است [۵]. با عنایت به این ویژگی‌ها میکروکریستالین سلولز به‌وفور در صنایع غذایی و دارویی به‌عنوان مواد کمکی، مواد ضد کیک، امولسیفایر، بایندر، پخش‌کننده، تثبیت‌کننده امولسیون، پایدارکننده حرارتی و حامل برای عوامل خشک‌کننده سریع و قرص‌سازی مصرف می‌شود [۶-۸].

با توجه به تقاضای روزافزون برای غذاهای فرآوری شده، تولید داروها و مواد آرایشی و بهداشتی، انتظار می‌رود بازار میکروکریستالین سلولز تا سال ۲۰۲۳ به ۱۲۴۱/۴ میلیون دلار برسد [۹، ۱۰].

در روش مرسوم برای تهیه میکروکریستالین سلولز از خمیر چوب به‌عنوان ماده خام استفاده می‌شود، که این امر موجب تخریب درختان و جنگل‌ها می‌شود. با عنایت به حساسیت عامه مردم و نگرانی‌ها در خصوص محیط‌زیست، تمرکز جهت یافتن منابع ارزان و تجدیدپذیر برای تهیه میکروکریستالین سلولز در دستور کار محققان و صنعتگران قرار گرفته است. از این‌رو الیاف حاصل از ضایعات گیاهی، به‌ویژه پسماندهای کشاورزی یک جایگزین قابل توصیه برای خمیر چوب است [۱۱]. امروزه تهیه میکروکریستالین سلولز از منابع مختلفی تهیه شده است از جمله: الیاف گیاه روزله [۶]، هسته خرما [۱۲]، پوسته بادام‌زمینی [۸]، کاه برنج [۱۳]، پسماند الیاف پنبه [۱۴]، الیاف پنبه [۱۵]، پسماند نخل روغنی [۱۷، ۱۶، ۴]، پسماند گیاه مگنو استین [۱۸]، الیاف علف الفا

(وزنی-حجمی) تهیه شد و به مدت ۲۰ min در معرض امواج فراصوت (35 kHz) در یک حمام قرار گرفت. اندازه ذرات میکروکریستالین سلولز با دستگاه Sympatec Helos Particle size analyzer (GmbH) سنجیده و با نمونه استاندارد (Avicel PH 101) به عنوان شاهد مورد مقایسه قرار گرفت.

۲.۳.۲. طیف سنجی FTIR

طیف FTIR نمونه تجاری میکروکریستالین سلولز و نمونه تهیه شده در آزمایشگاه، با پتاسیوم برماید مخلوط و به قرص تبدیل [۶] و سپس باند انتقالی آن در محدوده 400 - 4000 cm^{-1} با دستگاه Bruker Tensor 27 ثبت گردید.

۳.۳.۲. آنالیز وزنی - حرارتی (TGA)

رفتار حرارتی نمونه تجاری میکروکریستالین سلولز و نمونه تهیه شده در آزمایشگاه، با دستگاه آنالیز حرارتی SHIMADZU DTG-60H تعیین شد. ۵ g از نمونه‌ها، تحت اتمسفر نیتروژن، با سرعت جریان گاز 100 ml/min و نرخ افزایش دما 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ در دامنه دمایی ۲۵ تا ۶۰۰ $^{\circ}\text{C}$ مورد آزمایش قرار گرفت [۳۳]. درصد کاهش وزن با اندازه‌گیری وزن ماده باقیمانده در دمای ۶۰۰ $^{\circ}\text{C}$ بررسی شد.

۴.۳.۲. آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD)

آنالیز پراش اشعه ایکس برای نمونه تجاری میکروکریستالین سلولز و نمونه تهیه شده در آزمایشگاه، با استفاده از دستگاه Bruker D8 Advance X-ray diffractometer در دمای اتاق به انجام رسید. آزمایش با تابش $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$) انجام شد. تبلور نمونه‌ها (%ICr) به روش Segal با استفاده از معادله (۱) بررسی شد.

$$\%ICr = (I_{200} - I_{am})/I_{200} \times 100 \quad (1)$$

در این معادله:

ICr درجه نسبی تبلور، I_{200} ارتفاع پیک (۲۰۰) و I_{am} شدت پراکنش در زاویه 20 می‌باشد [۳۴]. رابطه بین اندازه بلورها و طرح XRD ثبت شده، به وسیله معادله Scherrer (۲) تعریف می‌شود [۳۵].

مقدار ۵۰ g از ضایعات الیاف مصرفی یونجه (مش ۸۰) را با ۵۰۰ ml از محلول ۱۷/۵٪ (وزنی-حجمی) هیدروکسید سدیم با نسبت ۱:۲۰ در یک بشر در ۸۰ $^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳ h در حالی که پیوسته به هم می‌خورد، مخلوط نموده تا واکنش دهند. پس از آن مخلوط واکنشی، که همان ترکیب لیگنین زدایی شده قهوه‌ای رنگ است را تا دمای محیط (۲۵ $^{\circ}\text{C}$) سرد نموده و سپس با یک پارچه نایلونی صاف نموده و به منظور بر طرف کردن ناخالصی‌ها و رسیدن به پی اچ (pH) خنثی، رسوب روی صافی را با آب مقطر شستشو داده می‌شود. ترکیب زرد رنگ سلولزی حاصل به مدت ۴۸ h در دمای اتاق خشک می‌شود. اجزاء اصلی ضایعات الیاف سلولزی و ماده میکروکریستالین سلولز حاصل آنالیز شده [۳۲] و نتایج آن در جدول (۱) آورده شده است.

۲.۲.۲. سفید کردن

ترکیب خشک و لیگنین زدایی شده با سدیم هیپوکلریت ۱۵٪ به نسبت ۱:۲۰ در دمای ۸۰ $^{\circ}\text{C}$ به مدت ۹۰ min عمل‌آوری شد. سپس مواد سفید شده صاف شده و با آب مقطر شسته شد تا به pH خنثی رسید.

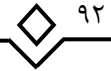
۳.۲.۲. هیدرولیز اسیدی

مقدار ۵۰ g پودر الیاف ضایعاتی سفید شده با ۲۵۰ ml از هیدروکلریک اسید (۲/۵ M) با نسبت ۱:۲۵ به مدت ۹۰ min در دمای ۸۰ $^{\circ}\text{C}$ مورد واکنش قرار گرفت [۳۲]. پس از پایان عمل هیدرولیز، میکروکریستالین سلولز حاصل را صاف نموده و با آب مقطر شسته تا جایی که pH محلول خروجی زیر صافی برابر ۷ باشد. آنگاه مواد روی صافی را در دمای ۶۰ $^{\circ}\text{C}$ خشک و به پودر یکنواخت تبدیل نموده که مقدار ۳۲ g میکروکریستالین سلولز با خلوص ۸۵٪ (بازده عملیات ۶۴٪) به دست آمد.

۳.۲. آنالیز مواد

۱.۳.۲. اندازه ذرات

سوسپانسیون میکرو سلولز در حلال استن با نسبت ۱:۱۰۰



$$\tau = K\lambda / \beta \cos\theta \quad (2)$$

در این معادله τ اندازه عمود به صفحه شبکه بلور، K عددی ثابت است که به شکل بلور بستگی دارد، λ طول موج پرتو برخوردکننده ($\text{Cu K}\alpha$ -radiation $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$)، β عبارت است از پهنای پیک در نیمه حداکثری ارتفاع (pwhm) بر حسب رادیان، θ جایگاه پیک (نصف مقدار 2θ رسم شده).

۵.۳.۲. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تصاویر سطح برای نمونه تجاری میکروکریستالین سلولز و نمونه تهیه‌شده در آزمایشگاه با استفاده از دستگاه Tescan Mira FE-SEM مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های خشک به‌وسیله طلا پوشش داده شد (۴۰-۵۰ nm) و آنگاه در فاصله کاری ۱۱ nm با ولتاژ شتاب‌دهنده ۵ kV تصویربرداری شد [۶،۳۶،۳۷].

۳. نتایج و بحث

۱.۳. مشخصه‌یابی و شناسایی ویژگی‌ها

اجزاء شیمیایی اصلی الیاف یونجه عبارت‌اند از: سلولز (۵۰-۷۰٪)، همی سلولز (۱۰-۱۴٪)، لیگنین (۸-۱۱٪) و رنگدانه‌های طبیعی [۳]. این گیاه به‌واسطه داشتن کلروفیل یک منبع بسیار خوب برای تولید رنگ خوراکی مس کلروفیلین (E141) می‌باشد. در این پژوهش ضایعات الیاف یونجه (پودر مش ۸۰) که رنگدانه‌های کلروفیلی و

کاروتنوئیدی آنها قبلاً با حلال اتانل ۹۰٪ (حجمی-حجمی) استخراج شده بود، به‌وسیله فرآیندهای لیگنین‌زدایی، سفید کردن و هیدرولیز اسیدی اصلاح‌شده و در نهایت پودر سفید میکروکریستالین سلولز حاصل گردید. تحت شرایط شدید هیدرولیز اسیدی زنجیرهای سلولزی در موقعیت پیوندهای ۱،۴-گلیکوزیدی شکسته شده و پیوندهای کوتاه‌تر سلولزی حاصل می‌شود [۱۶]. در این فرآیندها، اجزاء بی‌شکل (آمورف) سلولز به اجزاء محلول در اسید تبدیل می‌شوند و بقیه اجزاء در برابر اسیدها پایدار خواهند بود. میکروکریستالین سلولز (MCC) حاصل با بازده ۶۴٪ مورد آنالیز و شناسایی ساختاری، اندازه ذرات و خواص پایداری حرارتی قرار گرفت. برپایه نتایج به دست آمده، ویژگی‌های محصول بسیار نزدیک به ویژگی‌های نمونه تجاری به‌عنوان نمونه شاهد بود. میکروکریستالین سلولز طبیعی رطوبت‌گیر دارد و در آب نامحلول است، اما در تماس با آب متورم می‌شود. در جدول (۱) درصد اجزاء اصلی پودر ضایعات یونجه و میکروکریستالین سلولز تهیه‌شده از آن گزارش شده است.

در حین فرآیند لیگنین‌زدایی، محتوای لیگنین از مقدار ۲۵٪ در ماده خام به ۳٪ در محصول کاهش یافته، به همین ترتیب مقدار همی سلولز از ۱۷٪ به ۵٪ رسیده و مقدار الفا-سلولز از ۵۶٪ به ۸۵٪ افزایش یافته و میکروکریستالین سلولز با خلوص ۸۵٪ و بازده ۶۴٪ (۳۲ g از ۵۰ g) به دست آمده است (جدول ۱).

جدول (۱) درصد اجزاء اصلی پودر پسماند الیاف یونجه و میکروکریستالین سلولز تهیه‌شده

Table 1. The main components percent of alfalfa waste powder and prepared MCC

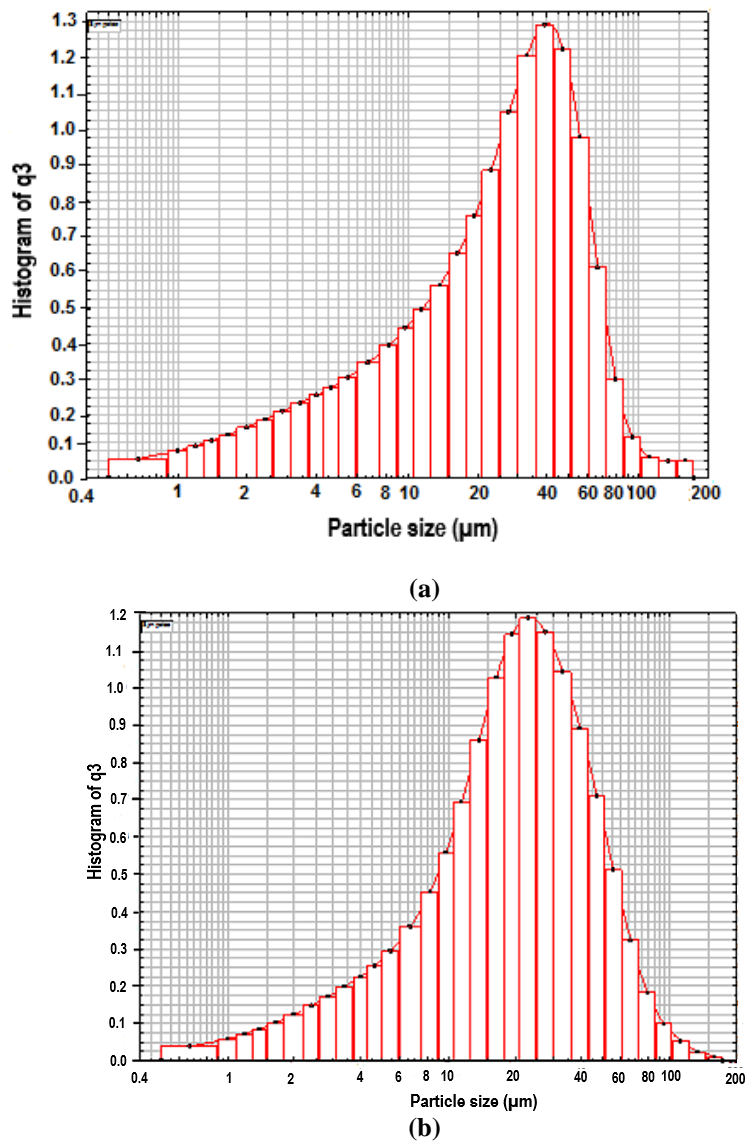
Compound	Test method	Lucerne fiber waste	Prepared MCC
Lignin	T222 om-98	25%	3%
Hemicellulose	Rowell 2012	17%	5%
α -Cellulose	Rowell 2012	56%	85%

اندازه ذرات پهن ($1-110 \mu\text{m}$) قرار گرفته است. توزیع تجمعی اندازه ذرات به‌ترتیب عبارت است از: $x10 = 3.87$ ، $x50 = 26.29$ ، $x90 = 59.17$ and $x99 = 109.60 \mu\text{m}$ با عنایت به نمودارهای توزیع اندازه ذرات مشاهده می‌شود که

۲.۳. آنالیز اندازه ذرات

نتایج آنالیز اندازه ذرات نمونه استاندارد و نمونه تهیه‌شده در آزمایشگاه در شکل (۱) نشان داده شده‌اند. میانگین اندازه ذرات نمونه تهیه‌شده برابر $26 \mu\text{m}$ است که در یک توزیع

میانگین اندازه ذرات نمونه تهیه شده برابر $26 \mu\text{m}$ (شکل ۱) همخوانی مناسبی را ارائه می‌کند. الف) و نمونه استاندارد برابر $20 \mu\text{m}$ (شکل ۱ ب) است که



شکل (۱) اندازه ذرات میکروکریستالین سلولز تهیه شده (a) و میکروکریستالین سلولز تجاری (b).

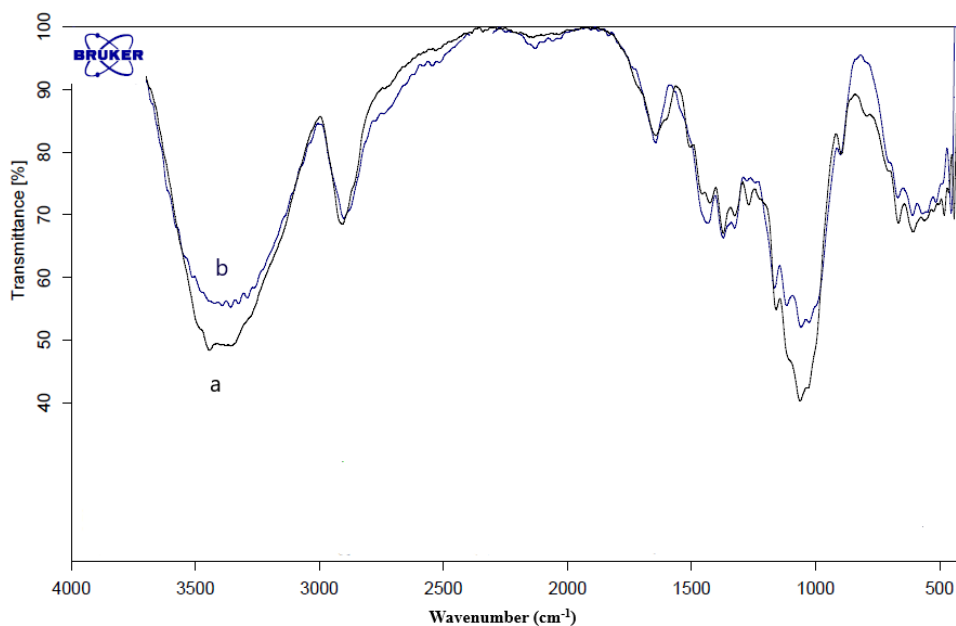
Fig 1. PSA analysis of alfalfa MCC (a) and commercial MCC (b)

۳.۳. آنالیز FTIR

۱۱۵۹، ۱۲۶۰، ۱۳۲۶، ۱۳۷۲ و 1425 cm^{-1} پدیدار شده‌اند. باند جذبی در موقعیت 896 cm^{-1} به ارتعاش گهواره‌ای پیوند C-H اختصاص می‌یابد (ارتعاش آنومریک خاص اتصال بتا-گلوکوزیدیک) [۳۸]. جذب در موقعیت 1162 cm^{-1} به ارتعاش کششی پیوند C-O-C مربوط می‌باشد [۶،۳۹]. مقایسه شدت جذب در باند 896 cm^{-1} مربوط به نمونه آزمایشگاهی و تجاری بیانگر افزایش خلوص نمونه ساخته

به‌منظور ارزیابی ساختار شیمیایی میکروکریستالین سلولز تهیه شده، از طیف سنجی FT-IR استفاده شد. طیف مربوط در شکل (۲) آورده شده است. از مقایسه طیف‌های نشان داده‌شده در شکل (a) (نمونه تهیه‌شده) و شکل (b) (نمونه استاندارد) مشابهت آنها کاملاً مشهود می‌باشد. پیک‌های شاخص ساختار سلولزی در موقعیت‌های ۶۶۶، ۸۹۶، ۱۰۶۲،

شده است. باند جذبی در موقعیت 1429 cm^{-1} به ارتعاش خمشی گروه CH_2 اختصاص داشته و به‌عنوان باند افزایش درجه تبلور میکروکریستالین سلولز شناخته می‌شود [۴۱].



شکل (۲) طیف FTIR میکروکریستالین سلولز تهیه‌شده (a) و میکروکریستالین سلولز تجاری (b).

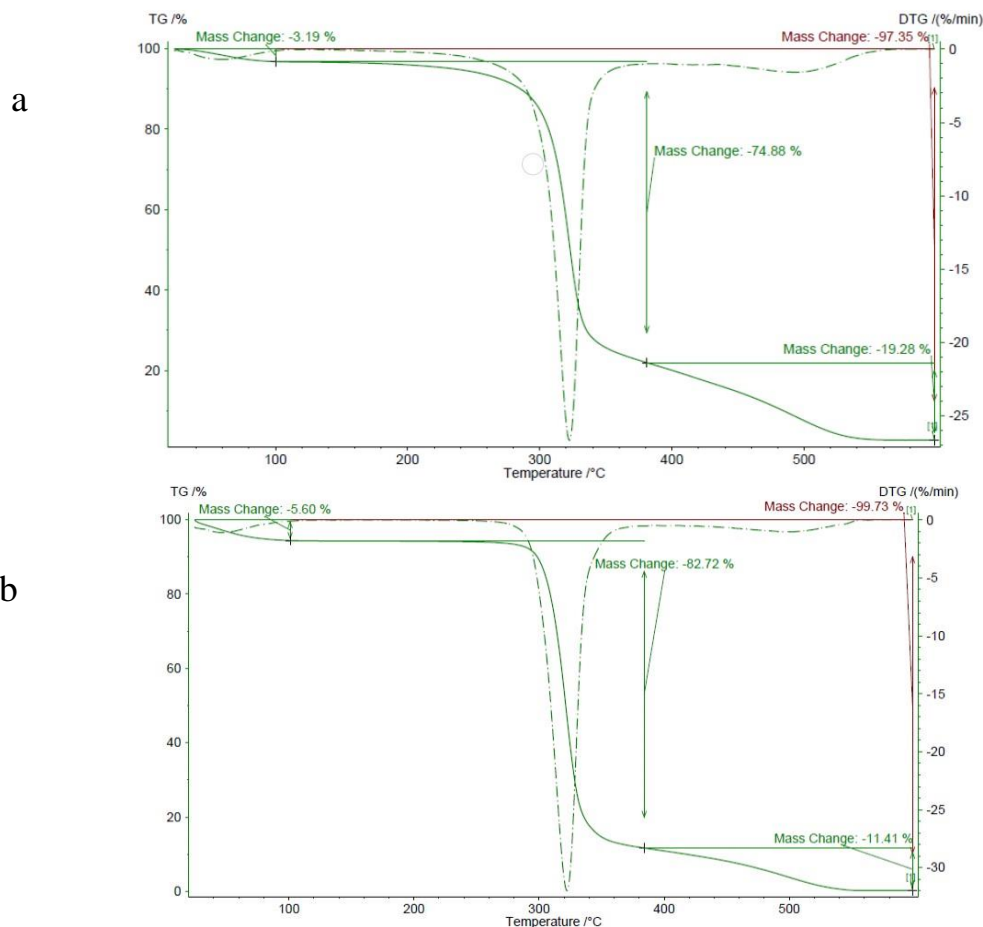
Fig 2. FTIR analysis of alfalfa MCC (a) and commercial MCC (b)

به میکروکریستالین سلولز آزمایشگاهی (شکل ۳ الف) سه مرحله تغییر وزن مشاهده می‌شود. مرحله نخست در دامنه دمایی $93-53\text{ }^\circ\text{C}$ می‌باشد، که به تبخیر محتوای رطوبت آن مربوط است (تقریباً ۰.۳٪). مرحله دوم در دامنه دمایی $355-273\text{ }^\circ\text{C}$ درجه و مرحله سوم در دامنه دمایی $523-403\text{ }^\circ\text{C}$ درجه رخ داده است. بیشترین کاهش وزن در دمای $320\text{ }^\circ\text{C}$ مشاهده می‌شود (۰.۷۵٪)، که به از دست دادن آب، کربوکسیل‌زدایی، پلیمرزدایی و کربونیره شده پیوندهای گلیکوزیدی و درنهایت مرحله سوم فرایند خاکستر شدن است (۰.۲۰٪) مربوط می‌باشد. همان‌گونه که از شکل (۳ ب) پیداست، نمودار آنالیز وزنی - حرارتی (TGA) نمونه تجاری نیز مشابه نمونه آزمایشگاهی سه مرحله کاهش وزن را دارد. مرحله نخست تجزیه (۰.۵/۶٪) تقریباً در دامنه دمایی $85-45\text{ }^\circ\text{C}$ رخ داده که به تبخیر رطوبت همراه مربوط است. مرحله دوم تجزیه (۰.۸۲/۷٪) در دامنه دمایی $355-275\text{ }^\circ\text{C}$ درجه و مرحله سوم تجزیه (۰.۱۱/۴٪) در دامنه دمایی $515-405\text{ }^\circ\text{C}$ درجه رخ داده است. این مشاهدات با نتایج آنالیز FT-IR و گزارش‌های علمی دیگر همخوانی مطلوبی دارند [۳۳].

از مقایسه طیف‌های نمونه آزمایشگاهی و نمونه تجاری پیداست که در نمونه تهیه‌شده لیگنین وجود ندارد. غیاب باند جذبی مربوط به ارتعاشات حلقه آروماتیک (1600 cm^{-1}) به معنی واکنش مؤثر هیدروکسید سدیم و سدیم هیپوکلریت در حذف اجزاء همی‌سلولز و لیگنین از ماده اولیه است [۴۲-۴۳]. پیک‌های جذبی در موقعیت‌های cm^{-1} $2800-2900$ و $3300-3450$ به ترتیب به ارتعاشات کششی گروه‌های O-H و پیوندهای C-H آلیفاتیک اشباع اختصاص می‌یابد [۳۹، ۴۲]. شدت جذب باند O-H در موقعیت cm^{-1} 3400 به دلیل گسست پیوند هیدروژنی در زنجیر سلولزی در زمان فرآیند هیدرولیز اسیدی کاهش یافته است [۴۲-۴۰، ۴۳].

۴.۳. آنالیز وزنی - حرارتی (TGA)

آنالیز وزنی - حرارتی نمونه آزمایشگاهی در مقایسه با نمونه تجاری در شکل (۳) نشان داده شده است. به علت تفاوت ساختاری سه ترکیب سلولز، همی-سلولز و لیگنین، تجزیه گرمایی آنها نیز متفاوت خواهد بود. در نمودار TGA مربوط



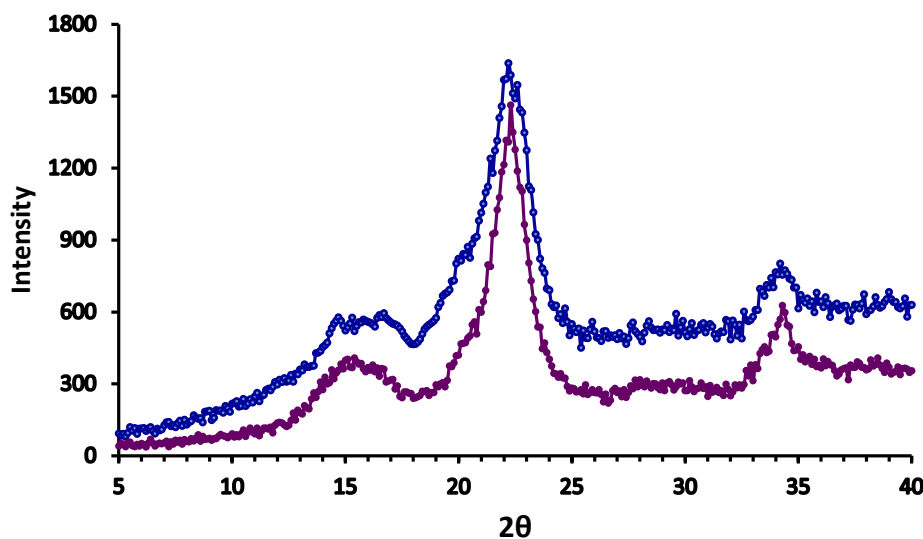
شکل (۳) آنالیز TGA میکروکریستالین سلولز تهیه شده از پسماند یونجه (a) و میکروکریستالین سلولز نوع تجاری (b).

Fig 3. TGA analysis of alfalfa MCC (a) and commercial MCC (b)

نیز هست. این مشاهدات با نتایج طیف FTIR نیز همخوانی دارد [۳۸-۳۹]. بر مبنای معادله Segal (معادله ۱) و طرح‌های XRD (شکل ۴) و اغماض سهم سلولز بی‌شکل در شدت پیک نشان داده شده در $2\theta = 18^\circ$ و مقایسه نسبت شدت خالص پیک مربوط به میکروکریستالین سلولز حاصل از ضایعات یونجه به شدت پیک مربوط به نوع تجاری، شاخص نسبی تبلور مربوط به ام سی سی حاصل از ضایعات یونجه برابر ۹۲٪ می‌شود. همچنین با استفاده از معادله Scherrer (معادله ۲)، اندازه تقریبی تبلور عمود به صفحه ۲۰۰ برای هر دو نمونه محاسبه گردیده و برای نوع آزمایشگاهی و تجاری به ترتیب برابر ۲۹/۱ و ۴۵/۰ می‌باشد.

۵.۳. آنالیز پراکنش اشعه ایکس (XRD)

به منظور بررسی تبلور میکروکریستالین سلولز حاصل از ضایعات یونجه، آنالیز پراکنش اشعه ایکس (XRD) روی آن انجام شد. در شکل (۴a) آنالیز مربوط به میکروکریستالین سلولز تهیه شده و در شکل (۴b) آنالیز نوع تجاری نشان داده شده است. پیک‌ها برای هر دو نمونه در حدود $2\theta = 14.9^\circ$ و 22.2° ظاهر شده‌اند که به ساختار سلولز نوع ۱ (cellulose I) مربوط می‌شوند. شدت پیک در محدوده 22.2° $2\theta =$ حالت حداکثری دارد و بیانگر تبلور بالا و حذف اجزاء بی‌شکل در فرآیند هیدرولیز در هر دو نمونه میکروکریستالین سلولز است. افزون بر این، طرح پراکنش مشابه هر دو نمونه، گویای عدم تخریب ساختار سلولز در حین هیدرولیز اسیدی



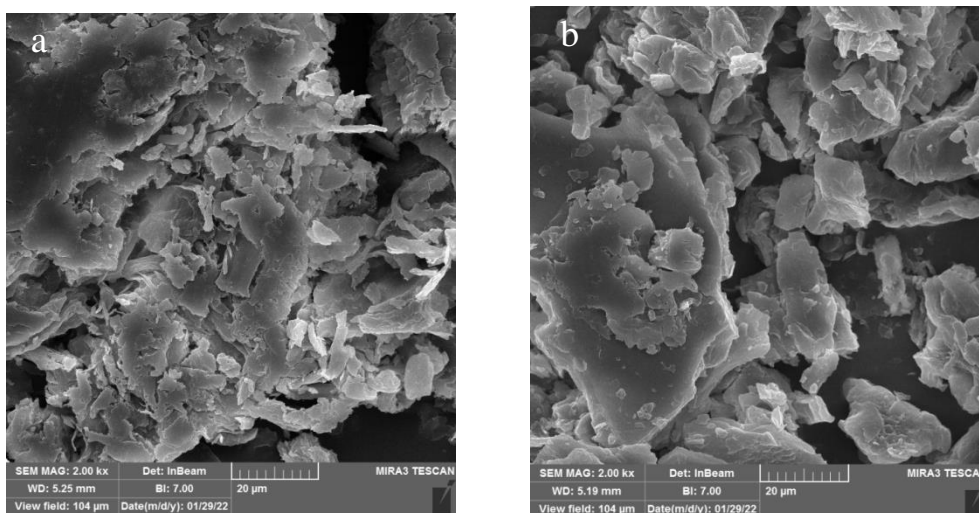
شکل (۴) مقایسه قالب‌های XRD مربوط به میکروکریستالین سلولز پسماند یونجه (a) و میکروکریستالین سلولز نوع تجاری (b).

Fig 4. The comparison of XRD patterns of alfalfa MCC (a) and commercial MCC (b)

تفاوت‌های موجود در SEM مربوط به نوع آزمایشگاهی و تجاری به نوع فرآیند و منبع اصلی تهیه آنها نیز مربوط می‌شود [۳۱،۳۶]. در تصویر نوع تجاری سطحی صاف مشاهده می‌شود که به دلیل انجام مرحله لیگنین زدایی است. تصویر نوع آزمایشگاهی نیز سطحی صاف مشابه نوع تجاری دیده می‌شود و بیانگر امکان‌پذیری مصرف آن در صنایع دارویی و غذایی است.

۶.۳. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

شکل (۵) تصویرهای میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مربوط به میکروکریستالین سلولز حاصل از ضایعات یونجه و نوع تجاری را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز SEM بیانگر تشابه میکرو کریستال‌های دو نمونه با هم و شاهدهی بر تهیه میکروکریستالین سلولز از بیوکامپوزیت ضایعات یونجه است. بر مبنای آنالیز SEM، کوتاه شده الیاف و میکروکریستالین سلولز با سطح صاف و برخی پولک مانند به دست آمده است.



شکل (۵) تصاویر SEM مربوط به میکروکریستالین سلولز آزمایشگاهی (a) و میکروکریستالین سلولز تجاری (b).

Fig 5. SEM images of alfalfa MCC (a) and commercial MCC (b)



بی‌نظم را نشان می‌دهد که شبیه تصویر نوع تجاری است. در مجموع خواص میکروکریستالین سلولز حاصل با نوع تجاری قابل قیاس بوده و همخوانی مطلوبی دارد و در نتیجه می‌توان آن را به‌عنوان یک منبع بیوپلیمری با قابلیت کاربرد در صنایع دارویی و غذایی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران که هزینه لازم را برای اجرای طرح پژوهشی با شماره قرارداد ۳۴۵۶۰۹ مورخ ۱۳۹۹/۳/۳۱ فراهم نموده است، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۴. نتیجه‌گیری

در این پژوهش، میکروکریستالین سلولز از ضایعات الیاف یونجه مصرفی جهت تهیه رنگ خوراکی، به روش معمول تهیه گردید. خواص محصول تهیه شده با خواص نوع تجاری آن مقایسه گردید. نتایج نشان داد که ساختار بلورین آن سلولز نوع ۱ (cellulose I) می‌باشد. محصول پودری سفید، بی بو، بی مزه، اندازه ذرات $2.6 \mu\text{m}$ ، pH برابر ۶/۸۸ و نسبت به نوع تجاری درجه سفیدی آن کمتر است. آنالیز طیف FT-IR نشان داد که ساختار اجزاء سلولزی ماده اولیه در فرآیند هیدرولیز اسیدی از بین نرفته است. نتایج آزمایش وزنی-حرارتی آن بیانگر اندک تفاوتی در خواص با نوع تجاری است. تصویر آنالیز SEM نمونه آزمایشگاهی، ساختاری تجمعی و

منابع

- [1] Bras, J., Hassan, M. L., Bruzesse, C., Hassan, E. A., El-Wakil, N. A., Dufresne, A. (2010). Mechanical, barrier, and biodegradability properties of bagasse cellulose whiskers reinforced natural rubber nanocomposites. *Ind. Crops Prod.*, 32, 627–633.
- [2] Abraham, E., Deepa, B., Pothan, L. A., Jacob, M., Thomas, S., Cvelbar, U., & Anandjiwala, R. (2011). Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach, *Carbohydr Polym.*, 86, 1468–1475.
- [3] Siró. I., Plackett, D. (2010). Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review, *Cellulose*, 17, 459–494.
- [4] Fahma, F., Iwamoto, S., Hori, N., Iwata, T., Takemura, A. (2010). Isolation, preparation, and characterization of nanofibers from oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). *Cellulose*, 17, 977–985.
- [5] Das, K., Ray, D., Bandyopadhyay, N. R., Sengupta, S. (2010). Study of the properties of microcrystalline cellulose particles from different renewable resources by XRD, FTIR, nanoindentation, TGA and SEM. *J. Polym. Environ*, 18, 355-363.
- [6] Kian, L. K., Jawaid, M., Ariffin, H., Alothman, O. Y. (2017). Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from roselle fibers. *Int. J. Biol. Macromol*, 103, 931-940.
- [7] Nsor-Atindana, J., Chen, M., Goff, H. D., Zhong, F., Sharif, H. R., Li, Y. (2017). Functionality and nutritional aspects of microcrystalline cellulose in food. *Carbohydr Polym*, 172, 159-174.
- [8] EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2017). Safety of the proposed amendment of the specifications for microcrystalline cellulose (E 460 (i)) as a food additive. *EFSA J.*, 15(2), e04699.
- [9] Baghel, R. S., Reddy, C. R. K., Singh, R. P. (2021). Seaweed-based cellulose: Applications, and future perspectives. *Carbohydr Polym.*, 267, 118241.
- [10] Haldar, D., Purkait, M. K. (2020). Micro and nanocrystalline cellulose derivatives of lignocellulosic biomass: A review on synthesis, applications and advancements. *Carbohydr Polym.*, 250, 116937.
- [11] Thoorens, G., Krier, F., Leclercq, B., Carlin, B., Evrard, B. (2014). Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review. *Int. J. Pharm.*, 473, 64-72.
- [12] Abu-Thabit, N. Y., Judeh, A. A., Hakeem, A. S., Ul-Hamid, A., Umar, Y., & Ahmad, A. (2020). Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from date seeds (*Phoenix dactylifera* L.). *Int. J. Biol. Macromol.*, 155, 730-739.
- [13] Collazo-Bigliardi, S., Ortega-Toro, R., Boix, A. C. (2018). Isolation and characterization of microcrystalline cellulose and cellulose nanocrystals from coffee husk and comparative study with rice husk. *Carbohydr Polym.*, 191, 205-215.
- [14] Setu, M. N. I., Mia, M. Y., Lubna, N. J., Chowdhury, A. A. (2014). Preparation of microcrystalline cellulose from cotton and its evaluation as direct compressible excipient in the formulation of Naproxen tablets. *Dhaka Uni. J. Pharm. Sci.*, 13, 187-192.
- [15] Rashid, M., Gafur, M. A., Sharafat, M. K., Minami, H., Miah, M. A. J., Ahmad, H. (2017).

- Biocompatible microcrystalline cellulose particles from cotton wool and magnetization via a simple in situ co-precipitation method. *Carbohydr Polym.*, 170, 72-79.
- [16] Haafiz, M. M., Eichhorn, S. J., Hassan, A., Jawaid, M. (2013). Isolation and characterization of microcrystalline cellulose from oil palm biomass residue. *Carbohydr Polym.*, 93, 628-634.
- [17] Owolabi, A. F., Haafiz, M. M., Hossain, M. S., Hussin, M. H., Fazita, M. N. (2017). Influence of alkaline hydrogen peroxide pre-hydrolysis on the isolation of microcrystalline cellulose from oil palm fronds. *Int. J. Biol. Macromol.*, 95, 1228-1234.
- [18] Winuprasith, T., Suphantharika, M. (2013). Microfibrillated cellulose from mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) rind: Preparation, characterization, and evaluation as an emulsion stabilizer. *Food Hydrocolloids*, 32, 383-394.
- [19] Trache, D., Khimeche, K., Mezroua, A., Benziane, M. (2016). Physicochemical properties of microcrystalline nitrocellulose from Alfa grass fibers and its thermal stability. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 124, 1485-1496.
- [20] Kalita, R. D., Nath, Y., Ochubiojo, M. E., Buragohain, A. K. (2013). Extraction and characterization of microcrystalline cellulose from fodder grass; *Setaria glauca* (L) P. Beauv, and its potential as a drug delivery vehicle for isoniazid, a first line antituberculosis drug. *Colloids Surf. B.*, 108, 85-89.
- [21] Jahan, M. S., Saeed, A., He, Z., Ni, Y. (2011). Jute as raw material for the preparation of microcrystalline cellulose. *Cellulose*, 18, 451-459.
- [22] Merci, A., Urbano, A., Grossmann, M. V. E., Tischer, C. A., Mali, S. (2015). Properties of microcrystalline cellulose extracted from soybean hulls by reactive extrusion. *Food Res. Int.*, 73, 38-43.
- [23] Wang, D., Shang, S. B., Song, Z. Q., Lee, M. K. (2010). Evaluation of microcrystalline cellulose prepared from kenaf fibers. *J. Ind. Eng. Chem.*, 16, 152-156.
- [24] Kharismi, R. R. A. Y., Suryadi, H. (2018). Preparation and characterization of microcrystalline cellulose produced from betung bamboo (*dendrocalamus asper*) through acid hydrolysis. *J. Young Pharmacists*, 10, S79.
- [25] Ejikeme, P. M. (2008). Investigation of the physicochemical properties of microcrystalline cellulose from agricultural wastes I: Orange mesocarp. *Cellulose*, 15, 141-147.
- [26] Suvachittanont, S., Ratanapan, P. (2013). Optimization of micro crystalline cellulose production from corn cob for pharmaceutical industry investment. *J. Chem. Chem. Eng.*, 7, 1136.
- [27] Katakajwala, R., & Mohan, S. V. (2020). Microcrystalline cellulose production from sugarcane bagasse: Sustainable process development and life cycle assessment. *J Clean Prod.*, 249, 119342.
- [28] Abdullah, N. A., Sainorudin, M. H., Rani, M. S. A., Mohammad, M., Abd Kadir, N. H., & Asim, N. (2021). Structure and thermal properties of microcrystalline cellulose extracted from coconut husk fiber. *Polimery*, 66, 187-192.
- [29] Tarchoun, A. F., Trache, D., Klapötke, T. M. (2019). Microcrystalline cellulose from *Posidonia oceanica* brown algae: Extraction and characterization. *Int. J. Biol. Macromol.*, 138, 837-845.
- [30] Zhao, T., Chen, Z., Lin, X., Ren, Z., Li, B., Zhang, Y. (2018). Preparation and characterization of microcrystalline cellulose (MCC) from tea waste. *Carbohydr Polym.*, 184, 164-170.
- [31] Hasanin, M. S., Kassem, N., Hassan, M. L. (2021). Preparation and characterization of microcrystalline cellulose from olive stones. *Biomass Convers. Biorefin.*, 1-8.
- [32] Battista, O. A. (1950). Hydrolysis and crystallization of cellulose. *Ind. Eng. Chem.*, 42, 502-507.
- [33] Wang, Z., Yao, Z., Zhou, J., Zhang, Y. (2017). Reuse of waste cotton cloth for the extraction of cellulose nanocrystals. *Carbohydr Polym.*, 157, 945-952.
- [34] Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res. J.*, 29(10), 786-794.
- [35] French, A. D., Santiago, Cintrón, M. (2013). Cellulose polymorphy, crystallite size, and the Segal Crystallinity Index. *Cellulose*, 20(1), 583-588.
- [36] El-Sakhawy, M., Hassan, M. L. (2007). Physical and mechanical properties of microcrystalline cellulose prepared from agricultural residues, *Carbohydr Polym.*, 67, 1-10.
- [37] Trache, D., Hussin, M. H., Chuin, C. T. H., Sabar, S., Fazita, M. N., Taiwo, O. F., Hassan, T. M., Haafiz, M. M. (2016). Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. *Int. J. Biol. Macromol.*, 93, 789-804.
- [38] Rosa, S. M., Rehman, N., de Miranda, M. I. G., Nachtigall, S. M., Bica, C. I. (2012). Chlorine-free extraction of cellulose from rice husk and whisker isolation. *Carbohydr Polym.*, 87, 1131-1138.
- [39] He, J. X., Tang, Y., Wang, S. Y. (2007). Differences in morphological characteristics of bamboo fibers and other natural cellulose fibers: studies on X-ray diffraction, solid state ¹³C-CP/MAS



NMR, and second derivative FTIR spectroscopy data. *Iran. Polym. J.*, 16, 807–818.

[40] Liu, Y., Kim, H. J. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and simple algorithm analysis for rapid and non-destructive assessment of developmental cotton fibers. *Sensors*, 17, 1469.

[41] Kale, R. D., Bansal, P. S., Gorade, V. G. (2018). Extraction of microcrystalline cellulose from cotton sliver and its comparison with commercial microcrystalline cellulose. *J. Polym. Environ.*, 26, 355-364.

[42] Soni, B., Mahmoud, B. (2015) Chemical isolation and characterization of different cellulose nanofibers from cotton stalks. *Carbohydr Polym.*, 134, 581-589.

[43] Rhim, J. W., Reddy, J. P., Luo, X. (2015). Isolation of cellulose nanocrystals from onion skin and their utilization for the preparation of agar-based bio-nanocomposites films. *Cellulose*, 22, 407-420.