



引用格式:杨锡洪,辛荣玉,张景禹,等. EDTA - 壳聚糖的制备及其对 Cd^{2+} 的吸附作用研究 [J]. 轻工学报,2018,33(6):1-7.

中图分类号:TS201 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.001

文章编号:2096-1553(2018)06-0001-07

EDTA - 壳聚糖的制备及其对 Cd^{2+} 的吸附作用研究

Study on the preparation of EDTA-chitosan and its adsorption on Cd^{2+}

杨锡洪¹,辛荣玉¹,张景禹¹,于文露¹,张俊逸²,李钰金^{3,4},
解万翠¹

YANG Xihong¹,XIN Rongyu¹,ZHANG Jingyu¹,YU Wenlu¹,ZHANG Junyi²,
LI Yujin^{3,4},XIE Wancui¹

1. 青岛科技大学 海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266042;
 2. 青岛信和源生物科技有限公司, 山东 青岛 266002;
 3. 荣成泰祥食品股份有限公司, 山东 荣成 264303;
 4. 山东省冷冻调理食品加工技术企业重点实验室, 山东 荣成 264309
1. *College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China;*
 2. *Qingdao Xinyuan Biotechnology Co., Ltd., Qingdao 266002, China;*
 3. *Rongcheng Taixiang Food Co., Ltd., Rongcheng 264303, China;*
 4. *Key Laboratory of Shandong Refrigeration Conditioning Food Processing Technology Enterprise, Rongcheng 264309, China*

关键词:

EDTA - 壳聚糖;
酰化改性; Cd^{2+} 吸附

Key words:

EDTA-chitosan;
acylation modification;
 Cd^{2+} adsorption

摘要:通过 EDTA-2Na 对壳聚糖进行酰化改性制备 EDTA - 壳聚糖,采用单因素试验结合正交试验确定 EDTA - 壳聚糖的最佳制备条件,并将其与壳聚糖盐酸盐、壳聚糖季铵盐、羟丙基壳聚糖、壳聚糖乳酸盐对 Cd^{2+} 的吸附性能进行对比。结果表明:1) EDTA - 壳聚糖的最佳制备条件为 EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比 2 : 1, pH 值 5.5, EDAC 浓度 40 mmol/L, 反应时间 16 h。在此条件下进行验证试验, 得出 EDTA - 壳聚糖对 Cd^{2+} 的平均吸附率达 53.04%。2) 对比试验表明, 在同一条件下, EDTA - 壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附效果, 均优于其他壳聚糖衍生物。

收稿日期:2018-07-14

基金项目:国家自然科学基金项目(31772089,31271938);山东省重点研发计划项目(2017GHY15127)

作者简介:杨锡洪(1963—),男,河北省安国市人,青岛科技大学教授,博士,主要研究方向为食品生物化学。

通信作者:解万翠(1969—),女,山东省莒南县人,青岛科技大学教授,博士,主要研究方向为食品风味与安全。

Abstract: EDTA-chitosan was prepared through the acylation modification between EDTA-2Na and chitosan. The preparation conditions of EDTA-chitosan were optimized by single factor test combined with orthogonal optimization test. The comparative analysis of Cd^{2+} adsorption properties of EDTA-chitosan was made with that of chitosan hydrochloride, chitosan quaternary ammonium salt, hydroxypropyl chitosan and chitosan lactate. The results showed that the optimum preparation conditions of EDTA-chitosan were as follows: the mass ratio of EDTA-2Na and CTS was 2 : 1, the pH value was 5.5, the concentration of EDAC was 40 mmol/L, and the reaction time was 16 h. The verification experiment under these conditions showed that the average Cd^{2+} adsorption rate of EDTA-chitosan was 53.04%. Moreover, the comparative experiment revealed that EDTA-chitosan had better Cd^{2+} adsorption effect than other chitosan derivatives under the same conditions.

0 引言

壳聚糖(chitosan)是自然界中唯一的碱性多糖,因其分子链上富含游离羟基和氨基,而在农业、食品、纺织、医药和环保等领域得到广泛应用。如,因壳聚糖具有较好的成膜性,能在水果表面形成半透膜,有助于水果保持整体品质进而延长保质期,故常被用作被膜剂^[1];又如,壳聚糖及其衍生物具有优越的生物相容性、可降解性、抗菌性、黏膜黏附性和无毒性^[2],其分子链上含有的功能基团能与大部分过渡金属发生螯合作用,故被广泛应用于含重金属的废水处理^[3]。但是壳聚糖分子链上分布的羟基、氨基、N-乙酰氨基极易形成分子内和分子间氢键,进而形成结晶区^[4],使其应用受到了一定限制。对壳聚糖进行化学改性,可以改善其水溶性、生物活性和机械性能,进而促进其在更广的领域中应用^[5]。

镉(Cd)是一种具有强烈致癌性和致畸性的有毒元素,超过安全剂量的镉会损伤肾小管,使患者出现糖尿、蛋白尿和氨基酸尿,还会导致骨骼生长代谢受阻,发生骨质疏松、萎缩等各种病变^[6]。由于工业化和化学品的过度使用,水的镉污染日益加剧。从水溶液中除去金属离子的方法包括化学沉淀、过滤、氧化、还原、离子交换、溶剂萃取和吸附等^[7]。其中,化学吸附法中的配位键吸附结合力较强,对水溶液中金属离

子的去除效率较高^[8],是常用的吸附方法之一。壳聚糖及其改性后的化合物,由于存在大量的活性物质,对重金属离子的吸附能力明显高于一些传统的吸附剂^[9],开发壳聚糖与金属的螯合物是提高其对金属离子吸附性能的有效途径^[10]。

EDTA-2Na是一种常见的金属螯合物,可用于络合和分离金属离子,因本身含有较多羧酸根,将其与壳聚糖结合,通过引入亲水基团来制备水溶性壳聚糖,可有效地提高壳聚糖对重金属离子的吸附性。已有研究者采用EDTA-2Na对壳聚糖进行改性研究,并将改性产物用于 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 等重金属离子的吸附研究^[11-14]。如E. Repo等^[12]将乙二胺四乙酸(EDTA)或二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)的配体固定在壳聚糖的聚合物基质上,研究了所得吸附剂对Co和Ni的吸附效率,范围为93.6%~99.5%。任泳等^[13]运用EDTA修饰的壳聚糖吸附剂对当归提取液中的重金属进行吸附脱除研究,发现其对Cd、Pb的去除率可分别达到90%和94.7%,对药液中的其他重金属如Zn、Mn等也有一定的脱除作用。鉴于此,本文拟用EDTA-2Na酰化改性壳聚糖,制备EDTA-壳聚糖,并研究其对 Cd^{2+} 的吸附效果,以期有效去除 Cd^{2+} 提供一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

壳聚糖(脱乙酰度 $\geq 90\%$,分子量500~

600 kD),食品级,山东陆海蓝圣生物科技股份有限公司产;壳聚糖季铵盐,羟丙基壳聚糖,食品级,南通绿神生物工程有限公司产;壳聚糖乳酸盐,壳聚糖盐酸盐,食品级,山东奥康生物科技有限公司产;EDTA-2Na, CdCl₂,分析纯,腾翔化工有限公司产。

1.2 仪器与设备

HS-12型磁力搅拌器,群安实验仪器有限公司产;pHs-3C型pH计,上海雷磷仪器厂产;MD55-7型透析袋,海门市中泰实验器材厂产;SHA-B型水浴恒温振荡器,苏州威尔实验用品有限公司产;FD-T12N-80型真空冷冻干燥机,上海胜卫电子科技有限公司产;Thermo M6型原子吸收光谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 EDTA-壳聚糖的制备 称取0.5 g壳聚糖,加入到50 mL体积分数为0.1%的醋酸溶液中,搅拌至完全溶解;加入1 g EDTA-2Na,并用浓度为5 mol/L的NaOH溶液调pH值至5.0;加入碳二亚胺(EDAC),搅拌反应4 h,透析,冷冻干燥,即得壳聚糖的衍生物EDTA-壳聚糖,并于4℃条件下保存^[15]。

1.3.2 Cd²⁺吸附率和吸附量的测定 量取50 mL质量浓度为200 mg/L的CdCl₂溶液,用体积分数为1%的HNO₃溶液和浓度为1 mol/L的NaOH溶液调pH值至5.0,加入6 mL质量分数为1%的壳聚糖衍生物,定容至100 mL,于100 r/min条件下振荡数小时后,过滤,取上清液,用火焰原子分光光度法^[16]对Cd²⁺的吸附率和吸附量^[17]进行测定,计算公式如下:

$$\text{吸附率} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\% \quad (1)$$

$$Q = \frac{V(C_0 - C_1)}{W} \quad (2)$$

式中,V为金属离子溶液体积/mL;C₀,C₁分别表示Cd²⁺离子液吸附前后的质量浓度/

(mg·L⁻¹);W为吸附剂质量/g;Q为吸附量/(mg·g⁻¹)。

1.3.3 制备EDTA-壳聚糖的单因素试验

以Cd²⁺吸附率为响应指标,研究EDTA-2Na与壳聚糖质量比、pH值、EDAC浓度和反应时间对Cd²⁺吸附效果的影响。

1) EDTA-2Na与壳聚糖质量比对Cd²⁺吸附率的影响试验

称取0.5 g壳聚糖加入到50 mL体积分数为0.1%的醋酸溶液中,室温条件下搅拌至完全溶解.分别按照EDTA-2Na与壳聚糖的质量比为1:1,2:1,4:1,6:1,8:1,10:1和12:1的要求加入计算量的EDTA-2Na,用浓度为5 mol/L的NaOH溶液调pH值至5.0.添加EDAC至其浓度为10 mmol/L,室温条件下搅拌4 h,透析,冷冻干燥为成品,测定不同EDTA-2Na与壳聚糖的质量比下所制EDTA-壳聚糖对Cd²⁺的吸附率。

2) pH值对Cd²⁺吸附率的影响试验

称取0.5 g壳聚糖加入到50 mL体积分数为0.1%的醋酸溶液中,室温条件下搅拌至完全溶解.加入1 g的EDTA-2Na,并用浓度为5 mol/L的NaOH溶液调pH值分别至3.0,4.0,5.0和6.0,其他试验步骤同1),测定不同pH值下所制EDTA-壳聚糖对Cd²⁺的吸附率。

3) EDAC浓度对Cd²⁺吸附率的影响试验

称取0.5 g壳聚糖加入到50 mL体积分数为0.1%的醋酸溶液中,室温条件下搅拌至完全溶解.加入1 g的EDTA-2Na,并用浓度为5 mol/L的NaOH溶液调pH值至5.0.添加EDAC至其浓度分别为10 mmol/L,20 mmol/L,30 mmol/L,40 mmol/L和50 mmol/L,其他试验步骤同1),测定不同EDAC浓度下所制EDTA-壳聚糖对Cd²⁺的吸附率。

4) 反应时间对Cd²⁺吸附率的影响试验

称取0.5 g壳聚糖加入到50 mL体积分数

为 0.1% 的醋酸溶液中,室温条件下搅拌至完全溶解.加入 1 g 的 EDTA-2Na,并用浓度为 5 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 5.0.添加 EDAC 至其浓度为 30 mmol/L,室温条件下分别搅拌 4 h,8 h,12 h,16 h,20 h 和 24 h,其他试验步骤同 1),测定不同反应时间下所制 EDTA - 壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附率.

1.3.4 正交试验设计 在单因素试验基础上,以 EDTA - 壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附率为评定指标,以 EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比(A),pH 值(B),EDAC 浓度(C)和反应时间(D)4 个因素为自变量,应用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计进行试验^[18],确定 EDTA - 壳聚糖的最佳制备条件.

1.3.5 不同壳聚糖衍生物的吸附性能评价 移取 5 份 30 mL 的 CdCl_2 重金属液(质量浓度为 100 mg/L)置于实验瓶中,分别加入 6 mL 质量分数为 1% 的壳聚糖季铵盐、羟丙基壳聚糖、壳聚糖乳酸盐、壳聚糖盐酸盐和 EDTA - 壳聚糖,均调节 pH 值至 6.0,定容至 50 mL,于 25 °C 条件下振荡反应 12 h,过滤,取适量滤液用火焰原子吸收分光光度法进行测定,分别使用公式①②计算它们对 Cd^{2+} 的吸附率和吸附量.

1.4 统计分析

采用 Statistica 5.0 统计软件包中的单因素方差分析和 Tukey's 多重比较进行数据处理.

2 结果与分析

2.1 EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比对 EDTA - 壳聚糖 Cd^{2+} 吸附率的影响

EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比对 EDTA - 壳聚糖 Cd^{2+} 吸附率的影响试验结果见图 1.由图 1 可知,随着 EDTA-2Na 与壳聚糖质量比的增加,EDTA - 壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附率呈现先增加后逐渐降低的趋势,并最终趋于稳定.当 EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比为 2 : 1 时,

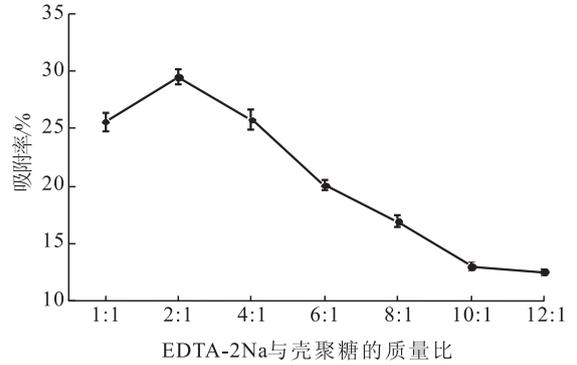


图 1 EDTA-2Na 与壳聚糖质量比对 EDTA - 壳聚糖 Cd^{2+} 吸附率的影响

Fig. 1 Effect of mass ratio of EDTA-2Na and chitosan on the Cd^{2+} adsorption rate of EDTA-chitosan

EDTA - 壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附率最高,达 29.5%,吸附量为 63.25 mg/g.这可能与 EDTA - 壳聚糖的取代度有关,当 EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比为 2 : 1 时,所制备产物引入的亲水基团最多^[20],此时制备的 EDTA - 壳聚糖的取代度较其他质量比制备的产物要高,故对 Cd^{2+} 的吸附率最高.因此,以适当的 EDTA-2Na 与壳聚糖的质量比制备的 EDTA - 壳聚糖不仅克服了壳聚糖溶解性差的缺点,而且还能提高其对 Cd^{2+} 的吸附性能,因此,选择 EDTA-2Na 与壳聚糖质量比为 2 : 1 较为适宜.

2.2 pH 值对 EDTA - 壳聚糖 Cd^{2+} 吸附率的影响

在壳聚糖的改性过程中,pH 值的不同可使产物的吸附性能产生较大差异,图 2 为 pH 值对 EDTA - 壳聚糖 Cd^{2+} 吸附率的影响试验结果.由图 2 可知,在一定的 pH 值范围内,所制备的 EDTA - 壳聚糖的吸附率会随着 pH 值的增大而逐渐升高,在 pH 值为 5.0 时,吸附率超过 20%,达到最高值;随着 pH 值的继续增大,吸附率反而开始降低.这可能是因为 EDAC 作为一种交联缩合剂,其 pH 值一般为 4.0 ~ 8.0,当反应溶液的 pH 值较低时,可能影响 EDAC

的缩合效果,进而抑制壳聚糖与 EDTA-2Na 发生的酰化反应,所以制备的 EDTA-壳聚糖的吸附率较低^[21];随着 pH 值的增大,EDAC 的缩合效果增强,壳聚糖在稀酸中与 EDTA-2Na 的反应条件适宜,故所制 EDTA-壳聚糖的吸附率逐渐升高.当 pH 值大于 5.0 后,大分子量的壳聚糖的溶解度较低,与 EDTA-2Na 的反应再次受到抑制,故所制 EDTA-壳聚糖对 Cd²⁺ 的吸附率开始降低.因此,选择 pH 值为 5.0 较为适宜.

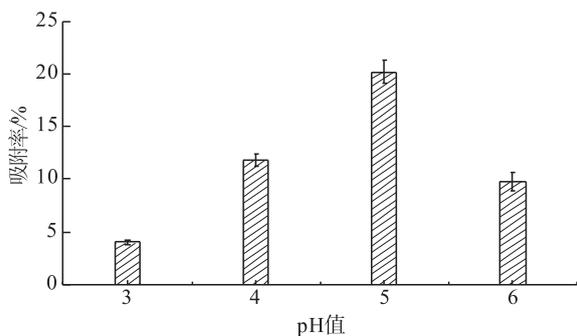


图2 pH 值对 EDTA-壳聚糖 Cd²⁺ 吸附率的影响

Fig. 2 Effect of pH value on the Cd²⁺ adsorption rate of EDTA-chitosan

2.3 EDAC 浓度对 EDTA-壳聚糖 Cd²⁺ 吸附率的影响

EDAC 是一种水溶性碳二亚胺类交联剂,可以催化羧基与氨基的缩合反应,在试验中充当缩合剂.EDAC 浓度对 EDTA-壳聚糖 Cd²⁺ 吸附率的影响结果见图 3.由图 3 可知,在一定的 EDAC 浓度范围内,随着 EDAC 浓度的增大,EDTA-壳聚糖对 Cd²⁺ 的吸附率逐渐升高.当 EDAC 浓度为 30 mmol/L 时,吸附率接近 33%,达到最高值,之后随着浓度的增大,EDTA-壳聚糖的吸附效果逐渐变差.这可能与 EDAC 本身的性质有关,随着 EDAC 浓度的增加,其催化 EDTA 中的羧基与壳聚糖中的氨基进行缩合反应的速率就会加快.但因 EDAC 具有较强的吸水作用,过高的 EDAC 浓度又会使 EDTA-壳

聚糖具有较强的吸水性能,黏度增大^[22],吸水溶胀为凝胶状,这将直接导致在加入 EDTA-壳聚糖后,重金属吸附液的浓度变大,使得最终的检测结果偏低.因此,选择 EDAC 浓度为 30 mmol/L 较为适宜.

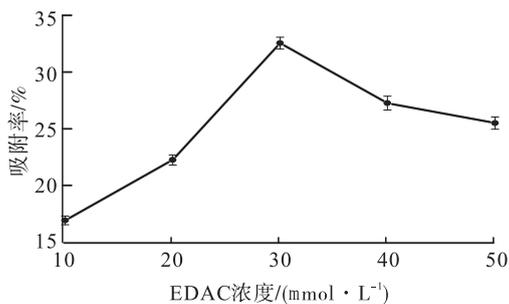


图3 EDAC 浓度对 EDTA-壳聚糖 Cd²⁺ 吸附率的影响

Fig. 3 Effect of EDAC concentration on the Cd²⁺ adsorption rate of EDTA-chitosan

2.4 反应时间对 EDTA-壳聚糖 Cd²⁺ 吸附率的影响

在其他条件确定的情况下,改变制备 EDTA-壳聚糖的反应时间,并对 Cd²⁺ 进行吸附试验,反应时间对 EDTA-壳聚糖 Cd²⁺ 吸附率的影响结果见图 4.由图 4 可知,随着制备 EDTA-壳聚糖反应时间的延长,所制得的 EDTA-壳聚糖对 Cd²⁺ 的吸附率呈逐渐升高的趋势,当反应时间为 16 h 时,EDTA-壳聚糖对 Cd²⁺ 的吸附率不再升高.因此,选择反应时间为 16 h 较为适宜.

2.5 正交试验结果与分析

在单因素试验的基础上,制备 EDTA-壳聚糖正交试验因素水平选择见表 1.

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A	B	C/(mmol · L ⁻¹)	D/h
1	1 : 1	4.5	20	16
2	2 : 1	5.0	30	20
3	4 : 1	5.5	40	24

正交试验结果与分析见表2.由表2可知,诸因素影响EDTA-壳聚糖对 Cd^{2+} 吸附率的主要关系排序为pH值>EDTA-2Na与壳聚糖的质量比>EDAC浓度>反应时间.根据测定结果的优化,得出EDTA-壳聚糖的最佳制备条件为 $A_2B_3C_3D_1$,即EDTA-2Na与壳聚糖的质量比为2:1,pH值为5.5,EDAC浓度为40 mmol/L,反应时间为16 h.进一步验证试验得出,在该工艺条件下,EDTA-壳聚糖对 Cd^{2+} 的平均吸附率达53.04%.

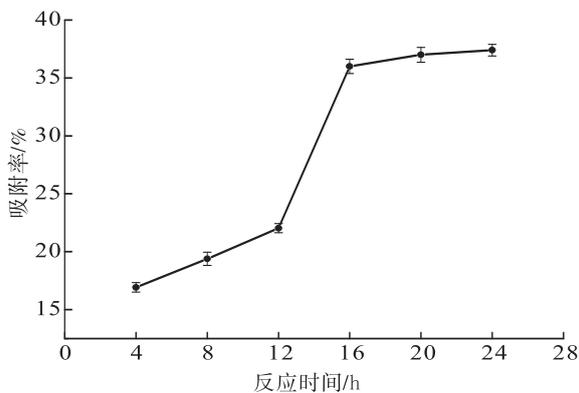


图4 反应时间对EDTA-壳聚糖 Cd^{2+} 吸附率的影响

Fig. 4 Effect of preparation time on the Cd^{2+} adsorption rate of EDTA-chitosan

表2 正交试验结果与分析

Table 2 Results and analysis of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	Cd^{2+} 吸附率/%
1	1	1	1	1	16.16
2	1	2	2	2	23.12
3	1	3	3	3	45.19
4	2	1	2	3	19.86
5	2	2	3	1	49.76
6	2	3	1	2	34.20
7	3	1	3	2	14.71
8	3	2	1	3	17.04
9	3	3	2	1	26.16
K_1	28.16	16.91	22.47	30.69	
K_2	34.61	29.97	23.05	24.01	
K_3	19.30	35.18	36.55	27.37	
R	15.30	18.27	14.09	6.68	

2.6 不同壳聚糖衍生物的吸附性能比较

不同壳聚糖衍生物对 Cd^{2+} 的吸附性能之对比结果见表3.由表3可知,在同一条件下,EDTA-壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附效果最好,壳聚糖乳酸盐次之,而羟丙基壳聚糖、壳聚糖盐酸盐和壳聚糖季铵盐对 Cd^{2+} 的吸附效果均较弱.

表3 不同壳聚糖衍生物对 Cd^{2+} 的吸附作用对比
Table 3 The comparison of Cd^{2+} adsorption properties for different chitosan derivatives

种类	Cd^{2+} 吸附率/%	Cd^{2+} 吸附量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
EDTA-壳聚糖	50.30 ± 1.60	30.40 ± 1.01
羟丙基壳聚糖	12.15 ± 1.81	7.43 ± 1.72
壳聚糖季铵盐	4.50 ± 0.02	2.74 ± 0.01
壳聚糖乳酸盐	26.47 ± 2.00	16.20 ± 2.06
壳聚糖盐酸盐	10.50 ± 0.53	6.40 ± 0.61

3 结论

本文用EDTA-2Na对壳聚糖进行酰化改性制备了EDTA-壳聚糖,研究了不同制备条件下EDTA-壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附率变化趋势,采用正交试验进行优化,得出EDTA-壳聚糖的最佳制备条件为:EDTA-2Na与壳聚糖的质量比为2:1,pH值为5.5,EDAC浓度为40 mmol/L,反应时间为16 h.在此条件下,进一步通过验证试验得出EDTA-壳聚糖对 Cd^{2+} 的平均吸附率达53.04%.同时,将EDTA-壳聚糖与其衍生物羟丙基壳聚糖、壳聚糖季铵盐、壳聚糖乳酸盐、壳聚糖盐酸盐对 Cd^{2+} 的吸附性能进行对比,发现:在同一条件下,EDTA-壳聚糖对 Cd^{2+} 的吸附效果均优于其他壳聚糖衍生物.

参考文献:

- [1] 栗子茜,高彦祥.壳聚糖在果蔬涂膜保鲜的应用[J].中国食品添加剂,2018(1):139.
- [2] 王海荣,纪宏宇,冯佳玉,等.壳聚糖及其衍生物在药物载体中的应用[J].中国药师,2018(2):324.

- [3] 孙强,王会才,刘明强. 改性壳聚糖对铅离子的吸附研究进展[J]. 科技通报,2018(2):5.
- [4] 薛海燕,仇旭东. 改性壳聚糖复合微球的制备[J]. 食品科技,2018(3):232.
- [5] LIU Y Q, LIU Y G, XIN-JIANG H U, et al. Adsorption of Cr(VI) by modified chitosan from heavy-metal polluted water of Xiangjiang River, China [J]. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, 2013, 23 (10) : 3095.
- [6] 危玲,熊燕,魏勇,等. 分散液液微萃取-火焰原子吸收光度法测定大米中痕量镉[J]. 粮食与油脂,2016(2):79.
- [7] NIU Y, YING D, LI K, et al. Adsorption of heavy-metal ions from aqueous solution onto chitosan-modified polyethylene terephthalate (PET) [J]. Research on Chemical Intermediates, 2017, 43 (7) : 4213.
- [8] 贾荣仙,闫芳. 新型壳聚糖交联改性物的制备及其性能研究[J]. 化工新型材料,2018(1):169.
- [9] ZHANG L, ZENG Y, CHENG Z. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: a review [J]. Journal of Molecular Liquids, 2016 (214) : 175.
- [10] 郭俊元,陈诚,张萍,等. 壳聚糖的改性及其去除废水中染料物质的性能研究[J]. 环境科学学报,2018,38(4):1529.
- [11] GYLIENE O, NIVINSKIENE O, RAZMUTE I. Copper(II) -EDTA sorption onto chitosan and its regeneration applying electrolysis [J]. Journal of Hazardous Materials, 2006, 137 (3) : 1430.
- [12] REPO E, WARCHOL J K, KURNIAWAN T A, et al. Adsorption of Co(II) and Ni(II) by EDTA- and/or DTPA-modified chitosan: kinetic and equilibrium modeling [J]. Chemical Engineering Journal, 2010, 161 (1/2) : 73.
- [13] 任泳,孙明慧,彭红,等. EDTA 修饰的壳聚糖磁性吸附剂对当归提取液中的重金属的去除[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3709.
- [14] REPO E, WARCHOL J K, BHATNAGAR A, et al. Heavy metals adsorption by novel EDTA-modified chitosan-silica hybrid materials [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2011, 358 (1) : 261.
- [15] TAN Z, PENG H, LIU H, et al. Facile preparation of EDTA-functionalized chitosan magnetic adsorbent for removal of Pb(II) [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2015, 132 (32) , 1.
- [16] 张薇,张卓勇,施燕友,等. 火焰原子吸收光谱法测定山药中多种微量元素[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(5):963.
- [17] 赵娜,金烨纯,李燕玲,等. 壳聚糖交联螺旋藻小球对 Cr(VI) 的吸附作用研究[J]. 生态环境学报,2016,25(6):994.
- [18] 曹小红,刘云海,朱政,等. 壳聚糖及其衍生物对铀的吸附研究[J]. 化学研究与应用,2006,18(7):878.
- [19] 黄暄暄,马海红,孙畅,等. 改性酰化壳聚糖缓释肥包膜材料的制备与表征[J]. 高分子材料科学与工程,2016,32(6):133.
- [20] 毛扬帆,辛梅华,李明春. 亲水基团性质对双亲性壳聚糖衍生物单分子膜性能的影响[J]. 化工进展,2015,34(2):490.
- [21] 李红,高德玉,李锦书,等. 壳聚糖降解技术[J]. 化学工程师,2008,(3):27.
- [22] LORETZ B, BERNKOP-SCHNÜRCH A. In vitro evaluation of chitosan-edta conjugate polyplexes as a nanoparticulate gene delivery system [J]. The AAPS Journal, 2006, 8 (4) : 756.



引用格式:黄浦,施文健,潘旻旻,等. 交联壳聚糖微球的制备及其对水中芳香族羧基化合物的吸附性能研究[J]. 轻工学报,2018,33(6):8-18.

中图分类号:X131;TS101.3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.002

文章编号:2096-1553(2018)06-0008-11

交联壳聚糖微球的制备及其对水中芳香族羧基化合物的吸附性能研究

Research on preparation of crosslinked chitosan microspheres and its adsorption properties for aromatic carboxyl compounds in water

黄浦,施文健,潘旻旻,彭阳,闻海峰

HUANG Pu, SHI Wenjian, PAN Minmin, PENG Yang, WEN Haifeng

上海理工大学 环境与建筑学院,上海 200093

School of Environment and Architecture, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

关键词:

交联壳聚糖微球;芳香族羧基化合物;反相悬浮法;吸附性能

Key words:

crosslinked chitosan microsphere; aromatic carboxyl compounds; reversed-phase suspension method; adsorption property

摘要:以壳聚糖为原料、液体石蜡为分散剂、甲醛为预交联剂、环氧氯丙烷为交联剂,采用反相悬浮法制备交联壳聚糖微球,并研究其对水中2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸、苯甲酸3种芳香族羧基化合物的吸附性能.结果表明:1)在弱酸性介质(pH=3~4)中,交联壳聚糖微球对上述3种芳香族羧基化合物的吸附速度快、吸附容量大,当pH=3.5,温度288 K条件下,其饱和吸附容量分别为702.0 mg·g⁻¹,320.1 mg·g⁻¹,176.3 mg·g⁻¹.2)其吸附过程符合 Lagergren 二级动力学方程,吸附反应较容易发生;吸附等温模型符合 Langmuir 等温吸附方程,该吸附过程主要为单分子层吸附,吸附过程是一个以物理吸附为主,同时伴有化学作用的自发、放热、熵减过程.3)交联壳聚糖微球具有较好的循环再生能力,经过8次循环再生过程,其吸附容量仍能稳定在97%以上.

收稿日期:2018-07-19

基金项目:国家自然科学基金项目(51208299)

作者简介:黄浦(1993—),男,河南省驻马店市人,上海理工大学硕士研究生,主要研究方向为环保功能材料.

通信作者:施文健(1957—),男,上海市人,上海理工大学教授,主要研究方向为分析化学及环保功能材料.

Abstract: Using chitosan as raw material, liquid paraffin as dispersant, formaldehyde as pre-crosslinking agent and epichlorohydrin as crosslinking agent, crosslinked chitosan microspheres were prepared by reversed-phase suspension method. The adsorption properties of crosslinked chitosan microspheres on aromatics carboxy compounds in water were studied. The results showed that it had fast adsorption rate and large adsorption capacity, the saturated adsorption capacity of crosslinked chitosan microspheres for 2-hydroxy-3-naphthoic acid, α -naphthoic acid and benzoic acid were $702.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $320.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $176.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ at the pH value of 3.5 and 288 K, respectively. The adsorption process conformed to the Lagergren-second-order kinetic equation, and the adsorption isotherm model conformed to the Langmuir isotherm adsorption equation, which was mainly monolayer adsorption. The adsorption process was a spontaneous, exothermic and entropic reduction process with physical adsorption and chemical action. The crosslinked chitosan microspheres had good recycling ability. After 8 cycles of regeneration, the adsorption capacity could still be stabilized above 97%.

0 引言

芳香族羧基化合物在水中有一定的溶解度,其熔点、沸点较高,是一类重要的有机化工中间体,被广泛应用于医药、染料、食品等领域^[1-3].这类化合物是带苯环的大分子有机物,在自然环境中很难被生物降解,而通过废水排放进入河流和土壤,则会给水体和环境带来持久性危害^[4-6].目前,处理芳香族羧基化合物的方法主要有吸附法和氧化法^[7-11].其中,吸附法具有吸附效率高、操作简单、成本低廉、可循环利用等优点^[12].常用的吸附剂(如活性炭等)虽然吸附性能良好,但选择性差,再生能力弱,机械强度低,价格昂贵.

壳聚糖(CTS)是甲壳素脱N-乙酰基的产物,是一种性能优良的天然高分子材料,对金属离子、染料分子和有机物均有良好的吸附性能^[13-16].但传统的壳聚糖在酸性介质中存在易溶解、机械性能差、不便于回收利用等缺点,这极大地限制了壳聚糖的应用与推广^[17-18].近年来,已有使用交联壳聚糖吸附去除阴离子染料、阴离子表面活性剂的相关报道^[15,18],但未见有关交联壳聚糖吸附水中芳香族羧基化合物的报道.鉴于此,本文拟参考文献[19-23]的制备方法并进行优化,以壳聚糖为原料、液体石蜡为分散剂、甲醛为预交联剂、环氧氯丙烷为交联

剂,采用反相悬浮法,制备交联壳聚糖微球(CCTS),通过研究其对水中芳香族羧基化合物的吸附性能来探讨吸附机理,以期为食品、印染和医疗废水的处理提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验试剂

液体石蜡、壳聚糖、司班80、2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸、苯甲酸、石油醚、三氯甲烷、环氧氯丙烷、乙酸、NaOH,以上试剂均为分析纯;甲醛,质量分数为37%;浓HCl,质量分数为37%.以上试剂均为上海沪试实验室器材股份有限公司产,所有溶液均用去离子水配制.

1.2 实验仪器

ESJ182型电子天平,上海精科天平厂产;SHJ-6型数显恒温搅拌器,江苏常州菲普实验仪器厂产;FE20型pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;UV2600型紫外分光光度计,上海精密科学仪器有限公司产;DKY-II型恒温调速回转式摇床,上海杜科自动化设备有限公司产;SHZ-D(III)型循环水真空泵,邦西仪器科技(上海)有限公司产;SJIA-30FD型冷冻干燥机,宁波市双嘉仪器有限公司产;Vega3型扫描电镜,TESCAN公司产;ASAP 2020 Plus HD88型比表面积与孔隙度分析仪,麦克默瑞提克(上海)仪器有限公司产;6700型傅里叶红外

光谱仪,美国 Nicolet 仪器公司产;D8A A25 型 X 射线衍射仪,德国布鲁克 AXS 有限公司产。

1.3 交联壳聚糖微球的制备^[19-23]

称取 5.000 g 壳聚糖溶解于 50 mL 质量分数为 4% 的乙酸溶液中,超声除气泡后,再加入 50 mL 液体石蜡,搅拌 10 min,使壳聚糖溶液均匀分散在液体石蜡中。加热升温至 50 ℃,加 2 滴司班 80,搅拌乳化 10 min。继续搅拌升温至 60 ℃,加入 5 mL 质量分数为 37% 的甲醛溶液,预交联 1 h,再用质量分数为 5% 的 NaOH 水溶液调节 pH 值至 10 左右,加入 5 mL 环氧氯丙烷,继续搅拌升温至 70 ℃,缓慢滴加 NaOH 溶液,保持 pH 值在 10 左右反应 3 h,待产物冷却后,抽滤洗涤至中性,得到交联壳聚糖微球粗产品。然后用石油醚对其提取 24 h,再将其放置在 1.0 mol · L⁻¹ 的 HCl 溶液中震荡 9 h,除去 Schiff 碱。接下来先后用 NaOH 水溶液和蒸馏水洗涤至中性,抽滤后,将其冷冻干燥,得到交联壳聚糖微球。

1.4 材料表征方法

将交联壳聚糖粉末均匀铺设在载样台上,于真空状态下利用扫描电子显微镜对交联壳聚糖微球进行形貌分析;采用比表面积与孔隙度分析仪,将样品于 40 ℃ 下真空脱气 8 h 后测定交联壳聚糖微球的比表面积;用傅里叶红外光谱仪测定交联壳聚糖微球的光谱图,扫描波数为 400 ~ 4 000 cm⁻¹;利用 X 射线衍射仪对交联壳聚糖微球进行结构分析,电压为 40 kV,扫描角度为 5° ~ 40°。

1.5 交联壳聚糖微球的吸附性能研究方法

1.5.1 交联壳聚糖微球在不同 pH 值溶液中吸附容量的分析

分别量取质量浓度为 200.0 mg · L⁻¹ 的 2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸和苯甲酸 3 种芳香族羧基化合物溶液各 50 mL,置于 100 mL 锥形瓶中,用质量分数为 10% 的 HCl 溶液和质量分数为 5% 的 NaOH 溶

液调节 pH 值为 2 ~ 9,分别加入 20.00 mg 交联壳聚糖微球,置于恒温调速摇床中,以 120 r · min⁻¹ 的频率振荡一定时间后,取上清液,测定吸附后溶液的质量浓度,根据式①计算交联壳聚糖微球对 3 种芳香族羧基化合物的吸附容量,选取吸附效果较好时的溶液 pH 值用于后续实验。

$$Q = V(C_0 - C_t) / M \quad (1)$$

式中, Q 为 t 时刻交联壳聚糖微球的吸附容量/(mg · g⁻¹), C_0 为污染物初始质量浓度/(mg · L⁻¹), C_t 为 t 时刻污染物质量浓度/(mg · L⁻¹), V 为溶液体积/L, M 为交联壳聚糖微球的质量/g。

1.5.2 吸附动力学分析

在 3 组 100 mL 锥形瓶中分别加入质量浓度为 200.0 mg · L⁻¹ 的 2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸、苯甲酸溶液各 50 mL,将其调节至适宜的 pH 值,再分别加入 20.00 mg 的交联壳聚糖微球,然后在不同温度下水浴振荡,连续测定溶液质量浓度,研究不同温度下吸附时间对吸附容量的影响。

利用 Lagergren 一级吸附动力学方程和二级吸附动力学方程对所得数据进行拟合,以求得吸附动力学方程相关参数;利用阿仑尼乌斯公式和吸附动力学方程相关参数计算交联壳聚糖微球对 3 种芳香族羧基化合物的表观吸附活化能。

1.5.3 吸附热力学分析

在 3 组 100 mL 锥形瓶中分别加入不同初始质量浓度(20.0 mg · L⁻¹, 50.0 mg · L⁻¹, 100.0 mg · L⁻¹, 200.0 mg · L⁻¹, 300.0 mg · L⁻¹ 和 500.0 mg · L⁻¹) 的 2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸、苯甲酸溶液各 50 mL,将其调节至适宜的 pH 值,再分别加入 20.00 mg 的交联壳聚糖微球,在温度 288 K 水浴条件下振荡至吸附平衡,测定溶液质量浓度,考察不同初始质量浓度对吸附容量的影响,并绘制吸附等温线。

分别用 Freundlich 等温吸附方程和 Langmuir 等温吸附方程将上述所得数据进行拟合,

研究交联壳聚糖微球对3种芳香族羧基化合物的等温吸附模型,并对交联壳聚糖微球吸附3种芳香族羧基化合物的热力学参数进行计算.

1.5.4 循环再生实验 在室温下,将吸附饱和的交联壳聚糖微球置于100 mL锥形瓶中,加入适量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH水溶液,恒温振荡脱附2 h后,过滤,用蒸馏水冲洗至中性,再加入适量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的HCl溶液进行活化再生,30 min后,过滤,用蒸馏水冲洗至中性.将再生的交联壳聚糖微球置于 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干.吸附剂经过8次重复利用后,测定其吸附容量.

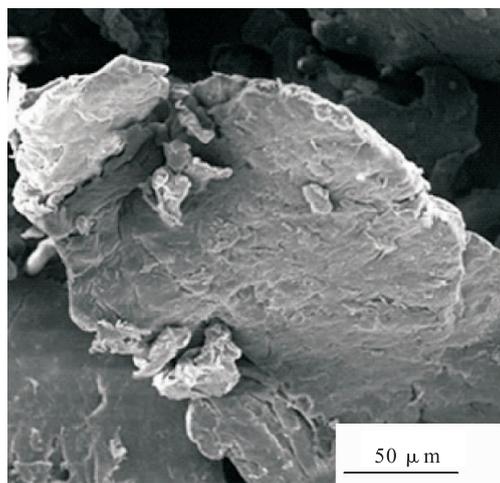
2 结果与讨论

2.1 交联壳聚糖微球结构表征分析

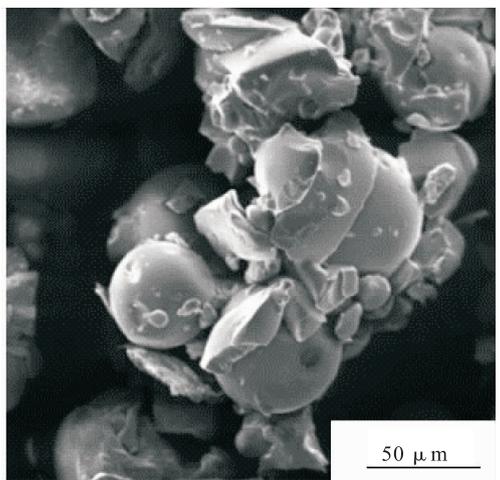
2.1.1 形貌分析 图1为壳聚糖和交联壳聚糖微球的SEM图.由图1可以看出,壳聚糖为片状结构,表面平整,其尺寸约为 $260.0 \text{ } \mu\text{m} \times 150.0 \text{ } \mu\text{m}$,厚度约为 $50.0 \text{ } \mu\text{m}$.而交联壳聚糖微球呈球形,球径约为 $60.0 \text{ } \mu\text{m}$,为空间多孔结构.壳聚糖由大颗粒变为微粒,由片状变为球状,微粒与微粒相连形成空间多孔结构,增大了多孔微球的比表面积,从而有利于吸附容量的提高.

2.1.2 比表面积和孔径分析 引入未改性的壳聚糖用来与本实验产品进行对比,经过测定得到壳聚糖和交联壳聚糖微球的比表面积分别为 $4.381 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $8.195 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$,孔容积分别为 $0.016 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $0.025 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$.交联壳聚糖微球的平均孔径为 7.163 nm ,在 $2 \sim 50 \text{ nm}$ 范围内,为介孔微球.与壳聚糖微球相比,由于交联反应中孔洞的塌陷,交联壳聚糖比表面积缩小而平均孔容积增大,更有利于吸附材料对大分子的吸附^[24].

2.1.3 结构分析 图2为壳聚糖和交联壳聚糖微球的IR谱图.由图2可以看出,壳聚糖中 3437 cm^{-1} 处有一个高强度的宽吸收峰,这是其



a) 壳聚糖



b) 交联壳聚糖微球

图1 壳聚糖和交联壳聚糖微球 SEM 图
Fig.1 SEM image of chitosan and crosslinked chitosan microspheres

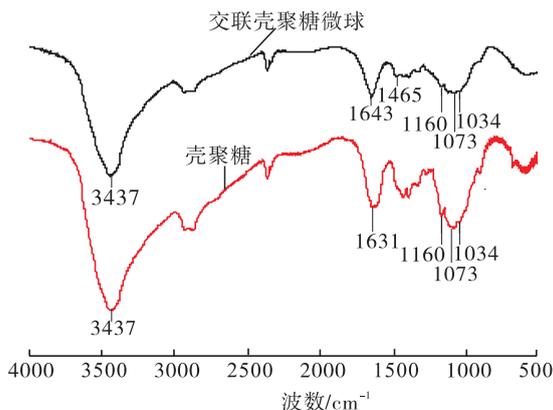


图2 壳聚糖和交联壳聚糖微球的IR谱图
Fig.2 IR spectra of chitosan and crosslinked chitosan microspheres

分子中 O—H 和 N—H 因氢键作用而致伸缩振动吸收峰重叠形成的^[24-25]. 交联壳聚糖微球中, 酰胺 I 谱带(1680 cm⁻¹ ~ 1630 cm⁻¹) 中伯胺基吸收峰由壳聚糖的 1631 cm⁻¹ 移至 1643 cm⁻¹ 处, 峰强度略有降低, 在 1465 cm⁻¹ 处出现仲胺吸收峰, 表明少量 C2 位上的伯胺与环氧氯丙烷发生了交联反应产生仲胺. 同时, 1073 cm⁻¹ 和 1034 cm⁻¹ 处羟基吸收峰强度大大减弱, 表明壳聚糖分子链上的—OH 也参加了交联反应^[26].

图 3 为壳聚糖和交联壳聚糖微球的 XRD 图. 由图 3 可以看出, 壳聚糖在 12°, 20° 和 29° 附近有 3 个结晶峰, 这是由于壳聚糖分子结构中存在大量的氢键, 使壳聚糖具有一定的结晶性. 而交联壳聚糖微球中, 在 12° 和 29° 处的吸收峰基本消失, 且 20° 处的衍射峰强度明显减弱、峰宽增大, 结晶度下降, 说明交联壳聚糖微球破坏了原壳聚糖分子的氢键, 使晶体结构无定型化, 也说明壳聚糖与环氧氯丙烷发生了交联反应^[27].

2.2 交联壳聚糖微球的吸附性能分析结果

2.2.1 交联壳聚糖微球在不同 pH 值溶液中的吸附容量分析结果

图 4 为交联壳聚糖微球在不同 pH 值溶液中的吸附容量. 由图 4 可以看出, 交联壳聚糖微球对 2-羟基-3-萘甲酸

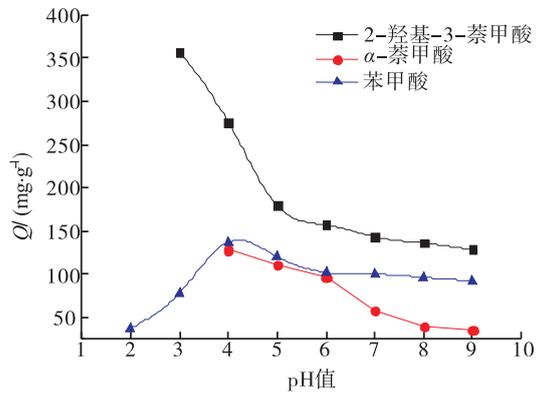


图 4 交联壳聚糖微球在不同 pH 值溶液中的吸附容量

Fig. 4 The adsorption capacity of crosslinked chitosan microspheres in solution with different pH value

的吸附容量随溶液 pH 值的增大而急剧减小, 由于 pH < 3 时 2-羟基-3-萘甲酸在溶液中析出, 所以当 pH = 3 时对其吸附容量最大; 交联壳聚糖微球对 α-萘甲酸的吸附容量也随溶液 pH 值的增大而减小, 由于在 pH < 4 时 α-萘甲酸析出, 所以当 pH = 4 时对其吸附容量最大; 而交联壳聚糖微球对苯甲酸的吸附在溶液 pH = 3 时得到最大吸附容量, 之后随溶液 pH 值的增大而减小. 由此可知, 溶液酸度对吸附容量的影响较大. 在水溶液中, 芳香族羧基化合物发生电离, 以离子和分子等形态存在. 在酸性溶液中, 因交联壳聚糖微球上的—NH₂ 质子化而带正电荷^[28], 而羧基基团是弱电解质, 电离产生部分阴离子, 铵离子与羧酸根缔合使电离平衡向右移动, 吸附容量较大. 但当酸度过高时, 溶液中羧基基团以分子形式存在, 电离程度大大降低, 呈现出吸附容量上升的现象. 在碱性溶液中, 交联壳聚糖微球上的—NH₂ 以分子形式存在, 质子化大大降低, 使吸附容量减小. 可见, 控制溶液 pH = 3 ~ 4 时, 交联壳聚糖微球对 2-羟基-3-萘甲酸、α-萘甲酸和苯甲酸的吸附效果较好, 因此后续实验选取适宜的溶液 pH 值为 3.5.

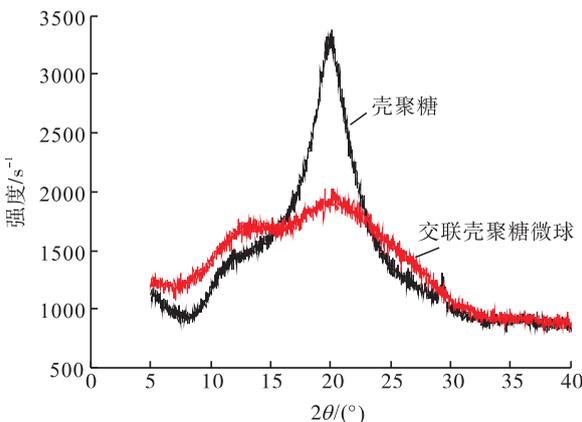


图 3 壳聚糖和交联壳聚糖微球的 XRD 图

Fig. 3 XRD spectra of chitosan and crosslinked chitosan microspheres

2.2.2 吸附动力学分析结果

图5为不同温度下交联壳聚糖微球对3种芳香族羧基化合物

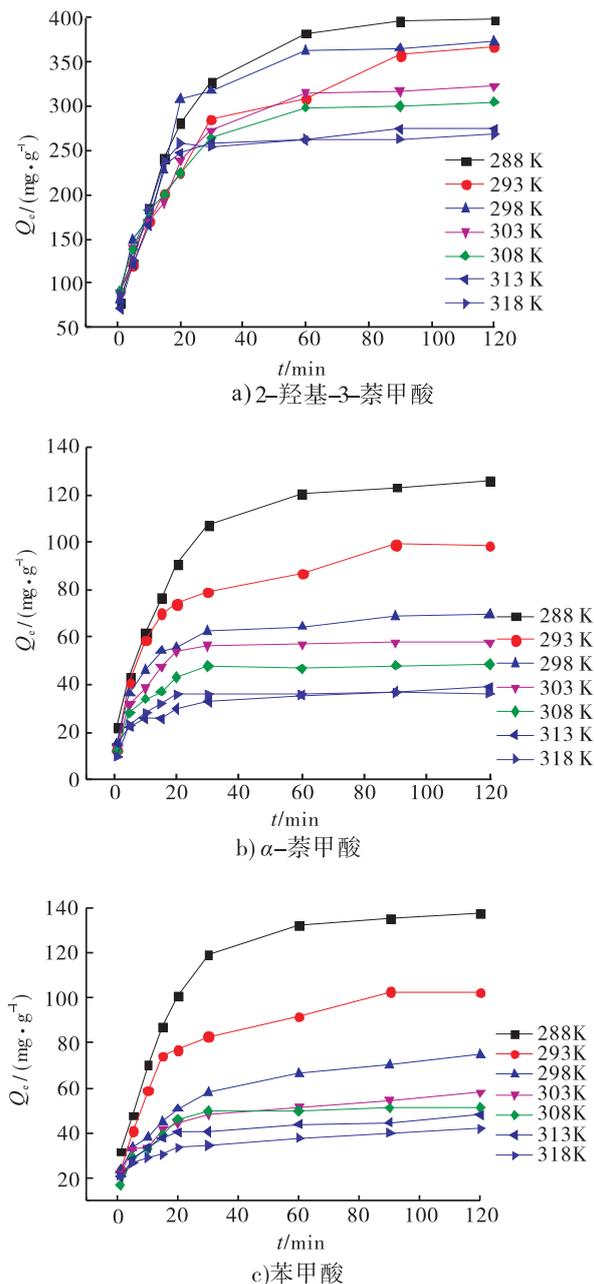


图5 不同温度下交联壳聚糖微球对3种芳香族羧基化合物平衡吸附容量与吸附时间之间的关系曲线

Fig. 5 The curves of relationship between equilibrium adsorption capacity and adsorption time of three aromatic carboxyl compounds by crosslinked chitosan microspheres at different temperatures

平衡吸附容量与吸附时间之间的关系曲线.由图5可以看出,不同温度下,交联壳聚糖微球吸附3种芳香族羧基化合物的变化趋势基本一致.整个吸附过程吸附速度较快,在60 min时的吸附容量均达到平衡吸附容量的90%以上.当温度大于303 K时,吸附60 min左右达到平衡状态;当温度小于303 K时,在90 min左右达到平衡状态.随着温度升高,吸附容量逐渐减小,说明该吸附过程是一个放热过程,而温度过高不利于吸附.

分别用 Lagergren 一级吸附动力学方程②和二级吸附动力学方程③对图5所得数据进行拟合,所得吸附动力学方程相关参数见表1.

$$\ln(Q_e - Q_t) = \ln Q_e - k_1 t \quad (2)$$

$$t/Q_t = 1/(k_2 \times Q_e^2) + t/Q_e \quad (3)$$

式中, Q_t 为吸附时间 t 时的吸附容量/(mg·g⁻¹); Q_e 为吸附平衡时的吸附容量/(mg·g⁻¹); k_1 为一级吸附速率常数/min⁻¹; k_2 为二级吸附速率常数/(g·mg⁻¹·min⁻¹).

由表1可知,在各种温度下,二级吸附动力学方程的相关系数 R^2 均在0.990 0以上,因此该吸附过程更符合二级吸附动力学模型,表明该吸附机理受化学吸附机理的影响,涉及吸附剂与吸附质之间的电子共用和电子转移.

利用阿伦尼乌斯公式④和表1中吸附速率常数 k_2 ,以 $\ln k$ 对 $1/T$ 作图,并计算吸附表观活化能 E_a ,结果见表2.

$$\ln k = -E_a/RT + \ln A \quad (4)$$

式中, k 为吸附速率常数/min⁻¹; E_a 为表观吸附活化能/(kJ·mol⁻¹); T 为热力学温度/K; 气体常数 $R=8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, A 为指前因子.

由表2可知,交联壳聚糖微球吸附3种芳香族羧基化合物的 E_a 均较小,说明该吸附反应较容易发生.

2.2.3 吸附热力学分析结果

图6为交联壳聚糖微球对3种芳香族羧基化合物的等温吸附

表1 吸附动力学方程相关参数

Table 1 The related parameters of adsorption kinetic equation

芳香族羧基化合物	T/K	准一级动力学方程			准二级动力学方程		
		$Q_e / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$k_1 \times 10^{-2} / \text{min}^{-1}$	R^2	$Q_e / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	$k_2 \times 10^{-4} / (\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	R^2
2-羟基-3-萘甲酸	288	388.0	6.040	0.990 3	434.8	2.210	0.995 7
	293	315.0	3.580	0.956 7	400.0	2.080	0.990 7
	298	357.9	7.600	0.987 3	400.0	2.960	0.990 8
	303	357.7	8.220	0.983 4	344.8	3.660	0.991 9
	308	261.5	9.060	0.980 4	322.6	4.640	0.995 2
	313	178.9	4.810	0.761 6	285.7	7.340	0.996 7
	318	149.9	10.400	0.911 1	277.8	11.100	0.997 4
	α -萘甲酸	288	91.40	4.140	0.971 7	137.00	7.63
293		66.90	3.780	0.965 5	105.30	11.50	0.997 9
298		60.09	4.430	0.963 6	72.46	26.60	0.999 2
303		13.58	6.060	0.907 8	59.88	47.00	0.999 2
308		17.67	4.370	0.716 6	50.00	55.10	0.999 3
313		24.26	2.680	0.948 0	39.84	46.10	0.997 3
318		8.120	4.160	0.725 5	37.45	113.00	0.999 6
苯甲酸		288	94.73	4.270	0.974 1	147.10	8.04
	293	69.16	3.960	0.974 3	108.70	12.20	0.997 4
	298	63.21	3.840	0.972 9	78.13	14.80	0.994 4
	303	27.13	2.450	0.932 4	59.17	29.70	0.996 4
	308	19.31	4.470	0.852 7	53.19	48.70	0.998 9
	313	17.26	2.170	0.824 0	48.08	52.60	0.997 5
	318	21.20	2.510	0.973 5	42.55	51.30	0.997 2

表2 吸附表观活化能 E_a 结果

Table 2 The results of the adsorption apparent activation energy E_a

芳香族羧基化合物	方程	R^2	$E_a / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
2-羟基-3-萘甲酸	$y = -5.068x + 8.94$	0.932 2	42.13
α -萘甲酸	$y = -7.611x + 19.39$	0.912 8	63.27
苯甲酸	$y = -6.352x + 14.98$	0.932 3	52.81

曲线. 由图6可以看出, 交联壳聚糖微球吸附3种芳香族羧基化合物的平衡吸附容量随着平衡质量浓度的增大而增大, 当溶液初始质量浓度达到 $300.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 吸附容量增幅减小, 表明吸附容量接近饱和. 交联壳聚糖微球在 $\text{pH} = 3.5$, 温度 288 K 时, 对2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸、苯甲酸的饱和吸附容量实验值分别

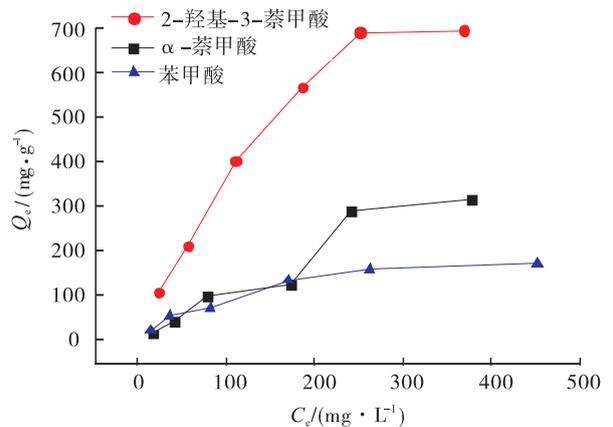


图6 交联壳聚糖微球对3种芳香族羧基化合物的等温吸附曲线

Fig. 6 Isothermal adsorption curves of crosslinked chitosan microspheres to three aromatic carboxyl compounds

为 $702.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $320.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $176.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 优于先前文献中报道的凝胶等吸附剂对苯甲酸的吸附容量^[29-31], 对比结果见表 3。

利用图 6 中的数据, 分别用 Freundlich 等温吸附方程⑤和 Langmuir 等温吸附方程⑥进行拟合, 进一步研究交联壳聚糖微球对 3 种芳香族羧基化合物的等温吸附模型, 结果见表 4。

$$\ln Q_e = (1/n) \ln C_e + \ln k_f \quad (5)$$

$$C_e/Q_e = 1/(K_L \times Q_m) + C_e/Q_m \quad (6)$$

式中, k_f 为 Freundlich 方程常数; n 为吸附强度; k_L 为 Langmuir 方程常数/ $(\text{L} \cdot \text{mg}^{-1})$; Q_m 为饱和吸附容量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$; Q_e 为平衡吸附容量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$; C_e 为平衡质量浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ 。

由表 4 可知, Langmuir 等温吸附方程拟合的相关系数 R^2 大于 Freundlich 等温吸附方程,

表 3 不同吸附剂对苯甲酸的吸附容量对比结果

Table 3 Comparison results of adsorption capacity of different adsorbents for benzoic acid

吸附剂	$Q_m/(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$	数据来源
PDMDAAC	61.5	文献[29]
CMKGM-Fe	60.4	文献[30]
Amberlite XAD-4	146.5	文献[31]
交联壳聚糖微球	176.3	本文

表 4 等温吸附模型及相关系数

Table 4 Isothermal adsorption model and correlation coefficient

芳香族羧基化合物	Langmuir 等温吸附模型		Freundlich 等温吸附模型	
	方程	R^2	方程	R^2
2-羟基-3-萘甲酸	$y = 0.2031x + 7.000 \times 10^{-4}$	0.9979	$y = 0.7696x + 2.253$	0.9794
α -萘甲酸	$y = 0.8887x + 4.000 \times 10^{-4}$	0.9940	$y = 0.8929x + 0.5165$	0.9689
苯甲酸	$y = 0.5056x + 4.700 \times 10^{-3}$	0.9911	$y = 0.5739x + 1.844$	0.9634

表 5 吸附热力学参数

Table 5 Thermodynamic parameters for the adsorption

芳香族羧基化合物	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$						
			288 K	293 K	298 K	303 K	308 K	313 K	318 K
2-羟基-3-萘甲酸	-17.66	-40.25	-6.069	-5.868	-5.667	-5.465	-5.264	-5.063	-4.862
α -萘甲酸	-30.83	-95.45	-3.336	-2.859	-2.382	-1.904	-1.427	-0.950	-0.473
苯甲酸	-32.51	-99.70	-3.798	-3.299	-2.801	-2.302	-1.804	-1.305	-0.807

这说明 Langmuir 等温吸附方程更适合用来描述交联壳聚糖微球对这 3 种芳香族羧基化合物的吸附过程, 这也说明该吸附过程主要为单分子层吸附。

利用式⑦—⑨对交联壳聚糖微球吸附 3 种芳香族羧基化合物的热力学参数进行计算, 并以 $\ln D$ 对 $1/T$ 作图, 根据直线的斜率和截距计算相应的热力学参数, 分别求得吸附焓变 $\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ 和吸附熵变 $\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$, 计算出不同温度下的吉布斯自由能变 $\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$, 计算结果见表 5。

$$D = Q_e/C_e \quad (7)$$

$$\ln D = \Delta S/R - \Delta H/RT \quad (8)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (9)$$

式中, D 为吸附分配系数/ $(\text{L} \cdot \text{mg}^{-1})$, T 为绝对温度/ K , 气体常数 $R = 8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

从表 5 可知, 吸附过程中 $\Delta H < 0$, 说明交联壳聚糖微球对上述 3 种芳香族羧基化合物的吸附过程是放热过程, 升高温度不利于吸附的进行, 这与运用吸附动力学方法所得的结果相符合。熵变 $\Delta S < 0$, 表明吸附过程熵值减少, 即体

系的紊乱度降低. 吉布斯自由能变 $\Delta G < 0$, 说明吸附过程可自发进行, 随着温度升高, $|\Delta G|$ 逐渐减小, 这也表明升高温度不利于吸附的进行.

2.3 吸附机理分析

由于制备的交联壳聚糖微球呈多孔结构, 具有极大的比表面积, 且交联壳聚糖微球上保留了部分氨基基团, 故在弱酸性介质中可以形成铵基阳离子. 吸附过程的动力学、热力学、等温吸附模型的研究结果表明: 吸附过程中的 E_a 较小, $\Delta H, \Delta S, \Delta G$ 均小于 0, 吸附容量在弱酸性介质中较大, 吸附容量与被吸附物质的大平面结构和分子量的大小有关等实验结果都指向交联壳聚糖微球对 2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸和苯甲酸的吸附以物理吸附为主, 同时, 等温吸附模型更符合 Langmuir 等温吸附方程, 所以伴有化学吸附, 这种化学吸附通过交联壳聚糖分子链上的胺基质子化形成阳离子 $R-NH_3^+$, 与 $Ar-COO^-$ 之间因静电作用而发生缔合. 阳离子的极化作用和芳香族羧基化合物的变形性, 使两者之间的作用力向共价键过渡, 这种化学作用进一步提高了交联壳聚糖微球的吸附容量.

2.4 循环再生性能

吸附剂能否重复使用是评价吸附剂性能的一个重要指标. 交联壳聚糖微球对 3 种芳香族羧基化合物的吸附循环再生性能如图 7 所示. 由图 7 可以看出, 经过 8 次循环再生过程, 其吸附容量稳定在 97% 以上, 说明交联壳聚糖微球具有较好的循环再生能力.

3 结论

本文利用反相悬浮法制备交联壳聚糖微球, 研究了其对 2-羟基-3-萘甲酸、 α -萘甲酸、苯甲酸 3 种芳香族羧基化合物的吸附性能. 结果表明: 1) 交联壳聚糖呈球状多孔结构, 在弱酸性介质 ($pH = 3 \sim 4$) 中吸附速度快、吸附容

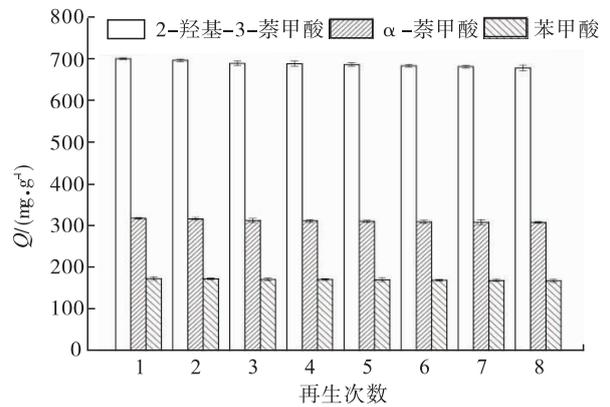


图 7 交联壳聚糖微球对 3 种芳香族羧基化合物的吸附循环再生性能

Fig. 7 Adsorption cyclic regeneration performance of crosslinked chitosan microspheres on three aromatic carboxyl compounds

量大, 在 $pH = 3.5$, 温度 288 K 时, 交联壳聚糖微球对上述 3 种芳香族羧基化合物的饱和吸附容量实验值分别为 $702.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $320.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $176.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 优于先前文献中报道的凝胶等吸附剂对苯甲酸的吸附容量^[29-31]. 2) 其吸附过程符合 Lagergren 二级动力学方程, 吸附反应较容易发生; 吸附等温模型符合 Langmuir 等温吸附方程, 该吸附过程主要为单分子层吸附, 吸附过程的热力学参数 $\Delta H, \Delta S, \Delta G$ 均为负值, 是一个以物理吸附为主, 伴有化学作用的自发、放热、熵减过程. 3) 交联壳聚糖微球吸附剂循环利用 8 次后吸附性能依然良好, 吸附容量仍能稳定在 97% 以上.

本吸附剂制备工艺简单, 材料廉价, 能有效降低废水处理成本, 有望应用于食品、印染和医疗废水的处理.

参考文献:

- [1] CHEN L W, MA J, LI X C, et al. A novel Fenton-like system with hydrogen peroxide, hydroxylamine and $Fe(III)$ for the degradation of benzoic acid[J]. Journal of Natural Science of Hei-

- longjiang University,2012,29(1):111.
- [2] 于泓,王艳,原小寓.直接电导检测-离子排斥色谱法测定芳香族羧酸[J].分析化学,2008,36(3):393.
- [3] 王晓君,刘吉平.苯甲酸的合成工艺[J].化工进展,2011(S1):603.
- [4] 董影杰,于泓,张小东.芳香族羧酸的高效液相色谱法测定及其在药品分析中的应用[J].分析测试学报,2010,29(6):564.
- [5] 郑凤英,李顺兴,钱沙华,等.水杨酸和5-磺基-水杨酸表面修饰纳米TiO₂吸附去除对硝基苯酚[J].环境科学学报,2007,27(1):64.
- [6] 徐红燕,周仕林,陶红,等.废水中邻苯二甲酸酯降解的研究进展[J].上海理工大学学报,2010,32(5):418.
- [7] LAABD M, CHAFAI H, ESSEKRI A, et al. Single and multi-component adsorption of aromatic acids using an ecofriendly polyaniline-based biocomposite [J]. Sustainable Materials and Technologies,2017,12:35.
- [8] 周艳,施文健,杨琴琳.717型阴离子交换树脂吸附水溶性芳香族有机污染物研究[J].离子交换与吸附,2012,28(4):289.
- [9] COKGOR E U, INSEL G, KATIPOGLU T, et al. Biodegradation kinetics of peptone and 2,6-dihydroxybenzoic acid by acclimated dual microbial culture [J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2):567.
- [10] 王海燕,蒋展鹏,余刚,等.光电协同催化氧化苯甲酸的试验研究[J].环境科学,2004,25(1):25.
- [11] 张丽,朱晓东,张燕峰,等.微波强化Fenton氧化处理邻氨基苯甲酸废水[J].环境科学研究,2009,22(5):516.
- [12] 孙志勇,严彪,王爱民,等.壳聚糖/CTAB复合改性膨润土对活性红X-3B的吸附[J].环境科学学报,2017,37(2):617.
- [13] 陶菡,魏万之,张梅芳,等.串联式压电传感技术用于壳聚糖脱乙酰度测定及其对铜(II)离子吸附的研究[J].分析测试学报,2009,28(6):729.
- [14] VAKILI M, RAFATULLAH M, SALAMATINIA B, et al. Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: a review [J]. Carbohydr Polym, 2014, 113:115.
- [15] 程华丽,李瑾,王涵,等.壳聚糖/蒙脱土插层复合物对活性红染料的吸附动力学及解吸性能[J].环境化学,2014,33(1):115.
- [16] SHEKHAWAT A, KAHU S, SARAVANAN D, et al. Synergistic behaviour of ionic liquid impregnated sulphate-crosslinked chitosan towards adsorption of Cr(VI) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 80:615.
- [17] NGAH W S W, TEONG L C, HANAFIAH M A K M. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: a review [J]. Carbohydr Polym, 2011, 83(4):1446.
- [18] 林越呈,王宏鹏,龚金炎,等.改性壳聚糖微球制备及其对阴离子染料的吸附行为研究[J].高校化学工程学报,2017,31(2):470.
- [19] NISHAD P A, BHASKARAPILLAI A, VELMURUGAN S. Enhancing the antimony sorption properties of nano titania-chitosan beads using epichlorohydrin as the crosslinker [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 334:160.
- [20] MORAIS W A, FERNANDES A L P, DANTAS T N C, et al. Sorption studies of a model anionic dye on crosslinked chitosan [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007, 310(1-3):20.
- [21] ZHANG C, WEN H, HUANG Y, et al. Adsorption of anionic surfactants from aqueous solution by high content of primary amino crosslinked

- chitosan microspheres [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 97: 635.
- [22] WAN N W, HANAFIAH M A, YONG S S. Adsorption of humic acid from aqueous solutions on crosslinked chitosan-epichlorohydrin beads: kinetics and isotherm studies [J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2008, 65(1): 18.
- [23] LIU B, LV X, MENG X, et al. Removal of Pb(II) from aqueous solution using dithiocarbamate modified chitosan beads with Pb(II) as imprinted ions [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 220(6): 412.
- [24] KAHU S, SHEKHAWAT A, SARAVANAN D, et al. Stannic chloride impregnated chitosan for defluoridation of water [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017.
- [25] Ge H, Chen H, Huang S. Microwave preparation and properties of O-crosslinked maleic acyl chitosan adsorbent for Pb^{2+} and Cu^{2+} [J]. *J Appl Polym Sci*, 2012, 125: 2716.
- [26] ZHU T, ZHU T, GAO J, et al. Enhanced adsorption of fluoride by cerium immobilized cross-linked chitosan composite [J]. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2017, 194: 80.
- [27] ABDUL-ZAHIR, ASLAM Z, KAMAL M S, et al. Development of novel cross-linked chitosan for the removal of anionic Congo red dye [J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, 244.
- [28] HUANG R, LIU Q, HUO J, et al. Adsorption of methyl orange onto protonated cross-linked chitosan [J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017, 10(1): 24.
- [29] 杨健, 辛晓东, 魏琴, 等. 改性膨润土对水中苯甲酸的吸附 [J]. *济南大学学报(自然科学版)*, 2012, 26(3): 241.
- [30] WANG B, LIAO L, HUANG Q, et al. Adsorption behaviors of benzoic acid by carboxyl methyl konjac glucomannan gel microspheres cross-linked with Fe^{3+} [J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2011, 57(1): 72.
- [31] 刘福强, 陈金龙, 李爱民, 等. 超高交联吸附树脂对苯甲酸的吸附研究 [J]. *离子交换与吸附*, 2002, 18(6): 522.



引用格式:赵建国,李玉,杨德健,等.双酚A废水处理对污泥急性毒性和蛋白质表达的影响[J].轻工学报,2018,33(6):19-26.

中图分类号:X703;TS08 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.003

文章编号:2096-1553(2018)06-0019-08

双酚A废水处理 对污泥急性毒性和蛋白质表达的影响

Effects of bisphenol A (BPA) wastewater treatment on sludge acute toxicity and proteins expression

赵建国¹,李玉¹,杨德健¹,朱昌蔼¹,李刚强²

ZHAO Jianguo¹, LI Yu¹, YANG Dejian¹, ZHU Chang'ai¹, LI Gangqiang²

1. 郑州轻工业学院 环境污染治理与生态修复河南省协同创新中心,河南 郑州 450001;

2. 郑州航空港区明港水务有限公司,河南 郑州 450001

1. He'nan Collaborative Innovation Center of Environmental Pollution Control and Ecological Restoration, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Zhengzhou Airport Harbour Minggang Water Service Co., Ltd., Zhengzhou 450001, China

关键词:

污泥急性毒性;蛋白质表达;双酚A;废水处理;序批式生物反应器

Key words:

sludge acute toxicity;
protein expression;
BPA; wastewater
treatment; sequencing
batch reactor

摘要:采用序批式生物反应器(SBR)处理BPA模拟废水,探讨不同BPA废水处理方式对污泥急性毒性和蛋白质表达的影响,结果表明:当进水BPA质量浓度为40 mg/L时,受BPA冲击的SBR中的污泥活性明显受到抑制,出水COD质量浓度显著高于经进水BPA逐步驯化的SBR,随着运行时间的延长,其水相、泥相中的BPA质量浓度均呈现先升高后降低直至被完全降解去除的变化趋势;在整个SBR运行过程中,经BPA冲击的SBR中污泥和EPS急性毒性均高于逐步驯化的SBR,但EPS急性毒性对污泥急性毒性的影响较小;采用不同方式处理BPA废水的污泥中其蛋白质表达呈现明显的差异,表明BPA质量浓度和降解去除BPA的方式对污泥中蛋白质表达有显著影响。

收稿日期:2018-03-06

基金项目:国家自然科学基金项目(41701569);河南省科技攻关项目(182102410094);河南省省属高校基础研究项目(17KYYWF0210)

作者简介:赵建国(1987—),男,山东省潍坊市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为工业废水处理及污泥毒性评估。

Abstract: BPA simulated wastewater was treated by Sequencing Batch Bioreactor (SBR) to investigate the effects of different BPA wastewater treatment methods on sludge acute toxicity and protein expression. The results showed that when the influent BPA concentration was 40 mg/L, the sludge activity in the BPA-impacted SBR was significantly inhibited, and the mass concentration of the effluent COD was significantly higher than that of the SBR gradually acclimated by the influent BPA. With the extension of running time, the mass concentration of BPA in the aqueous phase and mud phase increased first and then decreased until it was completely degraded. In the whole SBR operation, sludge and EPS acute toxicity in the SBR impacted by the BPA were both higher than that of the gradually acclimated SBR, but EPS acute toxicity had little effect on the acute toxicity of sludge; The protein expression in the sludge treated with different methods of BPA wastewater showed significant differences. The concentration of BPA and the way of degrading BPA had a significant effect on the protein expression in the sludge.

0 引言

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是生产聚碳酸树脂和环氧树脂的重要原料,被广泛应用于生产各种塑料制品. 工业生产过程中排放的 BPA 废水具有明显的毒性和难以生物降解等特性,在水体、土壤和沉积物中均能检测到它的存在^[1]. 同时, BPA 还是一种内分泌干扰物,进入人体后会导致内分泌失调,诱发性早熟,威胁婴幼儿的健康^[2]. 因此,国家已禁止生产含 BPA 的婴儿奶瓶. 任文娟等^[3-4]研究发现, BPA 对鱼、虾、蚯蚓和小鼠等均具有明显的生态毒性,能诱发多种疾病,而且它还具有明显的发光菌急性毒性.

笔者前期研究发现,尽管经 BPA 驯化的活性污泥系统能够充分降解去除 BPA 废水中的 BPA,但通过明亮发光杆菌急性毒性生物实验监测发现,其污泥急性毒性仍旧比对照组要高,即用该方法处理 BPA 废水会导致污泥急性毒性的增加^[5]. 赵骏等^[6-7]研究发现,不同类型反应器和反应器运行参数的改变会显著影响 BPA 废水的处理效果,但还未见关于反应器不同运行条件下的 BPA 废水处理过程是否会影响污泥急性毒性和污泥胞外聚合物 (EPS) 对发光菌急性毒性有无贡献的报道.

蛋白质是活性污泥的重要组成成分,在微

生物生长和代谢过程中有非常重要的作用. 同时,废水中的污染物可在蛋白质的作用下被降解去除,通过测定活性污泥中的蛋白质表达,可以推断污染物的降解过程^[8]. 另外,受污染物诱导,活性污泥中的蛋白质含量可过量表达,以防止有毒物质对微生物的损伤,因此,借助蛋白质组学技术可以探究污泥中蛋白质的差异表达^[9].

基于此,本文拟采用序批式生物反应器 (SBR) 处理 BPA 模拟废水,调整反应器运行参数,探讨反应器运行参数的改变对污泥急性毒性的影响,并通过蛋白质组学技术分析 BPA 废水处理过程中蛋白质的表达差异,以期工业废水处理过程中如何降低污泥急性毒性提供理论依据和数据支持.

1 材料与amp;方法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂: BPA (纯度为 99%), 上海阿拉丁化学试剂有限公司产; HPLC 级甲醇 (纯度 99.9%), 北京百灵威科技有限公司产; 超纯水, 由英国 ELGA 超纯水机 (包含水柱) 获取; 冷冻的海洋明亮发光杆菌 (*P. phosphoreum*), 购自中科院南京土壤研究所. 其他化学试剂均为分析纯或优级纯.

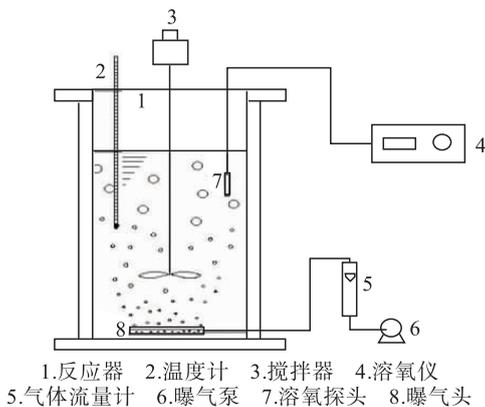
主要培养基: 0.5 g 酵母提取物, 0.5 g 蛋白胨, 3 g NaCl, 0.5 g Na₂HPO₄, 0.1 g KH₂PO₄,

100 mL蒸馏水, pH 值调整为 7.0 ± 0.5 。

主要仪器: LC-20ATVP 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司产; QL-861 型漩涡振荡器, 海门其林贝尔仪器制造有限公司产; DXY-2 型生物毒性测定仪, 中科院南京土壤研究所产; mini protean 3 cell 型电泳仪, Bio-Rad 公司产; Ettan IPGphor 3 型等电聚焦系统, Electrophoresis Power Supply - EPS 601 型垂直板电泳仪, Image Scanner III 型扫描仪, IPG 胶条, GE Healthcare 公司产。

1.2 接种污泥与合成废水配置

接种污泥取自当地厌氧—缺氧—好氧 (A^2/O) 市政污水处理厂好氧池的活性污泥。在投加到 SBR 之前, 活性污泥用自来水清洗 3 次, 并曝气 24 h, 以去除其中的有机物。SBR 的有效容积为 10 L, 由有机玻璃制成, SBR 活性污泥反应器如图 1 所示。投加的初始污泥质量浓度 (MLSS) 为 2500 mg/L, 污泥沉降比 (SV) 和污泥体积指数 (SVI) 分别为 30% 和 120 mL/g。实验废水采用人工配置的模拟废水, 以蛋白胨为碳源, 并补充活性污泥所需的氮、磷和微量元素, 具体成分及其质量浓度见表 1。



1.反应器 2.温度计 3.搅拌器 4.溶氧仪
5.气体流量计 6.曝气泵 7.溶氧探头 8.曝气头

图 1 SBR 活性污泥反应器的结构

Fig. 1 The structure of SBR activated sludge reactor

1.3 实验方法

1.3.1 实验方案

控制 SBR 的初始进水 COD 质量浓度和 pH 值分别在 300 mg/L 和 7.4 左右的范围内波动。SBR 运行期间, 控制反应器的温度、污泥停留时间 (SRT)、水力停留时间 (HRT) 和溶解氧 (DO) 质量浓度分别为 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, 20 d, 12 h 和 (2.5 ± 0.5) mg/L。另外, 在整个 SBR 运行过程中, 采用定时器控制反应器为间歇曝气模式, 即曝气 2 h, 静置 2 h。曝气期间通过搅拌器使活性污泥和废水充分混合均匀, 静置期间则停止搅拌。单个 SBR 周期内控制进水 0.15 h, 运行 11 h, 静置 0.70 h, 排水 0.15 h。待出水 COD 质量浓度在 30 ~ 60 mg/L 的范围内波动时, 认定 SBR 运行稳定。

本实验共运行 3 个以蛋白胨为碳源的 SBR。当这 3 个 SBR 运行稳定后, 其中 1 个 SBR 继续运行, 定义为对照组。通过逐步提高 BPA 浓度的方式对第 2 个 SBR 中的活性污泥进行驯化, 投加 BPA 的质量浓度由初始时 2.5 mg/L 逐步提高至 5.0 mg/L, 7.5 mg/L 和 20 mg/L, 当 SBR 运行周期末水相和泥相中检测不到 BPA 且出水 COD 质量浓度低于 60 mg/L 时, 认定此 SBR 稳定运行。继续提高进水 BPA 质量浓度至 40 mg/L, 此反应器定义为驯化组。第 3 个 SBR 则通过直接投加质量浓度 40 mg/L 进水 BPA 的方式对活性污泥进行冲击驯化, 此反应器定义为冲击组。3 个 SBR 在运行过程中, 对其出水 COD, 水相和泥相中的 BPA 残留、污泥急性毒性进行检测与对比分析。另外, 当 3 个 SBR 均运行稳定时, 通过蛋白质组学技术分析 3 个 SBR 中高表达蛋白质的差异。

表 1 模拟废水成分

Table 1 Composition of simulated wastewater

成分	蛋白胨	NaHCO_3	尿素	KH_2PO_4	CaCl_2	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	BPA
质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	330	360	32	13	0.73	0.45	1.33	0.3	20 ~ 40

1.3.2 测定项目与方法

采用酸性重铬酸钾滴定法测定 COD,即泥水混合液在 4000 r/min 下离心 5 min,测定上清液中 COD 的质量浓度^[10].采用高效液相色谱仪测定水相和泥相中 BPA 的残留量,反向 C18 柱为固定相, $V(\text{甲醇}):V(\text{超纯水})=77:23$ 的混合液为流动相,流速维持在 1 mL/min,测试波长为 280 nm.在测定水相和泥相中 BPA 含量之前进行预处理,即将 30 mL 泥水混合液在 4000 r/min 下离心 10 min 以分离水相和泥相,水相经 0.45 μm 滤膜过滤后直接测定其中的 BPA 含量,通过超声萃取的方法提取泥相中的 BPA,而后经 0.45 μm 滤膜过滤,测定其含量.

采用明亮发光杆菌 (*P. phosphoreum*) 急性毒性生物实验测定污泥急性毒性^[10].在进行实验之前,明亮发光杆菌采用 3% (若无特指,均指质量分数) 的灭菌 NaCl 溶液复苏,而后接种到灭菌培养基中,并经摇床培养.待明亮发光杆菌处于指数生长期时,用生物毒性测定仪测定污泥急性毒性.每个污泥样品设 3 个平行样,同时对应 3 个对照组,以相对抑光率(式①)来表征污泥急性毒性的大小.为保证实验结果的准确性,将 3 个平行样的平均值作为污泥急性毒性,污泥 EPS 对明亮发光杆菌的急性毒性定义为 EPS 急性毒性.由①式可知,相对抑光率越大,污泥急性毒性越强.

相对抑光率 =

$$(1 - \text{样品发光度} / \text{对照组发光度}) \times 100\% \quad \text{①}$$

在进行污泥急性毒性实验之前,为防止测定的污泥急性毒性偏低,污泥絮体需进行预处理,以释放微生物体内的物质,即通过阳离子树脂搅拌和低温高速离心的方法提取污泥中的 EPS,具体方法参考文献[11],通过冰水浴超声和低温高速离心的方法进行污泥絮体破碎,具体方法参考文献[12].

1.3.3 污泥中蛋白质组学分析方法

1.3.3.1 污泥中蛋白质的提取和纯化 当对照组、驯化组和冲击组的 SBR 均处于稳定运行阶段时,在 SBR 运行周期末取活性污泥并低温高速(4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min)离心 10 min,沉积物用低盐溶液(NaCl 8 g, KCl 2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.27 g 和蒸馏水 1 L, pH = 7.4)清洗 3 次后再次离心.最后,沉积物重新悬浮至 2 mL,裂解至 20 mL 的缓冲液(8 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 20 mmol/L DTT, 4% CHAPS, 2% IPG 溶液和 2 mol/L 蛋白酶抑制剂)中.将含污泥的裂解液置于冰水中,静置 20 min 后作超声处理(超声时间和功率分别为 5 min 和 200 W)使污泥破胞,采用间歇超声模式处理污泥,即超声 1 s,停止 2 s.超声后的悬浮液在 12 000 r/min 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 60 min 以去除细胞残片,得到的上清液储存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中备用.上清液中的蛋白质浓度通过 Lowry 法蛋白质试剂盒进行定量分析,具体操作步骤按照说明书进行.

1.3.3.2 蛋白质双向电泳实验 自污泥中提取的蛋白质通过蛋白质双向电泳的方法进行分离,即首先进行等电点聚集,随后根据分子量大小在凝胶中分离.根据测定的上述上清液中蛋白质浓度,取 80 μg 污泥蛋白与水化液(成分为 8 mol/L 尿素, 20 mmol/L DTT, 2% CHAPS, 0.5% IPG 溶液和 0.002% 溴酚蓝)充分混合,将上述所得的 500 μL 混合液和 24 cm 长的 IPG 胶条(pH = 4 ~ 7)置于胶条槽中,加入矿物油覆盖整个胶条后加上胶条盖,将其置于等电聚焦系统,确保胶条槽与仪器的电极一致.水化和等电聚焦程序为:水化 2 h \rightarrow 50 V 等电聚焦 8 h \rightarrow 100 V 等电聚焦 1 h \rightarrow 200 V 等电聚焦 1 h \rightarrow 1000 V 等电聚焦 1 h \rightarrow 10 000 V 等电聚焦 8 h \rightarrow 500 V 等电聚焦 10 h.

取出等电聚焦完成后的胶条进行平衡处

理.用电泳缓冲液清洗覆盖在胶条上的矿物油后,将胶条置于平衡液 A (成分为 50 mmol/L Tris-HCl, 6 mol/L 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, 0.002% 溴酚蓝, 1% DTT 和蒸馏水, pH = 8.8) 中平衡 15 min, 随后在平衡液 B (成分为在平衡液 A 中用 2.5% 碘乙酰胺取代 1% DTT, 其他成分不变) 中平衡 15 min.

将平衡完成的胶条置于体积分数为 13.5% 的 SDS 凝胶上端, 用质量分数为 0.5% 的琼脂糖封胶后, 将其置于垂直板电泳仪中进行第二向电泳, 按每根胶条 3 W 的功率电泳 0.5 h 后换用 25 W 的功率继续电泳, 直至溴酚蓝到达凝胶的底线, 此过程大概需要 2.5 h.

双向电泳结束后, 用染色液 (成分为 1 g 考马斯亮蓝 G-250, 甲醇 450 mL, 冰醋酸 100 mL 和蒸馏水 450 mL) 对凝胶染色 1.5 ~ 2 h, 以显示凝胶中的蛋白点. 凝胶染色结束后用蒸馏水清洗 3 次, 而后用脱色液 (成分为 100 mL 冰醋酸、50 mL 乙醇和 850 mL 蒸馏水) 脱色至蛋白点清晰可见. 用扫描位扫描并拍照脱色后的胶图.

2 结果与讨论

2.1 不同 SBR 中污染物的去除情况

图 2 为不同 SBR 的出水 COD 质量浓度曲线. 由图 2 可知, 在整个 SBR 运行过程中, 对照组处理效果良好, 出水 COD 质量浓度相对稳定, 在 (36.1 ± 9.8) mg/L 的范围内波动. 当驯化组 SBR 运行稳定时, 进水 BPA 质量浓度由 20 mg/L 提高至 40 mg/L, 其出水 COD 质量浓度基本不受影响, 与对照组出水 COD 质量浓度

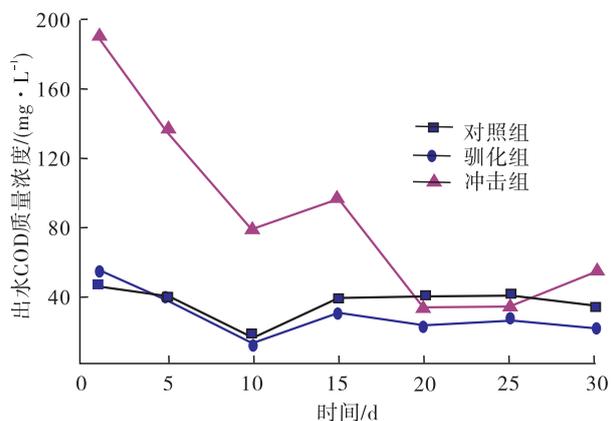


图 2 不同 SBR 的出水 COD 质量浓度曲线
Fig. 2 The mass concentration curves of the effluent COD in different SBR

相当, 甚至低于对照组, 这表明前期经不同质量浓度进水 BPA 驯化的活性污泥已形成降解 BPA 的优势菌群, 污泥活性良好. 驯化组 SBR 运行末期, 水相、泥相中检测不到 BPA 的存在, 也证实了该反应器已富集降解 BPA 的优势菌群, 这表明经低质量浓度 BPA 驯化的 SBR 耐受高质量浓度 BPA 冲击的能力较强, 反应器稳定效果良好.

然而, 当对照组活性污泥受质量浓度为 40 mg/L 的进水 BPA 直接冲击时, 具有明显毒性的 BPA 显著抑制污泥活性, 在 1 ~ 15 d 范围内, 冲击组 SBR 出水 COD 质量浓度显著高于对照组和驯化组, 第 1 d 的出水 COD 质量浓度高达 190 mg/L, 去除率低于 40%. 随着运行时间的延长, 降解 BPA 的优势菌群逐渐富集, 污泥活性缓慢恢复, 出水 COD 质量浓度逐渐降低, 20 d 后基本与对照组相当, 这表明经长时间 BPA 冲击的活性污泥能够富集降解 BPA 的优

表 2 冲击组 SBR 水相和泥相中 BPA 的残留情况

Table 2 The residual BPA contents in both aqueous and sludge phases in shocked SBR mg/L

检测项目	时间/d										
	1	2	3	5	7	10	12	16	23	24	32
水相	23.29	46.07	41.23	42.01	43.64	45.96	42.53	24.66	< DL	< DL	< DL
泥相	4.91	7.68	8.49	9.97	10.11	6.5	3.33	1.84	< DL	< DL	< DL

注: DL 代表液相色谱仪的检测限 (0.01 mg/L)

势菌群,活性污泥具有耐受污染物冲击的能力.表2为冲击组 SBR 水相和泥相中的 BPA 的残留情况.由表2可知,随着运行时间的延长,降解 BPA 的优势菌群逐渐富集,前期积累在污泥中的 BPA 逐渐被降解去除,所以水相、泥相中的 BPA 质量浓度均呈现先升高后降低直至被完全降解去除的变化趋势.积累在泥相中的 BPA 最大质量浓度为 10.11 mg/L(第7 d),23 d 后水相、泥相中均监测不到 BPA 的存在,即进水 BPA 和 COD 被同步降解去除.2~12 d,冲击组 SBR 运行末期,水相中 BPA 残留明显高于投加的 BPA 质量浓度,这是因为前一个 SBR 运行周期末只排放 70% 的废水,剩余的废水中含有部分溶解的 BPA,加上部分吸附到泥相的 BPA 解吸,故水相中的 BPA 残留较高. J. G. Zhao 等^[13]采用 SBR 活性污泥工艺处理质量浓度为 10 mg/L 的 4-氯酚(4-CP),发现在 SBR 运行末期,水相、泥相中 4-CP 的残留同样呈现先升高后降低直至被完全降解去除的变化趋势,与本研究冲击组 SBR 运行末期水相、泥相中 BPA 的变化趋势一致.

2.2 不同 SBR 中污泥急性毒性的对比分析

在整个 SBR 运行过程中,驯化组和冲击组 SBR 中污泥急性毒性显著高于对照组,这表明经毒性有机污染物驯化和冲击的活性污泥急性毒性升高,冲击组和驯化组 SBR 中污泥和 EPS 急性毒性变化曲线如图3所示.由图3可知,当进水 BPA 质量浓度由 20 mg/L 提高至 40 mg/L 时,驯化组 SBR 中污泥和 EPS 急性毒性均在一定范围内波动,分别为 $38.7\% \pm 7.2\%$ 和 $7.3\% \pm 3.9\%$,这表明采用逐步提高 BPA 质量浓度的方式驯化活性污泥,污泥和 EPS 急性毒性变化不大.但是,前期的研究已经证实,污泥急性毒性会随着 BPA 质量浓度的升高逐渐提高,抑制明亮发光杆菌光照强度的物质主要集中在微生物体内^[12],EPS 毒性对污泥急性毒性

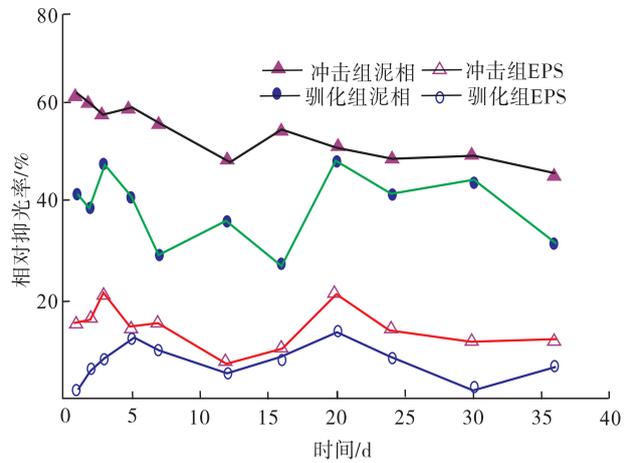


图3 冲击组和驯化组 SBR 中污泥和 EPS 急性毒性变化曲线

Fig. 3 Variations of EPS and acute toxicity sludge in both shocked and acclimated SBR

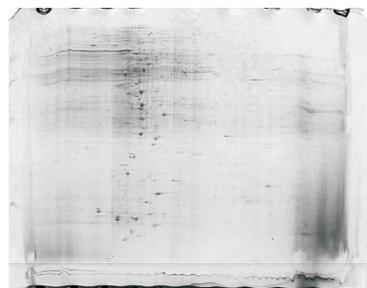
影响较小.

然而,当对照组活性污泥经质量浓度为 40 mg/L 的进水 BPA 直接冲击后,污泥急性毒性显著高于驯化组,第 1 d 的污泥急性毒性达到 61.4%,但随着冲击组 SBR 运行时间的延长,污泥急性毒性呈现明显的下降趋势.虽然吸附在泥相中的最高 BPA 质量浓度(10.11 mg/L,表2)出现在第7 d,但其污泥急性毒性并不是最高,这表明除吸附在污泥的 BPA 会导致污泥急性毒性升高外,受 BPA 冲击诱导微生物分泌的次生代谢产物和 BPA 降解过程中的代谢中间产物都可能会对污泥急性毒性有明显的影 响.随着 BPA 及其代谢中间产物和有毒次级代谢产物被降解去除,污泥急性毒性逐渐降低.虽然 23 d 后的冲击组 SBR 中污泥急性毒性仍略高于驯化组,但继续延长运行时间将会导致污泥急性毒性在一定范围内波动,最终与驯化组 SBR 的污泥急性毒性变化趋势基本一致.至于 EPS 急性毒性,冲击组 SBR 在 $14.2\% \pm 4.2\%$ 的范围内波动,略高于驯化组,但同样对污泥急性毒性的贡献较小,即微生物体内释放的抑制发光菌光照强度的物质是影响污泥急性毒性的

主要原因,其组成成分需进一步研究.

2.3 不同 SBR 中蛋白质图谱分析

当 3 个 SBR 处于稳定运行阶段时,对污泥中的蛋白质进行分析,结果如图 4 所示.由图 4 可知,3 个蛋白质图谱中蛋白点较少,推断与加入的污泥蛋白质含量较低有关.对照组污泥中高表达蛋白质主要集中在 pH 值为 5.0 ~ 5.5 的范围内,分子量为 20 ~ 100 kD.冲击组 SBR 污泥中高表达蛋白质主要集中在 pH 值为 5.0 ~ 6.0 的范围内,分子量为 10 ~ 50 kD.驯化组 SBR 污泥中高表达蛋白质主要集中在 pH 值为 5.0 ~ 5.5 的范围内,分子量为 15 ~ 70 kD.对



a) 对照组



b) 冲击组



c) 驯化组

图 4 不同 SBR 中污泥蛋白质图谱

Fig. 4 The sludge protein profiling in different SBR

比 3 个图谱中高表达蛋白质的 pH 值和分子量可以看出,BPA 质量浓度和降解去除 BPA 的方式对污泥中蛋白质的表达有显著影响,而受 BPA 诱导的上调或者下调蛋白质对 BPA 降解和污泥急性毒性的影响尚需进一步探讨.在后期研究中,可考虑通过质谱方式鉴定高表达蛋白质,分析不同蛋白质在降解 BPA 和抵抗 BPA 毒性等方面所起的作用.

3 结语

本研究利用 SBR 处理 BPA 模拟废水,并设置不含 BPA 的对照组,探讨不同 BPA 处理方式对污泥急性毒性和蛋白质表达的影响.结果发现,受质量浓度 40 mg/L 进水 BPA 冲击的 SBR 中污泥活性受到明显抑制,出水 COD 质量浓度显著高于经进水 BPA 逐步驯化的 SBR,随着运行时间的延长,其水相、泥相中的 BPA 质量浓度均呈现先升高后降低直至被完全降解去除的变化趋势;在整个 SBR 运行过程中,经 BPA 冲击的 SBR 中污泥和 EPS 急性毒性均高于逐步驯化的 SBR,但 EPS 急性毒性对污泥急性毒性的影响较小.活性污泥中蛋白质的表达与处理 BPA 废水的方式显著相关.本课题的研究有望为实际工业废水的处理提供一定的技术支持.

参考文献:

- [1] KITADA Y, KAWAHATA H, SUZUKI A, et al. Distribution of pesticides and bisphenol A in sediments collected from rivers adjacent to coral reefs[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(11): 2082.
- [2] 吴皓, 孙东, 蔡卓平, 等. 双酚 A 的内分泌干扰效应研究进展[J]. *生态科学*, 2017, 36(3): 200.
- [3] 任文娟, 汪贞, 王蕾, 等. 双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎及幼鱼的毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(1): 184.
- [4] 张辉, 李娜, 马梅, 等. 15 种取代酚对淡水发光

- 菌 Q67 的毒性及定量构效分析[J]. 生态毒理学报, 2012, 7(4): 373.
- [5] CHEN X R, ZHAO J G, BAO L L, et al. The investigation of different pollutants and operation processes on sludge toxicity in sequencing batch bioreactors [J]. Environmental Technology, 2016, 37(16): 2048.
- [6] 赵骏, 赵建国, 陈秀荣, 等. 处理 DMF 废水连续流和 SBR 两系统污泥毒性对比研究[J]. 环境科学与技术, 2015, 38(5): 125.
- [7] 李茂侨, 陈志强, 温沁雪. 延长缺氧水力停留时间对 A - AAO 工艺氮磷去除影响的研究[J]. 环境科学与管理, 2018, 43(1): 102.
- [8] ROMA-RODRIGUES C, SANTOS P M, BENNDORF D, et al. Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to phenol at the level of membrane proteome [J]. Journal of Proteomics, 2010, 73(8): 1461.
- [9] WEI D, WANG Y F, WANG X D, et al. Toxicity assessment of 4-chlorophenol to aerobic granular sludge and its interaction with extracellular polymeric substances [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 289: 101.
- [10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2006.
- [11] FRUND B, PALMGREN R, KEIDING K, et al. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin [J]. Water Research, 1996, 30(8): 1749.
- [12] ZHAO J G, CHEN X R, LIN F K, et al. Mechanism of toxicity formation and spatial distribution in activated sludge treating synthetic effluent containing bisphenol A (BPA) [J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 250: 91.
- [13] ZHAO J G, CHEN X R, ZHAO J, et al. Toxicity in different molecular-weight fractions of sludge treating synthetic wastewater containing 4-chlorophenol [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2015, 104: 251.

本刊数字网络传播声明

本刊已许可中国知网、万方数据资源系统、维普网、博看网、超星、中国科技论文在线、中教数据库等在其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。其相关著作权使用费与本刊稿酬一并支付。作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意本刊上述声明。



引用格式:马永鹏,田娟娟,李博,等.水生植物对受污染景观水体的净化效果研究[J].轻工学报,2018,33(6):27-33.

中图分类号:X524;TU983 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.004

文章编号:2096-1553(2018)06-0027-07

水生植物对受污染景观水体的净化效果研究

Study on the effect of purification of aquatic plants to the contaminated landscape water

马永鹏,田娟娟,李博,赵子敬,刘昊咏

MA Yongpeng, TIAN Juanjuan, LI Bo, ZHAO Zijing, LIU Haoyong

郑州轻工业学院 材料与化学工程学院/环境污染治理与生态修复河南省协同创新中心,河南 郑州 450001

College of Material and Chemical Engineering/He'nan Collaborative Innovation Center of Environmental Pollution Control and Ecological Restoration, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

水生植物;景观水体;
缓流水体净化

Key words:

aquatic plant;
landscape water;
slow flow water
purification

摘要:以凤眼莲、水芙蓉和青萍3种水生植物为净水材料,以郑州市A高校景观水体为处理对象,对水生植物的水体净化效果进行研究.结果表明,3种水生植物对水体中COD的净化效果依次为凤眼莲>水芙蓉>青萍;对氨氮的净化效果依次为凤眼莲>青萍>水芙蓉;对总磷的净化效果依次为水芙蓉>凤眼莲>青萍;对水体pH值的影响没有显著规律.综合比较可知,凤眼莲在景观水体中对多污染物的协同去除较其他净水材料有更好的效果.

收稿日期:2018-06-24

基金项目:国家自然科学基金项目(51508525);郑州轻工业学院大学生科技活动项目

作者简介:马永鹏(1984—),男,河南省新密市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为环境污染物控制理论与技术.

Abstract: Three kinds of aquatic plants, such as eichhornia crassipes, water hibiscus and common duckweeds were used as water purification materials, and the purification effect of aquatic plants was studied with the treatment of water in university A in Zhengzhou. The results showed that the purification effects of three aquatic plants on COD in water were followed by eichhornia crassipes > water hibiscus > common duckweeds; the purification effect of ammonia nitrogen was in the order of eichhornia crassipes > common duckweeds > water hibiscus; the purification effect of total phosphorus was in the order of water hibiscus > eichhornia crassipes > common duckweeds. There was no obvious rule to the effect of pH value in water. Comprehensive comparison showed that eichhornia crassipes had a better purification effect on the synergistic removal of multiple pollutants in the landscape water.

0 引言

随着我国城市化的迅猛发展,水的生态环境污染也日益严重,尤其是近年来水体的富营养化问题更为突出.据报道,国内九成以上的湖泊已处于营养化甚至富营养化状态^[1].城市景观水体大多为静止或流动性较差的半封闭缓流水体,水环境容量小,自净能力弱,更易造成富营养化污染^[2].近年来,国内各高等学校快速发展,普遍在校区建有人工湖以改善校园人文环境.人工湖作为校园景观水体,由于对水体的保护及治理措施尚不完善,会受到不同程度的污染,逐渐受到学者和管理者的关注.例如,华东师大普陀校区的丽娃河由于大量生活污水通过直排或渗透进入水体,大大超过其自净能力,水生系统出现阻滞,水质严重富营养化,浮游藻类季节性爆发,局部水体出现黑臭,不得不投入上千万元进行治理^[3].西南大学崇德湖曾受到严重富营养化污染,藻类大量繁殖,覆盖水面,水体浊度增加,呈现黄黑色且有异味,既影响湖泊的美观与调节局部气候的功能,也造成水资源的大量浪费^[4].

目前,对于景观水体污染治理的方法有多种,主体可分为3类:一是物理方法,即引水换水或循环过滤.该方法适用于处理水量较小的景观水体,且运行费用较高.二是化学方法,即选用合适的化学药剂去除污染物.该方法短时间内效果较好,但随着化学物质的大量使用,

水体生态系统会受到危害,易造成二次污染和其他环境问题.三是生物和生态处理方法.该方法适用于处理有机污染水体,具有处理效果较好、占地面积小、污泥产率低、操作简单且费用投入较少的特点,但需要后续人工维护才能维持净化效果.袁东海等^[5-7]利用水生植物处理受污染水体并进行生态修复,效果较好.目前,关于像校园景观水体这样的缓流水体污染治理方面还没有系统的研究.

郑州市西大学城有多所高等学校,校园景观水体星罗棋布,部分水体已经出现富营养化问题,必须引起高度重视.在前期对郑州市西大学城A高校(QY)校园水环境的水质变化特征进行调研和监测的基础上,本文拟以凤眼莲、水芙蓉和青萍3种水生植物为净水材料,以高校景观水体为处理对象,研究这3种水生植物对景观水体中污染物COD, $\text{NH}_3 - \text{N}$ (氨氮)和TP(总磷)的去除效果,以期为景观水体的污染防治提供参考.

1 材料与方法

1.1 主要实验材料与仪器

本实验使用的可净化受污染水体的水生植物凤眼莲、水芙蓉、青萍均从郑州市陈砦花卉市场购买种子,自行培养,进而选取高度、质量一致且生长状况良好的植株作为实验材料,其特征简介见表1.

植株预培养的实验用水取自郑州市西大学

表1 实验材料特征简介

Table 1 Character brief introduction of plants in experiments

植物名称	科属	生物学特征
青萍(别名水藻)	浮萍科	水生草本,漂浮在水面,叶小呈绿色,花期7个月左右
凤眼莲(别名水葫芦)	雨久花科	水生植物,植株的叶子漂浮于水面,叶柄基部膨大呈葫芦形,花期7个月
水芙蓉(别名大叶莲)	莲科	漂浮水生植物,叶片呈螺旋状排列成莲座状,花小,单生,花期6~7个月

城A高校(QY)景观湖水,净化实验用水分为两部分,第一部分是取自郑州市西大学城A高校(QY)的景观湖水,作为低浓度污染水体;第二部分是以A高校(QY)景观湖水为基础,配制较高浓度的污染水体。

主要仪器:AL204型电子天平,上海精密仪器有限公司产;KQ500型超声清洗仪,昆山超声仪器有限公司产;NC5044型微波消解仪,北京科创海光仪器有限公司产;SZCL-2A型数显智能控温磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司产;PHS-3C型pH计,上海仪电分析仪器有限公司产。

1.2 实验方法

实验地点设置在A高校化工学院顶楼温室玻璃房内,选用若干个直径35 cm,高30 cm的塑料桶作为实验容器。在花卉市场购买植物种子,以A高校景观湖水为培养基质进行培育,采集高度、重量一致且生长状况良好的水生植株作为实验材料,用水清洗(不损伤根系)植物后移入各实验桶中,桶内盛有相同体积的污水,水面高度接近桶弦,水量约20 L,使植株的根部能浸没在水里。每种植物分别设置两种不同氮、磷浓度的污水样品,每种植物各重复3次,1桶为1个重复,同时设置未种植物的桶以原污水作为空白对照。

实验前测定景观水的基础数值,水质情况每2 d进行1次采样,采样时间为9:00,测定水中的COD, $\text{NH}_3\text{-N}$ 和TP的质量浓度,同时观察水生植物的生长状况,定期以蒸馏水补充因蒸发和采样而失去的水分。

1.3 测试方法

依照《水质分析方法》^[8],采用重铬酸钾法测定水中COD,采用纳氏试剂分光光度法测定 $\text{NH}_3\text{-N}$,采用钼酸铵分光光度法测定TP,用pH计测定水体中pH值。通过游标卡尺测量水生植物高度和茎直径,以质量为判别依据描述生物量。

2 结果与讨论

2.1 水生植物生物量与生长态势比较

该实验过程中3种水生植物上桶时形态大小均匀,净化实验实施15 d后,发现3种水生植物长势较好,但植株质量有所差异,生物量大小顺序为凤眼莲>水芙蓉>青萍。凤眼莲不断发出新枝,新的叶子也不停地增加,根须比较长,生物量变化最大,是初始质量的1.8倍;水芙蓉的中心一直发出新的嫩叶,而且根须越来越长,生物量增加适中,约为初始质量的1.4倍;而青萍由于没有根须,叶片小而且薄,因此生物量增加相对较少。

2.2 3种水生植物对水体COD的净化效果

首先取A高校景观湖水作为试样,不加入任何试剂,作为低浓度污染水平进行实验。初始水质参数为COD质量浓度16.83 mg/L, $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度0.86 mg/L,TP质量浓度0.05 mg/L, $\text{pH} = 7.8$ 。图1为3种水生植物对低浓度污水中COD的净化效果曲线。由图1可以看出,随着时间的推移,种有3种水生植物的水体中COD质量浓度的变化趋势大致相同,COD质量浓度在前7 d下降迅速,然后逐渐趋于缓慢。实验进行到第15 d,种有3种水生植物

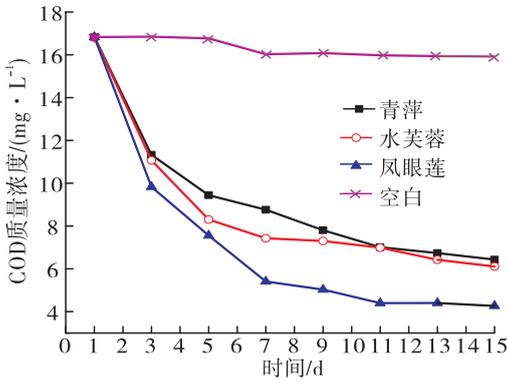


图1 3种水生植物对低浓度污水中COD的净化效果曲线

Fig.1 Purification effects curves of COD in low concentration wastewater by three kinds of aquatic plants

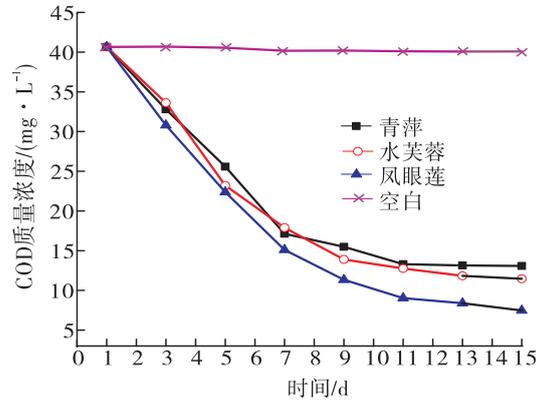


图2 3种水生植物对高浓度污水中COD的净化效果曲线

Fig.2 Purification effects curves of COD in high concentration wastewater by three kinds of aquatic plants

的水样和空白对照组水样中COD的质量浓度分别为种凤眼莲的4.26 mg/L,种水芙蓉的6.11 mg/L,种青萍的6.43 mg/L,空白的15.94 mg/L,凤眼莲、水芙蓉和青萍对COD的总去除率分别为74.7%,63.7%和61.8%。

取A高校景观湖水,加入8 g (NH₄)₂SO₄, 0.05 g K₃PO₄ · 7H₂O,以此水样作为高浓度污染水平进行实验,初始水质参数为COD质量浓度40.65 mg/L, NH₃ - N质量浓度3.40 mg/L, TP质量浓度0.88 mg/L, pH = 8.2. 图2为3种水生植物对高浓度污水中COD的净化效果曲线. 由图2可以看出,实验进行到第15 d,种有3种水生植物的水样和空白对照组水样中COD的质量浓度分别为种凤眼莲的6.17 mg/L,种水芙蓉的11.46 mg/L,种青萍的13.08 mg/L,空白的40.08 mg/L,凤眼莲、水芙蓉和青萍对COD的总去除率分别为81.6%,71.8%和67.8%。

由此可见,3种水生植物对污水中COD都有较明显的去除效果,总去除率大小顺序为凤眼莲 > 水芙蓉 > 青萍. 3种水生植物对于较高浓度的COD污水仍有较好的净化效果,说明植物的耐受范围较大. 对COD的去除机理是水生

植物生长需要吸收利用水体中的有机物,并且对水体悬浮的有机物也有一定的吸附作用,能够有效降低水体中的有机物含量. 在相同净化时间内,凤眼莲植株生长旺盛,生物量增长最多,所以凤眼莲对COD的总去除率最大。

2.3 3种水生植物对水体中NH₃ - N的净化效果

首先取A高校景观湖之湖水作为实验用水,不加入任何试剂,作为低浓度污染水平进行实验. 初始水质参数为COD质量浓度16.83 mg/L, NH₃ - N质量浓度0.86 mg/L, TP质量浓度0.05 mg/L, pH = 7.8. 图3为3种水生植物对低浓度污水中NH₃ - N的净化效果曲线. 由图3可以看出,3种水生植物对水体中NH₃ - N的去除趋势大致相同, NH₃ - N的质量浓度在前9 d下降幅度较大,然后逐渐趋于缓慢. 实验进行到第15 d,种有3种水生植物的水样和空白对照组水样中NH₃ - N的质量浓度分别为种凤眼莲的0.05 mg/L,种水芙蓉的0.25 mg/L,种青萍的0.07 mg/L,空白的0.85 mg/L,凤眼莲、水芙蓉和青萍对NH₃ - N的总去除率分别为94.2%,69.8%和91.9%。

取A高校景观湖水,加入8 g (NH₄)₂SO₄,

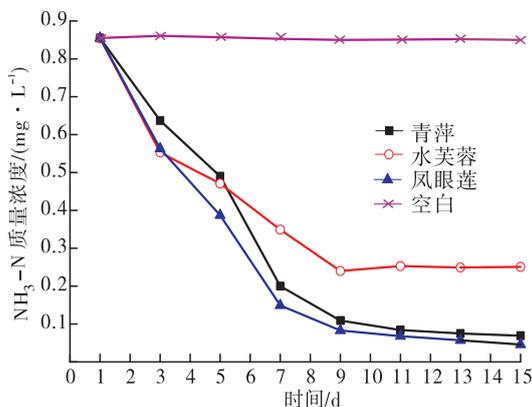


图3 3种水生植物对低浓度污水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的净化效果曲线

Fig. 3 Purification effects curves of $\text{NH}_3\text{-N}$ in low concentration wastewater by three kinds of aquatic plants

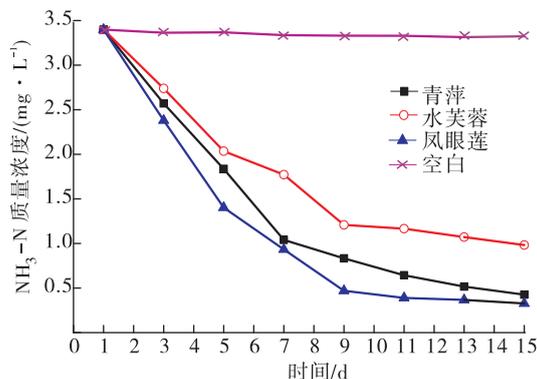


图4 3种水生植物对高浓度污水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的净化效果曲线

Fig. 4 Purification effects curves of $\text{NH}_3\text{-N}$ in high concentration wastewater by three kinds of aquatic plants

0.05 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,以此水样作为高浓度污染水平进行实验,初始水质参数为 COD 质量浓度 40.65 mg/L, $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度 3.40 mg/L, TP 质量浓度 0.88 mg/L, $\text{pH} = 8.2$. 图4为3种水生植物对高浓度污水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的净化效果曲线. 由图4可以看出,实验进行到第15 d,种有3种水生植物的水样和空白对照组水样中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的质量浓度分别为种凤眼莲的 0.33 mg/L,种水芙蓉的 0.98 mg/L,种青萍的 0.43 mg/L,空白的 3.32 mg/L,凤眼莲、水芙蓉和青萍对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的总去除率分别为 90.3%, 71.2% 和 87.4%.

由此可见,3种水生植物对污水中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的去除效果明显,总去除率大小顺序为凤眼莲 > 青萍 > 水芙蓉. 3种水生植物对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 总去除率均较高,可能是因为部分 $\text{NH}_3\text{-N}$ 被植物直接用于有机物的合成以促进生长,另有一部分 $\text{NH}_3\text{-N}$ 转化为 NH_3 直接逸出水体. 对于较高浓度的 $\text{NH}_3\text{-N}$ 污水的去除率略有降低,说明植物的生长需要的氮元素的绝对量有限,过剩的氮较难被水生植物吸收,需要定期对水生植物进行清除并更换处于旺盛生长期的新

鲜植株. 在相同净化时间内,凤眼莲植株生长旺盛,生物量增长最多,生长所需氮元素较多,对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的总去除率也最大. 水芙蓉的生物量增加比青萍大,但其对 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的总去除率却低于青萍.

2.4 3种水生植物对水体中 TP 的净化效果

取 A 高校景观湖水作为实验用水,不加入任何试剂,视为低浓度污染水平进行实验. 初始水质参数为 COD 质量浓度 16.83 mg/L, $\text{NH}_3\text{-N}$ 质量浓度 0.86 mg/L, TP 质量浓度 0.05 mg/L, $\text{pH} = 7.8$. 图5为3种水生植物对低浓度污水 TP 的净化效果曲线. 由图5可以看出,3种水生植物对水体中 TP 的去除趋势大致相同,都是逐渐缓慢降低. 实验进行到第15 d,种有3种水生植物的水样和空白对照组水样中 TP 的质量浓度分别为种凤眼莲的 0.017 mg/L,种水芙蓉的 0.01 mg/L,种青萍的 0.025 mg/L,空白的 0.042 mg/L,凤眼莲、水芙蓉和青萍对 TP 的总去除率分别为 66.0%, 80.0% 和 50.0%.

取 A 高校景观湖水,加入 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05 g $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,以此水样作为高浓度污染水平进行实验,初始水质参数为 COD 质量浓

度 40.65 mg/L, NH₃ - N 质量浓度 3.40 mg/L, TP 质量浓度 0.88 mg/L, pH = 8.2. 图 6 为 3 种水生植物对高浓度污水 TP 的净化效果曲线. 由图 6 可以看出, 实验进行到第 15 d, 种有 3 种水生植物的水样和空白对照组水样中 TP 的质量浓度分别为种凤眼莲的 0.27 mg/L, 种水芙蓉的 0.17 mg/L, 种青萍的 0.37 mg/L, 空白的 0.86 mg/L, 凤眼莲、水芙蓉和青萍对 TP 的总去除率分别为 69.3% ,80.7% 和 57.9%.

结合图 5 和图 6 可知, 3 种水生植物对污水中 TP 的去除效果很明显, 且对于水体中 TP 浓度的变化耐受度较强, 总体去除率水芙蓉 > 凤眼

莲 > 青萍. 这是由于水中磷的去除主要通过两个方面实现, 一方面是部分可溶性磷被水生植物吸收用于合成核酸等有机成分, 另一方面是水生植物根系中的微生物对不溶性磷进行降解, 同时为水生植物生长提供丰富的可溶性磷.

2.5 3 种水生植物对水体 pH 值的影响

整个实验过程中水体 pH 值变化情况见表 2. 由表 2 可知, 随着实验时间的推移, 3 种水生植物水体中的 pH 值都是先有稍许的下降, 然后又有所上升, 基本维持在碱性环境中, 然而空白对照组的 pH 值则呈缓慢下降的趋势. 有水生植物生长的环境, 其水体 pH 值的变化范围

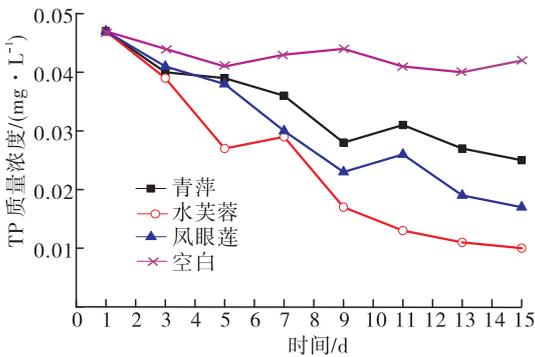


图 5 3 种水生植物对低浓度污水中 TP 的净化效果曲线

Fig. 5 Purification effects curves of TP in low concentration wastewater by three kinds of aquatic plants

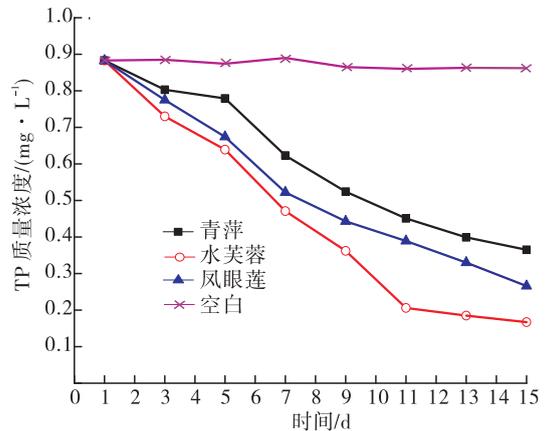


图 6 3 种水生植物对高浓度污水 TP 的净化效果曲线

Fig. 6 Purification effects curves of TP in high concentration wastewater by three kinds of aquatic plants

表 2 实验过程水体 pH 值的变化情况

Table 2 The variation of pH value of water in the experimental process

取样时间/d	青萍		水芙蓉		凤眼莲		空白对照	
	低浓度污染水平	高浓度污染水平	低浓度污染水平	高浓度污染水平	低浓度污染水平	高浓度污染水平	低浓度污染水平	高浓度污染水平
1	7.8	8.2	7.8	8.2	7.8	8.2	7.8	8.2
3	7.8	8.1	7.7	8.2	7.7	8.0	7.8	8.1
5	7.6	7.9	7.7	8.0	7.5	8.3	7.7	7.9
7	7.9	8.3	7.9	8.1	7.9	8.2	7.5	7.8
9	8.1	8.5	8.2	8.3	8.2	8.3	7.4	7.6
11	8.2	8.4	8.4	8.3	8.3	8.5	7.4	7.6
13	8.3	8.6	8.3	8.4	8.5	8.6	7.3	7.6
15	8.2	8.5	8.2	8.4	8.4	8.6	7.2	7.5

一般在 7.0~9.0 之间,而碱性环境更有利于硝化反应的进行,故本实验中水生植物对氨氮的去除率较高.高浓度污染物条件下,水体中的 pH 值普遍比低浓度污染条件要高,这可能是硫酸铵质量浓度的增加导致的.而无论对于低浓度还是高浓度的污水,水生植物对水体 pH 值的影响没有显著规律.无植物体系与有植物体系相比,水体中 pH 值存在极显著差异.

3 结论

本文选取凤眼莲、水芙蓉和青萍 3 种水生植物为净水材料,以郑州市 A 高校景观水体为处理对象,对这 3 种水生植物的净化效果进行研究.结果表明:凤眼莲、水芙蓉、青萍 3 种水生植物对景观水体中的 COD、 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 和 TP 都有较明显的去除效果——对水体中 COD 的净化效果依次为凤眼莲 > 水芙蓉 > 青萍;对 $\text{NH}_3 - \text{N}$ 的净化效果依次为凤眼莲 > 青萍 > 水芙蓉;对 TP 的净化效果依次为水芙蓉 > 凤眼莲 > 青萍.3 种水生植物对水体 pH 值的影响没有显著规律.综合多种污染物协同去除效果可知,凤眼莲的净化效果是最好的,其次是水芙蓉,青萍较差.在实际应用过程中,这 3 种水生植物均可作为净化景观水的植物选材,也可搭配使用.

总之,对于水体修复,水生植物已经成为一种有潜力的绿色处理方法,不仅可以吸收有机物、氮、磷等污染物质,还能够向水中供氧,对微生物呼吸供起到了重要的作用.随着技术不断完善,研究不断深入,今后对水生植物净化水体

的研究将主要集中于不同条件下水生植物的最优选型和最优群落配置,以及低透明度污染水体中水生植物的生存及在不同生活环境下水生植物的生存等.

参考文献:

- [1] 章涟漪,姜丹,葛燕燕,等.3 种水培植物对青山湖富营养化水体氮磷的去除研究[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2015(5):493.
- [2] 于玉彬,黄勇.景观水体表观污染成因分析[J].广东化工,2011,38(5):157.
- [3] 李静文,施文,余丽凡,等.丽娃河受损退化生态系统的近自然恢复工程及效果分析[J].华东师范大学学报(自然科学版),2010(4):35.
- [4] 张琳,童小容,罗刚,等.大学校园生态景观水体的污染原因及治理模式研究[J].中国高新技术企业,2015,23:94.
- [5] 袁东海,任全进,高士祥,等.几种湿地植物净化生活污水 COD、总氮效果比较[J].应用生态学报,2004,15(12):2337.
- [6] 张瑞斌.不同水生植物对污水处理厂尾水的生态净化效果分析[J].环境工程技术学报,2015,5(6):504.
- [7] 刘足根,张萌,李雄清,等.沉水-挺水植物镶嵌组合的水体氮磷去除效果研究[J].长江流域资源与环境,2015(Z1):171.
- [8] 鲁光四,周怀东,李怡庭.水质分析方法[M].北京:学术书刊出版社,1989.



引用格式: 陈志军, 雷李玲, 杨清香, 等. GO/WO₃/PANI 复合材料的制备及其电化学性能研究[J]. 轻工学报, 2018, 33(6): 34-41.

中图分类号: O646. 21; TS976. 8 文献标识码: A

DOI: 10. 3969/j. issn. 2096 - 1553. 2018. 06. 005

文章编号: 2096 - 1553(2018)06 - 0034 - 08

GO/WO₃ /PANI 复合材料的制备及其 电化学性能研究

Research on preparation and electrochemical performance of GO/WO₃/PANI composites

陈志军, 雷李玲, 杨清香, 杨光, 赵俊红, 董梦果

CHEN Zhijun, LEI Liling, YANG Qingxiang, YANG Guang, ZHAO Junhong,
DONG Mengguo

关键词:

纳米 WO₃; GO/WO₃/
PANI 三元复合材料;
电化学性能; 超级电
容器

郑州轻工业学院 材料与化学工程学院/河南省表界面科学重点实验室, 河南
郑州 450001

College of Materials and Chemical Engineering/He'nan Key Laboratory of Surface Interface Science,
Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Key words:

nano-WO₃;
GO/WO₃/PANI ternary
composites;
electrochemical
performance;
supercapacitor

摘要:以钨酸钠、石墨和苯胺为主要原料, 采用水热合成法和原位聚合法制备 GO/WO₃/PANI 三元复合材料, 对其电化学性能进行测试. 结果表明: 三元材料的复合可以提高材料的综合电化学性能, 在 20 mV/s 的扫描速率下、纳米 WO₃ 的添加量为 0.42 g 时, 三元复合材料样品 GWP-4 的电化学性能最好; 随着充放电电流的增大, 该样品的放电时间缩短, 比电容减小, 在充放电电流为 0.2 A/g 时, 其比电容最大, 为 107 F/g.

收稿日期: 2018-07-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(21271160, 21401170); 河南省科技重大专项项目(181100310300)

作者简介: 陈志军(1963—), 男, 河南省信阳市人, 郑州轻工业学院教授, 博士, 主要研究方向为功能材料及材料表界面物理化学.

Abstract: The GO/WO₃/PANI ternary composites were prepared by hydrothermal synthesis and in situ polymerization using sodium tungstate as the main raw material. The electrochemical properties were tested. The results showed that the composite of ternary materials could improve the overall electrochemical performance of the material. At the scanning rate of 20 mv/s, the addition of nano-WO₃ was 0.42 g, and the electrochemical performance of ternary composites sample GWP-4 was the best; as the charge and discharge current increased, the discharge time of the sample was shortened, and the specific capacitance was reduced. When the charge and discharge current was 0.2 A/g, the specific capacitance was the largest, which was 107 F/g.

0 引言

随着能源危机与环境污染问题的日益加剧,新型电化学储能器件一直是国内外新能源领域的研究热点^[1-2]. 超级电容器,又称电化学电容器,是介于传统电容器与充电电池之间的一种新型储能装置,与锂离子电池相比,它具有功率密度高、充电时间短、循环使用寿命长、安全系数高、环境友好等特点,被认为是极有发展前景的储能器件之一,在诸多领域占据不可替代的位置^[3]. 随着便携式电子产品在日常生活中的应用越来越广泛,对储能器件的小型化、高性能的要求也越来越高,影响储能器件小型化及性能提高的因素很多,其中电极材料是关键因素^[4-5].

过渡金属氧化物是构成储能器件电极材料的典型材料之一^[6-7],它可以与多种离子(如 Li⁺, K⁺, Na⁺, H⁺等)发生氧化还原反应,在不同氧化状态之间进行可逆转化,具有远高于传统碳/石墨材料的理论比电容,且循环稳定性更好. 然而,大部分过渡金属氧化物属半导体甚至绝缘体材料,电极反应过程中易出现电子和离子的传递受阻,其活性不能得到充分有效利用,即过渡金属氧化物存在实际能量储存密度低和能量转化效率低的缺点,这限制了其作为电极材料的商业化应用^[8-9]. 因此,目前的研究多集中在过渡金属氧化物作为电极材料的结构优化,其中纳米材料复合化是提高其综合性能比较有代表性的方法,应用前景良好.

目前,将过渡金属氧化物材料与导电材料

(包括导电聚合物材料和导电碳材料)复合是纳米材料复合化最常用的方法. 聚苯胺(PANI)、聚吡咯和聚噻吩是三大典型 π -共轭导电高聚物,具有优良的导电性能、可逆的氧化还原活性、质量轻、单位质量的能量载荷大等特点. 与金属氧化物相比,导电聚合物具有较高的电化学活性,且柔韧性好、导电性好、密度低,不仅可以单独用作电容器电极材料,还可以与其他材料复合作为超级电容器电极材料,在储能器件研究中一直受到高度重视. PANI 因制备方法简单、价格低廉,具有独特的掺杂行为、良好的电化学可逆性和化学稳定性,在导电聚合物的研究中备受关注^[10-12]. 但是, PANI 在掺杂/去掺杂过程中会出现体积的膨胀和收缩,且在去掺杂状态下 PANI 的导电性会有所下降,从而导致 PANI 单独用作超级电容器电极材料时循环性降低,这也是导电聚合物作为电容器电极材料的一个共性问题. 石墨烯作为一种独特的碳材料,因其高导电率、大的理论比表面积(约为 $2630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)和优异的机械柔韧性,在超级电容器电极材料中具有巨大的应用潜力^[13-14]. 以石墨烯为基底的复合材料作为电极材料时,石墨烯的柔性不仅可以改善导电聚合物在掺杂/去掺杂条件下因体积膨胀/收缩引起的结构不稳定,还可以提高复合材料的循环稳定性,为过渡金属氧化物的电化学氧化还原储能过程提供良好的导电通道,弥补导电聚合物在去掺杂条件下导电性下降的缺陷^[15-16].

目前,在众多过渡金属氧化物中,氧化钨

(RuO_2)具有突出的电容性能,但因为 Ru 资源稀缺,价格昂贵,研究者试图寻找其他廉价的过渡金属氧化物或化合物来取代 RuO_2 材料^[17-18]. 三氧化钨(WO_3)是一种典型的电化学性能稳定的 N-型半导体材料,多用在电致变色器件、光催化、气体传感、电催化制氢等研究领域^[19],而 WO_3 作为超级电容器活性电极材料最近几年才引起研究者的关注,相关研究成果较少.

鉴于此,本文拟采用水热合成和原位聚合方法合成 $\text{GO}/\text{WO}_3/\text{PANI}$ 三元复合材料,通过研究该三元复合材料的电化学电容性能,探索其用作超级电容器电极材料的应用前景,为开发新型高性能超级电容器电极材料提供新的思路.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:钨酸钠($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),天津市光复精细化工研究所产; NaOH , HCl , 丙酮,烟台市双双化工有限公司产;草酸($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$), KMnO_4 , 过硫酸铵($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$),天津市风船化学试剂科技有限公司产; NaNO_3 ,天津市科密欧化学试剂有限公司产; HNO_3 ,双氧水,天津瑞金特化学品有限公司产;无水乙醇,北京化工厂产;浓 H_2SO_4 ,洛阳市化学试剂厂产;苯胺,成都市科龙化工试剂厂产. 以上试剂均为分析纯. 石墨粉,青岛东凯石墨有限公司产.

主要仪器:AXS D8 型 X-射线衍射仪,SHZ-D(三)型循环水多用真空泵,郑州国瑞仪器有限公司产;DHG-9053A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海三发科学仪器有限公司产;SK2200H 型超声波振荡仪,上海科导超声仪器有限公司产;BS124S 型电子天平,德国 Sartorius 公司产;DZF-1 型真空干燥箱型,上海跃进

医疗器械有限公司产;DZKW-4 型电子恒温水浴锅,北京中兴伟业仪器有限公司产;HJ-6 型磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司产;JW-3021H 型离心机,安徽嘉文仪器装备有限公司产;Chi660D 型电化学工作站,上海辰华仪器有限公司产;FW-4 型压片机,天津市光学仪器厂;JSM-6490LV 型扫描电子显微镜(SEM),日本电子公司产;Diamond TG/DTA 型综合热重分析仪,美国电子公司产;

1.2 样品的制备

纳米 WO_3 的制备^[19]:在连续搅拌下,将 $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11 mmol, 3.63 g) 溶解于 20 mL 去离子水中,待溶解完全后,慢慢滴加 6 mol/L HCl 溶液调节溶液 pH 值至 1.5,然后在上述溶液中加入一定量的 NaCl (22 mmol, 1.287 g) 和 $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (11 mmol, 1.387 g),连续搅拌 30 min 后,再加入 50 mL 去离子水. 最后,将所得溶液分成两份,分别转移至聚四氟乙烯衬底的 50 mL 不锈钢反应釜中,密封后在烘箱中加热至 150 °C 反应 1 h. 反应结束冷却至室温,将沉淀物离心分离,然后分别用去离子水和乙醇洗涤,真空干燥得纳米 WO_3 样品.

GO 的制备:采用改良的 Hummers 法^[20],将 2 g 石墨、1 g NaNO_3 和 46 mL 浓 H_2SO_4 在冰水浴中混合均匀,低温下缓慢加入 6 g KMnO_4 ,冰浴 10 ~ 15 °C 反应 6 h 后,水浴(35 ± 1) °C 反应 2 h,加入 92 mL 去离子水,升温至 98 °C 再补加 280 mL 去离子水,20 min 后加入 20 mL 质量分数为 30 % 的双氧水,30 min 后趁热离心分离得到棕黄色粗产物,分别用质量分数 5 % 的 HCl 溶液和去离子水各洗涤 5—7 次至中性,最后加入 100 mL 去离子水,超声振荡 4 h,离心分离,干燥得到 GO 样品.

$\text{GO}/\text{WO}_3/\text{PANI}$ 三元复合材料的制备:称取一定量的纳米 WO_3 颗粒分散于 25 mL 去离子水中,磁力搅拌 10 min,形成均匀的分散液;

将一定量的浓 HCl (0.834 mL) 和 (NH₄)₂S₂O₈ (0.25 g) 溶解在 5 mL 去离子水中,配制成氧化剂溶液;称取 0.05 g 的 GO 溶于 50 mL 去离子水中,超声分散 1 h,然后将 0.1 mL 的 C₆H₅NH₂ 缓慢加入 GO 分散液中,磁力搅拌 10 min 得到均匀的 GO/C₆H₇N 溶液,置于冰浴中搅拌,然后将纳米 WO₃ 分散液和氧化剂溶液依次加入 GO/C₆H₇N 溶液中,磁力搅拌 10 min 后,用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH = 1 ~ 2,室温继续搅拌 12 h,将所得到的产物进行抽滤、洗涤、真空干燥得到墨绿色固体粉末.按照上述方法做 4 次平行实验,纳米 WO₃ 的添加量分别为 0.24 g, 0.30 g, 0.36 g 和 0.42 g,最后得到的 GO/WO₃/PANI 三元复合材料样品分别记作 GWP-1, GWP-2, GWP-3 和 GWP-4.在不加 GO 和 WO₃ 而其他条件不变的情况下,制备 PANI 作为对照.

工作电极的制备:将 10 mg GO/WO₃/PANI 三元复合材料样品加入到 1.25 mg 科琴黑和 400 μL 乙醇混合液中,超声 1 h,然后加入 20 μL 聚四氟乙烯 (PTFE) 乳液,超声 3 h 摇匀,用滴管吸涂在两个称量好的不锈钢网上面(正反两面都需要滴涂),置于真空干燥箱中,于 80 °C 干燥 4 h 之后压片,然后在 80 °C 下真空过夜干燥,称重,备用.

1.3 样品表征和电化学性能测试方法

采用 SEM 对样品的形貌进行表征,升高电压为 10 kV,放大倍数为 10 ~ 500 000.用 X-射线衍射仪对样品的组成进行测定:电压、电流、扫描范围和步长分别设置为 35 kV, 20 mA, 5° ~ 90°, 0.02°.用综合热重分析仪对样品的热稳定性进行测试:在 N₂ 气氛下,升温速率为 1 °C/min,测试范围为 5 ~ 700 °C.利用电化学工作站,采用三电极的方法(分别以饱和甘汞电极为参比电极, Pt 片电极为对电极,涂覆有活性物质的不锈钢网为工作电极,以 1 mol/L

H₂SO₄ 为电解质)进行电化学性能测试.循环伏安 (CV) 曲线测试条件:电位范围为 -0.6 ~ 0.8 V,扫描速率为 5 mV/s, 10 mV/s, 20 mV/s, 50 mV/s, 80 mV/s, 100 mV/s;恒电流充放电 (CP) 曲线测试条件:电位范围为 -0.5 ~ 0.8 V,电流密度为 5 A/g, 3 A/g, 1 A/g, 0.8 A/g, 0.5 A/g, 0.3 A/g, 0.2 A/g, 0.1 A/g;交流阻抗 (EIS) 曲线测试条件:初始电压为 0.53 V,增幅为 5 mV.

2 结果与讨论

2.1 样品的形貌分析

图 1 为样品的 SEM 图.由图 1a) 可以看出,利用水热合成法制备的 WO₃ 是由纳米片组成的花球状结构,这种结构有利于电化学过程中电解液和离子在样品中的传输;由图 1b) 可以看出,制备的 GO 为典型的二维平面结构;由图 1c) 可以看出,在未添加 GO 和纳米 WO₃ 的情况下,合成的 PANI 为典型的棒状结构;由图 1d) 可以看出,在含有 WO₃ 和 GO 的分散体系原位聚合得到的 GO / WO₃ / PANI 三元复合材料中,没有发现明显的棒状结构,这可能是由于 GO 和纳米 WO₃ 的加入改变了 PANI 的成核生长机理,纳米 WO₃ 被 GO 包裹,而 PANI 原位生成在 GO 和 WO₃ 的表面,使合成的 GO/WO₃/PANI 三元复合物形貌均一.

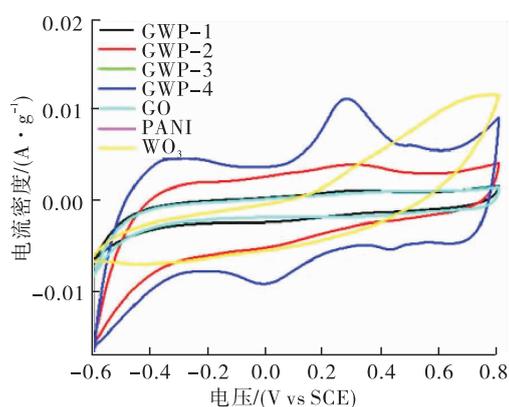
2.2 样品的组成分析

图 2 为样品的 XRD 谱图.由图 2 可以看出,采用水热合成法制备的球状纳米颗粒为 WO₃ (与 33-1387 标准卡一致),合成的 GO/WO₃/PANI 三元复合物的图谱中出现明显的 WO₃ 衍射峰,而 PANI 和 GO 的特征衍射峰较弱.这是由于 GO/WO₃/PANI 三元复合物中 WO₃ 的含量较高,而 PANI 和 GO 的含量较少所致;且 GO 是包裹在 WO₃ 的表面,而 PANI 是原位生长在 GO 和 WO₃ 的表面,所以材料的复合不影响 WO₃ 的晶体结构.

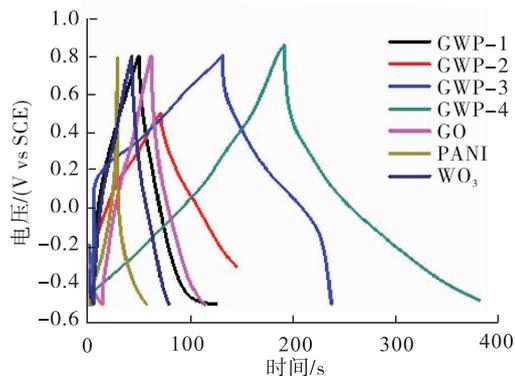
环面积较小,没有氧化还原峰,为典型的双电层电容. GO/WO₃/PANI 三元复合材料在 0.2 ~ 0.4 V 之间有一个氧化还原峰,随着复合材料中 WO₃ 含量的增大,氧化峰愈加明显,材料表现出一定的赝电容特征,且在相同的扫描速率下复合材料的 CV 曲线面积大于纯 GO, PANI 和 WO₃. GWP-4 的 CV 曲线面积最大,说明其电化学性能最好,适合用作超级电容器的电极材料,也说明三元材料的复合提高了材料的综合电化学性能. 由图 4b) 可以看出, CV 曲线偏离矩形,扫描过程中都有一对较弱的氧化还原峰,说明 GO/WO₃/PANI 复合材料在充放电过程中发生了可逆的氧化还原反应,产生了与双电层电容不同的赝电容,随着扫描速率的增大,峰电流增大,氧化峰和还原峰的位置发生明显偏移,这主要是由电极内阻和电子在电极中的

扩散速率降低引起的. 在该三元复合材料中, PANI 原位生长在 WO₃ 和 GO 表面上, GO/PANI 的导电性良好,使得纳米 WO₃ 在不同氧化态之间发生可逆氧化还原反应,产生了一定的赝电容,此外, PANI 涂层中极性氮基团的存在增强了电荷和电解质在充电-放电过程中的润湿性,纳米 WO₃ 和氮基团的存在还会引发高度赝电容反应^[21]. 由图 4c) 可以看出, GWP-4 样品的放电时间最长,即该样品具有最大的比电容. 由图 4d) 可以看出,随着充放电电流的增大, GWP-4 样品的放电时间缩短,比电容减小,在充放电电流为 0.2 A/g 时,其比电容最大,为 107 F/g.

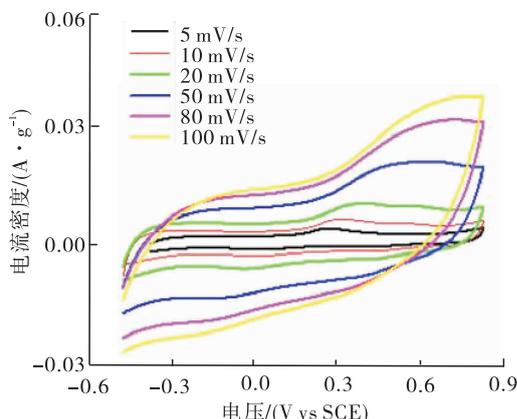
图 5 为样品的交流阻抗谱图. 由图 5 可以看出,纯纳米 WO₃ 的电阻比较大,纯 PANI 和 GO 的电阻较小,通过三元复合得到的 GWP-4



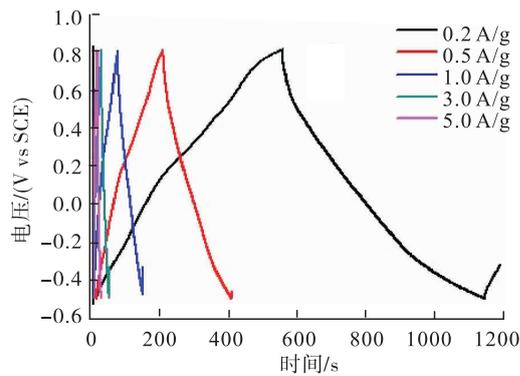
在扫描速率为 20 mV/s 条件下,不同样品的 CV 曲线



不同样品的 CP 曲线



GWP-4 样品在不同扫描速率下的 CV 曲线



GWP-4 样品在不同电流密度下的 CP 曲线

图 4 样品的电化学性能测试曲线

Fig. 4 Electrochemical performance test curves of the samples

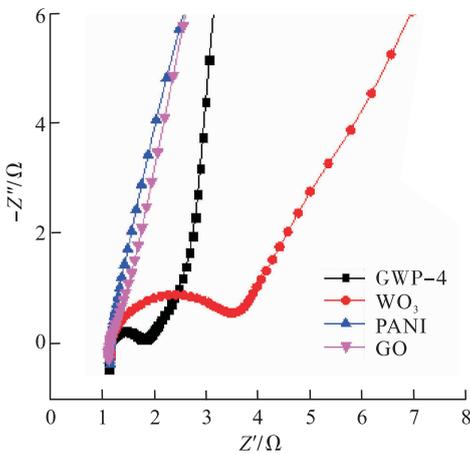


图5 样品的 EIS 曲线

Fig. 5 EIS curves of the samples

样品的电阻为 1.1Ω 。在中频区, GWP-4 样品的交流阻抗曲线呈 45° , 这是离子向电极中快速扩散的表现; 在低频区, 其交流阻抗曲线接近一条直线, 表现出纯电容性质, 说明 GWP-4 样品有较好的电容行为^[22]。

3 结语

本文采用水热合成和原位聚合法合成了 GO/ WO_3 /PANI 三元复合材料, 并研究了该类材料的电化学性能。结果表明, 三元材料的复合可以提高材料的综合电化学性能, 在 20 mV/s 的扫描速率下, 纳米 WO_3 的添加量为 0.42 g 时, 三元复合材料样品 GWP-4 的电化学性能最好; 在充放电电流为 0.2 A/g 时, 其比电容最大, 为 107 F/g 。该类材料作为超级电容器电极材料有较好的应用前景, 但还需对其结构进行优化从而进一步提高其综合电化学性能。

参考文献:

[1] XUE Q, SUN J, HUANG Y, et al. Recent progress on flexible and wearable supercapacitors [J]. *Small*, 2017, 13(45): 1701827.
 [2] YU Z, TETARD L, ZHAI L, et al. Supercapacitor electrode materials: nanostructures from 0 to

3 dimensions [J]. *Energy & Environmental Science*, 2015, 8(3): 702.

- [3] HUANG Y, LI H, WANG Z, et al. Nanostructured polypyrrole as a flexible electrode material of supercapacitor [J]. *Nano Energy*, 2016, 22: 422.
 [4] IQBAL N, WANG X, BABAR A A, et al. Polyaniline enriched flexible carbon nanofibers with core-shell structure for high-performance wearable supercapacitors [J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2017, 4(24): 1700855.
 [5] LIU L, YU Y, YAN C, et al. Wearable energy-dense and power-dense supercapacitor yarns enabled by scalable graphene-metallic textile composite electrodes [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7260.
 [6] GUAN B Y, KUSHIMA A, YU L, et al. Coordination polymers derived general synthesis of multishelled mixed metal-oxide particles for hybrid supercapacitors [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(17): 1605902.
 [7] ZHANG X, LUO J, TANG P, et al. A universal strategy for metal oxide anchored and binder-free carbon matrix electrode: A supercapacitor case with superior rate performance and high mass loading [J]. *Nano Energy*, 2017, 31: 311.
 [8] HUANG H, WANG X, TERVOORT E, et al. Nano-sized structurally disordered metal oxide composite aerogels as high-power anodes in hybrid supercapacitors [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(3): 2753.
 [9] HARILAL M, VIDYADHARAN B, MISONI I I. One-dimensional assembly of conductive and capacitive metal oxide electrodes for high-performance asymmetric supercapacitors [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(12): 10730.
 [10] MOUSAVI M F, HASHEMI M, RAHMANIFAR

- M S, et al. Synergistic effect between redox additive electrolyte and PANI-rGO nanocomposite electrode for high energy and high power supercapacitor [J]. *Electrochimica Acta*, 2017, 228 :290.
- [11] LUO Z, ZHU Y, LIU E, et al. Synthesis of polyaniline/SnO₂ nanocomposite and its improved electrochemical performance [J]. *Materials Research Bulletin*, 2014, 60 :105.
- [12] WANG K, WU H, MENG Y, et al. Conducting polymer nanowire arrays for high performance supercapacitors [J]. *Small*, 2014, 10 (1) :14.
- [13] LI Z F, ZHANG H, LIU Q, et al. Fabrication of high-surface-area graphene/polyaniline nanocomposites and their application in supercapacitors [J]. *Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5 (7) :2685.
- [14] XU Y, LIN Z, HUANG X, et al. Functionalized graphene hydrogel-based high-performance supercapacitors [J]. *Advanced Materials*, 2013, 25 (40) :5779.
- [15] ZHANG Z, XIAO F, WANG S. Hierarchically structured MnO₂/graphene/carbon fiber and porous graphene hydrogel wrapped copper wire for fiber-based flexible all-solid-state asymmetric supercapacitors [J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2015, 3 (21) :11215.
- [16] RACCICHINI R, VARZI A, PASSERINI S, et al. The role of graphene for electrochemical energy storage [J]. *Nature Materials*, 2015, 14 (3) :271.
- [17] JIANG Q, KURRA N, ALHABEB M, et al. All pseudocapacitive mxene-RuO₂ asymmetric supercapacitors [J]. *Advanced Energy*, 2018, 8 (13) :1703043.
- [18] ZHANG Y, PARK S J. Incorporation of RuO₂ into charcoal-derived carbon with controllable microporosity by CO₂ activation for high-performance supercapacitor [J]. *Carbon*, 2017, 122 :287.
- [19] CHU J, LU D, WANG X, et al. WO₃ nanoflower coated with graphene nanosheet: synergetic energy storage composite electrode for supercapacitor application [J]. *Journal of Alloys and Compounds*, 2017, 702 (25) :568.
- [20] HUMMERS W, OFFEMAN R. Preparation of graphitic oxide [J]. *Am Chem Soc*, 1958, 80 (6) :1339.
- [21] SHARMA R K, RASTOGI A C, Desu S B. Manganese oxide embedded polypyrrole nanocomposites for electrochemical supercapacitor [J]. *Electrochimica Acta*, 2008, 53 (26) :7690.
- [22] TAN Y T, RAN F, WANG L R, et al. Synthesis and electrochemical performance of polyaniline nanoparticles [J]. *Journal of Functional Polymers*, 2012, 72 (1) :7.



引用格式:刘瑞雪,周腾,樊晓敏,等.明胶基复合水凝胶研究进展[J].轻工学报,2018,33(6):42-54.

中图分类号:TQ431.3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.006

文章编号:2096-1553(2018)06-0042-13

明胶基复合水凝胶研究进展

Research progress in gelatin-based composite hydrogel

刘瑞雪,周腾,樊晓敏,李云秋,冯皓泽

LIU Ruixue, ZHOU Teng, FAN Xiaomin, LI Yunqiu, FENG Haoze

郑州轻工业学院 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001

College of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

明胶基复合水凝胶;
交联改性;互穿网络;
双网络;纳米复合

Key words:

gelation-based
composite hydrogel;
cross-linking
modification;
interpenetrating
network;
double network;
nanocomposite

摘要:从明胶的交联改性、与其他高分子共混(包括互穿网络及双网络)和与纳米材料复合三方面对国内外关于明胶基复合水凝胶的力学性能增强与功能化的研究现状进行了综述,指出,相较于物理交联改性,明胶的化学交联改性应用更为广泛,但过多的化学交联剂用量会产生一定的毒性;互穿网络能够结合明胶与其他聚合物网络的性质,而双网络的拓扑结构能够极大地提升明胶基复合水凝胶的力学性能;将不同纳米粒子或具有特殊功能的纳米粒子引入明胶体系中能避免传统化学交联剂产生的毒性,获得具有高拉伸强度的功能化明胶基纳米复合水凝胶。进一步优化设计合成具有与生物组织相适宜的力学强度、生物相容性和组织粘附性的明胶基水凝胶材料,以提高其在复杂环境中的机械性能和刺激响应性能,将会是未来的研究方向。

收稿日期:2017-08-23;修回日期:2018-01-12

基金项目:国家自然科学基金项目(21474092);河南省留学归国人员择优资助项目;郑州轻工业学院博士基金项目

作者简介:刘瑞雪(1971—),女,河南省范县人,郑州轻工业学院副教授,博士,主要研究方向为高分子水凝胶、功能高分子材料。

Abstract: The research status of the improvement of the mechanical properties and the functionalization of gelatin-based hydrogels from the cross-linking modification of gelatin, blending with other polymers (including interpenetrating network and dual network), and recombination with nanomaterials was reviewed. It was pointed out that the chemical cross-linking modification of gelatin was more widely used than physical cross-linking modification, but the excessive amount of chemical cross-linking agent would produce certain toxicity; the interpenetrating network could combine gelatin with other polymer networks. The nature of the dual network topology could greatly improve the mechanical properties of gelatin-based composite hydrogels; the introduction of different nanoparticles or nanoparticles with special functions into the gelatin system could avoid the toxicity of traditional chemical crosslinkers. Functionalized gelatin based nanocomposite hydrogel with high tensile strength was obtained. Further optimization and design of gelatin-based hydrogel materials with mechanical strength, biocompatibility and tissue adhesion suitable for biological tissues to improve their mechanical properties and stimuli in complex environments will be the future research direction.

0 引言

明胶是通过胶原蛋白水解获得的一类变性蛋白质^[1],在生理环境中具有良好的生物学性能,常被用于生物医学领域.其一,明胶具有很高的生物相容性和生物降解性.其二,作为一种变性蛋白质,相较于胶原蛋白,明胶具有更低的抗原性^[2].其三,明胶分子链中含有丰富的基因序列,例如调节细胞粘附的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)基因序列,将明胶与一些不含有细胞识别位点的聚合物复合,能提升其细胞粘附性能^[3].除此之外,明胶分子结构中还含有大量的活性官能团,这使明胶在一定浓度和温度下能够通过分子间氢键相互作用形成凝胶,并且十分容易通过改性、交联、复合等方式形成不同类型的水凝胶.水凝胶是一类特殊的软湿材料,因其与天然细胞外基质的相似性而成为生物医用材料的研究热点.

以天然高分子为基体合成的水凝胶能极大地避免人工合成高分子水凝胶的生理毒性.然而与大部分水凝胶类似,明胶基水凝胶存在力学性能弱、分子结构复杂、可控性较差的缺陷.近年来,研究者尝试通过物理改性、化学改性,以形成互穿网络结构、双网络结构和纳米复合等方式,来提升明胶基水凝胶的力学性能.本文拟对以上研究的进展情况进行梳理,并就明胶

基复合水凝胶研究中的一些问题进行评述,为高强度功能化明胶基水凝胶材料的开发提供理论基础和方向参考.

1 交联改性明胶基水凝胶

明胶的改性方法主要可以分为物理交联改性和化学交联改性.物理改性指通过辐射、等离子体、热处理等物理方法使明胶形成交联网络结构.化学改性指在明胶体系中添加一些化学交联剂,通过交联剂的桥接作用使明胶分子链形成交联结构或催化明胶分子链上的基团进行反应,形成自交联的结构.

1.1 物理交联改性

明胶分子链中存在大量的氢键,使得其自身在一定条件下可以通过物理交联形成凝胶,其传统物理改性主要为辐射交联,即通过高能射线的作用,使明胶分子链间以共价键形式连接起来,达到交联的效果.

R. Bhat等^[4]将明胶在紫外线下进行照射处理发现,经辐射处理的明胶黏度降低,熔化焓有明显的变化,凝胶强度有显著的改善.并且,在紫外光下处理不同的时间,凝胶强度相应地发生不同的改变:在紫外光下照射 30 min,凝胶强度可由之前的 177.8 g 增至 198.1 g;在紫外光下照射 60 min,凝胶强度可由之前的 177.8 g 增至 234.0 g.凝胶强度的增加可归因于辐射处

理引起的分子链交联。近年来,也有研究者利用等离子体对明胶进行交联改性。电纺明胶纳米纤维是一种有望用于软骨和肌腱修复的天然材料,尽管在水中具有高度溶解性,但难以进行化学交联,这极大地限制了其在软骨组织工程领域的应用。A. Liguori 等^[5]用等离子体直接处理固态的明胶纤维发现,通过等离子体处理可以诱导明胶形成交联结构,对明胶纳米纤维进行等离子体处理同样可以获得具有交联结构的明胶纳米纤维,且结构稳定性更好,在浸入水溶液之后仍然保留有良好的纤维形态。

1.2 化学交联改性

明胶的化学交联通常是使用一些具有双官能团或者多官能团的交联剂来达到交联的目的。常用作明胶化学交联剂的有京尼平、戊二醛、碳二亚胺盐酸盐和酶等。

M. A. D. Silva 等^[6]研究了戊二醛交联不同状态的明胶对凝胶强度的影响,通过对比戊二醛交联溶胶状态下的明胶和低温自身形成物理交联网络的固态明胶发现,固态明胶经化学交联后的剪切模量与明胶物理交联网络三股螺旋结构中的残基量密切相关。在低温状态下,明胶分子链中含有大量的缠结三股螺旋结构,形成物理交联网络。这种物理交联网络作为一种模板,能够提升明胶分子链间化学交联效率,促进分子间弹性活性键的形成,进而提升凝胶的剪切模量。当温度升高、明胶转化为溶胶状态时,这种物理网络模板被破坏,分子间化学交联效率降低,其剪切模量相应减小。研究结果表明,在物理交联状态下进行化学交联具有协同增益效果,在低温情况下混合交联制备的明胶水凝胶,其剪切模量比溶胶状态下交联制备的明胶水凝胶高出4~6倍。

M. M. Nadzir 等^[7]研究了京尼平交联剂对明胶水凝胶的孔径和核黄素释放行为的影响。研究发现,相较于未交联的明胶,京尼平用量为

0.1% (质量分数)时,凝胶的平均孔径由 $(3.86 \pm 1.02) \mu\text{m}$ 增加到 $(51.86 \pm 13.33) \mu\text{m}$,压缩强度得到提升,进一步增加京尼平用量至0.7% (质量分数),其压缩强度由7.31 N增加至47.65 N,但其平均孔径逐渐减小。通过研究该凝胶的溶胀和药物释放行为发现,京尼平用量为0.1% (质量分数)时形成的大孔洞结构有利于更多的核黄素分布在凝胶中。这种能够缓慢持续释放药物的凝胶有望应用于伤口敷料等医用领域。

P. L. Thi 等^[8]首先对明胶进行改性合成了苯酚共轭明胶 (phenol conjugated-gelatin polymer, GH polymer),在辣根过氧化物酶 (HRP) 的作用下,用 H_2O_2 对GH polymer进行交联,然后在体系中引入少量酪氨酸酶 (Tyr),将分子中的邻酚转化为具有高度活性的邻醌结构,极大地增强了凝胶与生物基质之间的粘附力,通过特殊的双酶交联方式形成了一种组织粘附性水凝胶。研究其粘附强度发现,在HRP单交联凝胶中引入少量的Tyr对凝胶的胶凝时间和机械强度影响不大,但是能显著提升凝胶的粘附强度。相较于市售的纤维蛋白胶和HRP单酶交联的GH/HRP凝胶,GH/HRP/Tyr双酶交联水凝胶的组织粘附强度(34 kPa)是前两者的2~5倍。

相较于物理交联改性,明胶的化学交联改性应用更为广泛,这是因为物理交联改性难以产生均匀稳定的交联结构。但过多化学交联剂用量又会不可避免地产生一定的毒性,因此寻求更有效且低毒性的明胶化学交联改性方式是未来的研究热点。

2 明胶基互穿网络水凝胶

互穿网络 (IPN) 结构是两种或两种以上聚合物共混而成的“合金”,其分子链相互贯穿,不同聚合物链之间不存在共价键作用,并且至少一种聚合物分子链以化学键的方式交

联^[9-11]. 传统的单网络水凝胶具有力学性能较弱和溶胀行为响应缓慢等缺点,通过构筑多组分的互穿网络结构可以增强明胶基水凝胶的力学性能、加快溶胀/消溶胀响应速率.

2.1 明胶与其他天然高分子形成的互穿结构水凝胶

明胶作为一种含有大量亲水性基团的天然高分子,易与其他高分子形成 IPN 结构. 大量的天然高分子及其衍生物与一些含有羧基、羟基、酰胺基团、磺酸基等的亲水性合成高分子已被用于合成 IPN 水凝胶^[12].

C. Shen 等^[13]以聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA)交联的羧基甜菜碱(PCBMA)作为第一网络,京尼平交联的明胶作为第二网络,通过“一锅法”合成了由明胶和羧基甜菜碱(CBMA)组成的 IPN 水凝胶. 相较于单网络的明胶基水凝胶和 PCBMA 凝胶,IPN 水凝胶的机械性能有了显著的提升,其压缩和拉伸断裂应力达到 6.5 MPa 和 2.4 MPa(为单网络凝胶的 4~20 倍),破坏应变分别超过 95% 和 700%. 由于明胶具有优秀的细胞粘附性,合成的 IPN 水凝胶有利于哺乳动物细胞的附着和增殖,同时由于抗结块性能 CBMA 的存在,能够减少血小板和微生物的附着. 通过调节明胶与 CBMA 的比例可以得到一系列机械性能不同的 IPN 水凝胶.

J. Wang 等^[14]通过化学交联明胶和羟丙基纤维素(HPC)合成了一种 IPN 水凝胶,该水凝

胶显示出典型的多孔结构,孔径随着 HPC 含量的增加而减少. 并且由于两种天然高分子网络之间的缠结和互穿,IPN 水凝胶表现出优异的机械强度和透光率,其最大拉伸强度和撕裂强度分别达到 3.1 MPa 和 5.2 MPa. 通过细胞毒性测试和药物负载能力评估发现,该 IPN 水凝胶对于成纤维细胞无毒性,并且具有良好的药物负载能力和体外释放行为.

明胶和壳聚糖是生物医用领域的两种热门材料,Z. S. Shen 等^[15]采用原位沉淀法制备了一种具有良好机械强度和生物学性能的明胶/壳聚糖水凝胶(见图 1). 通过调节各组分比例,该水凝胶具有可控的孔隙率和良好的生物可降解性. 经优化后,压缩测试结果显示其杨氏模量能达到 3.25 MPa,杨氏模量达到 2.15 MPa,力学性能与人类软骨相似. 循环压缩测试下其具有明显的滞回曲线,压缩韧性约为 $75.8 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$. 体内降解实验结果表明,其在 70 d 内降解度达到 65.9%. 除此之外,体外细胞培植实验结果表明,该水凝胶有利于软骨细胞的粘附与增殖. 作为一种纯天然高分子复合的可降解高强度水凝胶,其在软骨组织工程领域有潜在的应用价值.

Z. Yu 等^[16]首先用 L-半胱氨酸乙酯盐酸盐(Cys)和甲基丙烯酸酐(AMA)修饰透明质酸(HA),合成透明质酸的衍生物 HA-Cys-AMA. 利用其与明胶间的交联反应合成了一种

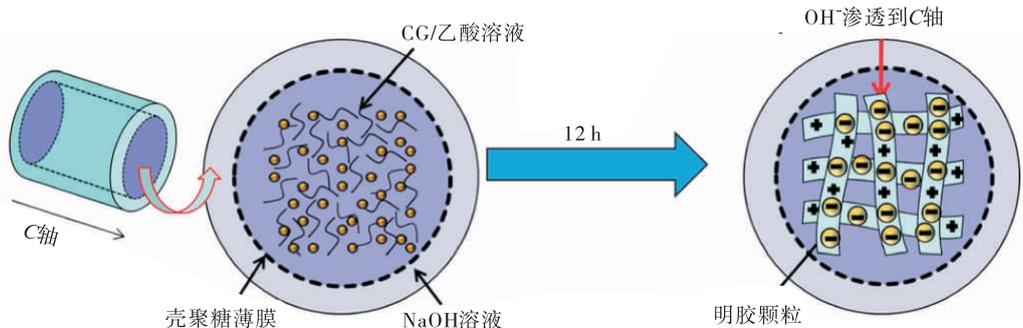


图 1 原位沉淀法形成壳聚糖-明胶凝胶过程的示意图^[15]

Fig. 1 Schematic representation of formation process of chitosan-gelatin gel with in situ precipitation method^[15]

HA-Cys-AMA/明胶水凝胶. 力学性能测试结果表明,单纯的 HA-Cys-AMA/明胶水凝胶机械性能很弱,在该水凝胶中引入软而韧的聚丙烯酰胺(PAAm)形成互穿网络,其力学性能得到很大提升,其压缩强度提升5倍,弹性模量和黏性模量都提高两个数量级.此外,互穿网络水凝胶的微观孔洞更加规则,孔径更小,具有典型的开放三维网络结构.

A. Pettignano 等^[17]通过构建明胶与氧化海藻酸钠的动态共价键,合成了一种自修复生物水凝胶(见图2).对该水凝胶在自愈合过程中的关键影响参数进行研究发现,pH值对受损水凝胶界面的重构具有重要影响:在pH值为1.36的HCl溶液中浸泡后,该水凝胶失去了自修复能力,而在pH值为13的NaOH溶液中浸泡后,该水凝胶仍具有自修复能力,这证实了明胶与氧化海藻酸钠间的席夫碱键对凝胶的自愈合过程有着促进作用.通过优化两者之间的浓度和配比,能够实现最优的自愈合特性.

2.2 明胶与合成高分子形成的互穿结构水凝胶

相较于天然高分子结构的不可控性,合成高分子具有可设计的特定官能团结构,将明胶与具有特定功能的合成高分子共混,能获得不同结构的明胶基复合水凝胶. Y. Gan 等^[18]以葡聚糖和明胶为主要网络,聚乙二醇为次要网络,合成了一种可用于髓核再生的IPN增韧水凝胶.通过调整二级网络与一级网络之间的质量比并进行力学性能、细胞相容性等方面的生物学性能测试来优化水凝胶的制备条件,得到了性能良好的水凝胶.当二级网络与一级网络之间的质量比为1:4时,该水凝胶压缩应变变量达到86%,呈现较高的力学性能.在小鼠体内研究的结果表明,该水凝胶有利于髓核细胞增殖与再生.

值得一提的是,IPN结构虽然能够改善凝胶的机械性能,但常会导致凝胶内部形成密集的孔洞结构,从而限制凝胶内细胞与细胞之间

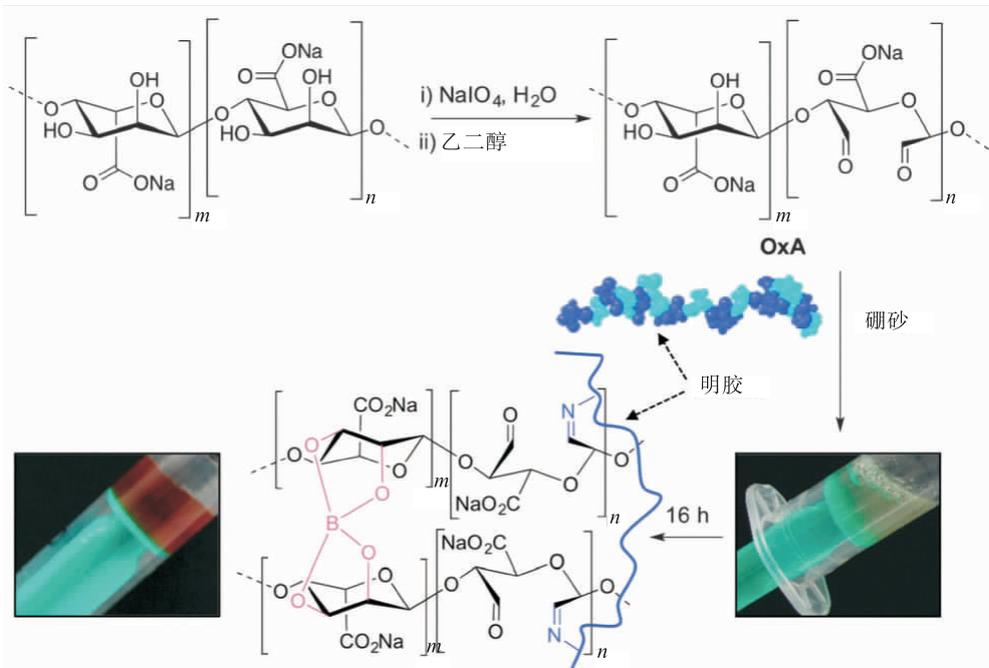


图2 明胶与氧化海藻酸钠在硼砂的存在下通过席夫碱键交联示意图^[17]

Fig.2 Schematic diagram of gelatin and oxidized sodium alginate crosslinked by Schiff base in the presence of borax^[17]

的相互作用、组织形成和营养交换. 因此,在维持 IPN 水凝胶力学性能的同时提高细胞在凝胶介质中的相互作用是一大难点. J. Zhang 等^[19]利用明胶和聚乙二醇合成了一种具有大孔洞结构的 IPN 水凝胶(见图 3),不同于传统的 IPN 水凝胶,该水凝胶有着孔径约为 80 μm 的独特大孔洞结构. 研究表明,当 IPN 水凝胶中的明胶含量较低(质量浓度为 1% ~ 2.5%)时,网络中无法形成大孔洞结构;当明胶含量继续提升(质量浓度为 5% ~ 10%)时,IPN 水凝胶中出现了独特的大孔洞结构. IPN 结构能够提升水凝胶的力学性能,而大孔洞结构能够明显促进细胞间相互作用和细胞增殖,因此该类水凝胶有望在软骨组织工程领域得到应用.

T. Miao 等^[20]使用 theta-gel 法制备了一种聚乙烯醇(PVA)/明胶(Gelatin) IPN 水凝胶. 致孔剂聚乙二醇(PEG)的存在,诱导明胶与聚乙烯醇分子链相互作用,获得一种具有大孔结构的 theta 凝胶,通过与 PVA, PVA-PEG 和不加入致孔剂的 PVA-明胶水凝胶进行对比发现,在致孔剂 PEG 的作用下, PVA/明胶水凝胶中 PVA 的结晶度更低,其剪切模量与弹性模量均

有所提升. 该水凝胶孔径较大(10 ~ 50 mm),具有较好的压缩弹性模量(20 ~ 400 kPa),在软骨再生支架领域有良好的应用前景.

聚乙烯多胺(PPA)的化学结构中存在大量的氨基,是形成氢键的良好供体,但是由于其不溶于水且与其他合成高分子间相互作用较弱,故很少应用于水凝胶的制备. Z. Zhang 等^[21]将 PPA 和明胶混合制备了一种具有多功能刺激响应性的明胶/PPA 水凝胶,研究表明,明胶与 PPA 之间形成的大量非共价键是水凝胶多功能刺激响应能力的来源,且凝胶的储能模量可以通过控制明胶的质量浓度和分子量来调控. 相较于纯明胶,明胶/PPA 复合水凝胶具有更好的机械性能和多功能响应性,在智能材料领域有很大的应用潜力.

3 明胶基双网络水凝胶

双网络(Double network, DN)水凝胶具有由两种不同性质的聚合物形成的互穿网络,第一层为紧密交联的刚而脆的聚电解质网络,第二层为松散交联的软而韧的中性网络,该类水凝胶具有极高的机械强度和韧性,甚至可以与

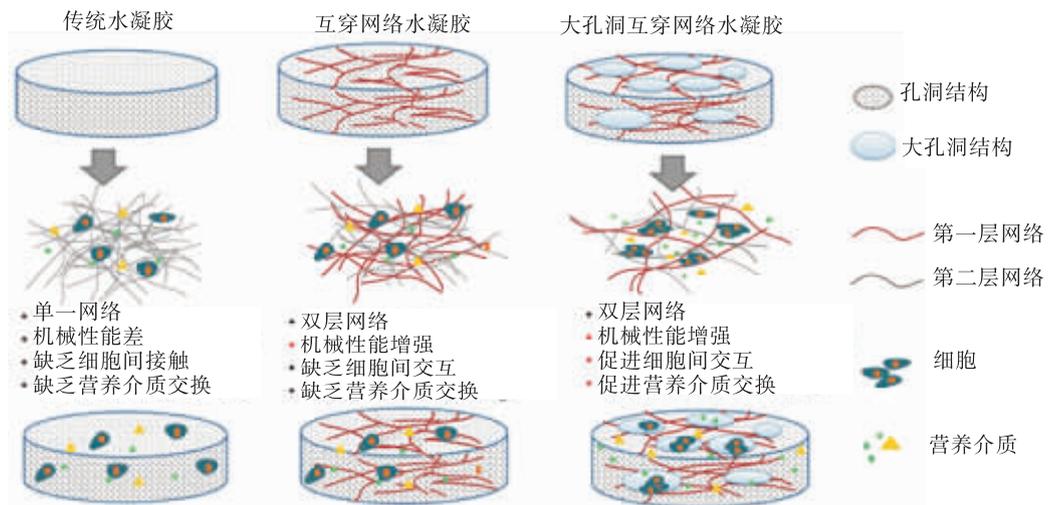


图 3 大孔 IPN 水凝胶与 SN (Single network) 水凝胶和传统 IPN 水凝胶对比示意图^[19]

Fig. 3 Schematic representation showing characterization of macroporous IPN hydrogels and SN (Single network) compared with traditional IPN hydrogels^[19]

橡胶相媲美. 其中,刚而脆的聚电解质网络起到了分散外界应力的作用,为双网络水凝胶提供了“牺牲键”;软而韧的中性聚合物填补于刚性网络中,为双网络水凝胶提供了支架,有助于保持水凝胶的外形^[22]. 双网络水凝胶一般是通过两步自由基聚合法^[23]制备的,首先合成紧密交联的第一层聚电解质网络,然后将形成的第一网络水凝胶浸泡在高浓度中性单体溶液中,使第一网络中充斥大量的中性单体和少量交联剂,随后聚合形成松散交联的第二网络.

J. Hou 等^[24]将明胶作为第一网络,将大分子微球(MMs)稳定的丙烯酰胺和甲基丙烯酸十六酯共聚物作为第二网络,合成了一种大分子微球增强双网络(DN-MMs)水凝胶. MMs作为疏水缔合中心,能够防止双网络凝胶裂缝的进一步发展. 此外,动态交疏水链段的解缠可以有效地分散能量并提高水凝胶的机械性能. 结果显示,DN-MMs水凝胶表现出优异的机械性能,其断裂应力达到1.48 MPa,断裂应变高达2100%.

X. Yan 等^[25]采用“一锅法”,以明胶作为第

一网络,共价键交联的 PAAm 作为第二网络,设计合成了一种高强度和具有自修复特性的 DN 水凝胶——明胶/PAAm 水凝胶(见图4). 经过各组分优化后,明胶/PAAm 水凝胶表现出较高的机械性能($E = 84 \text{ kPa}$, $\sigma_f = 0.268 \text{ MPa}$, $\epsilon_f = 40.69 \text{ mm} \cdot \text{mm}^{-1}$, $W = 6.01 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-3}$)和良好的自修复效率(室温下87%的韧性修复),即使在第二网络中不加入任何交联剂,明胶与 PAAm 形成的复合水凝胶也具有很高的机械性能和自修复能力. 他们认为明胶/PAAm DN 水凝胶的能量耗散归因于在承受外力时明胶物理网络的破裂,并且明胶具有可逆的溶胶凝胶转变能力,使得 DN 水凝胶具有快速的自修复能力. 而在第二网络中未添加交联剂也能获得较强机械性能的水凝胶,则是由于明胶分子基团上带有大量的羧基、氨基等活性基团,当引发 PAAm 聚合时,明胶与 PAAm 分子链发生了接枝反应,因此该类水凝胶也表现出优异的拉伸性能.

需要强调的是,虽然 DN 水凝胶与 IPN 水凝胶的合成过程有些类似,但是两者概念完全

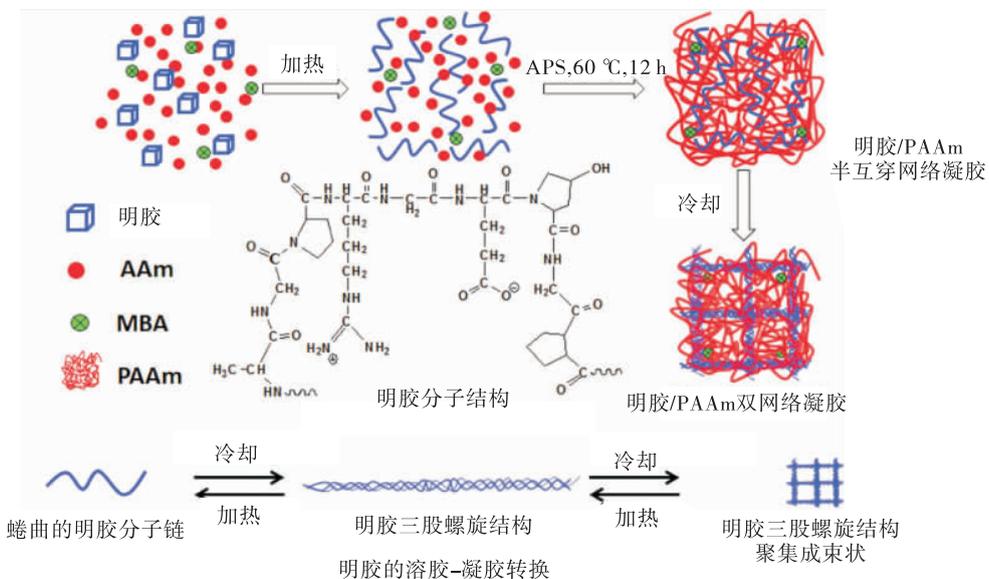


图4 “一锅法”合成明胶/PAAm 双网络水凝胶示意图^[25]

Fig. 4 Schematic representation of formation process of gelatin/PAAm

DN hydrogel with “one pot” method^[25]

不同^[23]. IPN 结构通常是用来组合不同材料间的各种性质,例如细胞粘附、吸水性、生物相容性和生物可降解性等^[26]. 而 DN 水凝胶通过结合两层不同性质网络的模式充分发挥“1 + 1 > 2”的能量耗散效果,使水凝胶的力学性能得到很大提升.

4 明胶基纳米复合水凝胶

纳米材料(粒径 1 ~ 100 nm)独特的尺寸效应和界面效应,使其在电子学、光学、机械学、生物学等领域展现出巨大的潜力. 纳米复合水凝胶是将纳米尺寸的颗粒分散在水凝胶中形成的复合材料,它不仅保持了纳米材料本身的功能性质,还将纳米材料的刚性、尺寸稳定性和热稳定性与水凝胶的软湿性能相融合,从而明显改善水凝胶的机械性能和热稳定性^[27-29]. 在水凝胶中可以复合各种纳米颗粒,例如碳基、陶瓷、聚合物、金属纳米颗粒等,以获得具有优异机械性能和特殊功能的纳米复合水凝胶^[30].

4.1 颗粒状纳米复合水凝胶

4.1.1 黏土复合水凝胶 2002 年, K. Haraguchi 等^[28]首次将黏土纳米颗粒掺杂进聚合物基质中合成纳米复合水凝胶,该类水凝胶是通过在黏土颗粒表面进行高产率的原位自由基聚合制备的,其中纳米黏土颗粒充当多功能的物理交联剂,聚合物链通过离子或极性作用连接在其表面,形成独特的有机/无机纳米复合结构,所获得的水凝胶一般具有高透明度和优良的拉伸强度.

C. Li 等^[31]在传统的 PAAm/Laponite 纳米复合水凝胶中引入明胶分子链,用 Laponite 纳米黏土粒子充当多功能交联剂,利用明胶与 Laponite 之间的氢键作用将明胶分子链和丙烯酰胺(AAm)吸附在 Laponite 粒子表面,通过 AAm 在纳米粒子上的原位聚合与明胶分子链形成复合网络,合成了明胶/PAAm/Laponite 纳

米复合水凝胶. 他们研究了明胶对传统纳米复合水凝胶的理化性质和血液相容性的影响,结果表明,随着明胶的加入,纳米复合水凝胶仍然保持着高透明度和良好的力学性能,这说明明胶分子在纳米复合材料体系中具有良好的分散性,并且随着明胶含量的增加,纳米复合水凝胶显示出良好的抗溶血和抗凝血能力.

4.1.2 羟基磷灰石复合水凝胶 羟基磷灰石(HAp)是天然骨基质的主要无机成分,具有优异的生物相容性、生物活性和骨传导性. 作为一种纳米增强填料, HAp 已被广泛应用于水凝胶体系的增强,引入 HAp 的水凝胶支架材料,因其具有较高的机械性能而作为替代材料广泛应用于骨修复等软组织工程领域. J. Ran 等^[32]以明胶和细菌纤维素为原料合成双网络水凝胶,并在双网络结构中引入无机粒子 HAp 构筑多组分有机/无机双网络结构(见图 5). 扫描电镜结果表明, HAp 成功地被组装在 BC 网络中的结节处. 通过引入 HAp 粒子能够有效提高双网络水凝胶的稳定性,而具有良好柔性的明胶网络能够分散网络结构中结节处的压力. 获得的有机/无机杂化双网络水凝胶具有很高的机械强度,其弹性模量和断裂应力分别达到 0.27 MPa 和 0.28 MPa. 失水后的干态凝胶表现出更高的机械强度,其杨氏模量和断裂应力分别达到 177 MPa 和 12.95 MPa. 体外细胞培养实验也表明这种凝胶具有良好的细胞粘附性,能够促进细胞增殖和分化.

4.1.3 纳米金属颗粒复合水凝胶 无机纳米银颗粒和具有软弹性质的三维网络水凝胶组合可以赋予水凝胶更高的机械性能和一些独特的性质^[33-36],例如纳米银复合水凝胶可以用于磁导向药物递送系统和改进电控组织生长等. C. Garcíastrain 等^[33]用咪喃改性的明胶和硫酸软骨素(CS)修饰的纳米银颗粒(Ag Nps)制备了一种纳米复合生物水凝胶(见图 6). 其中

Ag NPs 作为多功能交联剂,通过呋喃改性的明胶和苯并三唑马来酰亚胺封端的 Ag Nps 发生 Diels-Alder 环加成反应构建纳米复合水凝胶的交联网络.在明胶网络中引入纳米银颗粒能够提升其交联网络的稳定性,且具有较高的溶胀率,经体外细胞毒性测试,纳米银复合水凝胶具有低毒性的特点,这使得该类水凝胶有望在药物缓释和软组织工程等生

物医学领域得到应用.

4.2 平面状纳米复合水凝胶

4.2.1 石墨烯复合水凝胶

石墨烯是具有蜂窝结构的柔性单原子层碳片^[37],具有高电子迁移率、良好的机械性能和高比表面积,在光电子学、能量存储、催化、气体传感、超级电容器、热电器件、复合材料、软组织工程和药物输送等^[37-42]应用中得到了极大的关注.

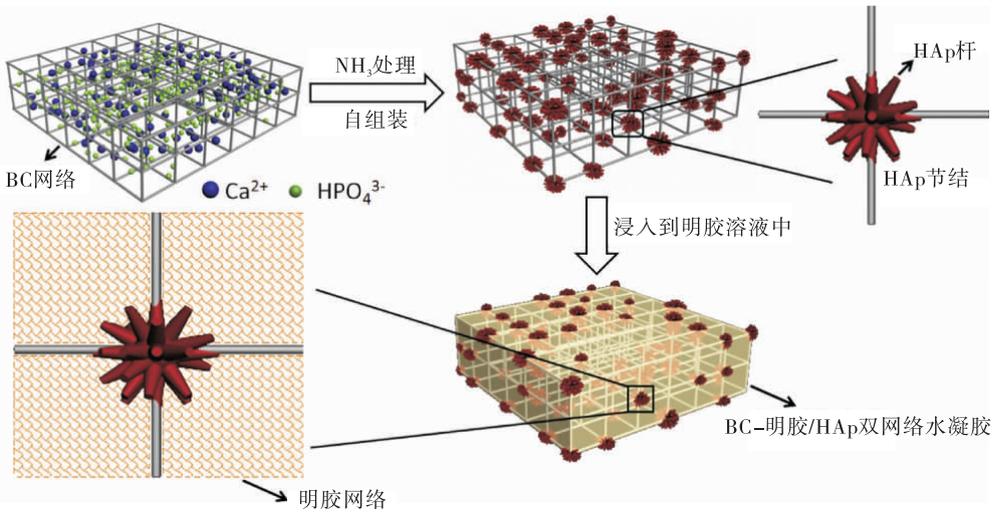


图5 HAp 自组装到 BC 网络和 BC - 明胶/HAp 双网络水凝胶的制备过程示意图^[32]

Fig. 5 Schematic diagrams of the self-assembly of HAp into the BC network and the preparation process of the BC-GEL/HAp DN hydrogel^[32]

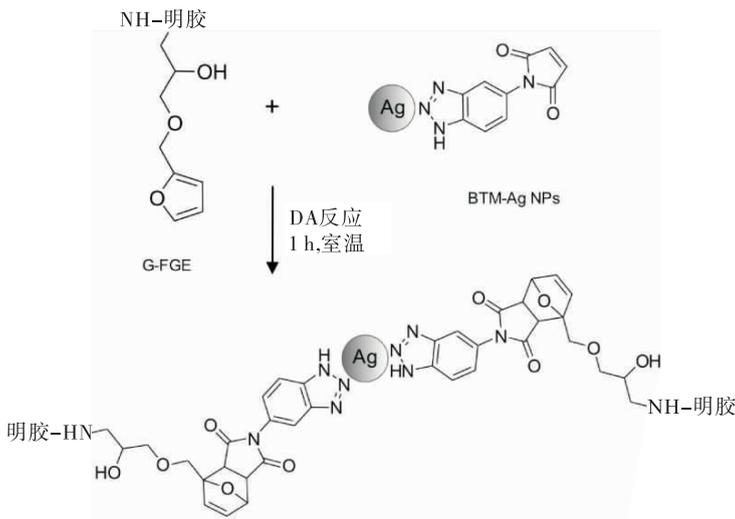


图6 基于 Diels-Alder 环加成的呋喃修饰明胶(G-FGE)和马来酰亚胺包覆银纳米粒子(BTM-Ag NPs)之间的交联示意图^[33]

Fig. 6 Schematic diagrams of Diels-Alder cycloaddition-based cross-linking between furan-modified gelatin (G-FGE) and maleimid-coated silver nanoparticles (BTM-Ag NPs)^[33]

J. Huang 等^[43]通过“一锅法”合成了以物理交联明胶和含有 GO 的交联聚丙烯酰胺 (PAM) 双网络形状记忆水凝胶. 经近红外光线照射后,该水凝胶具有显著的形状回复能力. 物理交联明胶网络中含有的三股螺旋结构具有可逆性,而 GO 能够快速有效地进行光热转换,两者的复合使得水凝胶具有良好的光响应能力. 并且双网络结构中特殊的“牺牲键”作用和 GO 的桥接作用使得明胶 - GO-PAM 水凝胶具有很高的韧性,其破坏应力和应变分别达到 400 kPa 和 500%. 通过优化各组分比例能够得到具有合适强度、稳定的临时形变和能够被近红外光线控制的快速回复形状记忆水凝胶. Y. Piao 等^[44]通过加热按一定比例混合的氧化石墨烯 (GO) 悬浮液和明胶溶液,制备了一种还原氧化石墨烯 - 明胶纳米复合水凝胶 (见图 7). 其中,明胶作为还原剂还原 GO 并且接枝在石墨烯片层上,明胶分子链与石墨烯片层一起构成纳米复合水凝胶. GO 也是作为一种多功能交联剂,充当明胶网络中的交联点来增加明胶网络的交联密度,从而提升纳米复合水凝胶的力学性能,其储能模量达到 172.3 kPa.

4.3 纤维状纳米复合水凝胶

4.3.1 几丁质纳米纤维复合水凝胶 几丁质是自然界除纤维素之外含量最丰富的天然多糖,机械强度较高,弹性模量可达到 2 GPa,极限拉伸强度可达到 140 MPa. 几丁质纳米纤维是一种直径约为 3 nm,具有自组装能力的纳米纤维. P. Hassanzadeh 等^[45]首先制备了甲基丙

烯酰化的明胶 (GelMA),然后将 GelMA 与几丁质纳米纤维混合,在紫外光照射条件下引发体系内 GelMA 发生交联,通过几丁质纳米纤维与明胶分子链之间的相互作用和几丁质的自组装行为,获得了具有超高强度、柔韧杂化的水凝胶. 在 GelMA 体系中引入几丁质纳米纤维能够显著提升水凝胶的储能模量,而相较于 GelMA 和几丁质纳米纤维的杂化体系,单纯的几丁质纳米纤维具有更高的弹性模量,但是其断裂伸长率较低. 作者认为凝胶的高弹性模量是由于 GelMA 与几丁质纳米纤维之间的物理缠结作用和几丁质纳米纤维在体系内自组装的结果. 通过调节 GelMA 和几丁质纳米纤维之间的比例, GelMA 水凝胶的弹性模量由 3.3 kPa 提升至 2.8 MPa (质量比 3 : 1),进一步提升了几丁质纳米纤维含量,水凝胶的强度也提升至 4.6 MPa (质量比 1 : 3). 相较于单纯几丁质纳米纤维, GelMA 在体系中充当了润滑剂的作用,通过减弱几丁质纳米纤维间的强氢键作用而提升水凝胶的柔韧度与断裂伸长率. 相较于纯几丁质纳米纤维和 GelMA 水凝胶,其断裂伸长率分别提升了 100% 和 200%.

4.3.2 纳米纤维素复合水凝胶 纳米纤维素 (TOCN) 是一种具有高横纵比、高比表面积和高结晶度的刚性纤维状纳米材料,在水凝胶中复合纳米纤维素通常能够增强其力学性能. L. Nan 等^[46]首先通过 TEMPO 氧化法制备了纳米纤维素,然后在明胶与 TOCNS 的混合悬浮液中进行丙烯酰胺 (AAm) 的原位聚合,获得了一种

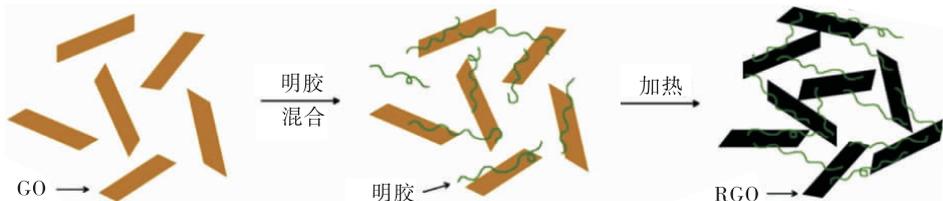


图 7 明胶与还原氧化石墨烯复合水凝胶制备示意图^[44]

Fig. 7 Schematic diagram of preparation of gelatin/RGO composite hydrogel^[44]

高强度形状记忆水凝胶. 这种复合凝胶包含两个交联网络,即化学交联的聚丙烯酰胺网络和物理交联的明胶网络,而引入的 TOCN 能够提升凝胶的机械性能. 通过优化凝胶组成成分能够获得具有快速响应形状记忆功能的高强度水凝胶,其中具有可逆性的明胶网络赋予了凝胶冷却条件下快速固定形状的能力(30 s 内)和热诱导形状恢复的能力(90 °C 下 5 s 内). 随着体系中 TOCN 含量的增加,凝胶的拉伸强度能够达到 240 kPa,最大应变达到 650%. 而随着明胶含量的增加,凝胶的弹性模量和拉伸强度能进一步提升,这表明明胶与 TOCN/PAAm 之间存在良好的相容性. 这种形状记忆型水凝胶在智能器件和组织工程领域都有着广泛的应用前景.

在明胶体系中引入纳米粒子充当多功能交联点,能够有效地避免因引入大量化学交联剂产生的毒性,明胶与纳米粒子间的非共价键作用,能够使水凝胶获得较高的拉伸强度和柔韧度,引入具有特殊功能的纳米粒子还能获得具有特殊功能化的明胶基纳米复合水凝胶材料.

5 结语

本文通过对明胶的交联改性、与其他高分子物质共混(包括互穿网络及双网络)、与纳米材料复合对明胶基水凝胶的力学性能增强与功能化的考察发现,相较于物理交联改性,明胶的化学交联改性应用更为广泛,但过多的化学交联剂用量会不可避免地产生一定的毒性;设计构筑明胶互穿网络能够结合明胶与其他聚合物网络的性质,而双网络的拓扑结构能够极大地提升明胶基复合水凝胶的力学性能;将不同纳米粒子或具有特殊功能的纳米粒子引入明胶体系中能避免传统化学交联剂产生的毒性,获得具有高拉伸强度的功能化明胶基纳米复合水凝胶.

由于明胶具备良好的溶胶-凝胶转变性质

和生物相容性,明胶基复合水凝胶在智能材料领域和软组织工程材料领域已经体现出良好的应用前景. 但以明胶为基体组合多种性质的水凝胶材料仍面临一些技术难题,例如当其用于生物智能材料时,无法在复杂环境中保持明胶基水凝胶材料的机械性能与刺激响应性能的长期稳定性;当其用于生物组织工程材料时,无法实现与复杂的软组织界面间的粘附等. 特别是目前对明胶基水凝胶材料生物组织粘附性的研究较少,因此在探索各种类型高强度功能化明胶基水凝胶材料的基础上,进一步优化设计合成具有与生物组织相适宜的力学强度、生物相容性和组织粘附性的明胶基水凝胶材料,将会是未来的研究方向.

参考文献:

- [1] YOUNG S, WONG M, TABATA Y, et al. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules [J]. *Journal of Controlled Release*, 2005, 109(1/3): 256.
- [2] ELZOGHBY A O, SAMY W M, ELGINDY N A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems [J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(1): 38.
- [3] WANG H, BOERMAN O C, SARIIBRAHIMOGU K, et al. Comparison of micro-vs. nanostructured colloidal gelatin gels for sustained delivery of osteogenic proteins: Bone morphogenetic protein-2 and alkaline phosphatase [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(33): 8695.
- [4] BHAT R, KARIM A A. Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113(4): 1160.
- [5] LIGUORI A, BIGI A, COLOMBO V, et al. Atmospheric pressure non-equilibrium plasma as a green tool to crosslink gelatin nanofibers [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38542.
- [6] SILVA M A D, KANG J, BUI T T T, et al. Tight-

- ening of gelatin chemically crosslinked networks assisted by physical gelation[J]. *Journal of Polymer Science B Polymer Physics*, 2017, 55(24):1850.
- [7] NADZIR M M, MUN L S, CHAN P J. Characterization of genipin-crosslinked gelatin hydrogel loaded with curcumin[J]. *Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2017, 12(9):2294.
- [8] THI P L, LEE Y, DAI H N, et al. In situ forming gelatin hydrogels by dual-enzymatic cross-linking for enhanced tissue adhesiveness[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 5(4):757.
- [9] MYUNG D, WATERS D, WISEMAN M, et al. Progress in the development of interpenetrating polymer network hydrogels [J]. *Polymers for Advanced Technologies*, 2008, 19(6):647.
- [10] SPERLING L H. Interpenetrating polymer networks and related materials [J]. *Chemistry & Properties of Crosslinked Polymers*, 1981, 12(1):141.
- [11] SPERLING L H, CHIU T W, HARTMAN C P, et al. Latex interpenetrating polymer networks [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1978, 17(2):149.
- [12] HOFFMAN A S. Hydrogels for biomedical applications[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64:18.
- [13] SHEN C, LI Y, WANG H, et al. Mechanically strong interpenetrating network hydrogels for differential cellular adhesion [J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(29):18046.
- [14] WANG J, WEI J. Interpenetrating network hydrogels with high strength and transparency for potential use as external dressings[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2017, 80:460.
- [15] SHEN Z S, CUI X, HOU R X, et al. Tough biodegradable chitosan-gelatin hydrogels via in situ precipitation for potential cartilage tissue engineering[J]. *Rsc Advances*, 2015, 5(69):55640.
- [16] YU Z, ZHANG Y, GAO Z J, et al. Enhancing mechanical strength of hydrogels via IPN structure[J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 134(8):44503.
- [17] PETTIGNANO A, HARING M, BERNARDI L, et al. Self-healing alginate-gelatin biohydrogels based on dynamic covalent chemistry: elucidation of key parameters [J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2017, 1(1):73.
- [18] GAN Y, LI P, WANG L, et al. An interpenetrating network-strengthened and toughened hydrogel that supports cell-based nucleus pulposus regeneration[J]. *Biomaterials*, 2017, 136:12.
- [19] ZHANG J, WANG J, ZHANG H, et al. Macroporous interpenetrating network of polyethylene glycol (PEG) and gelatin for cartilage regeneration[J]. *Biomed Mater*, 2016, 11(3):035014.
- [20] MIAO T, MILLER E J, MCKENZIE C, et al. Physically crosslinked polyvinyl alcohol and gelatin interpenetrating polymer network hydrogels for cartilage regeneration [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(48):9242.
- [21] ZHANG Z, LIU Y, CHEN X, et al. Multi-responsive polyethylene-polyamine/gelatin hydrogel induced by non-covalent interactions [J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(54):48661.
- [22] 王茹,王永鑫,陈重一. 不同体系的双网络水凝胶及其增强机理[J]. *材料导报*, 2015, 29(23):41.
- [23] GONG J P, KATSUYAMA Y, KUOKAWA T, et al. Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength[J]. *Advanced Materials*, 2003, 15(14):1155.
- [24] HOU J, REN X, GUAN S, et al. Rapidly recoverable, anti-fatigue, super-tough double-network hydrogels reinforced by macromolecular microspheres[J]. *Soft Matter*, 2017, 13(7):1357.
- [25] YAN X, CHEN Q, ZHU L, et al. High strength

- and self-healable gelatin/polyacrylamide double network hydrogels [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(37) : 7683.
- [26] SANTIN M, HUANG S J, IANNACE S, et al. Synthesis and characterization of a new interpenetrated poly (2-hydroxyethylmethacrylate) - gelatin composite polymer [J]. *Biomaterials*, 1996, 17(15) : 1459.
- [27] HARAGUCHI K, TAKADA T. Characteristic sliding frictional behavior on the surface of nanocomposite hydrogels consisting of organic-inorganic network structure [J]. *Macromolecular Chemistry & Physics*, 2005, 206(15) : 1530.
- [28] HARAGUCHI K, TORU TAKERHISA A, FAN S. Effects of clay content on the properties of nanocomposite hydrogels composed of poly (N-isopropylacrylamide) and clay [J]. *Macromolecules*, 2002, 35(27) : 10162.
- [29] HARAGUCHI K. Nanocomposite hydrogels [J]. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2007, 11(3) : 47.
- [30] GAHARWAR A K, PEPPAS N A, KHADEM-HOSSEINI A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(3) : 441.
- [31] LI C, MU C, LIN W, et al. Gelatin effects on the physicochemical and hemocompatible properties of gelatin/PAAm/Laponite nanocomposite hydrogels [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(33) : 18732.
- [32] RAN J, JIANG P, LIU S, et al. Constructing multi-component organic/inorganic composite bacterial cellulose-gelatin/hydroxyapatite double-network scaffold platform for stem cell-mediated bone tissue engineering [J]. *Materials Science and Engineering C*, 2017, 78 : 130.
- [33] GARCIAASTRAIN C, CHEN C, BURON M, et al. Biocompatible hydrogel nanocomposite with covalently embedded silver nanoparticles [J]. *Bio-macromolecules*, 2015, 16(4) : 1301.
- [34] BARBUCCI R, PASQUI D, GIANI G, et al. A novel strategy for engineering hydrogels with ferromagnetic nanoparticles as crosslinkers of the polymer chains. Potential applications as a targeted drug delivery system [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(12) : 5558.
- [35] DEMARCHI C A, DEBRASSI A, BUZZI F C, et al. A magnetic nanogel based on O-carboxymethylchitosan for antitumor drug delivery: synthesis, characterization and in vitro drug release [J]. *Soft Matter*, 2014, 10(19) : 3441.
- [36] GAHARWAR A K, PEPPAS N A, KHADEM-HOSSEINI A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2014, 111(3) : 441.
- [37] NOVOSELOV K S, GEIM A K, MOROZOV S V, et al. Materials and methods: electric field effect in atomically thin carbon films [J]. *Science*, 2004(306) : 666.
- [38] CHUNG C, KIM Y K, SHIN D, et al. Biomedical applications of graphene and graphene oxide [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2013, 46(10) : 2211.
- [39] COMPTON O C, CRANFORD S W, PUTZ K W, et al. Tuning the mechanical properties of graphene oxide paper and its associated polymer nanocomposites by controlling cooperative inter-sheet hydrogen bonding [J]. *Acs Nano*, 2012, 6(3) : 2008.
- [40] SOLDANO C, MAHMOOD A, DUJARDIN E. Production, properties and potential of graphene [J]. *Carbon*, 2010, 48(8) : 2127.
- [41] WEI P, BAO W, PU Y, et al. Anomalous thermoelectric transport of dirac particles in graphene [J]. *Physical Review Letters*, 2009, 102(16) : 166808.



引用格式:章银良,李鑫,蔡亚玲. 保健酒液有效成分提取与脱色工艺优化研究[J]. 轻工学报,2018,33(6):55-62.

中图分类号:TS261.4 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.007

文章编号:2096-1553(2018)06-0055-08

保健酒液有效成分提取与脱色工艺优化研究

Technique optimization of extraction of active ingredients and decoloring of health liquor

章银良,李鑫,蔡亚玲

ZHANG Yinliang, LI Xin, CAI Yaling

郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001

College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

关键词:

保健酒;索氏提取;
脱色;人参皂苷

Key words:

health liquor;
soxhlet extraction;
decolorization;
ginsenosides

摘要:以人参等6味中药为原料制备保健酒,采用索氏提取法提取其有效成分,并采用多种脱色剂对保健酒提取液进行脱色处理.以保健酒液中人参皂苷的质量浓度为提取指标,以保健酒液在560 nm下的吸光度为脱色指标,在单因素试验的基础上,采用均匀试验法优化提取和脱色工艺.结果表明:当反应温度为97℃,反应时间为2 h,液料比为610:1时,人参皂苷提取率最高,为67.63 mg/(100 mL);当脱色温度为35℃,脱色时间为20 min,液料比为5:1,脱色剂为活性炭粉末时,脱色效果最好,酒液色泽适宜,此时人参皂苷损失率仅为2.47%.

收稿日期:2018-07-31

基金项目:河南省科技攻关项目(182102110094)

作者简介:章银良(1963—),男,浙江省上虞市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为食品品质控制与食品化学.

Abstract: Health wine was prepared from six Chinese medicines, such as ginseng etc. The active ingredients were extracted by Soxhlet extraction and then decolorized by decolorants. The concentration of Ginsenoside and absorbance at 560 nm in health liquor were set as the extraction and decolorization index, respectively. The uniform test on the basis of single factor test was conducted to optimize the extraction and decolorization process. The results showed that the highest extraction rate of ginsenosides was 67.63 mg/(100 mL) when the reaction temperature was 97 °C, the reaction time was 2 h and the liquid-to-material ratio was 610 : 1. Moreover, when the decolorization temperature was 35 °C, the decolorization time was 20 min, the liquid-to-material ratio was 5 : 1 and the decolorizing agent was activated carbon powder, the decolorization effect was the best, and the liquor color was appropriate. Under this condition, the loss rate of glycosides was only 2.47%.

0 引言

保健酒是指具有调节人体生理功能、适宜特定人群饮用、不以治疗疾病为目标的酒类产品。保健酒必须同时具备4种属性,即营养性、安全性、嗜好性和功能性(具有特定的功能)。参类保健酒是以人参等为原料,经过提取、脱色、过滤、调配、冷藏等工序制成,具有增强免疫力、防癌抗肿瘤、延缓衰老等功效。随着消费市场的逐渐成熟,人们的消费意识不断增强,产品质量鉴别能力不断提高,对保健酒的质量也提出了更高的要求^[1]。人参皂苷作为人参的主要活性成分之一,其含量成为评价参类保健酒质量的重要指标,而提取方法对保健酒液中有效成分的富集具有重要影响。目前,保健酒原液提取方法主要有溶剂提取法、水蒸气蒸馏法、升华法和压榨法四大类别。溶剂提取法是适用范围最广且应用最多的方法,它包括浸渍法、渗漉法、煎煮法、回流法、连续回流法等方法^[4-7],其中,又数浸渍法最常用于大范围、高产量的保健酒生产。此方法投资较少,设备简单,操作方便,只是所需时间较长,提取液颜色较深。目前,有关保健酒提取液脱色方面的研究少见报道,已有成果也多是与其相类似的相关发酵液或提取物的脱色研究^[8-11]。

鉴于此,本研究采用目前还未被用于保健酒液有效成分提取的经典索氏提取方法,对以人参等6种中药材为原料制得的保健酒原液进

行人参皂苷提取,以期提升提取液质量,减轻工艺强度;同时对原液进行脱色处理,优化工艺流程,为保健酒的品质与感官提升提供参考。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与试剂

实验材料:人参等6种药材,分别记为原料A,B,C,D,E,F,由仲景宛西制药股份有限公司提供。

实验试剂:甲醇,天津市致远化学试剂有限公司产;冰乙酸,天津市改通化学试剂有限公司产;HClO₄,天津市鑫源化工有限公司产;香草醛,天津市大茂化学试剂厂产;无水乙醇,天津市永大化学试剂有限公司产;中性Al₂O₃,山东汇泽化工科技有限公司产。以上试剂均为分析纯。人参皂苷Re标准品(纯度≥98.0%),北京北纳创联生物科技研究院产;Amberlite-XAD-2大孔吸附树脂,美国Sigma公司产;粉末状活性炭、颗粒状活性炭,唐山晨晖炭业有限公司产;硅藻土,济南辉腾化工有限公司产。

1.2 实验仪器与设备

HH型恒温水浴锅,江苏金怡仪器科技有限公司产;752型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司产;SQP型电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 保健酒液有效成分提取的单因素试验

以酒液中人参皂苷质量浓度为响应指标,

研究提取温度、提取时间、提取液料比对保健酒提取工艺的影响,并分别设定为提取温度组、提取时间组和提取液料比组。

1.3.1.1 提取温度对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响试验 准确称取 1.5 ~ 1.9 g 人参(原料 A),1.2 ~ 1.3 g 原料 B,2.5 g 原料 C,2.5 g 原料 D,10.0 g 原料 E,10.0 g 原料 F,将以上原料装入 18 cm × 20 cm 滤纸包中,置于索氏提取器,在圆底烧瓶中注入 500 mL 体积分数为 60% 的食用酒精(或基酒)(液料比 500 : 1)。组装抽提设备,打开冷凝装置,检查其气密性是否良好。

设置提取温度分别为 92 °C,94 °C,96 °C 和 98 °C,提取时间为 2.5 h。待提取结束后,将索氏提取器与圆底烧瓶中的液体全部倒入 500 mL 锥形瓶中,并贴上标签冷却备用,待后期测定人参皂苷的质量浓度。

1.3.1.2 提取时间对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响试验 参考 1.3.1.1 实验步骤第一段,设置提取时间分别为 2.0 h,2.5 h,3.0 h,3.5 h 和 4.0 h,提取温度为 95 °C,液料比 500 : 1。待提取结束后,将索氏提取器与圆底烧瓶中的液体全部倒入 500 mL 锥形瓶中,并贴上标签冷却备用,待后期测定人参皂苷的质量浓度。

1.3.1.3 提取液料比对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响试验 参考 1.3.1.1 实验步骤第一段,将索氏提取器与分别装 250 mL,500 mL,750 mL 和 1000 mL 体积分数为 60% 的食用酒精(或基酒)的圆底烧瓶连接(液料比分别为 250 : 1,500 : 1,750 : 1 和 1000 : 1),在温度为 95 °C 的水浴锅中恒温水浴回流提取 2.5 h。提取结束后贴上标签冷却备用,待后期测定人参皂苷质量浓度。

1.3.2 保健酒液有效成分提取的均匀试验

为了获得保健酒液有效成分的最佳提取工

艺,结合上述单因素试验结果,以人参皂苷的质量浓度(Y)为响应指标,采用 $U_6 \times (6^4)$ 均匀试验因素水平表^[12],进行保健酒液有效成分提取均匀试验。

1.3.3 保健酒液脱色的单因素试验

将在最佳工艺条件下制得的保健酒液作为脱色原液,以 560 nm 条件下测定的保健酒液吸光度值为响应指标,比较脱色效果以判别脱色方案的优劣。

1.3.3.1 脱色温度对脱色效果的影响试验

选用颗粒状活性炭作为脱色剂,脱色液料比为 10 : 1,分别在 30 °C,35 °C,40 °C,45 °C 和 50 °C 条件下脱色 15 min,再将脱色保健酒液经常温定性滤纸过滤后,于 560 nm 条件下测定吸光度值。

1.3.3.2 脱色时间对脱色效果的影响试验

选用颗粒状活性炭作为脱色剂,脱色液料比为 10 : 1,在 35 °C 条件下分别脱色 5 min,10 min,15 min,20 min 和 25 min,再将脱色保健酒液经常温定性滤纸过滤后,于 560 nm 条件下测定吸光度值。

1.3.3.3 脱色液料比对脱色效果的影响试验

选用颗粒状活性炭作为脱色剂,脱色液料比分别设为 20 : 1,10 : 1 和 5 : 1,在 35 °C 条件下脱色 15 min,再将脱色保健酒液经常温定性滤纸过滤后,于 560 nm 条件下测定吸光度值。

1.3.3.4 脱色剂种类对脱色效果的影响试验

分别选用颗粒状活性炭、粉末状活性炭、硅藻土作为脱色剂,脱色液料比为 10 : 1,在 35 °C 条件下脱色 15 min,再将脱色保健酒液经常温定性滤纸过滤后,于 560 nm 条件下测定吸光度值。

1.3.4 保健酒液脱色的均匀试验

为了获得保健酒液的最佳脱色工艺,结合上述单因素试验结果,以 560 nm 条件下的吸光度值(R)为响应指标,采用 $U_6 \times (6^4)$ 均匀试验

因素水平表进行保健酒液脱色的均匀试验。

1.4 保健酒液中人参皂苷质量浓度的测定

1.4.1 试样处理

准确吸取样品 5 mL, 置 25 mL 容量瓶中, 加 35% 的乙醇定容至刻度, 摇匀, 准确吸取 1 mL 于蒸发皿中, 置沸水浴上挥干溶剂, 残渣加适量水溶解后进行柱层析。

1.4.2 柱层析

用 10 mL 注射器作层析管, 内装 3 cm 大孔吸附树脂, 上加 1 cm 中性 Al_2O_3 。先用 25 mL 体积分数 70% 的乙醇洗柱, 弃去洗脱液; 再用 25 mL 水洗柱, 弃去洗脱液; 加入已处理好的试样溶液, 用 25 mL 水洗柱, 弃去洗脱液。用 25 mL 体积分数 70% 的乙醇洗脱人参皂苷, 收集洗脱液于蒸发皿中, 置于沸水浴挥干溶剂, 以此作显色用。

1.4.3 显色

在上述已挥干的蒸发皿中加入 0.2 mL 质量分数 5% 的香草醛冰乙酸溶液, 转动蒸发皿, 使残渣全部溶解, 再加入 0.8 mL HClO_4 , 混匀后移入 5 mL 带塞刻度离心管中, 60 °C 水浴上加热 10 min, 取出, 冰浴冷却后, 加入冰乙酸 5.0 mL, 摇匀后, 以 1 cm 比色池于 560 nm 波长处与标准管一起进行比色测定。

1.4.4 标准管设置

准确吸取质量浓度为 2.0 mg/mL 的人参皂苷 Re 标准溶液 100 mL 置于蒸发皿中, 60 °C 水浴挥干, 加适量水溶解, 依次过柱层析、测定吸光度值。

1.4.5 计算方法

$$X = \frac{A_1 \times C \times V}{A_2 \times m}$$

式中, X 为试样中总皂苷质量浓度(以人参皂苷 Re 计)/($\text{mg} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$), A_1 为被测液的吸光度值, A_2 为标准液的吸光度值, C 为标准管人参皂苷 Re 的质量/mg, V 为试样稀释体积/mL,

m 为取样量/mL。

1.5 数据处理

所有试验均重复 3 次, 结果取平均值, 以消除偶然因素造成的误差。均匀试验采用 Mathematics 4.0 软件进行处理, 曲线采用 Origin 7.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 保健酒液有效成分提取的单因素试验结果与分析

2.1.1 提取温度对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响

提取温度对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响试验结果如图 1 所示。由图 1 可知, 当提取温度为 96 °C 时, 人参皂苷的质量浓度最高, 为 28.71 mg/(100 mL), 表明此时保健酒液的提取效果最好。这是由于提取温度的增加能够使提取物细胞壁渗透性增强, 增加提取物的溶解度和扩散系数, 并降低提取溶剂的黏度, 从而提高提取效率^[13]。但当提取温度继续升高时, 索氏提取回流速度过快, 提取效率反而下降。因此, 选择提取温度为 96 °C 较适宜。

2.1.2 提取时间对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响

提取时间对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响试验结果如图 2 所示。由图 2 可知, 保健酒液在提取时间为 3.0 h 时提取效果最好, 此时保健酒液中人参皂苷质量浓度达到 59.97 mg/(100 mL)。根据 Fick 扩散定律^[14], 人参皂苷的提取效率与提取时间成正比, 在一定范围内, 提取时间越长, 提取效率越高, 但增长幅度有所下降; 同时, 由于热效应作用, 长时间处理会导致热敏感组分的转化降解, 提取溶剂挥发导致乙醇体积分数的降低, 从而降低提取效率。因此, 选择提取时间为 3.0 h 较适宜。

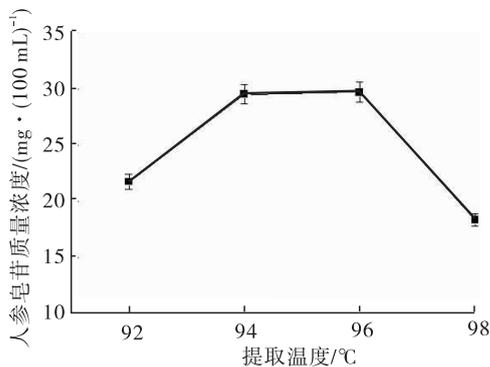


图1 提取温度对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响

Fig. 1 Effect of extraction temperature on the concentration of ginsenosides in health liquor

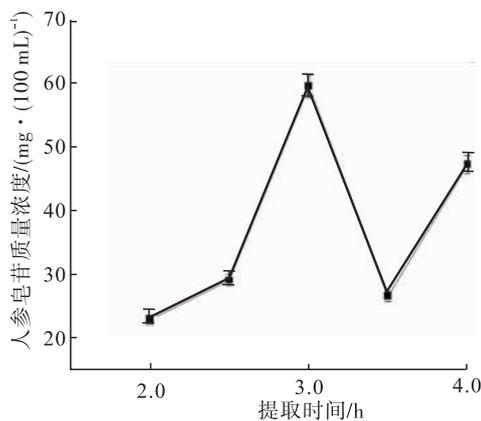


图2 提取时间对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响

Fig. 2 Effect of extraction time on the concentration of ginsenosides in health liquor

2.1.3 提取液料比对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响

提取液料比对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响试验结果如图3所示.由图3可知,随着提取液料比的增大,从细胞内到溶剂之间扩散的提取物浓度梯度增大,人参皂苷的质量浓度不断增加.这是由于提取液料比的增大在一定程度上提高了传质推动力,提取出来的有效物质也就越多.但从提取效果、溶剂用量、降低能耗等方面综合考虑,选择提取液料比为1000:1较适宜.

2.2 保健酒液有效成分提取的均匀试验结果与分析

基于单因素试验,保健酒液有效成分提取的均匀试验因素水平选择见表1.保健酒液有效成分提取的均匀试验结果、回归参数和均匀试验方差分析分别见表2、表3和表4.

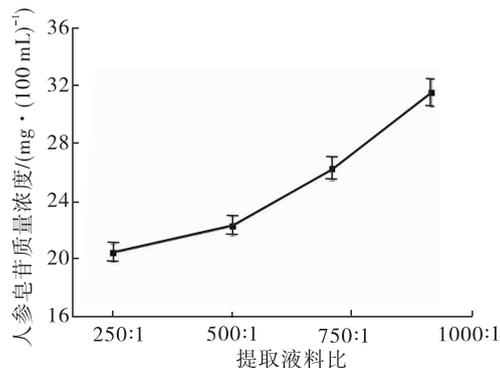


图3 提取液料比对保健酒液中人参皂苷质量浓度的影响

Fig. 3 Effect of liquid-solid ratio on the concentration of ginsenosides in health liquor

表1 保健酒液有效成分提取的均匀试验因素水平

Table 1 The factors and levels of uniform test for health liquor extraction of active ingredients

水平	因素		
	提取温度 $X_1/^\circ\text{C}$	提取时间 X_2/h	提取液料比 X_3
1	93	2.0	250 : 1
2	93	2.0	250 : 1
3	95	2.5	500 : 1
4	95	2.5	500 : 1
5	97	3.0	1000 : 1
6	97	3.0	1000 : 1

表2 保健酒液有效成分提取的均匀试验结果

Table 2 The results of uniform test for health liquor extraction of active ingredients

试验号	提取温度 $X_1/^\circ\text{C}$	提取时间 X_2/h	提取液料比 X_3	人参皂苷质量浓度/(mg · (100 mL) ⁻¹)
1	93	2.0	500 : 1	18.09
2	93	2.5	1000 : 1	22.20
3	95	3.0	250 : 1	65.59
4	95	2.0	1000 : 1	18.76
5	97	2.5	250 : 1	57.27
6	97	3.0	500 : 1	21.98

表3 保健酒液有效成分提取的回归参数

Table 3 The regression parameters for health liquor extraction of active ingredients

回归模型	系数值	误差	T值	P值
常数项	130.702	11.565 6	11.300 9	0.007 739 4
X_3^2	0.000 221 433	0.000 034 513 8	6.415 79	0.023 443 1
X_3	-0.294 511	0.232 164	-1.268 54	0.332 272
X_1X_3	0.000 395 152	0.002 398 23	-0.164 768	0.884 274

表4 保健酒液有效成分提取均匀试验方差分析

Table 4 Analysis of variance in uniform test of extraction of active ingredients

方差来源	自由度	偏差平方和	均方	F值	P值
模型	3	2 261.08	753.692	31.7679	0.030 672 4
误差	2	47.45	23.725		
总和	5	2 308.53			

由表2、表3和表4可知,提取液料比对保健酒液中人参皂苷的质量浓度具有极显著影响,提取温度和提取液料比之间没有交互作用.影响保健酒液有效成分提取的诸因素,其影响大小的主次顺序依次为提取液料比 > 提取温度 > 提取时间.回归方程为 $Y = 130.702 + 0.000\ 221\ 433X_3^2 - 0.294\ 511X_3 + 0.000\ 395\ 152X_1X_3$. 经过优化后的保健酒液有效成分提取最佳条件为:提取温度97℃,提取时间2 h,提取液料比610:1,此时保健酒液中人参皂苷的质量浓度最高,为58.12 mg/(100 mL).在此条件下进行验证试验,人参皂苷的质量浓度可达67.63 mg/(100 mL),表明经均匀试验优化后的保健酒液有效成分提取最佳条件结果可靠.

2.3 保健酒液脱色的单因素试验结果与分析

2.3.1 脱色温度对保健酒液吸光度值的影响

脱色温度对保健酒液吸光度值的影响试验结果如图4所示.由图4可知,保健酒液的吸光度值随着脱色温度的升高而降低,即保健酒液的脱色效果随着脱色温度的升高得到改善.这是由于适当提高脱色温度可加快色素分子的扩

散速度,同时料液的黏度下降,有利于色素的吸附,提高脱色效率^[15].因此,在考虑脱色工艺对保健酒液中人参皂苷质量浓度影响的前提下,选择脱色温度为40℃较适宜.

2.3.2 脱色时间对保健酒液吸光度值的影响

脱色时间对保健酒液吸光度值的影响试验结果如图5所示.由图5可知,保健酒液的吸光度值随着脱色时间的延长而降低,即保健酒液的脱色效果随着脱色时间的延长得到改善.当脱色时间在5~15 min时,吸光度数值降幅较大;当脱色时间在20~25 min时,吸光度数值下降较为缓慢,脱色效率有所减缓.这是由于活性炭刚开始吸附时,其表面是全新的无结合界面,但随着吸附时间的延长,吸附面慢慢缩小,脱色效果将趋向稳定.因此,在考虑脱色工艺对保健酒液中人参皂苷质量浓度影响的前提下,

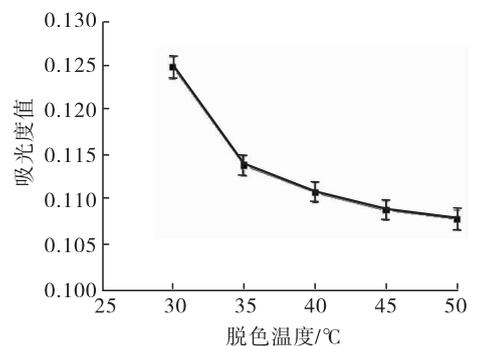


图4 脱色温度对保健酒液吸光度值的影响

Fig. 4 Effect of decolorization temperature on absorbance value of health liquor

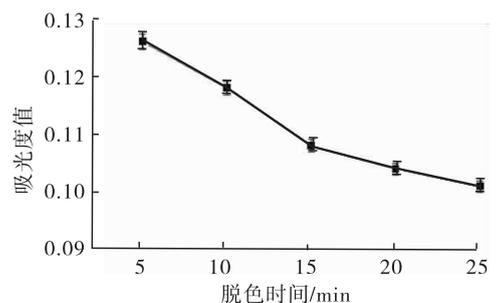


图5 脱色时间对保健酒液吸光度值的影响

Fig. 5 Effect of decolorization time on absorbance value of health liquor

选择脱色时间为 20 min 较适宜。

2.3.3 脱色液料比对保健酒液吸光度值的影响

脱色液料比对保健酒液吸光度值的影响试验结果如图 6 所示。由图 6 可知,保健酒液的吸光度值随着液料比的增大而升高,表明保健酒液的脱色效果随着液料比的增大而减弱。这是由于在固定脱色时间、脱色温度和脱色剂用量的前提下,被脱色的量越小,活性炭用于吸附有色物质的能量就越强,所以当脱色液料比为 5 : 1 时,酒液吸光度值最低。因此,在考虑脱色工艺对保健酒液中人参皂苷质量浓度影响的前提下,选择液料比为 5 : 1 较适宜。

2.3.4 脱色剂种类对保健酒液吸光度值的影响

脱色剂种类对保健酒液吸光度值的影响试验结果如图 7 所示。由图 7 可知,与硅藻土和颗粒状活性炭相比,粉末状活性炭的脱色效果较好。这可能是由于粉末状活性炭的接触表面积较大,而硅藻土和颗粒状活性炭的接触表面积则相对较小一些。因此,选择脱色剂为粉末状活性炭较适宜。

2.4 保健酒液脱色的均匀试验结果与分析

基于单因素试验,保健酒液脱色的均匀试验因素水平选择见表 5。保健酒液脱色的均匀

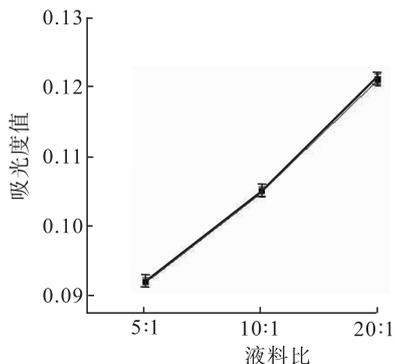


图 6 液料比对保健酒液吸光度值的影响

Fig. 6 Effect of liquid solid ratio on absorbance value of health liquor

试验结果、回归参数和均匀试验方差分析分别见表 6、表 7 和表 8。

由表 6、表 7 和表 8 可知,脱色温度、脱色时间和脱色液料比对保健酒液吸光度值具有极显

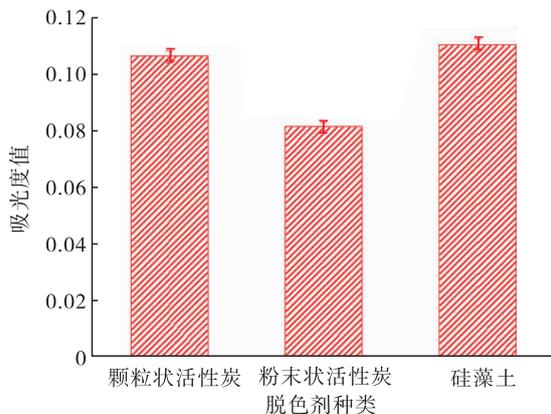


图 7 脱色剂种类对保健酒液脱色效果的影响

Fig. 7 Effect of decolorant species on absorbance value of health liquor

表 5 保健酒液脱色的均匀试验因素水平

Table 5 The factors and levels of uniform test for health liquor decoloration

水平	因素			
	脱色温度 A/°C	脱色时间 B/min	脱色液料 比 C	脱色剂 种类 D
1	30	10	5 : 1	颗粒状活性炭
2	30	10	5 : 1	颗粒状活性炭
3	35	15	10 : 1	粉末状活性炭
4	35	15	10 : 1	粉末状活性炭
5	40	20	20 : 1	硅藻土
6	40	20	20 : 1	硅藻土

表 6 保健酒液脱色的均匀试验结果

Table 6 The results of uniform test for health liquor decolorization

试验号	脱色温度 A/°C	脱色时间 B/min	脱色液料 比 C	脱色剂 种类 D	脱色后 吸光度值
1	30	10	10 : 1	硅藻土	0.115
2	30	15	20 : 1	硅藻土	0.122
3	35	20	5 : 1	粉末状活性炭	0.063
4	35	10	20 : 1	粉末状活性炭	0.100
5	40	15	5 : 1	颗粒状活性炭	0.090
6	40	20	10 : 1	颗粒状活性炭	0.103

表7 保健酒液脱色的回归参数

Table 7 Regression parameters for health liquor decolorization

回归模型	系数值	误差	T值	P值
常数项	1.323 46	$3.224\ 09 \times 10^{-3}$	410.490	0.001 550 88
A	-0.045 175 7	$1.196\ 81 \times 10^{-4}$	-377.468	0.001 686 55
B	-0.001 507 57	$8.864\ 24 \times 10^{-6}$	-170.074	0.003 743 16
C	0.001 462 14	$4.756\ 29 \times 10^{-6}$	307.411	0.002 070 9
AD	0.004 907 57	$1.325\ 38 \times 10^{-5}$	370.278	0.001 719 3

表8 保健酒液脱色的均匀试验方差分析

Table 8 Analysis of variance of uniform test for health liquor decolorization

方差来源	自由度	偏差平方和	均方	F值	P值
模型	4	$2.178\ 83 \times 10^{-3}$	0.000 544 707	93 508	0.002 452 65
误差	1	5.83×10^{-9}			
总和	5	$2.178\ 83 \times 10^{-3}$			

著影响,脱色温度和脱色剂之间有极显著的交互作用.影响保健酒液脱色效果的上述诸因素其影响大小顺序依次为:脱色温度 > 液料比 > 脱色时间 > 脱色剂种类.回归方程为 $R = 1.323 - 0.045\ 2A - 0.001\ 51B + 0.001\ 46C + 0.004\ 91AD$.经过优化后的保健酒液脱色最佳条件为:脱色温度 35 ℃,脱色时间 20 min,液料比 5 : 1,以活性炭粉末为脱色剂.在此条件下得到的稀释 10 倍的保健酒液的理论脱色吸光度为 0.0478,验证试验测定的保健酒液的吸光度为 0.042,表明经均匀试验优化后的保健酒液脱色最优条件脱色效果明显.此时酒液中人参皂苷质量浓度为 65.96 mg/(100 mL),由脱色试验产生的损失率仅为 2.47%.

3 结论

本研究采用索氏提取方法对由人参等 6 味中药制备的保健酒进行有效成分提取,并采用多种脱色剂对保健酒液进行脱色处理,以保健酒液中人参皂苷的质量浓度为提取指标,以保健酒液在 560 nm 下的吸光度值为脱色指标,在

单因素试验的基础上,采用均匀试验优化提取和脱色工艺.结果表明:当反应温度为 97 ℃,反应时间为 2 h,液料比为 610 : 1 时,人参皂苷质量浓度最高,为 67.63 mg/(100 mL);当脱色温度为 35 ℃,脱色时间为 20 min,液料比为 5 : 1,脱色剂为粉末状活性炭时,脱色效果最好,酒液色泽适宜,品质良好,且此时由脱色试验产生的人参皂苷损失率仅为 2.47%.

参考文献:

- [1] 黄书声,韩娜,佟晓芳.中国保健酒的历史现状和发展[J].酿酒,2008,35(4):16.
- [2] MING L, XIAO M H, KANG T, et al. Application of electronic nose in Chinese spirits quality control and flavor assessment [J]. Food Control, 2012(26):564.
- [3] CHANG K J, THACH M L, OLSEN J. Wine and health perceptions: exploring the impact of gender, age and ethnicity on consumer perceptions of wine and health [J]. Wine Economics and Policy, 2016(5):105.
- [4] 阮冲,肖小华,李攻科.天然产物有效成分提取分离制备方法研究进展[J].化学试剂, 2014,36(3):193.
- [5] 令狐晨,阿依吐伦·斯马义.昔提取纯化及其抗氧化活性的研究进展[J].广州化工,2015, 43(6):7.
- [6] 李华.大豆皂苷提取方法的比较[J].食品科技,2008(1):122.
- [7] 王赛君,伍振峰,杨明,等.中药提取新技术及其在国内的转化应用研究[J].中国中药杂志,2014,39(8):1360.
- [8] 项碧华,李小林.可溶性大豆多糖活性炭脱色工艺研究[J].饮料工业,2017,20(2):12.
- [9] 林英,吕淑霞,代义,等.酒糟木糖提取液活性炭脱色工艺的研究[J].食品科技,2008(7):116.



引用格式:刘胜男,赵紫悦,杜浩楠,等. 藜麦粉对面团粉质特性与馒头品质的影响[J]. 轻工学报,2018,33(6):63-70.

中图分类号:TS213.2 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.008

文章编号:2096-1553(2018)06-0063-08

藜麦粉对面团粉质特性与馒头品质的影响

Effect of quinoa flour on dough farinograph property and steamed bread quality

刘胜男^{1,2},赵紫悦^{1,2},杜浩楠^{1,2},张惠萍^{1,2},相启森^{1,2}
LIU Shengnan^{1,2},ZHAO Ziyue^{1,2},DU Haonan^{1,2},ZHANG Huiping^{1,2},
XIANG Qisen^{1,2}

关键词:

藜麦粉;馒头;粉质特性;拉伸特性;质构分析;感官评价

Key words:

quinoa flour;
steamed bread;
farinograph property;
extensograph property;
texture analysis;
sensory evaluation

1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 河南省食品生产与安全协同创新中心,河南 郑州 450001

1. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. He'nan Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Zhengzhou 450001, China

摘要:将藜麦粉按不同质量分数(0%~30%)添加到小麦面粉中,测定面团的粉质特性和拉伸特性、馒头的比容和径高比,并对馒头进行质构特性测试和感官评价。结果表明:藜麦粉添加量对面团的粉质特性、拉伸特性具有显著影响($p < 0.05$);在添加的藜麦粉质量分数为5%~15%时,馒头的比容和径高比均有所提高,且按该添加比例蒸制的馒头,其弹性、咀嚼度、色香和口感相比全麦粉馒头得到了明显改善。

收稿日期:2018-09-25

基金项目:国家自然科学基金项目(31501491);河南省高等学校重点科研项目(15A550024)

作者简介:刘胜男(1993—),女,河南省周口市人,郑州轻工业学院硕士研究生,主要研究方向为食品化学与营养。

通信作者:相启森(1984—),男,山东省枣庄市人,郑州轻工业学院副教授,博士,主要研究方向为食品化学与营养。

Abstract: The quinoa flour was added into wheat flour at different proportions (0 ~ 30%), and the effect of quinoa flour addition on the farinograph and extensograph properties of dough, as well as the specific volume and diameter height ratio of steamed bread was tested. Texture characteristic test and quality evaluation of steamed bread were made. The results showed that with the addition of quinoa flour in wheat flour exerted significant effect on the farinograph and extensograph properties of dough ($p < 0.05$). When the addition of quinoa flour reached 5% ~ 15%, the specific volume and diameter height ratio of steamed bread were significantly increased. Moreover, the springiness, chewiness, appearance colour and taste of steamed bread were improved greatly.

0 引言

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 是苋科藜属一年生草本植物,早在几千年前就已经在南美洲安第斯山脉一带开始种植和食用,属于当地的传统粮食作物^[1-2]. 藜麦含有丰富的氨基酸、多不饱和脂肪酸、维生素、矿物质等营养成分,能够平衡健康人群营养素的摄入状况^[3-4]. 同时,藜麦还含有丰富的多酚、黄酮等活性植物化学物,具有抗氧化、抑菌、免疫调节、防治心血管疾病等功能,非常适合老年人、儿童、孕产妇、糖尿病患者和肠胃疾病患者等特殊人群食用^[5-7]. 联合国粮农组织 (FAO) 认为藜麦能够满足人体基本营养需求,并把藜麦列为最适宜人类食用的全营养食品^[8].

随着社会的发展和经济水平的提高,人们的膳食结构也日趋失衡. 研究结果显示,当今许多人类慢性非传染性疾病都与人体摄入营养素不均衡有关^[9]. 因此,通过摄入营养均衡的单体食品来满足人体健康需求,改善日益突出的慢性病问题显得尤为重要. 我国是以面食为主食的消费大国,将藜麦加入面制品中是提高藜麦摄入频次和摄入量的重要途径. 目前,关于藜麦面制品,国内外都已开展相关研究,但大多为藜麦面包、饼干制品等西式食品,涉及中国传统主食的研究报道相对较少^[10-12]. 馒头是我国北方居民的传统主食,并在居民日常膳食结构中占据重要地位. 因此,本研究拟将藜麦粉按不同比例加入小麦面粉中,测定面团的粉质特性和拉

伸特性、馒头的比容和径高比,并对馒头进行质构分析和感官评价,以期藜麦粉应用于中式面制品提供参考.

1 实验材料与amp;方法

1.1 主要实验材料

藜麦粉,繁峙县三晋农夫商贸有限公司产;高筋小麦粉,河南省金苑粮油有限公司产;NaCl,分析纯,天津市化学试剂六厂产.

1.2 主要实验仪器

布拉本德粉质仪、布拉本德拉伸仪,德国 Brabender 公司产;TA - XT plus 型质构仪,英国 Stable Micro System 公司产;智能型恒温鼓风干燥箱,河南兄弟仪器设备有限公司产;BSA224S - CW 电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司产;KSW 型电炉温度控制器,北京科伟永兴仪器有限公司产.

1.3 实验方法

1.3.1 面团的制作 对藜麦粉进行添加量梯度实验,以小麦粉量为基准,分别添加质量分数为 0%,5%,10%,15%,20%,25%,30% 的藜麦粉,形成配粉. 每个添加比例配粉总重 300 g,然后将 3 g 干酵母用温水活化,搅拌均匀,添加到调配好的配粉中,手工揉面 5 min,随后放置于 38 °C 恒温发酵箱中发酵 45 min.

1.3.2 馒头的制作 取出面团,然后揉面 3 ~ 5 min 成型,于室温下醒发 15 min. 准备好装有适量蒸馏水的不锈钢蒸锅,并在蒸篦上铺好纱布,待馒头醒发完成后放入蒸锅的蒸篦上,盖好

锅盖开火,蒸煮 40 min 后取出馒头放在室温下冷却备用。

1.3.3 面团粉质和拉伸特性的测定 参照 GB/T 14614—2006 测定方法,使用布拉本德粉质仪测定面团粉质和拉伸特性指标^[13]。

1.3.4 馒头比容的测定 采用菜籽排重法进行测定^[14],计算公式为 $P = V/m$,其中 P 为馒头比容/($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$), V 为馒头体积/ mL , m 为馒头质量/ g 。

1.3.5 馒头径高比的测定 选取冷却 1 ~ 2 h 后的馒头,用游标卡尺测量其直径和高度,同一馒头取 3 个不同的测试点。馒头径高比为馒头直径平均值与其高度平均值之比,其计算公式^[15]为 $S = D/H$, S 为径高比, D 为馒头直径/ mm , H 为馒头高度/ mm 。

1.3.6 馒头的质构特性测试 选取冷却 1 ~ 2 h 后的馒头,沿同一方向将馒头切成 20 mm 厚的均匀切片,然后进行质构特性测试^[16]。测试条件为:选用 P/25 探头,测试前速度 1.00 mm/s;测试时速度 1.00 mm/s;测试后速度 3.00 mm/s;压缩率 50%;感应力 Auto-5 g;压缩次数 2 次。

1.3.7 馒头的感官评价 选取经过感官评价培训的 9 位评价人员进行品尝并打分,结果取平均值。评价方法参照馒头鉴评项目和评分标准(GB/T 21118—2007)进行^[17],见表 1。

1.4 实验数据处理

所有实验均平行测定 3 次,结果取平均值。

实验数据使用 SPSS21.0 软件进行处理分析。运用方差分析法进行显著性分析, $p < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 藜麦粉添加量对面团粉质特性的影响

藜麦粉添加量对面团粉质特性的影响试验结果如图 1 所示。由图 1 可知,当藜麦粉质量分数为 10% 时,面团的吸水率最低,比全小麦粉面团下降了 0.9%;而当藜麦粉的质量分数达到 30% 时,面团的吸水率相比于全小麦粉面团升高了 4.7%。一般来讲,面团吸水率与面筋蛋白含量、淀粉结合水能力有关^[18]。藜麦粉中含有较高含量的蛋白质,但缺乏与面筋形成有关的蛋白。藜麦粉的小量增加(质量分数 0 ~ 10%)对面筋蛋白起到了稀释的作用,因此,面团的吸水率有所下降。而当藜麦粉的质量分数逐步增加至 15% ~ 30% 时,藜麦粉中的淀粉颗粒被破坏程度加大。另外,藜麦粉中支链淀粉含量较高且含有丰富的水溶性膳食纤维,使得面团吸水率升高且持水性也变强。

当藜麦粉质量分数为 10% 时,面团的形成时间最久,比全小麦粉面团的形成时间延长了 7.2%;而藜麦粉质量分数的持续增加反而缩短了面团的形成时间,当藜麦粉质量分数为 30% 时,面团的形成时间为 1.19 min,比全小麦粉面团形成时间缩短了 6.3%。这是由于白蛋白和

表 1 馒头感官评定项目与评分标准

Table 1 The sensory evaluation items and scoring criteria of steamed bread

感官指标	评定标准	满分
外观形状	表皮光滑、均匀 12.1 ~ 15 分;中等 9.1 ~ 12 分;表皮粗糙,有硬块,形状不对称 1 ~ 9 分	15
比容	馒头比容 2.3 为满分,每减少 0.1 扣 1 分	20
色泽	自然色,色泽光亮、均匀;8.1 ~ 10 分;中等 6.1 ~ 8 分;色泽灰暗 1 ~ 6 分	10
结构	气孔大小均匀、组织细腻 12.1 ~ 15 分;中等 9.1 ~ 12 分;气孔大小不均、组织粗糙 1 ~ 9 分	15
弹性	用手指按复原性好,有咬劲 16.1 ~ 20 分;中等 12.1 ~ 16 分;复原性、咬劲均差 1 ~ 12 分	20
黏牙性	咀嚼爽口不黏牙,松软 12.1 ~ 15 分;中等 9.1 ~ 12 分;咀嚼不爽口,发黏 1 ~ 9 分	15
气味	具有麦香味,无异味 4.1 ~ 5 分;中等 3.1 ~ 4 分;有异味 1 ~ 3 分	5

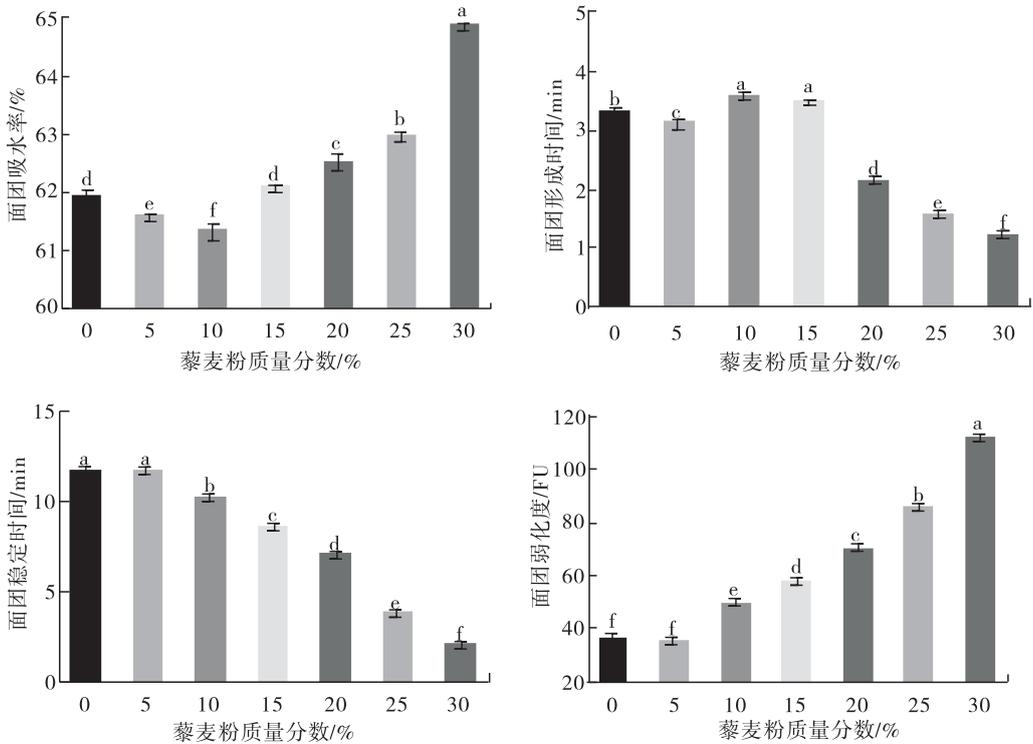


图1 藜麦粉添加量对面团粉质特性的影响

Fig. 1 Effect of quinoa flour addition on farinose quality of dough

球蛋白占据了藜麦粉总蛋白的绝大部分(质量分数 44% ~ 77%),而醇溶谷蛋白和谷蛋白含量相对较少. 这导致面团中面筋含量减少,面筋强度下降,致使面团稳定时间显著缩短^[19,20].

随着藜麦粉质量分数的增加,面团稳定时间缩短,弱化度显著升高($p < 0.05$),尤其在藜麦粉质量分数大于 10% 时变化更为明显. 当藜麦粉质量分数为 30% 时,弱化度高达 112 FU,比全小麦粉面团的测试结果增加了两倍多. 面团中面筋蛋白形成的面筋网络结构的强度表征着面团弱化度的高低,面团在搅拌过程中面筋的网络结构被破坏、削弱,面团的弱化度也发生变化. 藜麦粉的加入使面团中面筋网络结构的强度下降,致使面团的可塑性下降,另外,面团弱化度增大到一定值时,面团的可塑性也会明显下降,此时不再适宜做面制品.

2.2 藜麦粉添加量对面团拉伸特性的影响

藜麦粉添加量对面团拉伸特性的影响试验

结果如图 2 所示. 由图 2 可知,面团拉伸阻力与藜麦粉的质量分数成负相关. 但在发酵 135 min 时,面团的拉伸阻力在藜麦粉质量分数为 10% 和 15% 时,相比于全小麦粉面团略有增加. 这可能是由于藜麦粉与小麦粉混合后,随着发酵时间的延长,面团产生的 CO_2 气体量增多,使得面团的面筋网络结构有所改善. 此外,藜麦粉的加入可显著降低面团的拉伸阻力. 当藜麦粉质量分数为 30% 时,发酵 45 min 时,面团的拉伸阻力下降至 236 BU,相比于全小麦粉面团降低了 54.9%;而当面团发酵 90 min 和 135 min 时,相比于全小麦粉面团分别下降了 48.5% 和 34.8%.

与全小麦粉面团相比,藜麦粉的添加显著降低了面团的拉伸度和拉伸曲线面积($p < 0.05$). 对于面团拉伸度,面筋含量极低的藜麦粉能够导致面团中面筋蛋白形成的网络结构状态不稳定,进而导致面团拉伸度减小、面团的韧

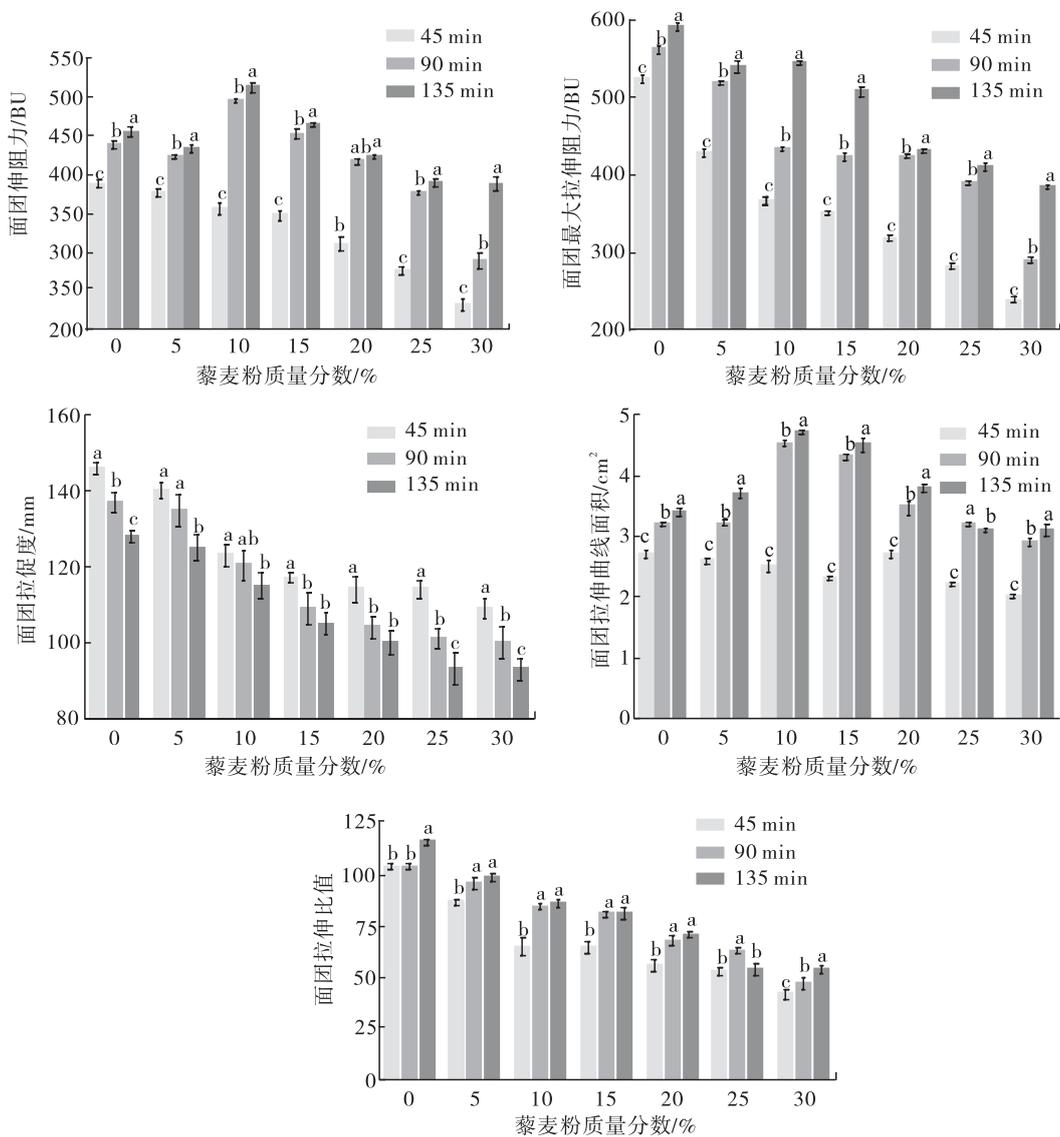


图2 藜麦粉添加量对面团拉伸特性的影响

Fig. 2 Effect of quinoa flour addition on tensile properties of dough

性下降,可塑性变差,因此较短时间内就会被拉断.而对于面团拉伸曲线面积,由于藜麦粉中面筋蛋白的含量极少,当其添加到小麦粉中反而降低了面团总的的面筋蛋白含量,面团拉伸能量也会相应降低.拉伸比值表征着抗拉伸阻力与面团拉伸长度的关系,用作考量不同面制品时的具体要求也不相同.拉伸比值在藜麦粉添加后呈现不规则变化,但在一个适中的范围内对面团品质会有所改善.

总体来说,藜麦粉的加入使面团各拉伸指标均呈现整体下降的趋势,但藜麦粉质量分数

较小(5%~15%)时会对拉伸特性产生改善作用,且在同一质量分数水平下,面团各拉伸指标均随发酵时间的延长而增加,与张园园等^[18]的研究结论一致.

2.3 藜麦粉添加量对馒头比容的影响

藜麦粉添加量对馒头比容的影响试验结果如图3所示.馒头的比容表征着馒头内部结构的完整性,即网络结构的好坏.由图3可知,当藜麦粉的质量分数为5%~20%时,所蒸制馒头的比容相比于全小麦粉馒头的比容有所升高,尤其是当藜麦粉的质量分数为10%时,所

蒸制馒头的比容比全小麦粉馒头升高了27.6%。这可能是由于藜麦粉中小淀粉颗粒不容易被破坏,面团的吸水率降低,从而有效促进面团中面筋网络结构的形成,馒头的体积相对增加,比容也会随之增大。

2.4 藜麦粉添加量对馒头径高比的影响

藜麦粉添加量对馒头径高比的影响测试结果见图4。由图4可知,当藜麦粉的质量分数在5%~15%范围时,馒头的径高比相比于全小麦粉馒头有所升高。其中,当藜麦粉的质量分数为10%时,所蒸制的馒头的径高比全小麦面粉馒头升高了15.9%。但当藜麦粉质量分数大于15%时,馒头的径高比却呈下降趋势。这表明馒头的径高比与面团里的湿面筋含量有关,面筋

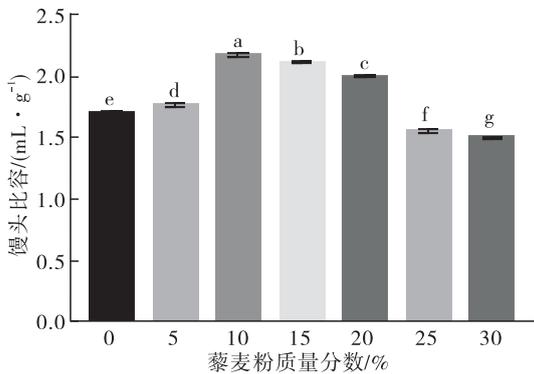


图3 藜麦粉添加量对馒头比容的影响
Fig.3 Effect of quinoa flour addition on specific volume of steamed bread

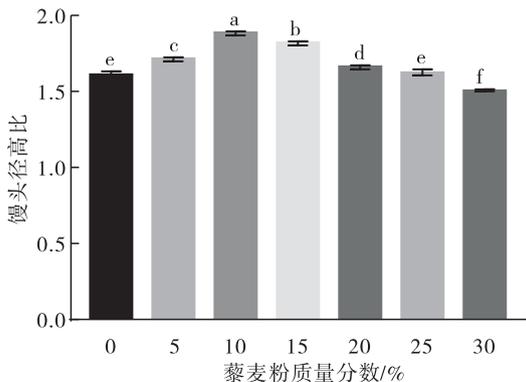


图4 藜麦粉添加量对馒头径高比的影响
Fig.4 Effect of quinoa flour addition on the diameter to height ratio of steamed bread

含量越高的面团所蒸制的馒头径高比越小^[21]。

2.5 藜麦粉添加量对馒头质构特性的影响

藜麦粉添加量对馒头质构特性的影响测试结果见表2。由表2可知,藜麦粉添加量能够影响馒头的硬度、黏合性、咀嚼性。最能反映馒头质构特性的是硬度和弹性这两个指标^[22]。馒头的硬度随着藜麦粉的添加呈现逐渐增大趋势,而馒头的弹性则呈现基本稳定后又有所下降的趋势。馒头的硬度与面团的网络结构强度相关,藜麦粉中面筋蛋白含量极低,对于面筋蛋白网络结构强度影响不佳,使面团延展性变差,成品馒头的气室偏小,从而使馒头的柔软度相应降低,这与本实验藜麦粉对面团粉质特性的影响结论相一致。回复性是指在馒头质构特性测试时第1次压缩后所持有的回复原来性状的能力^[20]。添加藜麦粉(质量分数5%~20%)后,馒头回复值逐渐升高,其中,添加质量分数为10%的藜麦粉时,馒头的回复性为0.49,相比全小麦粉馒头升高了13.9%。总体来说,添加适量的藜麦粉(质量分数5%~20%)对馒头质构特性有改良作用。

2.6 藜麦粉添加量对馒头感官评价的影响

藜麦粉添加量对馒头感官评价的影响试验结果如表3所示。由表3可知,随着藜麦粉添加量的增加,馒头的各项感官指标均发生了不同

表2 藜麦粉添加量对馒头质构特性的影响

Table 2 Effect of quinoa flour addition on texture characteristic of steamed bread

质量分数/%	硬度	弹性	凝聚力	黏合性	咀嚼性	回复性
0	7 201.37	0.94	0.80	5 738.01	5 413.98	0.43
5	7 168.32	0.94	0.78	7 331.72	5 987.54	0.44
10	7 666.42	0.95	0.79	5 020.04	5 638.61	0.49
15	7 665.08	0.94	0.79	5 735.14	5 544.62	0.48
20	7 710.37	0.92	0.79	6 724.43	5 616.93	0.46
25	7 864.88	0.92	0.79	6 860.24	5 683.11	0.42
30	7 977.57	0.91	0.79	6 862.29	5 697.12	0.42

表3 藜麦粉添加量对馒头感官评价的影响

Table 3 Effect of quinoa flour addition on the sensory evaluation of steamed bread 分

质量分数/%	比容	外观形状	色泽	结构	弹韧性	黏牙性	气味	总分
0	13.1	12.0	8.7	9.3	12.0	14.0	4.1	73.2
5	14.2	11.7	7.8	9.5	12.7	13.0	4.5	73.4
10	18.7	10.3	6.4	10.7	14.0	12.3	4.3	76.7
15	18.3	10.7	6.0	11.7	13.3	11.1	4.1	75.2
20	16.8	11.3	7.2	12.7	13.2	8.7	3.8	73.7
25	16.7	10.0	3.0	14.0	13.0	7.7	3.1	67.5
30	12.7	9.0	2.0	14.0	12.0	5.6	2.3	57.6

程度的改变. 与全小麦粉相比,藜麦粉色泽略深,因此所制作馒头的色泽总体呈现下降的趋势. 此外,当藜麦粉质量分数为10%时,馒头评价总分最高为76.7分,相比于全小麦粉馒头增加了4.7%. 当藜麦粉质量分数为30%时,总分降至57.6分,相比于全小麦粉馒头下降了21.3%. 由于藜麦粉中支链淀粉较长,当其质量分数增加时,面团吸水率升高,会对馒头黏性、结构都有所影响,使馒头评价降低^[21]. 添加低比例的藜麦粉(质量分数5%~15%)可使得藜麦粉中的淀粉颗粒被包裹,淀粉被破坏程度下降,其吸水率相对于添加高比例的藜麦粉有所降低,可促进面筋网络结构的形成,使馒头比容增加,这与本研究馒头比容测定结果一致. 因此,利用藜麦粉制作馒头时,适宜的藜麦粉添加量是改善馒头感官品质的关键.

3 结论

本研究将藜麦粉按不同质量分数(0%~30%)添加到小麦面粉中,测定了面团的粉质和拉伸特性、馒头的比容和径高比,并对馒头进行了质构特性测试和感官评价. 结果表明,藜麦粉添加量对面团的粉质特性、拉伸特性具有显著影响($p < 0.05$). 馒头比容、径高比在添加的藜麦粉质量分数为5%~15%时均有所提高,质量分数10%时达最大值,分别为2.17 mL/g

和1.89. 感官评价结果表明,相比较全麦面粉,添加质量分数为5%~15%的藜麦粉对馒头的弹性、咀嚼度、色香和口感均有改良效果. 因此,适宜的藜麦粉添加量是改善馒头感官品质的关键. 本研究为以藜麦为辅料实现馒头及其相关面制品的营养品质升级和产品的开发提供了依据.

参考文献:

- [1] 肖正春,张广伦. 藜麦及其资源开发利用[J]. 中国野生植物资源,2014,33(2):62.
- [2] VEGA-Gálvez A, MIRANDA M, VERGARA J, et al. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), an ancient Andean grain: a review[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 90(15):2541.
- [3] ABUGOCH L E, ROMERO N, TAPIA C A, et al. Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2008, 56(12):4745.
- [4] 申瑞玲,张文杰,董吉林,等. 藜麦的营养成分、健康促进作用及其在食品工业中的应用[J]. 中国粮油学报,2016,31(9):150.
- [5] LAMOTHE L M, SRICHUWONG S, REUHS B L, et al. Quinoa (*Chenopodium quinoa* W) and amaranth (*Amaranthus caudatus* L) provide dietary fibres high in pectic substances and xyloglucans[J]. Food Chemistry, 2015, 167:490.
- [6] WOLTER A, HAGER A S, ZANNINI E, et al. In vitro starch digestibility and predicted glycaemic indexes of buckwheat, oat, quinoa, sorghum, teff and commercial gluten-free bread[J]. Journal of Cereal Science, 2013, 58(3):431.
- [7] 王黎明,马宁,李颂,等. 藜麦的营养价值及其应用前景[J]. 食品工业科技,2014,35(1):

- 381.
- [8] 谭文武,谭洪卓,文明,等. 粮食(全谷物)的营养与健康[J]. 中国粮油学报,2010,25(4):100.
- [9] 郑建仙. 现代功能性粮油制品开发[M]. 北京:科学技术文献出版社,2003.
- [10] RODRIGUEZ S D,ROLANDELLI G,BUERA M P. Detection of *quinoa* flour adulteration by means of FT-MIR spectroscopy combined with chemometric methods [J]. Food Chemistry, 2019,274:392.
- [11] DALLAGNOL A M,PESCUMA M,GRACIELA ROLLÁN, et al. Optimization of lactic ferment with *quinoa* flour as bio-preservative alternative for packed bread[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2015,99(9):3839.
- [12] ROMANO A, MASI P, BRACCIALE A, et al. Effect of added enzymes and *quinoa* flour on dough characteristics and sensory quality of a gluten-free bakery product[J]. European Food Research and Technology,2018,244(9):1595.
- [13] 中国国家标准委员会. 小麦粉 面团的物理特性 吸水量和流变学特性的测定 粉质仪法:GB/T 14614—2006[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [14] 刘海燕,尚珊,王宏兹,等. 糯麦粉对冷冻面团发酵流变特性和面包烘焙特性的影响[J]. 食品科学,2012,33(3):77.
- [15] 吴迪,陈金发. 马铃薯葛根馒头理化及感官特性影响因素研究[J]. 食品科技,2018,43(5):151.
- [16] 张焕新,张伟,徐春仲. 糯小麦粉添加量对配粉流变学特性及馒头品质的影响[J]. 食品科学,2014,35(3):80.
- [17] 中国国家标准委员会. 小麦粉馒头:GB/T 21118—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [18] 张园园,卢宇,阿荣,等. 藜麦粉对小麦面团流变学特性的影响[J]. 食品科技,2016,41(6):159.
- [19] 魏爱春,杨修仕,么杨,等. 藜麦营养成分及生物活性研究进展[J]. 食品科学,2015,36(15):272.
- [20] 张文杰. 藜麦全粉与淀粉的理化性质与结构研究及应用[D]. 郑州:郑州轻工业学院,2016.
- [21] 陈瑞红. 短链菊粉对馒头品质的影响[D]. 洛阳:河南科技大学,2014.
- [22] 张春庆,李晴祺. 影响普通小麦加工馒头质量的主要品质性状的研究[J]. 中国农业科学,1993,26(2):39.
- [23] 林金剑. 多种谷物馒头粉的研究[D]. 无锡:江南大学,2008.
- [24] PUTSEYS J A, DERDE L J, LAMBERTS L, et al. Functionality of short chain amylose-lipid complexes in starch-water systems and their impact on in vitro starch degradation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(3):1939.



引用格式:许丹云,王维,马爱民.融合疏水蛋白在毕赤酵母中的表达及其性质研究[J].轻工学报,2018,33(6):71-81.

中图分类号:TS201;S646.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.009

文章编号:2096-1553(2018)06-0071-11

融合疏水蛋白在毕赤酵母中的表达及其性质研究

Study on expression of fusion hydrophobin in *Pichia pastoris* and its properties

许丹云,王维,马爱民

XU Danyun, WANG Wei, MA Aimin

华中农业大学 食品科学技术学院,湖北 武汉 430070

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

关键词:

融合疏水蛋白;毕赤酵母;转化子;响应面分析;乳化性;起泡性

Key words:

fusion hydrophobin;
Pichia pastoris;
transformant;
response surface
optimization;
emulsibility; foamability

摘要:运用基因改造方法,将不同来源的 I 型疏水蛋白基因(平菇的 *Po. hyd1* 和香菇的 *Le. hyd*) 拼接后,构建融合表达载体 pPIC9k-*Po. hyd1-Le. hyd*,并将其电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,经 PCR 验证和遗传霉素 G418 的抗性筛选,得到 3 个高效表达的毕赤酵母转化子;运用三氟乙酸方法分离纯化发酵上清液中的融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd*,经检测其单体分子量约为 26 kD。运用单因素试验和响应面分析试验优化,得到毕赤酵母转化子的最佳诱导表达条件为碳源(甲醇)质量分数为 0.62%,氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度为 8.39 g/L,发酵培养基的初始 pH 值为 6.05,YNB 质量浓度为 100 mg/L,装液量为 50 mL,初始 OD_{600} 值为 1.2。此时融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的产量最高可达 30 mg/L。对融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 起泡性和乳化性的研究发现,其蛋白性质均优于从平菇菌丝中提取的疏水融合蛋白。

收稿日期:2018-07-24

基金项目:国家自然科学基金项目(30771502)

作者简介:许丹云(1990—),女,广东省汕头市人,华中农业大学博士研究生,主要研究方向为食品生物技术。

通信作者:马爱民(1965—),男,湖北省天门市人,华中农业大学教授,主要研究方向为食品生物技术。

Abstract: Two hydrophobin genes, *Po. hyd1* of *Pleurotus ostreatus* and *Le. hyd* of *Lentinula edodes* were ligated to construct the expression vector pPIC9k-*Po. hyd1-Le. hyd*, and then it was transferred into the *Pichia pastoris* GS115 competent cells by electroporation. After PCR validation and geneticin G418 resistance screening, three highly expressed *Pichia pastoris* transformants were obtained. After separation and purification of fusion hydrophobin *Po. hyd1-Le. hyd* from fermentation supernatant by the trifluoroacetic acid method, it showed that its monomer was about 26 kD. The fermentation conditions of *P. pastoris* were optimized by single factor and response surface analysis and the best fermentation conditions were showed as followed: the mass fraction of carbon source (methanol) was 0.62%, the mass concentration of nitrogen source (m (yeast extract) : m (peptone) = 1 : 2) was 8.39 g/L, the initial pH value of the fermentation medium was 6.05, the mass concentration of YNB was 100 mg/L, the fluid amount was 50 mL and the initial OD₆₀₀ value was 1.2. Under the above conditions, the maximum yield of the fusion hydrophobin *Po. hyd1-Le. hyd* could be up to 30 mg/L. The foaming and emulsifying properties of the fusion hydrophobin *Po. hyd1-Le. hyd* were investigated and they were all better than that of fusion hydrophobin extracted from the *Pleurotus ostreatus* mycelium.

0 引言

疏水蛋白是由丝状真菌分泌所产生的一类具有特殊理化性质的小分子量两性蛋白,这类蛋白约含有 100 个氨基酸,分子量约为 10 kD^[1]. 根据氨基酸排列方式和性质的不同,疏水蛋白被分为 I 型疏水蛋白和 II 型疏水蛋白两种^[2]. I 型疏水蛋白聚合物具有高度的不溶解性,只解离于强酸(如甲酸和三氟乙酸等); II 型疏水蛋白形成的蛋白膜稳定性较差,可溶于特定质量分数或体积分数的 SDS 溶液或乙醇溶液^[3-4]. 两种疏水蛋白的氨基酸序列保守性都很低,但在结构上存在共性,即都含有由 8 个半胱氨酸残基形成的 4 个二硫键. 这一特殊的结构使疏水蛋白能在亲水和疏水界面自组装形成纳米级蛋白薄膜,使疏水性表面具有可湿性、亲水性表面具有疏水性^[5-6],因此,疏水蛋白是一种天然的表面活性剂.

疏水蛋白特殊的结构与性质使它具有广阔的应用前景:在食品方面,可作为食品的稳定剂,也可用于充气食品生产^[7]和食品保鲜^[8]等;在医学方面,可作为生物医学材料^[9-10];在蛋白质分离应用^[11]、蛋白(酶)固定化^[12]和生物传感器电极修饰^[13]等方面,也都具有潜在的应用价值. 然而,从天然丝状真菌提取疏水蛋白产

量较低,且真菌的生长周期长,因此限制了疏水蛋白的推广与应用. 为了提高疏水蛋白的产量,已有研究通过原核和真核表达系统分离纯化疏水蛋白^[14]. 例如,在大肠杆菌表达系统中, I 型疏水蛋白的产量仅为毕赤酵母中的 1/100 ~ 1/10^[15-17],且外源蛋白只有部分活性^[14];而毕赤酵母作为另一种常见的异源表达系统,具有生长速度快、培养成本低、适合表达真核生物蛋白等优势^[18].

本研究拟通过基因改造,将不同来源的 I 型疏水蛋白基因(平菇的 *Po. hyd1* 和香菇的 *Le. hyd*) 拼接后,构建融合表达载体,并将其电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,再经 PCR 验证和遗传霉素抗性的筛选,获得高效表达的毕赤酵母转化子;运用单因素试验和响应面分析试验,优化毕赤酵母转化子的诱导表达条件,研究融合疏水蛋白的起泡性和乳化性,以期对疏水蛋白的改性和应用提供参考.

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

平菇 P739, 香菇 L54, 毕赤酵母 GS115, pPIC9k 质粒,由华中农业大学食品科学技术学院微生物实验室保存.

1.2 试剂与仪器

主要试剂:大肠杆菌 DH5 α , pMD18-T 克隆载体,限制性内切酶 *Asu* II, *Xho* I, *Not* I, *Sac* I, T₄ DNA Ligase, TaKaRa RNAiso TM plus, TaKaRa 公司产;配制 PCR 体系试剂, DNA 分子量标准, 低分子量蛋白标准, TransScript[®] One-Stepg DNA Removal, cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒, TransGen 公司产;凝胶纯化试剂盒、回收试剂盒、质粒提取试剂盒, Axygen 公司产; SDS-PAGE 试剂盒, 谷歌生物公司产;葡萄糖 (AR)、甲醇 (AR)、酵母提取物 (AR)、蛋白胨 (AR)、考马斯亮蓝 R-250 (BR)、考马斯亮蓝 G-250 (AR)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、牛血清白蛋白 (BSA, BR)、国药集团化学试剂有限公司产;遗传霉素 (G418, AR)、酵母无氨基酸氮源 (YNB, AR), Biosharp 公司产;三氟乙酸 (TFA, AR), Sigma 公司产;Bradford 蛋白定量试剂盒, Tiangen 公司产;引物合成, 天一辉远有限公司。

毕赤酵母培养及诱导所用的培养基 YPD, MM, MD, BMGY, BMMY 都参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册配制。

主要仪器: LRH - 150B 型生化培养箱, 广东省医疗器械厂产; T100 型 PCR 仪, Bio-Rad 公司产; GEL LOGIC 200 型凝胶成像分析系统, Kodak 公司产; 722 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Centrifuge 5417R 型高速冷冻离心机, Eppendorf 公司产; Micro pulser 电

转化仪, Bio-Rad 公司产; LD plus 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司产; JY92 - IIN scientz 超声波细胞破碎仪, 上海京灿实业有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 基因克隆与载体构建

将平菇 P739 和香菇 L54 接种在 PDA 平板上, 当菌丝长满平板时, 收集菌丝。平菇 P739 和香菇 L54 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成参照 TaKaRa RNAiso TM plus, TransScript[®] One-Stepg DNA Removal 和 cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒的使用说明书。根据 NCBI 公布的平菇和香菇的疏水蛋白基因序列 (GenBank: AF331452 和 AF217807.1), 并利用软件 Primer 5.0 设计的引物序列见表 1。

以平菇 P739 的 cDNA 为模板, 运用引物 *Po. hyd1*-F/R 扩增平菇 P739 疏水蛋白基因 *Po. hyd1*。扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环数为 34 个。同理, 以香菇 L54 的 cDNA 为模板, 用引物 *Le. hyd*-F/R 扩增疏水蛋白基因 *Le. hyd*, 除退火温度为 58 °C 外, 其余条件同前。胶回收 PCR 扩增得到的产物, 并将产物与 pMD18-T 克隆载体连接后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 细胞中。菌落送往天一辉远有限公司测序。分别提取含有 *Po. hyd1* 和 *Le. hyd* 基因的质粒, 并分别用限制性内切酶 *Asu* II, *Xho* I 和 *Xho* I, *Not* I 双酶切 PCR 纯化产物, 同时用 *Asu* II, *Not* I 双酶切 pPIC9k 质粒, 通过酶连方法构建表达载体 pPIC9k-*Po. hyd1*-*Le. hyd*

表 1 所用引物序列

Table1 Primers used in this study

引物名称	序列(5' → 3')	说明
<i>Po. hyd1</i> -F	<u>CGAGCTCTACCTAGGATGTTCTCCAAGGCCAC</u>	扩增 <i>Po. hyd1</i> 基因 (去除 TAA)
<i>Po. hyd1</i> -R	<u>CCGCTCGAGAAGACTGACGTTGGTGCA</u>	
<i>Le. hyd</i> -F	<u>CCGCTCGAGATGCTTTCTTTGCTCTCCA</u>	扩增 <i>Le. hyd</i> 基因
<i>Le. hyd</i> -R	<u>AAATATGCGCCGCCTAGAGTTGCAAGGGACT</u>	
α -factor	TACTATTGCCAGCATTGCTG	转化子验证引物
Aox1-3	GCAAATGCCATTCTGACAT	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCCACTCACGAC	测序引物
M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA	

注: 下划线部分表示酶切位点

如图1所示。

1.3.2 电击转化与转化子筛选

参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册,将 pPIC9k-Po. *hyd1*-Le. *hyd* 质粒经 *Sac* I 线性化后,电转化到毕赤酵母 GS115 的感受态细胞中.将转化子对应接种到以葡萄糖为碳源的 MD 和以甲醇为碳源的 MM 培养基上,选择在 MM 和 MD 培养基上均能生长的转化子,并筛选出 His⁺ Mut⁺ 表型转化子.用 α -factor/*Aox1*-3 引物对转化子进行菌落 PCR 验证,再将所筛选得到的转化子分别接种在含有不同质量浓度 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 4.0 mg/mL 和 5.0 mg/mL) 的遗传霉素的 YPD 培养基上,筛选出高效表达的毕赤酵母转化子,并选择在高浓度 G418 中能生长的高效表达的毕赤酵母转化子。

1.3.3 诱导表达条件的优化

1.3.3.1 最佳表达时间的优化 将筛选得到的高效表达的毕赤酵母转化子接种于 25 mL BMGY 培养基中,以转化 pPIC9k 质粒的毕赤酵母 GS115 菌株作为对照,于 28 °C 条件下振荡培养 16 ~ 18 h. 进而于 3000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 将细胞重悬于适当体积的 BMMY 培养基中, 培养至 OD₆₀₀ 值为 1.0 ~ 2.0,

并于 250 r/min, 30 °C 条件下继续振荡培养. 诱导开始后, 每隔 24 h 补加甲醇至其最终体积分数为 0.5%, 并吸取 1 mL 发酵上清液, 于 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清, 用 SDS-PAGE 检测发酵上清液融合疏水蛋白质量浓度, 以确定其最佳收获表达时间。

采用 Bradford 法^[19] 制备牛血清蛋白标准曲线. 从发酵液的上清中取 15 μ L 样品加入到试管中, 用 PBS 缓冲液补足 150 μ L, 再加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 充分混合, 静置 5 min 后用分光光度计测定吸光值, 以不含 BSA 的样品作为空白对照, 记录读数, 通过牛血清蛋白的标准曲线方程计算发酵上清液中蛋白的质量浓度, 通过比较上清液中的蛋白含量得到最佳表达时间。

1.3.3.2 单因素试验 选择碳源(甲醇)质量分数, 氮源(*m*(酵母提取物) : *m*(蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度, YNB 质量浓度, 发酵培养基的初始 pH 值, 装液量, 初始 OD₆₀₀ 值作为影响毕赤酵母表达的因素. 以 BMMY 为诱导表达的基础营养培养基, 如无特殊说明, 均在初始接种量 OD₆₀₀ 值为 1.0, 装液量为 50 mL (250 mL 三角瓶中), 温度为 28 °C, 转速为 180 r/min 的条件下进行诱导表达. 各因素不同条件设定如下: 碳源(甲醇)质量分数为 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% 和 1.2%, 每 24 h 添加 1 次; 氮源(*m*(酵母提取物) : *m*(蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度为 4.0 g/L, 6.0 g/L, 8.0 g/L, 10.0 g/L 和 12.0 g/L; YNB 质量浓度为 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L 和 140 mg/L; 发酵培养基的初始 pH 值为 5.2, 5.6, 6.0, 6.4 和 6.8; 装液量为 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL 和 70 mL; 初始 OD₆₀₀ 值为 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 和 1.4. 根据不同因素进行诱导表达, 取第 4 d 的发酵上清液, 进行融合疏水蛋白质量浓度的测定与分析。

1.3.3.3 响应面试验 在单因素试验的基础

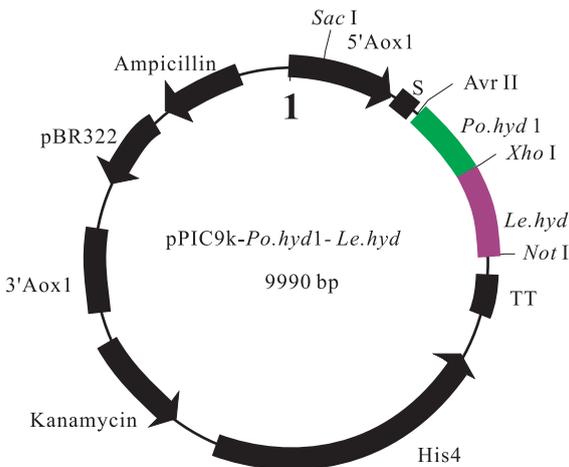


图1 pPIC9k-Po. *hyd1*-Le. *hyd* 载体图

Fig. 1 pPIC9k-Po. *hyd1*-Le. *hyd* portrait

上,以发酵上清液中融合疏水蛋白质量浓度为响应值,选取对菌体生长影响显著的3个因素,即碳源(甲醇)质量分数(X_1)、发酵培养基的初始pH值(X_2)和氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度(X_3),根据Box-Behnken的中心组合设计原理,设计三因素三水平的响应面分析试验。

1.3.4 最佳优化条件下融合疏水蛋白得率的测定 将高效表达的毕赤酵母转化子按照优化后的最佳诱导表达条件培养1L的培养基,按照马爱民等^[20]报道的方法提取发酵上清液融合疏水蛋白,并对沉淀进行称重。

1.3.5 融合疏水蛋白的起泡性和乳化性分析方法 取适量融合疏水蛋白沉淀,加入少量三氟乙酸于4℃溶解30min,经氮气吹干后加适量去离子水4℃静置溶解,配制成50μg/mL的新鲜融合疏水蛋白溶液,以用于研究融合疏水蛋白的性质。分别取10mL质量浓度为50μg/mL的新鲜融合疏水蛋白*Po. hyd1*-*Le. hyd*溶液、平菇疏水蛋白*Po. hyd1*溶液、SDS溶液和蛋白质BSA溶液,经超声波细胞破碎仪均质处理30s(振幅70%),量取起始泡沫高度和30min后泡沫高度^[21]。根据以下两个公式分别计算4种样品的起泡性(*FC*)和泡沫稳定性(*FS*):

$$FC = \text{起始泡沫高度} / \text{总的液面高度}$$

$$FS = 30 \text{ min 后泡沫高度} / \text{起始泡沫高度}$$

分别取10mL新鲜融合疏水蛋白*Po. hyd1*-*Le. hyd*,平菇疏水蛋白*Po. hyd1*溶液和SDS溶液,各加入5mL的食用油,同时用经过相同处理后的去离子水作空白对照。将配制好的样品,用超声波细胞破碎仪均质处理30s(振幅60%),制成乳化液。分别在0min和15min时取0.5mL乳化液置于50mL的容量瓶中,加入质量浓度为50μg/mL的SDS溶液定容并摇匀,以质量浓度为50μg/mL的SDS溶液作空

白对照,在500nm处测定其吸光度 A_0 ,15min后再次测定吸光度值 A_1 ^[22]。融合疏水蛋白的乳化活性用*EA*表示,乳化稳定性用*ES*表示,即

$$EA = A_0$$

$$ES = (A_1 / A_0) \times 100 \%$$

式中, A_0 为乳化液在0min时的吸光值, A_1 为乳化液在静置15min后的吸光值。

1.4 数据分析

所有试验均重复3次,结果取平均值。采用Design Expert 8.0和Origin软件对数据进行处理。

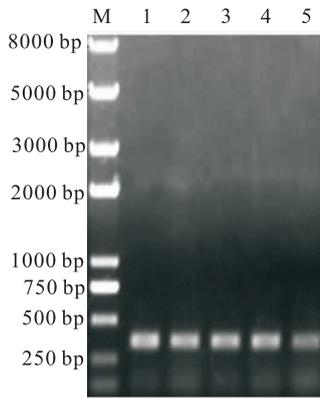
2 结果与分析

2.1 基因克隆与引物序列实验结果

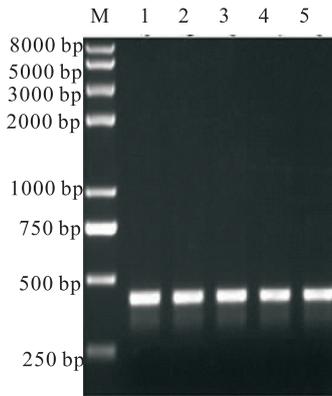
分别以平菇和香菇的cDNA为模板,经PCR扩增平菇P739的疏水蛋白基因*Po. hyd1*和香菇L54的疏水蛋白基因*Le. hyd*,扩增结果如图2a)和b)所示(M表示Trans 2K DNA marker,下同)。再将目的条带切胶回收,连接到pMDT载体上进行测序,测序结果显示:平菇P739的疏水蛋白基因*Po. hyd1*为333bp,香菇L54的疏水蛋白基因*Le. hyd*为384bp,与NCBI公布的序列一致。通过酶切酶连方法,将平菇P739的疏水蛋白基因*Po. hyd1*和香菇L54的疏水蛋白基因*Le. hyd*拼接在一起,构建pPIC9k-*Po. hyd1*-*Le. hyd*表达载体,并将该表达载体电转化到毕赤酵母GS115细胞中,酵母转化子菌落PCR验证结果如图2c)所示,共获得100个转化子。该结果与实验预期相符。

2.2 高效表达酵母转化子的筛选结果

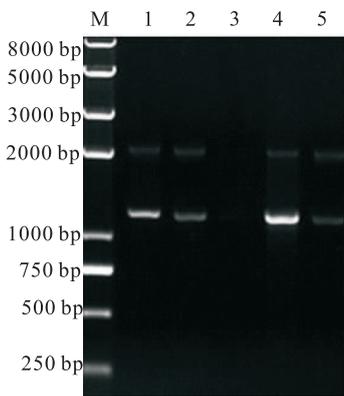
将获得的酵母转化子对应接种于MD和MM培养基上,选择在这两种培养基上生长速度相似的转化子,即为His⁺Mut⁺表型的转化子。再将转化子对应接种于G418抗性平板上进行高效表达酵母转化子的筛选(如图3所示),最终筛选出3个高效表达酵母转化子。



a)平菇P739疏水蛋白基因*Po.hyd1*扩增结果



b)香菇L54疏水蛋白基因*Le.hyd*扩增结果



c)酵母转化子菌落PCR验证结果

图2 疏水蛋白基因扩增与酵母转化子的菌落PCR验证

Fig.2 Gene amplification of hydrophobic protein and colony PCR confirmation of yeast transformants

2.3 酵母转化子的诱导表达

随机挑取一个高效表达酵母转化子进行诱导表达实验,每天收集发酵上清液,并进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 4a)所示(M 表示低分子量蛋白质标准,下同;1 表示 96 h 空质粒酵

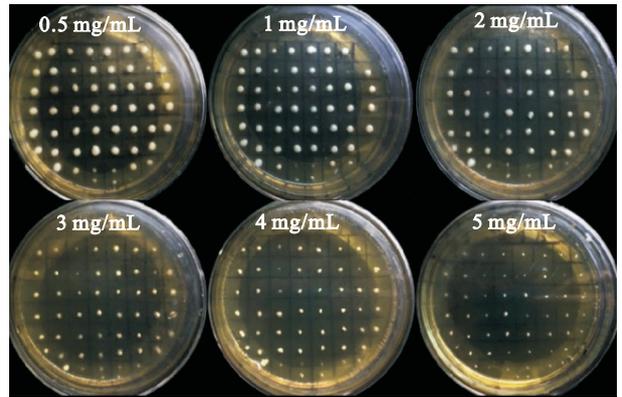


图3 高效表达酵母转化子的筛选

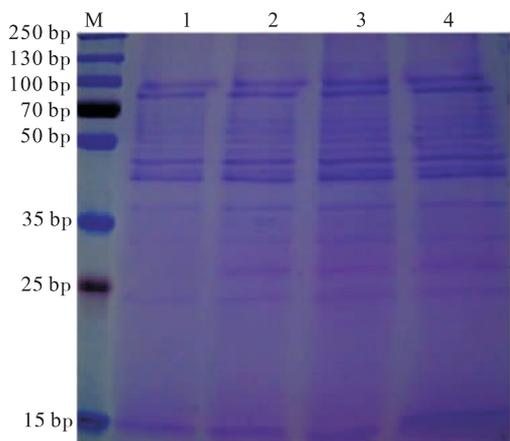
Fig.3 Screening of multicopy transformants

母发酵上清液;2—4 分别表示 48 h,72 h,96 h 重组质粒酵母发酵上清液)。图 4a)显示:含有重组表达质粒的酵母菌在 26 kD 左右有条带,而含空质粒的毕赤酵母则没有.这表明该高效酵母转化子能成功表达目的蛋白.利用三氟乙酸法分离纯化目的蛋白,并进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4b)所示.由图 4b)可知,在 1 号泳道 26 kD 处有明显的条带,与融合疏水蛋白理论值相符合,且没有其他杂带.这表明分离纯化成功.

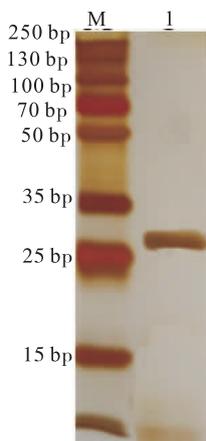
由图 5 所示牛血清蛋白标准曲线可以得到,测定蛋白质量浓度的方程为 $y = 0.0153x$, $R^2 = 0.99876$. 分别测定每天发酵上清液的蛋白质量浓度,结果如图 6 所示.由图 6 可知,酵母菌的最佳诱导表达时间为诱导后第 4 d.

2.4 诱导表达条件的优化结果

2.4.1 单因素试验结果 单因素试验结果如图 7 所示.其中,不同发酵培养基的初始 pH 值、不同碳源(甲醇)质量分数和不同氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度对酵母表达影响较大,因此选取这 3 个因素进行进一步的响应面优化试验.由于其他 3 个因素对酵母表达影响较小,后续试验将 YNB 的质量浓度设定为 100 mg/L,装液量设定为 50 mL,初始 OD_{600} 值设定为 1.2.



a)不同诱导表达时间的发酵上清液蛋白SDS-PAGE分析结果



b)分离纯化后重组蛋白SDS-PAGE分析结果

图4 诱导表达的重组蛋白 SDS-PAGE 分析结果
Fig.4 Results of inducible expression recombinant proteins by SDS-PAGE analysis

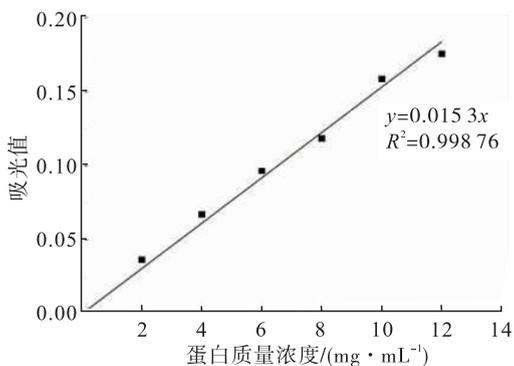


图5 牛血清蛋白标准曲线

Fig.5 The standard curve of bovine seroprotein

2.4.2 响应面试验结果 在单因素试验的基础上设计多因素试验,试验因素与水平选择见表2。

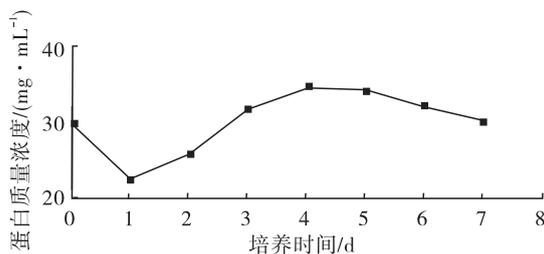


图6 培养时间对发酵液蛋白质量浓度的影响
Fig.6 Effect of induction time on protein content in fermentation broth

表2 试验因素与水平表

Table 2 Test factors and levels table

水平	$X_1/\%$	X_2	$X_3/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
-1	0.4	5.6	6.0
0	0.6	6.0	8.0
1	0.8	6.4	10.0

利用 Design-Expert8.0 软件对响应面的试验数据进行多元回归拟合,得到发酵上清液融合疏水蛋白质量浓度(Y_1)对培养基碳源(甲醇)质量分数(X_1)、氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度(X_2)和发酵培养基的初始 pH 值(X_3)的二次多项回归模型方程为

$$Y_1 = -541.1075 + 84.075X_1 + 12.12875X_2 + 165.09375X_3 - 0.875X_1X_2 + 0.625X_1X_3 - 0.09375X_2X_3 - 65.0625X_1^2 - 0.65687X_2^2 - 13.60938X_3^2$$

对该模型的方差分析结果见表3。由表3可知,碳源(甲醇)质量分数(X_1)、氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度(X_2)和发酵培养基的初始 pH 值(X_3)对重组毕赤酵母产融合疏水蛋白都比较重要,尤其是氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度(X_2)特别显著; X_1X_2 对融合疏水蛋白表达交互影响显著, X_1X_3 和 X_2X_3 交互影响不显著; X_1^2 , X_2^2 和 X_3^2 对融合疏水蛋白表达量有着重要的曲面影响。

根据Box-Behnken原理,各因素响应面交

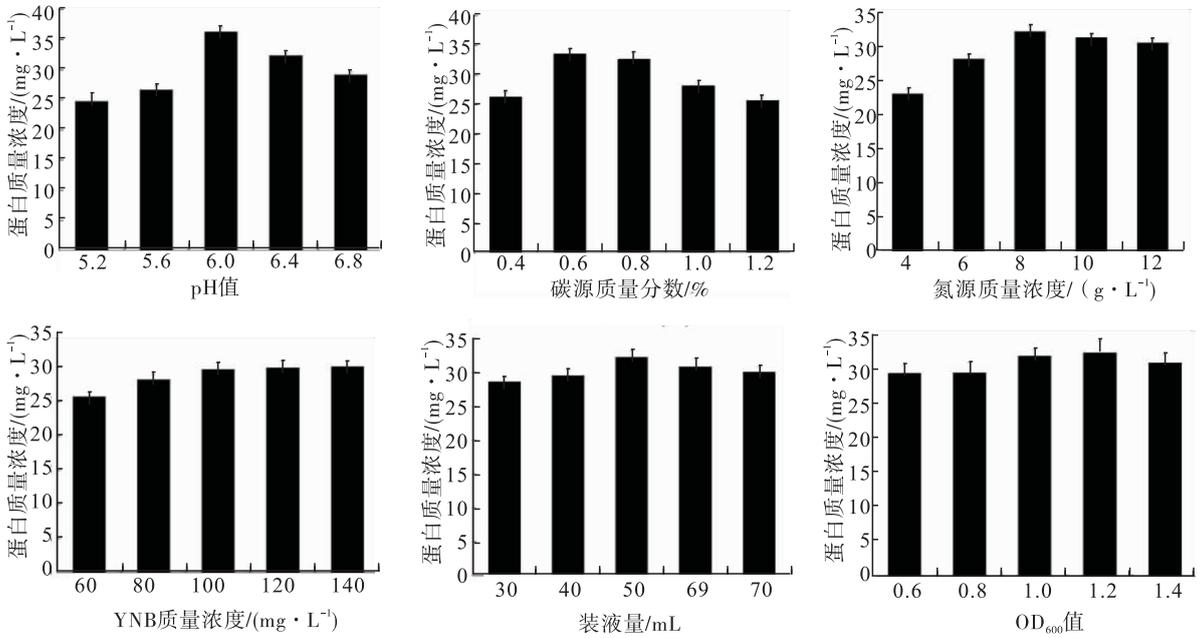


图7 单因素试验结果

Fig. 7 Results of single factor experiments

表3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

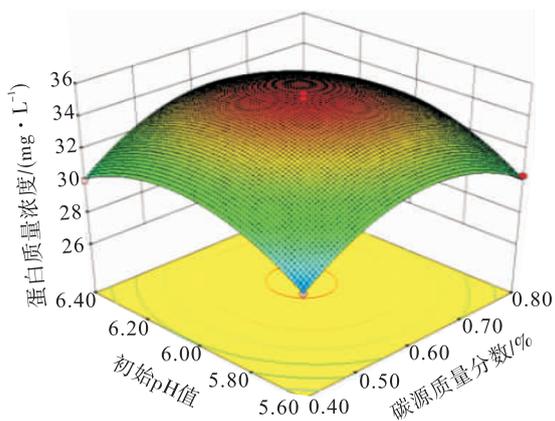
方差来源	F 值	P 值
模型	101.09	< 0.000 1
X_1	2.42	0.007 4
X_2	9.03	0.000 2
X_3	2.53	0.006 6
X_1X_2	0.49	0.137 6
X_1X_3	0.01	0.817 6
X_2X_3	0.02	0.730 0
X_1^2	28.52	<0.000 1
X_2^2	29.07	<0.000 1
X_3^2	19.96	<0.000 1

互作用的分析结果如图8所示. 理论的最佳培养条件为:碳源(甲醇)质量分数为0.62%,氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度为8.39 g/L,发酵培养基的初始pH值为6.05, YNB质量浓度为100 mg/L,装液量为50 mL,初始OD₆₀₀值为1.2,此时融合疏水蛋白的表达量可达最高值35.244 6 mg/L. 根据理论的最佳培养条件对毕赤酵母转化子进行诱导培养,可从1 L的发酵液中分离纯化融合疏水蛋白粉末30 mg.

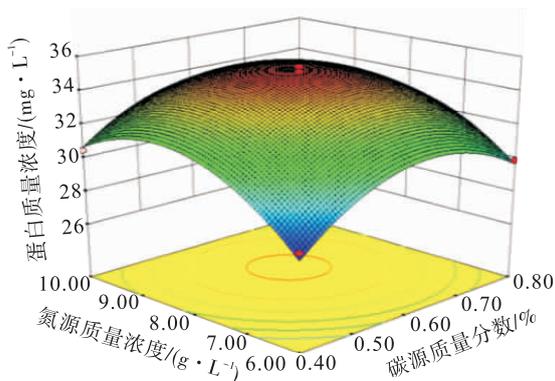
2.5 融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的性质分析

2.5.1 融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的起泡性和泡沫稳定性

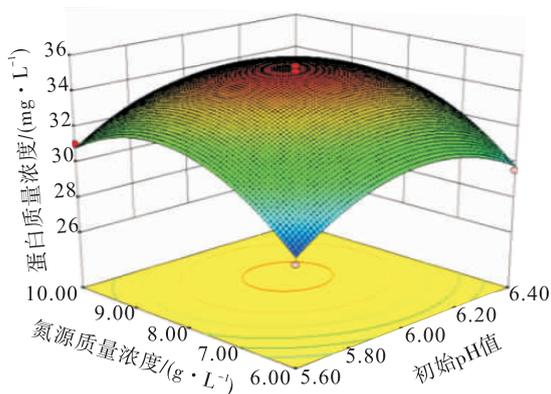
样品的起泡性和泡沫稳定性实验结果见表4. 由表4可知,4种样品的起泡性(FC)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液 > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液 > 蛋白质 BSA 溶液. 其中,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液的起泡性能分别是平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液、表面活性剂 SDS 溶液和蛋白质 BSA 溶液的1.21倍、1.53倍和2.76倍. 另外,4种样品的泡沫稳定性(FS)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 蛋白质 BSA 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液. 其中,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液的泡沫稳定性分别是平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液、表面活性剂 SDS 溶液和蛋白质 BSA 溶液的1.16倍、2.99倍和2.01倍. 由此可见,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的起泡性和泡沫稳定性都优于平菇疏水蛋白、传统



a)初始pH值和碳源质量分数对发酵液上清液蛋白质质量浓度的影响



b)氮源质量浓度和碳源质量分数对发酵液上清液蛋白质质量浓度的影响



c)氮源质量浓度和初始pH值对发酵液上清液蛋白质质量浓度的影响

图8 各因素响应面交互作用的分析结果

Fig. 8 Response surface analysis of interaction of various factors

的表面活性剂 SDS 和蛋白质 BSA.

2.5.2 融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的乳化性和乳化稳定性 样品的乳化性和乳化稳定性实验结果见表5. 由表5可知,4种样品的乳化指数(EA)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-*

Le. hyd 溶液 > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液 > 去离子水. 另外,4种样品的乳化稳定性指数(ES)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液 > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液 > 去离子水. 由此可见,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的乳化性和乳化稳定性都优于平菇疏水蛋白、传统的表面活性剂 SDS 和去离子水.

表4 样品的起泡性和泡沫稳定性

Table 4 Formability and foam stability of samples

样品	初始泡沫高度/mm	30 min 泡沫高度/mm	总液体高度/mm	FC/%	FS/%
融合疏水蛋白 <i>Po. hyd1-Le. hyd</i> 溶液	34.2	28.4	50	68.4	83.04
平菇疏水蛋白 <i>Po. hyd1</i> 溶液	28.2	20.1	50	56.4	71.28
表面活性剂 SDS 溶液	22.3	6.2	50	44.6	27.80
蛋白质 BSA 溶液	12.4	5.1	50	24.8	41.29

表5 样品的乳化性和乳化稳定性

Table 5 Emulsifying and emulsifying stability of samples

样品	吸光度值 A	15 min 后吸光度值 A ₁	EA	ES
融合疏水蛋白 <i>Po. hyd1-Le. hyd</i> 溶液	0.841	0.835	84.1	14.89
平菇疏水蛋白 <i>Po. hyd1</i> 溶液	0.717	0.692	71.2	14.48
表面活性剂 SDS 溶液	0.535	0.486	53.5	13.63
去离子水	0.228	0.192	22.8	12.63

3 结语

本研究通过基因改造方法,将不同来源的 I 型疏水蛋白基因(平菇的 *Po. hyd1* 和香菇的 *Le. hyd*) 经拼接后构建融合表达载体 pPIC9k-*Po. hyd1-Le. hyd*, 并将其电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,经 PCR 扩增和遗传霉素抗性筛选,得到 3 个高效表达的毕赤酵母转化子;通过三氟乙酸方法分离纯化发酵上清液中的融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd*, 经检测其单

体分子量约为 26 kD. 应用单因素试验和响应面分析试验进行优化, 得到毕赤酵母转化子的最佳诱导表达条件为: 碳源(甲醇)质量分数为 0.62%, 氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨) = 1:2)质量浓度为 8.39 g/L, 发酵培养基的初始 pH 值为 6.05, YNB 质量浓度为 100 mg/L, 装液量为 50 mL, 初始 OD₆₀₀ 值为 1.2. 此时融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 可达最高产量 30 mg/L. 对融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的起泡性和乳化性研究发现, 其蛋白性质均优于从平菇菌丝中提取的疏水融合蛋白.

参考文献:

- [1] WESSELS J G H. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface [J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(1):9.
- [2] WÖSTEN H A B, de VOCHT M L. Hydrophobins, the fungal coat unraveled [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1469(2):79.
- [3] LUGONES L G, WÖSTEN H A B, BIRKENKAMP K U, et al. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus* [J]. Mycological Research, 1999, 103(5):735.
- [4] LINDER M B. Hydrophobins: proteins that self assemble at interfaces [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2009, 14(5):356.
- [5] 丁靖志, 于雷, 王洪辉, 等. 真菌疏水蛋白的结构和功用 [J]. 生物学杂志, 2004, 21(5):8.
- [6] 林福呈. 真菌疏水蛋白的研究进展 [J]. 微生物学报, 2001, 41(4):518.
- [7] BLIJDENSTEIN T B J, GROOT P W N, STOYANOV S D. On the link between foam coarsening and surface rheology: Why hydrophobins are so different [J]. Soft Matter, 2010, 6(8):1799.
- [8] BURKE J, COX A, PETKOV J, et al. Interfacial rheology and stability of air bubbles stabilized by mixtures of hydrophobin and β -casein [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 34(1):119.
- [9] WÖSTEN H A, SCHOLTMEIJER K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4):1587.
- [10] HEKTOR H J, SCHOLTMEIJER K. Hydrophobins: proteins with potential [J]. Biotechnology, 2005, 16(4):434.
- [11] LINDER M, SELBER K, NAKARI-SETÄLÄ T, et al. The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems [J]. Biomacromolecules, 2001, 2(2):511.
- [12] ZHAO Z X, WANG H C, QIN X, et al. Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009, 71(1):102.
- [13] LAAKSONEN P, KAINLAURI M, LAAKSONEN T, et al. Interfacial engineering by proteins: exfoliation and functionalization of graphene by hydrophobins [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2010, 49(29):4946.
- [14] 王泽芳. 疏水蛋白 HGFI 的表达、功能应用及自组装机理研究 [D]. 天津: 南开大学, 2010.
- [15] KIISKINEN L L, KRUIUS K, BAILEY M, et al. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme [J]. Microbiology, 2004, 150(9):3065.
- [16] KUDO T, SATO Y, TASAKI Y, et al. Heterogeneous expression and emulsifying activity of class I hydrophobin from *Pholiota nameko* [J]. Mycoscience, 2011, 52(4):283.
- [17] MORRIS V K, KWAN A H, MACKAY J P,

- et al. Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(2):244.
- [18] ROTHAN H A, TEH S H, Haron K, et al. A comparative study on the expression, purification and functional characterization of human adiponectin in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(3):3549.
- [19] BRADFORD M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248.
- [20] 马爱民,单麟军,杜昭平,等. 糙皮侧耳(平菇)疏水蛋白的分离纯化及其界面自组装特性研究 [J]. *菌物学报*, 2007, 26(4):557.
- [21] 沈心好,许时婴,王璋. 番茄籽蛋白的功能和结构 [J]. *食品科学*, 2005, 26(11):42.
- [22] 顾楠,张子沛,吴锦波,等. 不同处理方式对鹰嘴豆分离蛋白乳化性质的影响 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(12):158.
-
- (上接第 54 页)
- [42] ZHU J, CHEN M, HE Q, et al. An overview of the engineered graphene nanostructures and nanocomposites [J]. *Rsc Advances*, 2013, 3(45):22790.
- [43] HUANG J, ZHAO L, WANG T, et al. NIR-Triggered rapid shape memory PAM-GO-Gelatin hydrogels with high mechanical strength [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(19):12384.
- [44] PIAO Y, CHEN B. One-pot synthesis and characterization of reduced graphene oxide-gelatin nanocomposite hydrogels [J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(8):6171.
- [45] HASSANZADEH P, KAZEMZADEHNARBAT M, ROSENZWEIG R, et al. Ultrastrong and flexible hybrid hydrogels based on solution self-assembly of chitin nanofibers in gelatin methacryloyl (GelMA) [J]. *J Mater Chem B Mater Biol Med*, 2016, 4(15):2539.
- [46] NAN L, WEI C, CHEN G, et al. Rapid shape memory TEMPO-oxidized cellulose nanofibers/polyacrylamide/gelatin hydrogels with enhanced mechanical strength [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171:77.



引用格式: 申永鹏, 刘安康, 崔光照, 等. 不平衡电桥电动汽车绝缘电阻在线检测系统设计 [J]. 轻工学报, 2018, 33(6): 82 - 91.

中图分类号: TM855; TS976.9 文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.010

文章编号: 2096-1553(2018)06-0082-10

不平衡电桥电动汽车绝缘电阻 在线检测系统设计

Design of online detection system for insulation resistance of electric vehicle based on unbalanced bridge

申永鹏, 刘安康, 崔光照, 葛高瑞

SHEN Yongpeng, LIU Ankang, CUI Guangzhao, GE Gaorui

郑州轻工业学院 电气信息工程学院, 河南 郑州 450002

College of Electrical and Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

关键词:

电动汽车; 动力电池;
绝缘检测; 电桥电路

Key words:

electrical vehicle;
power battery;
insulation detection;
bridge circuit

摘要:针对现有电动汽车绝缘检测系统精度低、检测时间长、可靠性差等问题, 用电阻分压测量、光控继电器替代传统继电器, 设计了一种基于高精度仪表放大器的不平衡电桥绝缘电阻在线检测电路, 并提出了四步骤绝缘电阻在线计算方法. 运用本检测系统对某轻型货车进行多组绝缘电阻测试实验, 结果表明, 该系统能够将绝缘电阻测量精度控制在误差5%以下, 同时还具有可在线检测、可靠性高等优点.

收稿日期: 2018-07-25

基金项目: 河南省科技开放合作项目(182106000032); 郑州轻工业学院研究生创新基金项目(2017012)

作者简介: 申永鹏(1985—), 男, 河南省安阳市人, 郑州轻工业学院讲师, 博士, 主要研究方向为新能源汽车电驱动系统的优化与控制.

Abstract: Aiming at the problems of low accuracy, long detection time and poor reliability of existing insulation detection system for electric vehicles, on the basis of studying the inherent mechanism of the measurement accuracy and reliability of insulation resistance for electric vehicles, replacing traditional electric relay by resistance partial measurement and optical control relay, an insulation resistance detection circuit of unbalanced bridge based on high-precision instrument amplifier was designed, then a four-step on-line calculation method of insulation resistance was proposed. Finally, a number of insulation resistance tests were completed for a light truck. The results showed that the detection system could achieve 5% insulation resistance measurement accuracy, and had the advantages of on-line detection and high reliability.

0 引言

动力电池作为电动汽车的能量来源,其电压通常高于 36 V,甚至达到几百 V,远远超过了人体安全所能承受的电压,因此直流母线与整车保持良好的绝缘状态至关重要^[1]。然而电动汽车是一个复杂的机电一体化产品,包含电机及其控制器、车载充电机、辅助电池充电装置等高压电器,这些部件的工作条件又比较复杂,振动、酸碱气体的腐蚀、温湿度的变化,都有可能造成直流母线和其他绝缘材料老化甚至破损,使设备绝缘强度大大降低,进而危及司乘人员安全^[2]。因此,对动力电池的正极、负极与车体之间的绝缘电阻进行实时检测,是对电动汽车基本安全的要求之一^[3-5]。

现有绝缘检测技术可分为电桥法^[6-8]和信号注入法两大类^[9-11]。

电桥法测量绝缘电阻的基本原理如下:基于电桥电路原理,通过控制动力电池正、负极两边继电器的开通与关断,得到几种不同的测试点电压组合状态,并据此来计算系统的绝缘阻值。尽管该方法具有测量简单的优点,但是存在如下不足:机械开关继电器开断灵敏度低,且存在机械磨损问题,可靠性低^[12];采用多个运算放大器,电路的一致性差,精度较低^[13]。张向文等^[14]采用电桥法检测绝缘电阻,但是需要采集多处电压信号,增加了系统设计的复杂度。

信号注入法测量绝缘电阻基本原理如下:在直流母线与车体之间注入一定频率的电压信

号,通过测量反馈的信号来计算绝缘阻值。该方法能够检测出正、负端绝缘电阻同时下降的情况,但是注入信号会造成直流系统纹波增大,影响所供电的品质,进而影响采样精度^[15]。何耀等^[16]采用信号注入法结合内阻模型进行绝缘电阻测量,由于充分考虑了实际工况,稳定性明显提高,但是最大绝对测量误差仍高达 16.23%。

针对现有绝缘检测技术存在的精度差、算法实现复杂等问题,本文拟提出一种绝缘电阻检测的改进算法,并设计一种不平衡电桥检测电路,以期提高绝缘电阻的检测精度,并实现同时在线测量多种情况下动力电池正、负端绝缘电阻。

1 传统电桥法绝缘电阻检测方法及其存在问题分析

传统电桥法绝缘电阻检测电路如图 1 所示。正端绝缘电阻 R_+ 定义为动力电池正极母线与车身地之间的电阻值,负端绝缘电阻 R_- 定义为动力电池负极母线与车身地之间的电阻值。

采用该方法时,首先断开继电器 K_1 和 K_2 ,可得

$$V_1 = \frac{R_+}{R_+ + R_-} V_{\text{总}} \quad (1)$$

$$V_2 = \frac{R_-}{R_+ + R_-} V_{\text{总}} \quad (2)$$

闭合继电器 K_1 ,断开继电器 K_2 ,可得

$$V_3 = \frac{R_+ // R_1}{R_+ // R_1 + R_-} V_{\text{总}} \quad (3)$$

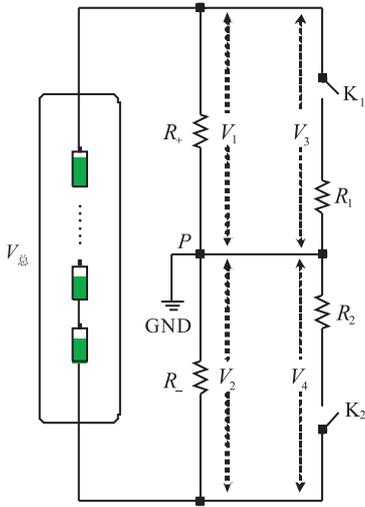


图1 传统电桥电路等效电路图

Fig. 1 Equivalent circuit of typical bridge circuit

$$V_4 = \frac{R_-}{R_+ // R_1 + R_-} V_{总} \quad (4)$$

结合式①②③④可计算出正端绝缘电阻阻值

$$R_+ = \left(\frac{V_4 V_1}{V_3 V_2} - 1 \right) R_1$$

同理,可得负端绝缘电阻阻值

$$R_- = \left(\frac{V_3 V_2}{V_4 V_1} - 1 \right) R_2$$

该方法存在如下两个问题:

- 1) 需要测量正、负绝缘电阻两端的电压,系统结构复杂且存在较大误差;
- 2) 当正、负端绝缘电阻中有一个阻值为零时,方程无解.

2 不平衡电桥法绝缘电阻检测方法

针对传统电桥法绝缘电阻检测存在的问题,本文设计一种如图2所示的不平衡电桥法绝缘电阻检测电路,采用光控继电器和高精度仪表放大器以提高检测的精度和可靠性、降低电路的复杂度,并通过电阻分压测量电压保证计算过程中方程有解.检测电路中元器件的参数将会在3.1节中详细介绍.

不平衡电桥法绝缘电阻检测等效电路如图

3所示,其中P点为测量 V_+ 和 V_- 的参考零电位点,与车体地连接.

四步骤绝缘电阻在线计算方法具体步骤如下.

2.1 测量动力电池总电压

以动力电池负端为基准电压参考点,测量动力电池总压,此时闭合继电器 K_1 与 K_2 ,其等效电路如图4所示.

图4中, i_1 和 i_2 分别为流经上桥臂和下桥臂的电流,动力电池两端的总电压即为正端与P点之间电压和负端与P点之间电压之和.

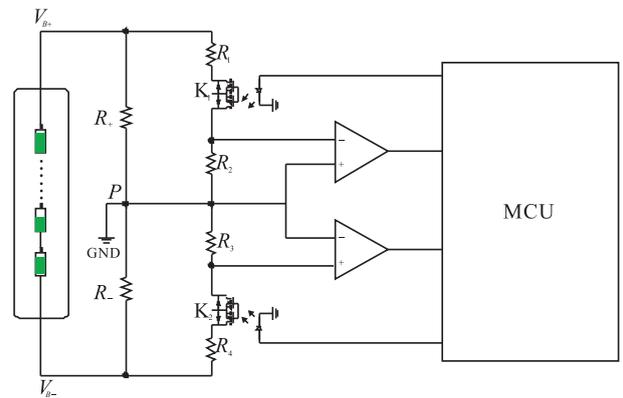


图2 不平衡电桥绝缘电阻检测电路

Fig. 2 Insulation resistance detection circuit based on unbalanced bridge

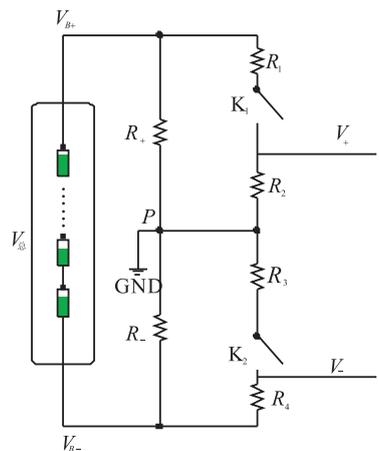


图3 不平衡电桥法绝缘电阻检测电路的等效电路图

Fig. 3 Equivalent circuit diagram of detection circuit based on unbalanced bridge

$$V_{\text{总}} = i_1(R_1 + R_2) + i_2(R_3 + R_4) = \frac{V_+}{R_2}(R_1 + R_2) + \frac{V_-}{R_3}(R_3 + R_4)$$

2.2 测量上桥臂采样点电压信号

通过单片机控制使光控继电器 K_1 闭合, K_2 断开, 选取 P 为基准电压参考点, 等效电路如图 5 所示。

动力电池正、负两端电流 i_1 和 i_2 参考方向如图 5 所示, 通过检测电路检测到电阻 R_2 与 P 点之间的电压为 V_+ , 即可得出流过 R_1 和 R_2 的

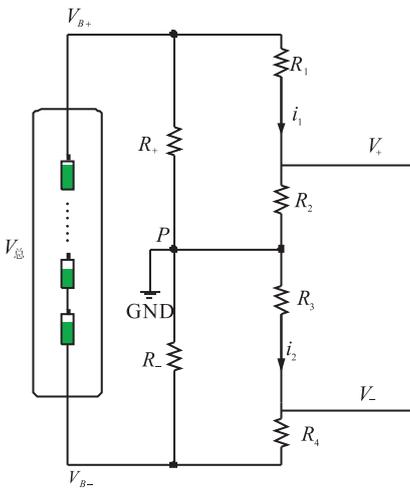


图 4 K_1 和 K_2 同时闭合时的等效电路图

Fig. 4 Equivalent circuit when K_1 and K_2 connected

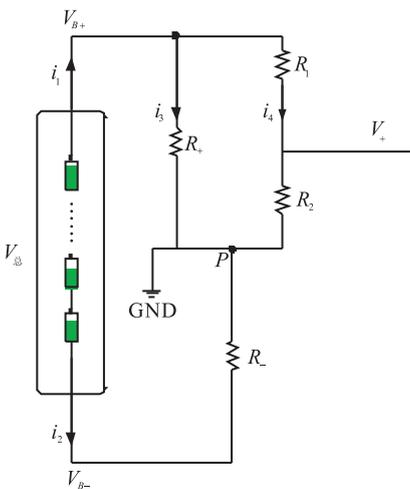


图 5 K_1 闭合、 K_2 断开时的等效电路图

Fig. 5 Equivalent circuit when K_1 connected and K_2 disconnected

电流

$$i_4 = \frac{V_+}{R_2}$$

动力电池正端与参考点 P 之间的电压

$$V_{B+} = V_+ \left(1 + \frac{R_1}{R_2} \right)$$

流过正端绝缘电阻 R_+ 上的电流

$$i_3 = \frac{V_{B+}}{R_+}$$

动力电池正端电流

$$i_1 = i_3 + i_4 = \frac{V_{B+}}{R_+} + \frac{V_+}{R_2} = V_+ \left(\frac{1}{R_+} + \frac{R_1}{R_+ R_2} + \frac{1}{R_2} \right)$$

因 $V_{B+} + V_{B-} = V_{\text{总}}$, $i_1 + i_2 = 0$, 故可得

$$(R_1 + R_2)R_- + R_+R_- = R_2 \frac{V_{B-}}{V_+} R_+ \quad (5)$$

2.3 测量下桥臂采样点电压信号

通过单片机使光控继电器 K_1 断开、 K_2 闭合, 等效电路如图 6 所示。

由于电路发生变化, 基准电压参考点 P 的实际电压发生改变, 因此正负极相对于参考零电位点的电压、电流均发生变化, 与 2.2 同理可得

$$(R_3 + R_4)R_+ + R_+R_- = R_3 \frac{V_{B+}}{V_-} R_- \quad (6)$$

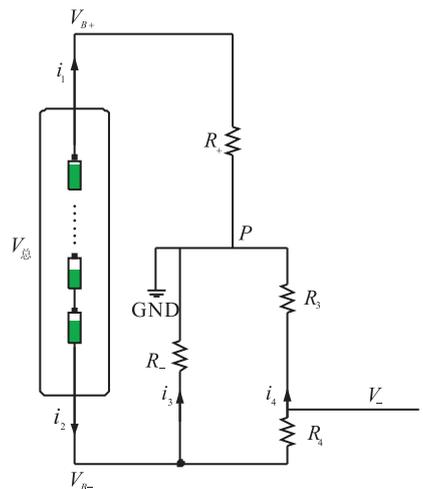


图 6 K_2 闭合、 K_1 断开时的等效电路图

Fig. 6 Equivalent circuit when K_2 connected and K_1 disconnected

2.4 绝缘电阻阻值计算

通过上述步骤测得采样点电压 V_+ 与 V_- ，根据电压的不同正负端绝缘电阻又分为如下4种情况。

情况1 V_+ 与 V_- 都等于零时，正端绝缘电阻值 R_+ 与负端绝缘电阻值 R_- 都等于无穷大。

情况2 V_+ 等于零、 V_- 不等于零时，负端绝缘电阻值 R_- 等于无穷大，断开继电器 K_1 ，闭合继电器 K_2 ，等效电路如图6所示。

流经正端绝缘电阻 R_+ 上的电流 $i_1 = i_4$ ，进而可得

$$R_+ = \frac{V_{B+}}{i_1} = \frac{V_{总} - \frac{V_-}{R_3}(R_3 + R_4)}{\frac{V_-}{R_3}}$$

情况3 V_+ 不等于零、 V_- 等于零时，正端绝缘电阻值 R_+ 等于无穷大，闭合继电器 K_1 ，断开继电器 K_2 ，等效电路如图5所示。

流经负端绝缘电阻 R_- 上的电流 $i_2 = i_4$ ，进而可得

$$R_- = \frac{V_{B-}}{i_2} = \frac{V_{总} - \frac{V_+}{R_2}(R_1 + R_2)}{\frac{V_+}{R_2}}$$

情况4 V_+ 与 V_- 都不等于零时，绝缘电阻

的计算过程如下。

公式⑤⑥相减可得

$$R_+ = \frac{R_1 + R_2 - R_2 \frac{V_{B-} R_1 + R_2 + R_3 + R_4}{V_+} R_2 \frac{V_{B-}}{V_+} + R_3 \frac{V_{B+}}{V_-}}{\frac{R_1 + R_2 + R_3 + R_4}{R_2 \frac{V_{B-}}{V_+} + R_3 \frac{V_{B+}}{V_-}}}$$

$$R_- = \frac{R_1 + R_2 + R_3 + R_4 R_+}{R_2 \frac{V_{B-}}{V_+} + R_3 \frac{V_{B+}}{V_-}}$$

3 电动汽车绝缘电阻检测系统设计

3.1 硬件设计

本文所设计的电动汽车绝缘电阻检测系统的硬件由待测直流系统、检测电路、采样电路、单片机和AD转换电路等组成，电路示意图见图7。

待测直流系统由动力电池及其两端存在的正端绝缘电阻和负端绝缘电阻组成。

检测电路和采样电路中，桥臂采样电阻采用精度1%的精密MELF电阻， R_1 和 R_4 的阻值为1880 kΩ， R_2 和 R_3 的阻值为4.7 kΩ； K_1 和 K_2 取耐压值为1500 V的AQV258型光控MOS继电器，与传统机械继电器相比，该继电器动作

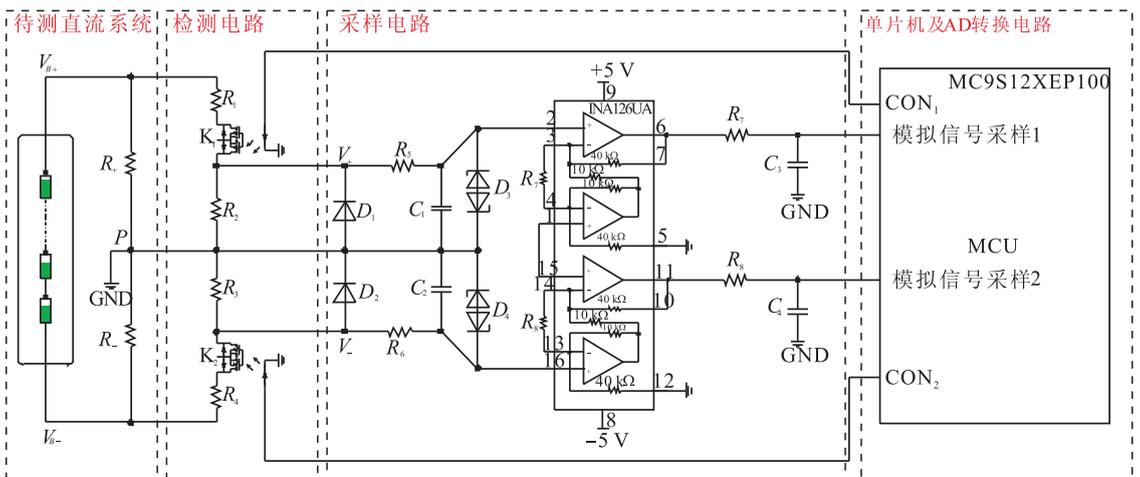


图7 电动汽车绝缘电阻检测电路与采样电路示意图

Fig. 7 Schematic of electric vehicle insulation resistance detection circuit and sampling circuit

电流低、泄露电流小,可以保证系统的测量精度和可靠性;钳位二极管 D_1 和 D_2 型号为 CD4148,可避免 AD 采样电路的损坏;双向 TVS 二极管 D_3 和 D_4 型号为 PESD5V0S1,使信号处理电路免受静电放电(ESD)和浪涌脉冲的损害;电容 C_1, C_2, C_3 和 C_4 的容量均为 $0.01 \mu\text{F}$;电阻 R_5, R_6, R_7 和 R_8 的阻值均为 100Ω ;选取最大失调电压值为 $250 \mu\text{V}$,最大电压漂移值为 $3 \mu\text{V}/\text{C}$ 的 INA2126 型双仪表放大器用于信号放大,并实现电压极性转换,因此只需一片芯片即可完成对正、负两路信号的运放与采集。

单片机和 AD 转换电路由内置的 12 位多

通道 AD 转换电路的 MC9S12XEP100 型单片机构成,通过 CON_1 和 CON_2 信号控制光控继电器 K_1 和 K_2 的导通与关断。

3.2 软件设计

在 Freescale 公司的 Code warrior 编程环境下进行软件设计.功能模块主要包括:初始化程序、电池状态分析、光控继电器控制、电压检测、动力电池总电压测量、绝缘电阻阻值情况分类与计算、数据处理与故障处理、CAN 总线通讯等。

本文所设计的绝缘电阻检测系统的工作流程如图 8 所示.当车辆开始运行时,首先对主控

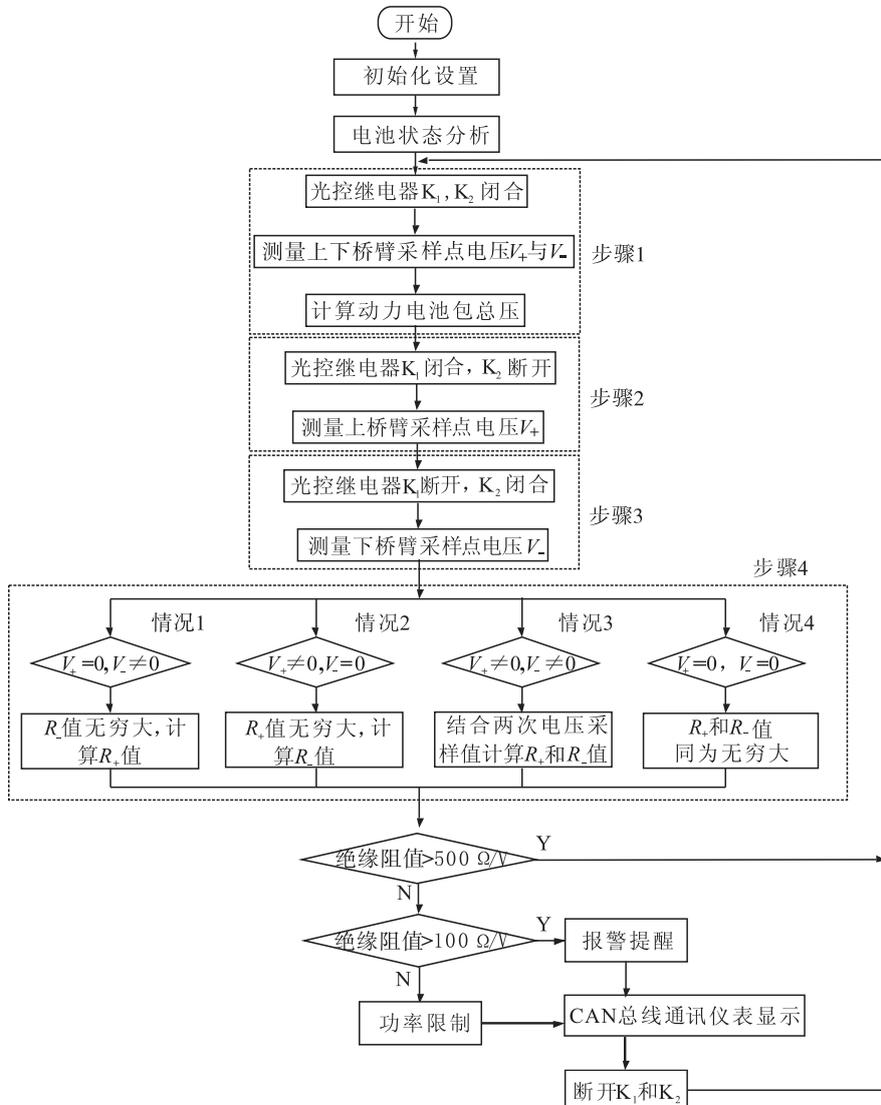


图 8 绝缘电阻检测系统的工作流程

Fig. 8 Workflow of insulation resistance detection system

制器进行初始化,完成有关寄存器的配置;然后依照步骤1—步骤4绝缘电阻在线计算方法对动力电池包正负端绝缘电阻进行检测计算;最后主控制器对测量结果进行判断,并通过CAN总线发送到仪表盘上实时显示. 根据国家标准(GB/T18384.3—2015)的要求,纯电动汽车绝缘阻值至少为 $100\ \Omega/V$ ^[1],因此选取 $500\ \Omega/V$ 作为安全阈值. 绝缘阻值介于 $100\ \Omega/V$ 与 $500\ \Omega/V$ 之间属于一级故障,在仪表盘进行故障提醒;绝缘阻值小于 $100\ \Omega/V$ 属于二级故障,要对车辆进行功率限制.

由于检测电阻的引入,降低了动力电池与车体之间的绝缘等级,影响了检测精度,因此为了确保检测电阻不影响绝缘检测系统的性能,只在检测瞬间时闭合开关 K_1 和 K_2 ,检测结束后开关处于断开状态,测量桥臂与动力电池正、负端母线断开.

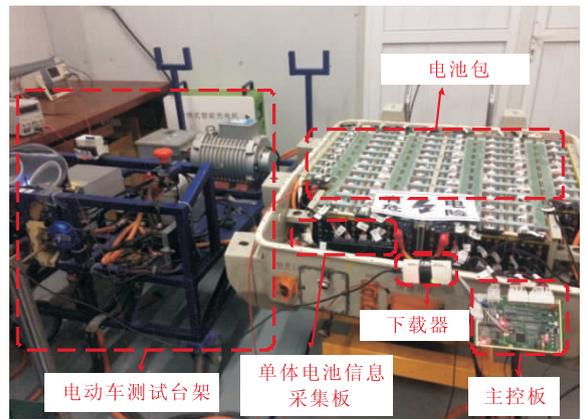
4 测试结果与分析

为了对动力电池绝缘电阻在线检测系统的性能进行检测,搭建了如图9所示的实验平台. 实验所采用的动力电池为标称值 $3.6\ V$,容量 $2.6\ A\cdot h$ 的18650三元锂电池,45节电池并联为一组,共90节2组电池串联组成动力电池包,动力电池包标称电压 $330\ V$,容量为 $117\ A\cdot h$. 将开发的基于不平衡电桥的电动汽车绝缘电阻测试电路集成于电池管理系统主控制电路板中,如图10所示. 实验通过在动力电池两端与车体之间并联接入不同阻值的电阻来模拟不同情况下的绝缘电阻状况,测量结果通过CAN总线发送至上位机显示界面,如图11所示.

分别采用传统电桥法、不平衡电桥法与FLUKE 1587C型绝缘电阻测量仪,对3组不同绝缘电阻进行测试,结果见表1. 由表1可知,设计的电动汽车绝缘电阻检测系统能够对动力



a) 测试用整车



b) 模拟测试台架

图9 绝缘检测实验平台

Fig. 9 Insulation detection of experimental platform

电池正、负端多种绝缘阻值状况进行检测,测量误差较传统电桥法更低,可控制在5%以内,能够满足纯电动汽车的绝缘检测要求.

在测试中,将一个 $2\ M\Omega$ 的电阻连接在电池包与汽车底盘之间,将其中一段时间的绝缘电阻检测结果通过CAN总线获取,解析得到误差绝对值波形,图12为剩余电量较少时的误差波形,图13为剩余电量较多时的误差波形. 由图12,图13可以看出,不同剩余电量情况下,测量误差不同. 这是由于电池内阻和电池电压会随电池剩余电量的变化而变化,在电池剩余电量降低时,内阻会变大,电池总压会降低,因此在电池剩余电量较低时的绝缘电阻测量误差略高于电池剩余电量较高时的测量误差. 同时可以看到,两种不同方法在相同条件下平均测

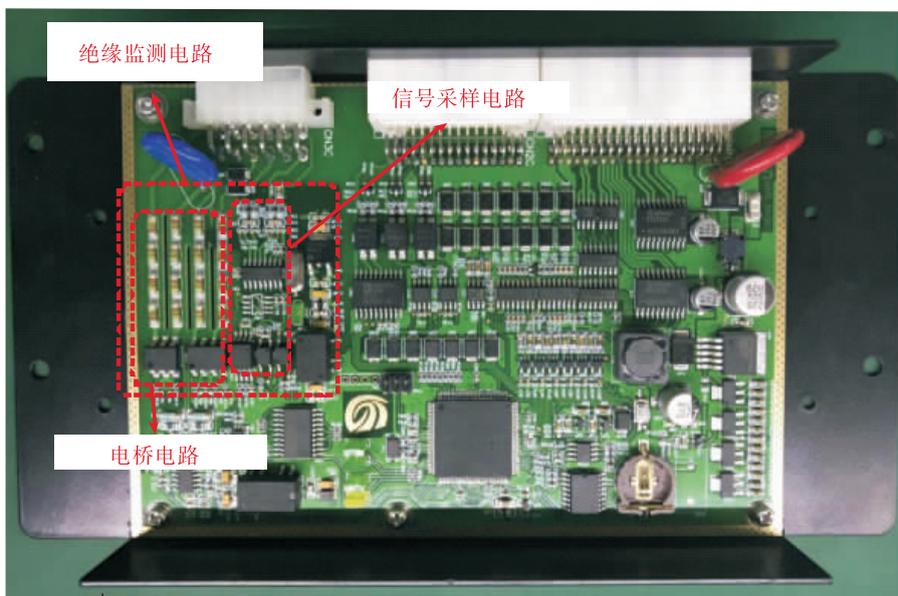


图 10 电池管理系统主控电路板

Fig. 10 Main controller circuit board of battery management system

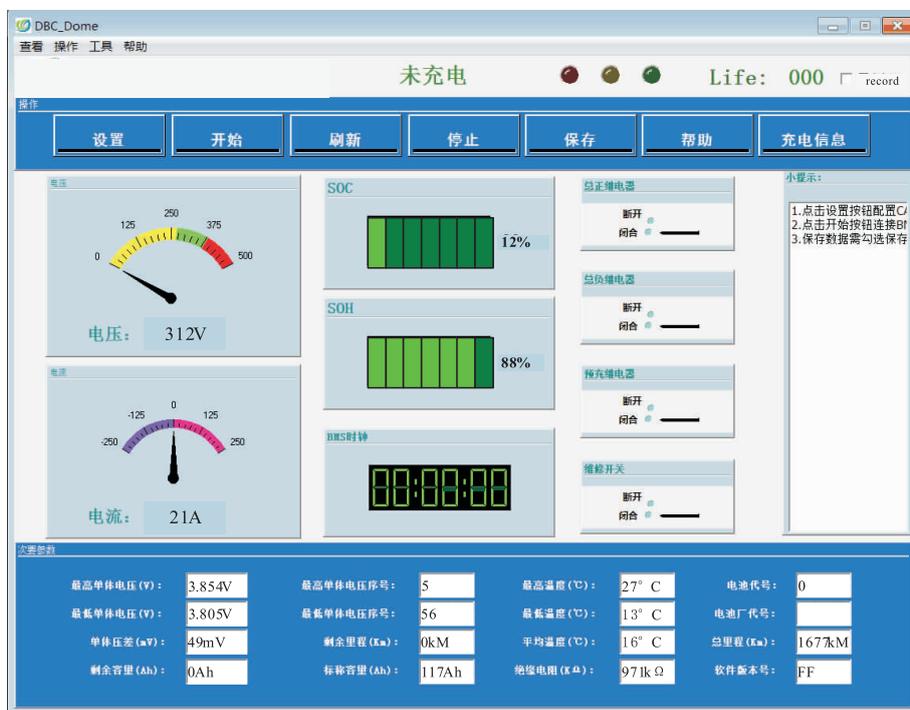


图 11 上位机界面显示的测量结果

Fig. 11 Measure results displayed on host computer interface

量误差也不相同,不平衡电桥法平均测量误差在 3% 左右,而传统电桥法因需要测量绝缘电阻两端电压,在相同条件下平均误差在 6% 左右.

5 结论

本文通过用电阻分压测量、光控继电器替代传统继电器等手段对传统电桥法进行改进,针对不平衡电桥电路设计了一种电动汽车绝缘

表1 使用不同方法对3组绝缘电阻的测量结果

Table 1 Measurement results of three groups insulation resistance by different methods MΩ

测量方法	测试对象	1#绝缘电阻	2#绝缘电阻	3#绝缘电阻
不平衡电桥法	正端	0.971	1.941	∞
	负端	0.965	0.962	0.973
传统电桥法	正端	0.942	1.891	∞
	负端	1.498	0.945	0.938
使用FLUKE电阻测量仪	正端	0.995	1.985	∞
	负端	0.993	0.997	0.997
实际值	正端	1	2	∞
	负端	1	1	1

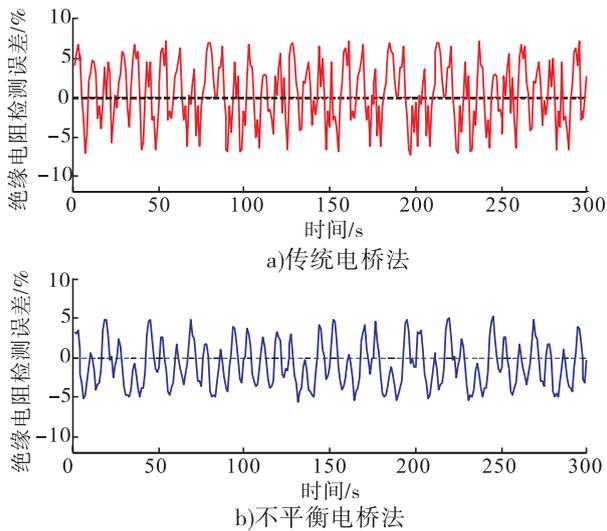


图12 剩余电量10%时两种方法测量误差波形
Fig. 12 Measurement error waveforms of the two methods when the residual power was 10%

电阻在线检测系统,并提出了四步骤绝缘电阻在线计算方法.验证实验表明,在车辆运行过程中,所开发的电动汽车绝缘电阻检测系统能够在线测量动力电池正、负端不同的绝缘阻值,检测结果稳定,测量误差均在5%以内.另外,测试中发现剩余电量较少时会使绝缘电阻检测精度降低,运行工况的不同也会影响测量精度,如何降低这方面的影响将是接下来的研究重点.

参考文献:

[1] 中国国家标准委员会. 电动汽车 安全要求

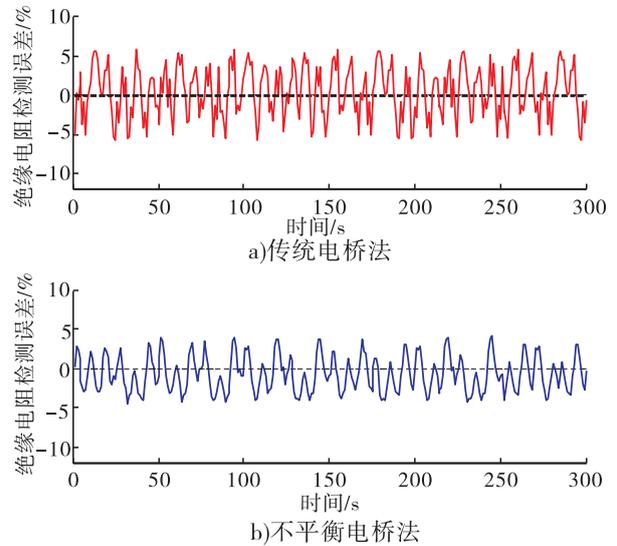


图13 剩余电量90%时两种方法测量误差波形
Fig. 13 Measurement error waveforms of the two methods when the residual power was 90%

第3部分:人员触电防护:GB/T 183848.1—2015[S].北京:中国标准出版社,2015.

[2] ANUCHIN A, BELYAKOV G, FEDOROVA K, et al. Insulation fault detection and localisation in electric and hybrid electric vehicles [C] // 2016 51st International Universities Power Engineering Conference (UPEC), Coimbra: IEEE, 2016:1-3.

[3] 徐佳宁,梁栋滨,魏国,等. 串联电池组接触电阻故障诊断分析[J]. 电工技术学报, 2017, 32(18):106.

[4] 程泽,孙幸勉,程思璐. 一种锂离子电池荷电状态估计与功率预测方法[J]. 电工技术学报, 2017, 32(15):180.

[5] 刘大同,周建宝,郭力萌,等. 锂离子电池健康评估和寿命预测综述[J]. 仪器仪表学报, 2015, 36(1):1.

[6] 任谊,沙立民,姜雨,等. 单回路直流系统绝缘电阻检测装置技术研究[J]. 电子测量技术, 2014, 37(3):10.

[7] 王福忠,董鹏飞,董秋生,等. 煤矿6 kV 动力电缆绝缘在线监测系统研究[J]. 电子测量与

仪器学报,2015,29(9):1398.

- [8] PIAO C H, CONG T. Study on isolation monitoring of high-voltage battery system[J]. *Frontiers of Manufacturing and Design Science*, 2005, 44(1):571.
- [9] 周晨,胡社教,沙伟,等. 电动汽车绝缘电阻有源检测系统[J]. *电子测量与仪器学报*, 2013, 27(5):409.
- [10] 姜雨,沙立民,任谊. 基于低频信号法的电动汽车绝缘监测方法研究[J]. *国外电子测量技术*, 2014, 33(11):25.
- [11] 冯建,来磊,石雷兵,等. 交流电阻及其时间常数的准平衡式电桥精密测量技术[J]. *电工技术学报*, 2017, 32(19):187.
- [12] 周兴叶,朱建新,陈祥,等. 混合动力汽车用电

池包动态绝缘电阻检测方法研究[J]. *现代电子技术*, 2017, 40(10):121.

- [13] 杨为,谢永芳,胡志坤. 高压动力电池组绝缘性能的实时监测研究[J]. *计算技术与自动化*, 2015, 34(3):55.
- [14] 张向文,高冠. 电动汽车动力电池绝缘电阻实时在线监测系统[J]. *吉林大学学报(工学版)*, 2017, 47(5):1395.
- [15] SONG C X, SHAO Y L, SONG S X, et al. Insulation resistance monitoring algorithm for battery pack in electric vehicle based on extended Kalman filtering [J]. *Energies*, 2017, 10(5):1.
- [16] 何耀,刘兴涛,张陈斌,等. 基于动力电池组内阻模型的绝缘检测算法[J]. *吉林大学学报(工学版)*, 2013, 43(5):1165.

(上接第 62 页)

- [10] 周统武,梁志坚,吴天秀,等. 熟地多糖活性炭脱色工艺的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2013, 25:972.
- [11] 秦为辉,张晓琳,陈新,等. 多杀菌素发酵提取液的脱色工艺研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(1):48.
- [12] 章银良. *食品与生物试验计算与数据处理* [M]. 2版. 北京:中国轻工业出版社, 2018.
- [13] 李珍,哈益明,李安,等. 响应面优化苹果皮渣

多酚超声提取工艺研究[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(21):4569.

- [14] YUE T, SHAO D, YUAN Y, et al. Ultrasound-assisted extraction, HPLC analysis, and antioxidant activity of polyphenols from unripe apple [J]. *Journal of Separation Science*, 2012, 35(16):2138.
- [15] 李紫薇,欧阳艳,腊萍,等. 棉籽壳木聚糖提取液的脱色工艺[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(5):60.



引用格式:高明,崔钊,李昊,等. 基于 HCPS 多层感知器的污水处理后氨氮浓度测量[J]. 轻工学报,2018,33(6):92-100.

中图分类号:TP273;TS97;X703.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.011

文章编号:2096-1553(2018)06-0092-09

基于 HCPS 多层感知器的污水处理后氨氮浓度测量

Measurement of ammonia nitrogen concentration after sewage treatment based on HCPS multilayer perceptrons

高明¹,崔钊¹,李昊¹,栗三一²

GAO Ming¹, CUI Ke¹, LI Hao¹, LI Sanyi²

关键词:

污水处理;氨氮浓度预测;软测量技术;神经网络结构自调整算法;多层感知器;结构自组织

1. 黄河流域水环境监测中心 监测管理处, 河南 郑州 450004;
2. 郑州轻工业学院 电气信息工程学院, 河南 郑州 450001
1. *Monitoring Management Service, Yellow River Basin Water Environment Monitoring Center, Zhengzhou 450004, China;*
2. *College of Electrical and Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China*

Key words:

sewage treatment; ammonia nitrogen concentration prediction; soft measurement; HCPS; multilayer perceptron; structural self-organizing

摘要:针对现污水处理后出水氨氮预测模型中隐含层神经元存在过大冗余而浪费资源的问题,提出了一种基于敏感度和互信息的混合增加删减的神经网络结构调整算法(HCPS)。该算法重新定义了敏感度公式,利用敏感度和互信息自适应地调整网络结构,删除敏感度过低的隐含神经元,分裂过大的隐含层神经元,合并互信息过大的两个隐含层神经元。在污水处理基准仿真平台 BSM1 上的验证结果表明,HCPS 算法可以获得更紧凑的网络结构,用于出水氨氮浓度预测精度较高。

收稿日期:2018-10-18

基金项目:国家自然科学基金项目(61603347)

作者简介:高明(1986—),女,河南省宜阳县人,黄河流域水环境监测中心工程师,硕士,主要研究方向为水环境监测与研究。

Abstract: In the existing prediction model of ammonia nitrogen in sewage treatment effluent, the hidden layer neurons excessively redundant, which wastes resources. A new structure adjustment algorithm (HCPS) based on sensitivity analysis (SA) and mutual information (MI) was proposed. The algorithm redefined the sensitivity formula, adaptively, adjusted the network structure by using sensitivity and mutual information, deleted hidden neurons with low sensitivity, divided hidden neurons with excessive sensitivity, and merged two hidden neurons with excessive mutual information. The results of verification on BSM1, a benchmark simulation platform for sewage treatment, showed that HCPS algorithm could obtain a more compact network structure, and the prediction accuracy of ammonia nitrogen concentration in effluent was higher.

0 引言

随着工业的发展和人们环保意识的增强,国家不断提高城市和工业污水处理排放标准,污水处理厂面临着提高出水水质的挑战.氨氮含量是评价水质的一个重要指标.氨氮的主要成分为硝酸盐氮($\text{NO}_3\text{-N}$),氨氮浓度的增加会导致水体富营养化,污染环境,且对人类健康产生极为不利的影 响,因此国家对污水排放氨氮浓度做了明确规定并对氨氮超标的污水处理厂进行严厉处罚^[1].为了提高污水处理效果,实现出水水质达标,需要对氨氮浓度等关键变量进行在线实时监测.目前污水处理厂大多使用分光光度法进行氨氮浓度的测量,即对污水采样后在实验室中通过化学反应进行测定,该方法易受悬浮物和有 色离子干扰且十分耗时,难以达到实时监测的目标^[2].此外,污水处理过程包含复杂的生物化学反应,干扰严重,变量之间具有强耦合性、非线性、时变性和滞后性等特点,因此很难通过机理分析建立测量氨氮浓度的数学模型^[3].为了解决该问题,有学者提出将基于数据驱动的软测量技术应用于污水处理中的氨氮检测.

软测量技术的核心是使用易测变量对难以测得的变量进行预测,主要使用回归分析、状态估计和神经网络等智能方法建模,其中多层感知器神经网络因其工程易实现和强大的非线性拟合能力被广泛应用于多个领域^[4-6].但是,使用多层感知器建立氨氮软测量模型时,其精度

并不理想,主要原因之一是网络结构难以确定.神经网络的结构对网络性能有重要影响:网络规模过小,不能有效解决问题;网络规模过大,则会出现过拟合现象,导致泛化能力变差^[7].为了获得最佳的网络结构,有学者根据生物、数学等机制,动态地增加或删减神经元,提出多种网络结构自调整算法. J. H. Wang 等^[8]基于人类学习的集成原理提出一种增长型神经网络,并且该增长型神经网络构建方法是无监督的,该方法对具有不同特征的数据建立相应的子网络. J. A. Platt^[9]提出一种基于资源分配的增长型网络结构调整算法(RAN),该算法可以根据输入样本对输出进行分类,当训练数据没有类别时会增加隐含层神经元. P. Lauret 等^[10]对全连接单层神经网络提出一种删减算法,该算法基于全局敏感度分析,通过计算每个隐含层神经元对整个网络输出的影响,删除影响较小的神经元,保留影响较大的隐含层神经元. M. M. Islam 等^[11]提出自适应删减增长算法(AM-GA),该算法在网络训练的过程中增加和删减神经元.删除神经元是一种混合操作,在删除两个神经元的 同时会增加一个神经元;增加神经元是一种分裂操作,即分裂一个最活跃的隐含层神经元.这种混合增长删减算法保留了隐含层神经元自身的功能. H. G. Han 等^[12]提出的增长删减算法(CPNN)使用敏感度分析评价隐含层神经元的贡献度,删除贡献度过小的隐含层神经元,当网络性能不足时增加神经元,并且在增加和删减神经元的同时对临近神经元的权

值进行补偿,减小网络变化对网络输出带来的影响. 以上算法可以动态地调节网络结构. 然而这些算法均没有考虑隐含层神经元之间的信息,因此会导致隐含层神经元出现冗余. 冗余神经元的存在会浪费计算资源,增加计算成本,同时也会降低网络的泛化能力,影响网络精度.

为了消除隐含层冗余神经元,通过借鉴生物神经元结构自调整机制,本文拟提出一种基于敏感度和互信息的混合增加删减的神经网络结构自调整算法(HCPS),使用互信息衡量隐含层神经元之间的相关性,用敏感度分析方法评价隐含层神经元对网络输出的贡献度,从而充分地利用网络层内和层间信息来调整网络结构,以期获得简洁有效的网络结构,从而用于提高污水处理后的氨氮浓度测量精度.

1 互信息估计与敏感度分析

1.1 多层感知器

多层感知器结构分为3部分,即输入层、隐含层和输出层^[13]. 由于单隐含层的多层感知器可以逼近任意精度的曲线,因此本文主要研究单隐含层多层感知器. 对于多输入多输出多层感知器,设其输入层神经元、隐含层神经元和输出层神经元个数分别为 n_0, n_1 和 n_2 . 输入变量为 $X = [x_1, x_2 \dots, x_{n_0}]$, 则隐含层神经元输入和输出分别为

$$z_j = \sum_{i=1}^{n_0} w_{ij}x_i + b_j \tag{①}$$

$$y_j = f(z_j) = (1 + e^{-z_j})^{-1} \tag{②}$$

其中, z_j 是第 j 个隐含层神经元的输入, b_j 是第 j 个隐含层神经元的阈值, w_{ij} 是第 i 个输入神经元与第 j 个隐含层神经元之间的权值, y_j 是第 j 个隐含层神经元的输出, $f(z_j)$ 是激活函数. 输出层神经元的输入和输出分别为

$$z_k = \sum_{j=1}^{n_1} w_{jk}y_j + b_k \tag{③}$$

$$y_k = z_k \tag{④}$$

其中, z_k 是第 k 个输出层神经元的输入, b_k 是第 k 个输出层神经元的阈值, w_{jk} 是第 j 个隐含层神经元与第 k 个输出层神经元之间的权值, y_k 是第 k 个输出层神经元的输出.

1.2 互信息

熵和互信息是信息论中的两个基本概念. 熵可用于描述信源的不确定度,这里可以表示一个变量中包含的信息量. 互信息可以测量两个随机变量之间的相互关系. 给定一个离散随机变量 $X = \{x_i | i = 1, \dots, K\}$, 则 X 的熵可表示为

$$H(X) = - \sum_{k=1}^K p(x_k) \log p(x_k)$$

其中, $p(x_k)$ 是概率密度函数, K 是变量 X 的维度. 联合熵可表示多个变量中的信息量. 对于二变量 (X, Y) , 联合熵可表示为

$$H(X, Y) = \sum_{x \in \mathcal{X}} \sum_{y \in \mathcal{Y}} p(x, y) \log p(x, y)$$

其中, $p(x, y) = p\{X = x, Y = y\}$ 是 X 和 Y 的联合分布律, $x \in \mathcal{X}, y \in \mathcal{Y}$, \mathcal{X} 和 \mathcal{Y} 分别是 X 和 Y 的取值空间.

互信息的计算公式为

$$I(X; Y) = \sum_{x \in \mathcal{X}} \sum_{y \in \mathcal{Y}} p(x, y) \log \frac{p(x, y)}{p_X(x)p_Y(y)}$$

其中, $p_X(x)$ 和 $p_Y(y)$ 是 X 和 Y 的边缘概率密度.

互信息与熵的关系可表示为

$$I(X; Y) = H(X) + H(Y) - H(X, Y) \tag{⑤}$$

1.3 多层感知器的互信息估计

估计两个神经元之间的互信息的关键是计算概率分布函数. 目前计算互信息的方法大致有4类,即联合熵法、核函数法、 k 最近邻法和直方图法. 本文采用最简单的、计算效率最高的直方图方法.

假设多层感知器两个神经元的输出变量分别为 X 和 Y , 计算过程分两步.

第一步:估计变量 X 的熵. 直方图方法将变

量 X 的取值范围等分为宽度为 Δx 的 K_X 个片段. 为了增加熵估计的精度, K_X 可由如下公式计算^[14]:

$$K_X = \text{round} \left\{ \frac{\varepsilon}{6} + \frac{2}{3\varepsilon} + \frac{1}{3} \right\}$$

$$\varepsilon = \sqrt[3]{8 + 324N + 12 \sqrt{36N + 729N^2}}$$

其中, N 为样本总数.

由于变量 X 为离散随机变量, 故 X 的熵可以表示为

$$H(X) = - \sum_{k=1}^{K_X} p_k(x) \log p_k(x)$$

其中, $p_k(x)$ 为样本落入第 k 个片段的概率, 可表示为

$$p_k(x) = \frac{n_k}{N}$$

其中, n_k 为样本落入第 k 个片段中的个数. 则 X 的熵为

$$H(X) = - \sum_{k=1}^{K_X} \frac{n_k}{N} \log \frac{n_k}{N} \quad (6)$$

变量 Y 的熵的计算过程与 X 相同.

第二步: 估计变量 X 和 Y 的联合熵. 直方图方法将 $x - y$ 平面平均分为 $(K_X \times K_Y)$ 个单元, 每个单元的尺寸为 $(\Delta x \times \Delta y)$, 则 X 和 Y 的联合熵可以估计为

$$H(X, Y) = - \sum_{k_i=1}^{K_X} \sum_{k_j=1}^{K_Y} p_{k_i, k_j}(x, y) \log p_{k_i, k_j}(x, y)$$

其中, $p_{k_i, k_j}(x, y)$ 为样本落入单元 (k_i, k_j) 的概率, 可表示为

$$P_{k_i, k_j}(x, y) = \frac{n_{k_i, k_j}}{N}$$

式中, n_{k_i, k_j} 为落入单元 (k_i, k_j) 中的样本的数量. 则 X 和 Y 的联合熵为

$$H(X, Y) = - \sum_{k_i=1}^{K_X} \sum_{k_j=1}^{K_Y} \frac{n_{k_i, k_j}}{N} \log \frac{n_{k_i, k_j}}{N} \quad (7)$$

联合式 (5)(6)(7), 变量 X 和 Y 的互信息可以表示为

$$I(X; Y) = - \sum_{k_i=1}^{K_X} \frac{n_{k_i}}{N} \log \frac{n_{k_i}}{N} - \sum_{k_j=1}^{K_Y} \frac{n_{k_j}}{N} \log \frac{n_{k_j}}{N} +$$

$$\sum_{k_i=1}^{K_X} \sum_{k_j=1}^{K_Y} \frac{n_{k_i, k_j}}{N} \log \frac{n_{k_i, k_j}}{N}$$

1.4 敏感度分析

敏感度分析法用于评价模型输出对输入因子的依赖程度, 在此可以用于评价隐含层神经元的输出变量对网络输出的贡献. 敏感度分析法使用敏感度指标测量输入变量的重要程度, 定义为由该输入变量产生的输出部分占总输出的比重. 本文使用敏感度分析法测量隐含层神经元对网络输出的贡献度. 敏感度分析法的主要步骤如下.

- 1) 确定模型输入变量和模型输出变量;
- 2) 对每个输入变量分配概率密度函数;
- 3) 基于样本抽样建立输入矩阵;
- 4) 计算输出;
- 5) 计算哪个输入变量对输出变量产生的影响最大.

目前已有多种方法分析模型输出的敏感度, 但大多都依赖于敏感度指标. 本文敏感度模型的输入变量为 $[w_{11}y_1, w_{21}y_2, \dots, w_{n_1}y_{n_1}; w_{12}y_1, w_{22}y_2, \dots, w_{n_2}y_{n_1}; w_{1n_2}y_1, w_{2n_2}y_2, \dots, w_{n_2n_2}y_{n_1}]$, 其维数为 $n_2 \times n_1$, 其中 $w_{n_1n_2}$ 为第 n_1 个隐含层神经元与第 n_2 个输出神经元之间的权值, y_{n_1} 为第 n_1 个隐含层神经元的输出, 则敏感度模型可以表示为

$$Y^k = f(w_{1k}y_1, w_{2k}y_2, \dots, w_{n_1k}y_{n_1})$$

其中, Y^k 是第 k 个模型响应; $w_{1k}y_1, w_{2k}y_2, \dots, w_{n_1k}y_{n_1}$ 为输入变量值, 反映了每个隐含层神经元与第 k 个输出神经元之间的关系.

传统的敏感度计算公式为

$$S_j^k = \frac{\text{Var}_{w_{jk}y_j} [Y^k(w_{jk}y_j = \partial_j)]}{\text{Var}(Y^k)} \quad (8)$$

其中, S_j^k 为第 j 个输入变量对第 k 个模型输出的贡献率; $w_{jk}y_j$ 是对于第 k 个模型的第 j 个输入变量, $j = 1, 2, \dots, n_1, k = 1, 2, \dots, n_2$; $[Y^k | w_{jk}y_j = \partial_j]$ 表示第 k 个模型输出值中由第 j 个隐含层神经元产

生的部分; $Var[Y^k]$ 为第 k 个网络输出变量的方差. 为了增加公式的可解释性, 将式 ⑧ 改写为

$$S_j^k = \frac{Var_{w_{aj}}[Y^k | w_{jk}y_j = \partial_j]}{\sum_{i=1}^{n_i} Var_{w_{ai}^{(1)}}[Y^k | w_{ik}y_i = \partial_i]} \quad \text{⑨}$$

由式 ⑨ 可以计算输入因子对输出的影响, 输入变量的活跃性越高, 贡献率就越大.

2 基于敏感度和互信息的混合增加删减神经网络结构自调整算法(HCPS)

2.1 网络结构调整机制

本文提出的 HCPS 算法在网络结构自调整阶段共有 3 种操作, 分别是合并隐含层神经元、删减隐含层神经元和分裂隐含层神经元.

2.1.1 合并隐含层神经元 为了使隐含层神经元之间相关性较小, 即每个隐含层神经元具有各自的功能, HCPS 将互信息超过设定值的两个隐含层神经元合并为一个神经元, 合并的同时调整网络权值使网络输出稳定.

假设 $[x_t, y_t] (t = 1, 2, \dots, N)$ 为训练样本, $x_t = (x_{t1}, x_{t2}, \dots, x_{tm_0})$, $(t = 1, 2, \dots, N)$. 计算第 a, b 两个隐含层神经元之间的互信息 $I(a, b)$, 如果该互信息大于 λ_1 , 则将其合并.

假设 a, b 两个隐含层神经元合并为一个神经元 c , 合并公式为

$$\begin{cases} w_{ic} = mw_{ia} + nw_{ib} \\ w_{ck} = w_{ak} + w_{bk} \\ d_c = md_a + nd_b \end{cases} \quad \text{⑩}$$

其中, w_{ic}, w_{ia} 和 w_{ib} 分别为第 i 个输入神经元与隐含层神经元 c, a 和 b 的连接权值; m 和 n 为系数且 $m + n = 1$; w_{ck}, w_{ak} 和 w_{bk} 分别为第 k 个输出神经元与隐含层神经元 c, a 和 b 的连接权值.

根据公式 ①②③④ 可知, 由神经元 a, b 和 c 产生的网络输出为

$$\begin{cases} y_a(x_t) = \frac{w_{ak}}{1 + e^{-\left(\sum_{i=1}^{n_a} w_{ia}x_{ti} + d_a\right)}} \\ y_b(x_t) = \frac{w_{bk}}{1 + e^{-\left(\sum_{i=1}^{n_b} w_{ib}x_{ti} + d_b\right)}} \\ y_c(x_t) = \frac{w_{ck}}{1 + e^{-\left(\sum_{i=1}^{n_c} w_{ic}x_{ti} + d_c\right)}} \end{cases} \quad \text{⑪}$$

其中, x_t 为第 t 个输入样本; y_a, y_b 和 y_c 分别为由隐含层神经元 a, b 和 c 产生的网络输出. 为了确保网络输出不变, 需要满足

$$y_c(x_t) = y_a(x_t) + y_b(x_t) \quad \text{⑫}$$

根据式 ⑩ 和 ⑪, 公式 ⑫ 可改写为

$$\frac{w_{ak}}{1 + e^{-z_a}} + \frac{w_{bk}}{1 + e^{-z_b}} = \frac{w_{ak} + w_{bk}}{1 + e^{-(mz_a + nz_b)}} \quad \text{⑬}$$

其中, $z_a = \sum_{i=1}^{n_a} w_{ia}x_{ti} + d_a, z_b = \sum_{i=1}^{n_b} w_{ib}x_{ti} + d_b$.

将所有样本训练一遍以后调节网络结构, x_t 为第 N 个训练样本, 由此保证网络输出不变. 公式 ⑬ 可简化为

$$mz_a + nz_b = -\ln A$$

其中

$$A = \frac{w_{ak}e^{-z_a} + w_{ak}e^{-z_a}e^{-z_b} + w_{bk}e^{-z_b} + w_{bk}e^{-z_a}e^{-z_b}}{w_{ak} + w_{bk} + w_{ak}e^{-z_b} + w_{bk}e^{-z_a}}$$

结合条件 $m + n = 1$ 可得

$$m = \frac{\ln A - z_b}{z_a - z_b} \quad n = \frac{z_a - \ln A}{z_a - z_b}$$

由此可以确定式 ⑩.

2.1.2 删减隐含层神经元 当隐含层神经元贡献率很低时, 可认为其为无效神经元, 将其删除. 假设第 j 个隐含层神经元的贡献率 S_j 低于阈值 λ_2 , 则可以将其删除. 为了保证网络输出不变, 距离其最近的神经元(称其为神经元 l , 为与神经元 j 互信息最大的隐层神经元)的权值调整公式为

$$\begin{cases} w'_{il}(t) = w_{il}(t) \\ w'_{lk}(t) = w_{lk}(t) + \frac{y_j}{y_l} + w_{jk}(t) \end{cases} \quad \text{⑭}$$

其中, $w_{il}(t)$ 和 $w'_{il}(t)$ 分别为结构调整前、后第 i 个输入神经元与隐层神经元 l 的连接权值; $w_{lk}(t)$ 和 $w'_{lk}(t)$ 分别为结构调整前、后隐层神经元 l 与输出神经元 k 之间的连接权值; y_j 和 y_l 分别为结构调整前隐层神经元 j 和 l 的输出; $w_{jk}(t)$ 为结构调整前隐层神经元 j 与输出神经元 k 之间的连接权值。

2.1.3 分裂隐含层神经元 当某个隐层神经元贡献度过大时,网络输出会随着该神经元输出剧烈波动,因此需将这种神经元分裂为两个神经元。HCPS 将贡献度大于 λ_3 的隐层神经元分裂为两个神经元。假设隐层神经元 j 的贡献度 S_j 大于 λ_3 , 分裂为两个隐层神经元 a 和 b , 新神经元的权值计算公式为^[15]

$$\begin{cases} w_{ia} = w_{ij} \\ w_{ak} = (1 - \alpha)w_{jk} \\ w_{ib} = w_{ij} \\ w_{bk} = \alpha w_{jk} \end{cases} \quad (15)$$

其中, w_{ia} 和 w_{ib} 分别为输入神经元 i 与隐层神经元 a 和 b 的连接权值; w_{ak} 和 w_{bk} 分别为输出神经元 k 与隐层神经元 a 和 b 的连接权值; α 为突变参数。文献[15]中 α 取值为 0 到 1 之间的随机数。为了避免某个新的隐层神经元贡献度过高, HCPS 设定 α 取值为 0.2 到 0.8 之间的随机数。

2.2 阈值的设定

阈值 λ_1 , λ_2 和 λ_3 的设定是 HCPS 算法的关键,对于不同的训练样本该值是不同的。HCPS 算法中阈值的设定具有自适应性。

1) 假设隐含层神经元个数为 n_1 , 计算每两个隐层神经元之间的互信息。所有互信息的平均值为

$$I_{\text{mean}} = \frac{\sum_{i=1}^{n_1} \sum_{j=1}^{n_1-i} I(h_i; h_j)}{n_1(n_1 - 1)/2}$$

其中, $I(h_i; h_j)$ 为隐层神经元 i 和 j 之间的互信息。那么 λ_1 可以设定为

$$\lambda_1 = \partial_1 I_{\text{mean}}$$

其中, ∂_1 为系数,根据经验,对于大部分问题其值设置为 [3, 4] 都比较合适。

2) 计算每个隐层神经元的贡献度。所有贡献度的平均值为

$$S_{\text{mean}} = \sum_{i=1}^{n_1} S_i / n_1$$

其中, S_i 为第 i 个隐层神经元的贡献度。那么 λ_2 和 λ_3 的计算公式分别为

$$\lambda_2 = \partial_2 S_{\text{mean}} \quad \lambda_3 = \partial_3 S_{\text{mean}}$$

其中, ∂_2 和 ∂_3 为系数。根据经验, ∂_2 取值为 [0.3, 0.5] 较合适, ∂_3 取值为 [2, 3] 较合适。

2.3 HCPS 算法流程

HCPS 根据敏感度和互信息自动调整网络结构,目的是使隐含层神经元之间的相关性最小,并且所有隐层神经元都为有效神经元。算法流程如下。

步骤 1 随机初始化隐层神经元,其个数为 n_1 。使用 BP 算法训练网络。

步骤 2 当所有样本训练结束后,计算每个隐含层神经元的贡献度。

步骤 3 计算阈值 λ_2 , 删除贡献度小于 λ_2 的神经元,并根据公式 (14) 调整权值。

步骤 4 计算每两个隐含层神经元的互信息,计算阈值 λ_1 。

步骤 5 将互信息大于 λ_1 的神经元合并,根据公式 (10) 对新神经元权值进行初始化。

步骤 6 计算阈值 λ_3 。将贡献度大于 λ_3 的隐层神经元分裂,根据公式 (15) 对新神经元权值进行初始化。

步骤 7 重新训练神经网络。

步骤 8 当达到期望误差或最大训练步数时停止训练。

3 仿真实验与结果分析

3.1 辅助变量的提取和数据采集

在污水处理过程中,与出水氨氮相关的因

素有出水总磷、出水氧化还原电位、进水总磷、出水 pH 值、温度、厌氧末端氧化还原电位、好氧末端固体悬浮物浓度、好氧前端溶解氧和硝态氮 (NO₃ - N) 等。辅助变量的选择应与待测变量密切相关,如选择过少则预测精度下降。结合文献[15 - 17]综合分析,选取温度、进水总磷、好氧末端固体悬浮物浓度、pH 值、好氧前端溶解氧这 5 个变量作为预测模型的输入变量。

本文以活性污泥污水处理基准仿真模型 BSM1^[18] 为实验平台进行数据采样和验证实验。使 BSM1 模型开环运行 14 d,每 15 min 采样 1 次,记录所有相关变量和出水氨氮浓度,运行 1 次可记录 1344 组数据。改变第 2 分区溶解氧和第 5 分区硝态氮浓度设定值,运行 BSM1 模型 10 次,采用其中 9 次记录的数据作为训练集,剩余的数据作为测试集。最后共采集 13 440 组数据,其中 12 096 组数据作为训练集,剩余的 1344 组数据作为测试集。

3.2 仿真结果与分析

训练前将数据归一化到[-1,1],使用 BP 算法对网络进行训练,初始学习率设为 0.1,最大学习步数为 10 000 步。系数 δ_1, δ_2 和 δ_3 分别为 3,0.45 和 3。为了体现结构调整算法的有效性,初始网络结构设为隐含层神经元很少(2 个)和隐含层神经元很多(100 个)两种情况。

将本文所提出的 HCPS 算法与 CPNN 算法^[19]、mPMIc 算法^[20] 和网络结构固定算法进行对比,结果如表 1 所示。CPNN 算法采用敏感度对网络结构进行调整,mPMIc 算法采用互信息对网络结构进行调整。

表 1 中网络性能评价采用指标为均方根误差,即

$$RMSE(t) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^{n_2} (y_k(t) - y'_k(t))^2}$$

其中, $y'_k(t)$ 是在 t 时刻第 k 个输出神经元的期望输出, N 是总样本数。

表 1 不同算法氨氮软测量实验结果

Table 1 Experimental results of soft sensing of ammonia nitrogen using different algorithms

算法	初始隐含层 神经元个数	最终隐含层 神经元个数	RMSE 值	RMSE 标准差
HCPS	100	9	0.390 6	0.081 0
	2	10	0.408 5	0.090 5
网络结构 固定算法	100	100	1.270 9	0.091 3
	2	2	1.632 4	0.097 5
CPNN	100	13	0.052 7	0.095 7
	2	13	0.055 4	0.096 4
mPMIc	100	14	0.061 5	0.094 8
	2	14	0.062 1	0.098 0

从表 1 可以看出,对于固定结构的多层感知器,当隐含层神经元过多或过少时都不能很好地预测氨氮浓度,另外 3 种具有自调整算法结构的神经网络取得的预测精度都比固定结构的高;HCPS 算法获得的最终网络结构最精简,而且网络精度比另外两种结构自调整算法也有所提高。另外,4 种算法的 RMSE 标准差基本相同,说明这 4 种算法的稳定性相近。

图 1 和图 2 分别为初始隐含层神经元为 100 和 2 时的隐含层神经元更新过程。从图 1 和图 2 可以看出,HCPS 算法可以快速收敛到稳定的网络结构。

图 3,图 4 和图 5 分别为 HCPS, CPNN 和

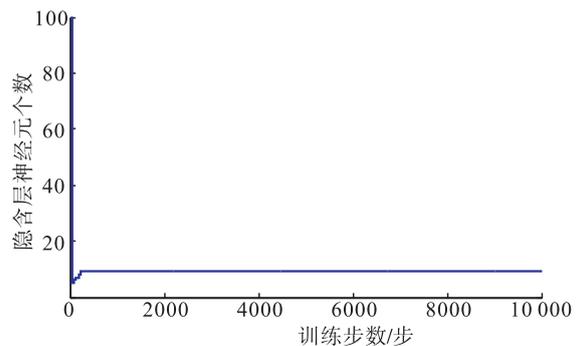


图 1 初始隐含层神经元为 100 时的
隐含层神经元更新过程

Fig. 1 The process of neuron regeneration when the number of initial hidden neurons was 100

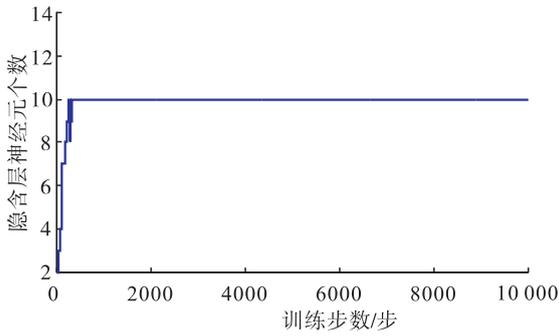


图2 初始隐含层神经元为2时的
隐含层神经元更新过程

Fig.2 The process of neuron regeneration when
the number of initial hidden neurons was 2

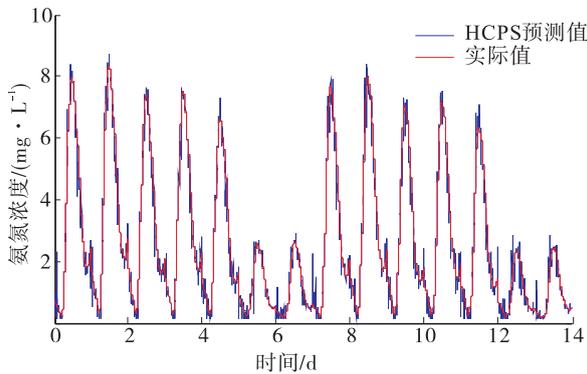


图3 HCPS 算法的出水氨氮浓度预测曲线

Fig.3 The prediction curve of effluent ammonia
nitrogen concentration by HCPS algorithm

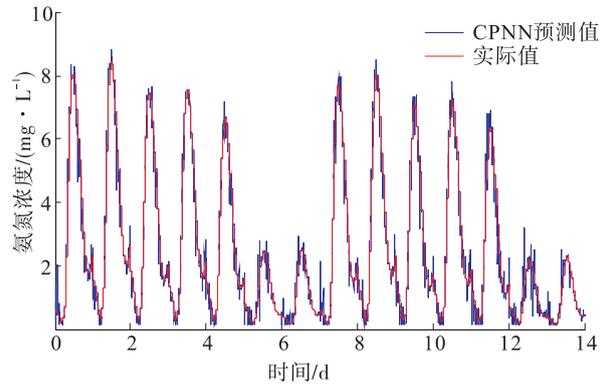


图4 CPNN 算法的出水氨氮浓度预测曲线

Fig.4 The prediction curve of effluent ammonia
nitrogen concentration by CPNN algorithm

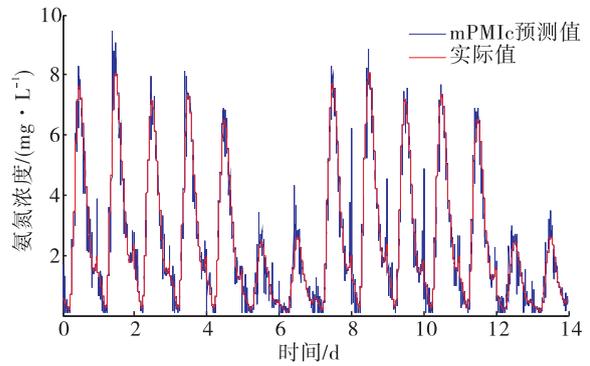


图5 mPMIc 算法的出水氨氮浓度预测曲线

Fig.5 The prediction curve of effluent ammonia
nitrogen concentration by mPMIc algorithm

mPMIc 算法的出水氨氮浓度预测结果. 从图3, 图4 和图5 可以看出, 在峰值处, HCPS 和 CPNN 预测结果的误差小于 mPMIc, 图中 HCPS 和 CPNN 的差别不明显, 但从表1 中测试均方根误差的结果可以看出, HCPS 算法获得的氨氮预测效果比 CPNN 和 mPMIc 的预测效果更好.

4 结论

针对现污水处理后氨氮浓度软测量模型中隐含层神经元存在过大冗余的问题, 本文提出了一种基于敏感度和互信息的混合增加删减神经网络结构自调整算法(HCPS)用于出水氨氮

浓度测量. 该算法核心是通过使用敏感度和互信息同时对网络结构进行调整, 删除贡献过低的隐含层神经元, 分裂贡献度过高的隐含层神经元, 合并互信息过高的隐含层神经元. 由于它同时考虑了层内和层间关系, 因此可以获得更精简的网络结构. 另外, 本文所提出的合并公式可以保证在网络结构变化时网络输出不变; 算法中隐含层神经元在分裂或删除的同时会进行相应的权值补偿, 也保证了网络输出的稳定性, 避免隐含层神经元贡献的不平衡. 在污水处理基准仿真平台 BSM1 上对 HCPS 算法进行验证, 结果表明, HCPS 算法能够获得更紧凑的网络结构, 用于出水氨氮浓度预测精度较高.

参考文献:

- [1] DU R, PENG Y, CAO S, et al. Advanced nitrogen removal from wastewater by combining anammox with partial denitrification [J]. *Biore-source Technology*, 2015, 179:497.
- [2] 杨航涛, 王双保, 王成龙. 基于分光光度法的水质氨氮检测系统设计[J]. *测控技术*, 2012, 31(5):49.
- [3] 乔俊飞, 安茹, 韩红桂. 基于 RBF 神经网络的出水氨氮预测研究[J]. *控制工程*, 2016, 23(9):1301.
- [4] ESFE M H, AFRAND M, WONGWISES S, et al. Applications of feedforward multilayer perceptron artificial neural networks and empirical correlation for prediction of thermal conductivity of $Mg(OH)_2$ -EG using experimental data [J]. *International Communications in Heat and Mass Transfer*, 2015, 67(4):46.
- [5] ZHANG Y D, WANG S H, JI G L, et al. Fruit classification using computer vision and feedforward neural network[J]. *Journal of Food Engineering*, 2014, 143(6):167.
- [6] FARAJZADEH J, FARD A F, LOTFI S. Modeling of monthly rainfall and runoff of Urmia lake basin using "feed-forward neural network" and "time series analysis" model [J]. *Water Resources and Industry*, 2014(7):38.
- [7] OONG T H, ISA N A. Adaptive evolutionary artificial neural networks for pattern classification [J]. *IEEE Trans Neural Netw*, 2011, 22(11):1823.
- [8] WANG J H, WANG H Y, CHEN Y L, et al. A constructive algorithm for unsupervised learning with incremental neural network[J]. *Journal of Applied Research & Technology*, 2015, 13(2):188.
- [9] PLATT J. A resource-allocating network for function interpolation [J]. *Neural Computation*, 1991, 3(2):213.
- [10] LAURET P, FOCK E, MARA T A. A node pruning algorithm based on a Fourier amplitude sensitivity test method [J]. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 2006, 17(2):273.
- [11] ISLAM M M, SATTAR M A, AMIN M F, et al. A new adaptive merging and growing algorithm for designing artificial neural networks [J]. *IEEE Transactions on Systems Man and Cybernetics Part B*, 2009, 39(3):705.
- [12] HAN H G, QIAO J F. A structure optimisation algorithm for feedforward neural network construction [J]. *Neurocomputing*, 2013, 99:347.
- [13] GUO W, WEI H, ZHAO J, et al. Theoretical and numerical analysis of learning dynamics near singularity in multilayer perceptrons [J]. *Neurocomputing*, 2015, 151:390.
- [14] HACINE-GHARBI A, RAVIER P, HARBA R, et al. Low bias histogram-based estimation of mutual information for feature selection [J]. *Pattern Recognition Letters*, 2012, 33(10):1302.
- [15] GUO Y M, LIU Y G, ZENG G M, et al. An integrated treatment of domestic wastewater using sequencing batch biofilm reactor combined with vertical flow constructed wetland and its artificial neural network simulation study [J]. *Ecological Engineering*, 2014, 64:18.
- [16] MIRBAGHERI B, EHTESHAMI M, BAGHERI Z. Modeling of a sequencing batch reactor treating municipal wastewater using multi-layer perceptron and radial basis function artificial neural networks [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2015, 93:111.
- [17] VIVIANO G, SALERNO F, CHIARA E, et al. Surrogate measures for providing high frequency estimates of total phosphorus concentrations in urban watersheds [J]. *Water Research*, 2014, 64:265.



引用格式: 窦智峰, 晋玉祥, 郭新飞. IGBT 瞬态短路失效分析及其有限元热电耦合模型研究 [J]. 轻工学报, 2018, 33(6): 101 - 108.

中图分类号: TM46 文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.012

文章编号: 2096-1553(2018)06-0101-08

IGBT 瞬态短路失效分析及其有限元热电耦合模型研究

Research on transient short-circuit failure analysis and finite element thermoelectric coupling model of IGBT

窦智峰, 晋玉祥, 郭新飞

DOU Zhifeng, JIN Yuxiang, GUO Xinfei

关键词:

绝缘栅型晶闸管; 瞬态短路; 结温测量; 临界能量值; 有限元热电耦合模型

郑州轻工业学院 电气信息工程学院, 河南 郑州 450002

College of Electric and Information Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

Key words:

insulated gate bipolar transistor (IGBT); transient short-circuit junction temperature measurement; critical energy; finite element thermoelectric coupling model

摘要: 针对传统热网络模型不适用于 IGBT 短路情况下结温测量的问题, 通过现场瞬态短路破坏性试验, 在分析现场瞬态短路情况下 IGBT 失效机理的基础上, 界定了 IGBT 短路失效时的临界能量值, 发现了临界能量值在不同初始温度和不同母线电压情况下的演化规律, 并建立了有限元热电耦合模型. 结果表明, 随着直流母线电压、初始温度和电流密度的增加, IGBT 的短路维持时间和临界能量值会大幅度减小, 而 IGBT 发生失效的临界温度点与初始温度的大小无关; 在短路过程中 IGBT 失效前热量的传递仅达到焊料层, 且短路瞬间其结温最高点分布在耗尽层的边界处.

收稿日期: 2018-07-06

基金项目: 河南省自然科学基金项目(162300410321)

作者简介: 窦智峰(1979—), 男, 吉林省松原市人, 郑州轻工业学院讲师, 博士, 主要研究方向为大、中功率电力电子器件可靠性与多电平电能变换器故障容错及其控制策略.

Abstract: Aiming at the problem that the traditional thermal network model is not suitable for IGBT short-circuit junction temperature measurement, based on the analysis of the failure mechanism of IGBT in the case of transient short-circuit, the energy value of IGBT short-circuit failure was defined. The evolution law of the critical energy value of IGBT under different initial temperature and different bus voltage was found, and finite element thermoelectric coupling model was established. The simulation results showed that with the increase of DC bus voltage, initial temperature and current density, the short-circuit maintenance time and critical energy value of IGBT would be greatly reduced while the critical temperature point of IGBT failure was independent of the initial temperature; the heat transfer before IGBT failure only reached the solder layer during the short-circuit process, and the maximum temperature point of IGBT was distributed at the boundary of the depleted layer at the instant of short-circuit.

0 引言

绝缘栅型晶闸管 IGBT (insulated gate bipolar transistor) 具有驱动简单、功率密度大、功耗小、热稳定性好等性能,被广泛应用于各种中、大功率电能变换装置,是目前应用较为广泛的全控型电力电子器件^[1-2]。作为各种电能变换的主功率开关器件,在某些工作环境恶劣的应用场合,如海上风力发电、航空航天电能转换等,电能转换器内外部工作条件的巨大差异,常导致功率器件的可靠性降低,使失效机率大幅增加,最终有可能造成严重损失或灾难^[3-4]。

根据 IGBT 产生失效历经时间的长短,可将 IGBT 的失效分为老化失效和现场失效。造成 IGBT 老化失效的主要原因是 IGBT 模块在导通和关断的过程中受到高频率热冲击的影响,加之不同封装工艺下 IGBT 各层异质结构的热膨胀系数不均衡,使 IGBT 在受到长时间过应力作用时表现出不同的失效模式^[5-6]。现场失效是 IGBT 在经受瞬间的过应力冲击之后的失效。IGBT 的现场失效又可分为开路失效和短路失效。从系统可靠性的角度分析,开路失效故障的影响可以被隔离并限定在一定范围内,因此,开路失效对系统本身安全运行的影响并不是致命的^[5]。造成短路失效的原因主要包括过电压、闩锁效应、二次击穿和过能量冲击。由于 IGBT 在各种短路失效模式下都伴随着很高

的电流上升率和瞬间高温的现象,因此这种致命的失效模式对 IGBT 的损坏是不可逆转的^[7-8],如果不加以保护和控制,严重时会导致器件烧毁、爆炸、系统停机,甚至造成更大的损失。根据失效的部位不同,又可将 IGBT 失效分为封装失效和芯片失效。现有 IGBT 均采用叠层封装技术,该技术有效提高了封装密度和器件的运行效率。但在功率循环或温度循环中,由于器件各层材料的热膨胀系数不同,在温度变化时热应变不同,因此连接层之间会产生热应力疲劳损耗,即封装失效。因此,IGBT 的封装失效实质是器件各层异质结构导热系数不同导致的。导致 IGBT 芯片失效的原因有很多,如电源或负载波动、控制或驱动电路故障、散热装置故障、线路短路等,但最终都可归结为电击穿或热击穿,其中电击穿失效的本质也是温度过高的热击穿失效^[2]。

IGBT 结温瞬态变化机理直接影响功率器件寿命预测理论的建立。传统的结温测量方法是在模块底部安装热敏电阻或者热电偶,此方法响应速度非常慢,一般在 s 级^[9];直接测量法一般采用光导纤维和红外测温仪,此方法的响应速度一般在 ms 级,而 IGBT 在短路的情况下维持时间非常短,通常是几十 μs 甚至几 μs ,因此传统的热网络模型并不适用于短路情况下的结温测量^[10-14]。

鉴于此,本文首先对 IGBT 进行短路破坏

性试验,分析 IGBT 在短路情况下的失效机理,界定导致 IGBT 失效的临界能量值,分析临界能量值在不同情况下的变化规律. 然后利用由试验得到的短路数据,建立有限元热电耦合模型,对 IGBT 在短路情况下的瞬态结温变化趋势和 IGBT 内部的温度分布进行分析,从而为 IGBT 的老化失效分析、器件状态健康管理和功率器件寿命预测提供参考,也为高可靠 IGBT 模块的设计提供数据积累和实验参考.

1 短路试验

1.1 短路试验平台

IGBT 瞬态短路失效试验是通过搭建多重安全保护功率器件失效测试平台实现的. 此试验平台通过不同能量等级的预设,对功率器件进行定量(能量)短路失效试验,可实现雪崩击穿、二次击穿、器件爆炸等由不同失效机理引起的失效模式试验.

失效试验的电路原理如图 1 所示. 通过对单个 IGBT 的控制,将 8 个 $460 \mu\text{F}/600 \text{V}$ 薄膜电容预存储的能量完全释放,能够实现最高能量值为 330J ,瞬间额定电流值超过 $17 \text{kA}^2 \cdot \text{s}$ 的破坏性试验. 此装置回路总阻抗和总感抗分别为 $180 \mu\Omega$, 120nH . IGBT 短路失效电流的测量是通过 CWT3/6/30/150R 型柔性电流探头实现的. IGBT 的基板下面安装有一个电加热盘,用于控制 IGBT 的温度.

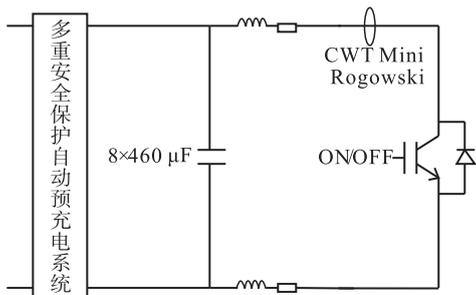


图 1 短路失效测试电路原理图

Fig. 1 Schematic diagram of circuit testing short-circuit failure

1.2 短路失效分析

本试验选用英飞凌 PG - TO247 - 3 封装型 AIKW30N60CT $600 \text{V} - 30 \text{A}$ 的单 IGBT - Diode 半桥臂结构模块,对此模块施加 300V 的直流母线电压,保持基板温度为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,驱动电压为 $+15 \text{V}$,得到其瞬态短路波形图如图 2 所示. 其中 V_{gs} 为驱动电压, I_{d} 为集电极电流, V_{dc} 为直流母线电压, V_{pt} 为测试平台的保护信号. 整个短路过程可以分为 4 个阶段.

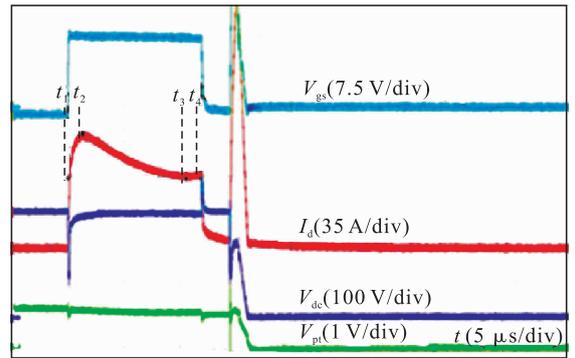


图 2 在直流母线电压 300V , 基板温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 IGBT 短路波形图

Fig. 2 Short-circuit waveform diagram of IGBT with $V_{\text{dc}} = 300 \text{V}$ and $T_{\text{case}} = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

阶段 1 ($t_1 \sim t_2$): 当短路发生在 t_1 时刻时,主回路中仅存在较小的线路阻抗,集电极的电流迅速上升. 此时,IGBT 从正向阻断区进入饱和区,集射极两端的饱和电压几乎等于直流母线电压. 在此阶段,由于 MOS 沟道的自由度与温度呈现正反馈关系(直到 600K),因此电流呈现不断上升的趋势.

阶段 2 ($t_2 \sim t_3$): 在此阶段,IGBT 一直处于饱和区,将会产生相当大的功率损耗,开关管的自热效应使 IGBT 的结温迅速上升. 当温度上升到一定程度,将会导致 MOS 沟道(漂移区)载流子的自由度降低,短路电流会略微下降. 此时,如果 IGBT 的结温在安全范围内,它仍然能够通过控制驱动信号将 IGBT 关断.

阶段 3 ($t_3 \sim t_4$): 随着结温的继续上升,短

路电流与温度呈正反馈关系. 这是由 MOS 沟道电子电流下降率低于由热辅助的碰撞电离所引起的. 因此, 短路电流又呈现出略微的上升趋势.

阶段4($t_4 \sim$): t_4 时刻 IGBT 被关断, 关断之后存在非常大的拖尾泄漏电流, 使 IGBT 结温瞬间以指数规律上升, 最终导致 IGBT 发生热失效. 这种失效模式发生在 IGBT 被关断延迟一段时间之后.

图3和图4, 分别为基板温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$, 直流母线电压分别为 300 V 和 375 V 时 IGBT 的瞬态短路波形, 其过程与上述4个阶段的分析一致.

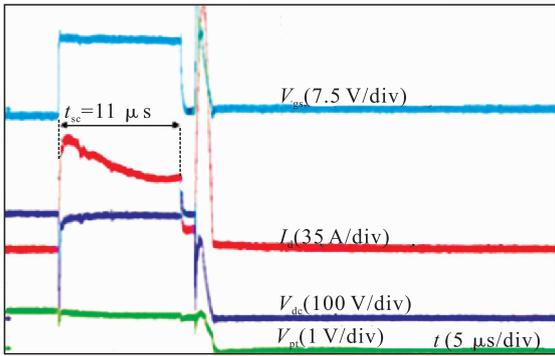


图3 在直流母线电压 300 V , 基板温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 IGBT 短路波形图

Fig. 3 Short-circuit waveform diagram of IGBT with $V_{dc} = 300\text{ V}$ and $T_{case} = 150\text{ }^\circ\text{C}$

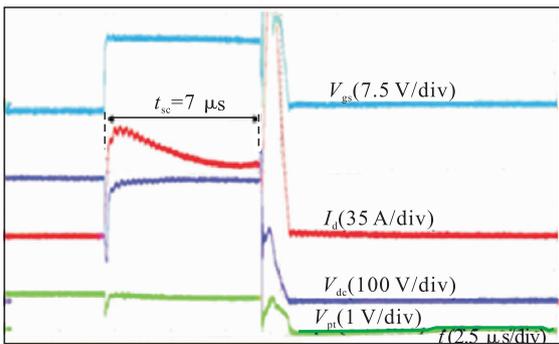


图4 在直流母线电压 375 V , 基板温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 IGBT 短路波形图

Fig. 4 Short-circuit waveform diagram of IGBT with $V_{dc} = 375\text{ V}$ and $T_{case} = 150\text{ }^\circ\text{C}$

1.3 临界能量值界定

IGBT 在承受不同能量值的冲击过程中, 当能量值低于临界能量值时, 其失效之前能够承受的冲击次数至少在万次以上; 当能量值大于临界能量值时, 经受一次能量冲击, 器件就会发生失效^[7]. 因此, 在短路过程中, 界定临界能量值非常重要. 临界能量值 E_c 定义为

$$E_c = \int_{t_1}^{t_2} V_{ds} \cdot I_d dt$$

在不同的试验条件下, IGBT 的临界能量值根据基板温度、直流母线电压的变化趋势如图5和图6所示.

从图5可以看出, 在同一直流母线电压下, 低温时需要更大的能量损耗才能使其达到临界失效温度点. 随着温度的上升, IGBT 失效临界能量值呈线性略微下降的趋势. 从图6可以看

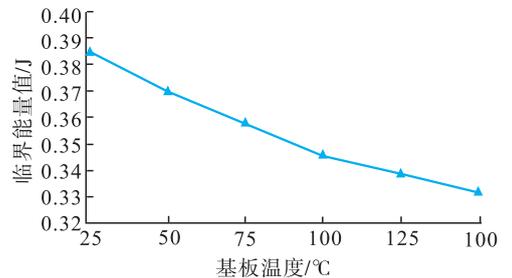


图5 当直流母线电压为 330 V 时, 不同温度下临界能量值的比较

Fig. 5 Comparison of critical energy value under different temperature conditions at $V_{dc} = 330\text{ V}$

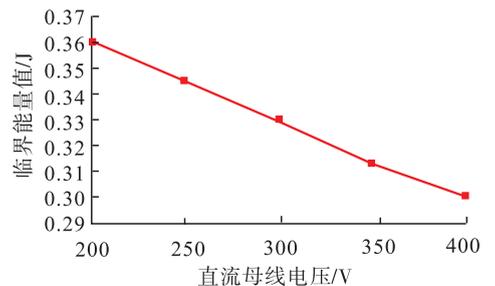


图6 当基板温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 时, 不同直流母线电压下临界能量值的比较

Fig. 6 Comparison of critical energy value under different DC bus voltage conditions at $T_{case} = 150\text{ }^\circ\text{C}$

出,在同一温度下,随着直流母线电压的升高,引起 IGBT 失效的临界能量值也略微降低. 因此,IGBT 的临界能量值与温度、直流母线电压均呈负反馈的关系.

2 IGBT 的有限元热电耦合模型

为了得到短路情况下 IGBT 的温度分布,本文基于短路试验的数据建立了 IGBT 的有限元热电耦合模型,如图 7 所示. IGBT 各层材料的物理参数如表 1 所示^[15].

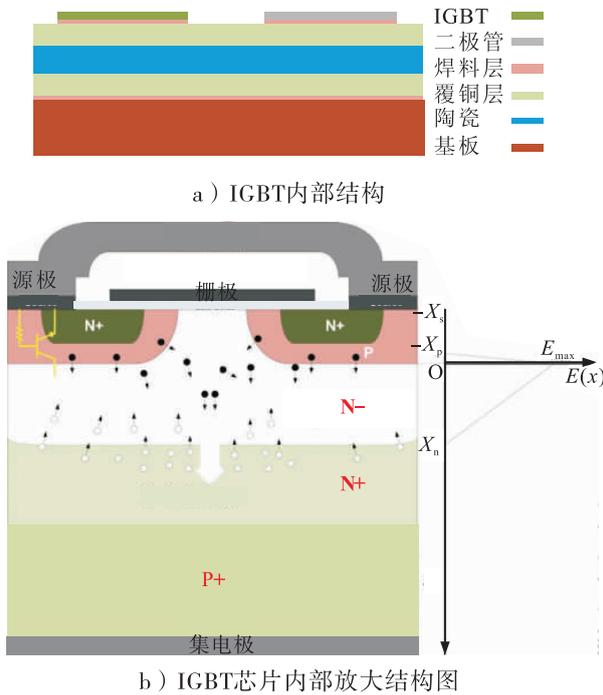


图 7 IGBT 有限元热电耦合模型

Fig. 7 Finite element thermoelectric coupling model of IGBT

表 1 IGBT 各层材料的物理参数

Table 1 Each layer of physical parameters of IGBT

名称 (材料)	比热容/ (J · kg ⁻¹ · K ⁻¹)	密度/ (kg · m ⁻³)	热传导系数/ (W · m ⁻¹ · K ⁻¹)
IGBT 芯片 层(硅)	700	2329	131
二极管(硅)	700	2329	131
覆铜层(铜)	385	8700	400
焊料层	200	7360	48
陶瓷(Al ₂ O ₃)	200	7360	35
基板(铜)	385	8700	400

在短路瞬间,当直流母线电压施加在功率器件上时,将会形成一个宽度为 x_p 的 P 沟道和一个宽度为 x_n 的 N 漂移区的耗尽层,即

$$x_p = \frac{N_d}{N_d + N_a} \sqrt{\frac{2\epsilon_s}{q} \left(\frac{N_d + N_a}{N_d N_a} \right) V_{dc}} \quad (1)$$

$$x_n = \frac{N_a}{N_d + N_a} \sqrt{\frac{2\epsilon_s}{q} \left(\frac{N_d + N_a}{N_d N_a} \right) V_{dc}} \quad (2)$$

其中, ϵ_s 为硅材料的电介质常数, q 为电子电荷, N_a 和 N_d 分别代表 P 沟道和 N 漂移区的掺杂浓度. 在此模型中,根据击穿电压的大小可以确定 N 漂移区的厚度为 20 μm ,掺杂浓度为 $2 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$. 在不同的短路条件下,IGBT 的温度分布可以通过在笛卡尔坐标下求解热传递公式而得到

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(k_p \frac{\partial T}{\partial x} \right) + \frac{\partial}{\partial y} \left(k_p \frac{\partial T}{\partial y} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(k_p \frac{\partial T}{\partial z} \right) + Q = \rho c_p \frac{\partial T(x, y, z)}{\partial t} \quad (3)$$

其中, k_p, ρ, c_p 分别为硅材料的热传导系数、材料密度和比热容; Q 为 IGBT 在短路过程中的功率损耗所产生的热量. 由于热量的流动方向是从 IGBT 芯片层向基板传递,因此式(3)可以简化为

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(k_p \frac{\partial T}{\partial x} \right) + Q = \rho c_p \frac{\partial T(x, y, z)}{\partial t} \quad (4)$$

内部热源 Q 可以由下式计算得到:

$$Q = E(x)J(t) = \frac{E(x)I(t)}{S} \quad (5)$$

其中, $J(t)$ 为短路电流密度; S 为 IGBT 的有效面积; $I(t)$ 为试验所测短路电流; $E(x)$ 为空间电荷区的电场分布,可以由式(6)(7)计算得到

$$E(x) = \frac{qN_d}{\epsilon_s} (x - x_n) \quad 0 \leq x \leq x_n \quad (6)$$

$$E(x) = \frac{qN_a}{\epsilon_s} (x + x_p) \quad -x_p \leq x \leq 0 \quad (7)$$

将式(1)(2)(5)(6)(7)带入式(4)中可以得出

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(k_p \frac{\partial T}{\partial x} \right) + \frac{qN_d}{\epsilon_s} \times$$

$$\left[\frac{N_a}{N_d + N_a} \sqrt{\frac{2\varepsilon_s}{q} \left(\frac{N_d + N_a}{N_d N_a} \right) V_{dc}} - x \right] \times \frac{I(t)}{S} = \rho c_p \frac{\partial T(x)}{\partial t} \tag{8}$$

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(k_p \frac{\partial T}{\partial x} \right) + \frac{q N_d}{\varepsilon_s} \times \left[\frac{N_d}{N_d + N_a} \sqrt{\frac{2\varepsilon_s}{q} \left(\frac{N_d + N_a}{N_d N_a} \right) V_{dc}} - x \right] \times \frac{I(t)}{S} = \rho c_p \frac{\partial T(x)}{\partial t} \tag{9}$$

根据式⑧和⑨,得出以下结论:

1) 随着直流母线电压的升高,短路电流也升高,将会导致结温迅速上升. 对于给定的临界失效温度,从短路发生到器件失效之间的维持时间将会大大缩短.

2) 在同样的直流母线电压下,结温的上升率与短路电流密度成正比.

在此模型中,基板下表面($x = x_c$)被设定为恒定温度(从 25 °C 到 200 °C),假设 IGBT 内部热量流通是单向的,且由于绝热硅胶芯片层上表面($x = -x_s$)是绝热的,因此短路前 IGBT 的温度等于基板温度. 由此可得模型中的边界条件和初始值如下:

$$T(x = x_c, t) = T_c$$

$$k_p \frac{\partial T}{\partial x} \Big|_{x = -x_s} = 0$$

$$T(x, t = 0) = T_c$$

3 仿真结果与分析

根据试验短路电流波形和 IGBT 的有限元热电耦合模型,通过数值仿真的方法可以得到 IGBT 的温度分布. 图 8 为直流母线电压 300 V, 基板温度 25 °C 的情况下 IGBT 发生短路后关断时刻垂直方向温度分布图.

从图 8 可以看出,由于短路时间非常短,在整个短路过程中,IGBT 的热量传递仅仅传递到焊料层且最高温度在耗尽区的边界($x = 0$),这

是由于此边界处的电场强度最高. 如此短的热量传递距离反映了在短路过程中温度的分布与 IGBT 封装技术和外部冷却条件无关. 此外,在耗尽区产生的集中热量将会造成栅极氧化层和金属层的退化甚至破坏.

图 9 为 IGBT 在不同的直流母线电压和基

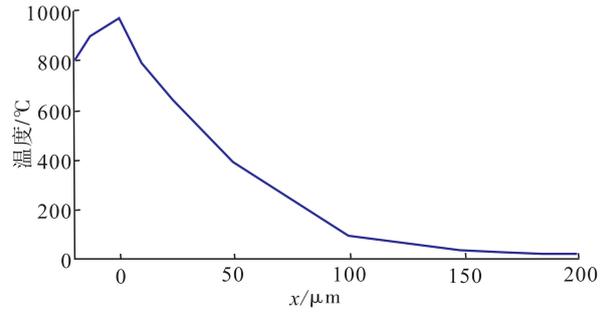


图 8 IGBT 短路关断时刻垂直方向温度分布图
Fig. 8 Vertical temperature distribution diagram of IGBT at short-circuit shutdown time

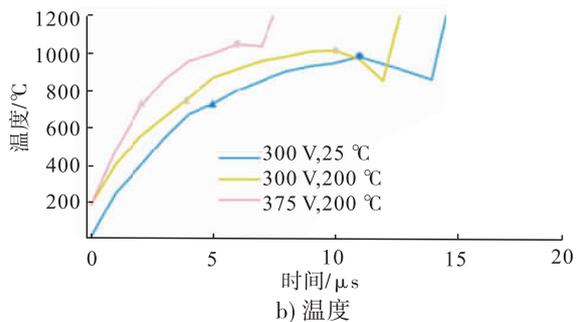
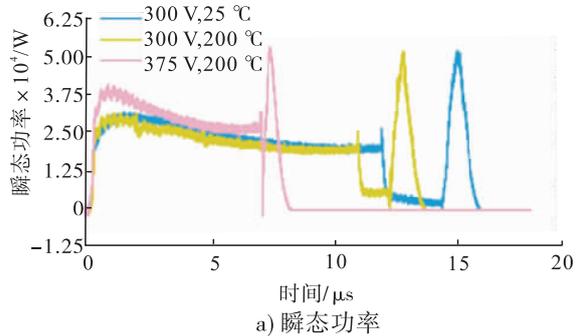


图 9 不同直流母线电压和基板温度下,耗尽层边界处不同瞬态功率、温度曲线图
Fig. 9 Curves of different transient power and temperature at the boundary of depletion layer under different DC bus voltage and base temperature

板温度下,耗尽层边界处($x=0$)的瞬态功率、温度曲线对比图。

从图9可以看出,发生短路时IGBT温度的变化对失效临界温度点影响不大,仅仅缩短了短路过程所维持的时间。而在不同的直流母线电压下,直流母线电压的升高会使失效临界温度点有所升高,并且短路过程所维持的时间几乎缩短了一半。相比较于较高的温度,由于短路过程所维持的时间更短,较高的直流母线电压对IGBT短路所造成的损害更加严重,这也对整个系统的保护装置提出了更高的要求。

4 结语

本文对IGBT进行了破坏性短路试验,在分析IGBT短路过程中的失效机理、IGBT失效临界能量值及其在不同情况下演化规律的基础上,建立了IGBT的有限元热电耦合模型,通过仿真得出了IGBT在瞬态短路情况下的内部温度分布和直流母线电压与初始温度对内部温度分布的影响。结果如下:

1)随着直流母线电压、初始温度、电流密度的增加,IGBT的短路维持时间和临界能量值都将会大幅度减小,而IGBT发生失效的临界温度点与初始温度的大小无关,与直流母线电压、电流密度有关,且呈现出正反馈关系。

2)IGBT发生短路瞬间,结温迅速上升且结温的最高点分布在耗尽层的边界处($x=0$);短路电流密度越大将会导致结温上升的速度越快,且造成较大的温度梯度。

3)在短路过程中,IGBT失效前热量的传递仅仅达到焊料层,这说明IGBT的短路能力与其封装、散热条件无关。

对于电力电子功率电路的设计者来说,在设计电路的过程中必须考虑一定的安全裕度,本文所得试验数据和仿真数据具有一定参考价值,可为高可靠性IGBT模块的设计提供数据

积累和实验参考,也可为电力电子故障诊断和容错提供新思路。

参考文献:

- [1] 李武华,陈玉香,罗皓泽,等.大容量电力电子器件结温提取原理综述及展望[J].中国电机工程学报,2016,36(13):3546.
- [2] 汪波,罗毅飞,张烁,等.IGBT极限功耗与热失效机理分析[J].电工技术学报,2016,31(12):135.
- [3] SONG Y, WANG B. Survey on reliability of power electronic systems[J]. IEEE Transactions on Power Electronics,2013,28(1):591.
- [4] 徐帅,杨欢,王田刚,等.电力电子变换器可靠性研究[J].北京交通大学学报(自然科学版),2015,39(5):125.
- [5] WU R, BLAABJERG F, WANG H, et al. Catastrophic failure and fault-tolerant design of IGBT power electronic converters-an overview[C]//IECON 2013—39th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society, Vienna: IEEE,2013:507-513.
- [6] 赖伟,陈民铀,冉立,等.老化实验条件下的IGBT寿命预测模型[J].电工技术学报,2016,31(24):173.
- [7] LEFEBVRE S, KHATIR Z, SAINT-EVE F, et al. Experimental behavior of single-chip IGBT and CoolMOS devices under repetitive short-circuit conditions[J]. IEEE Transactions on Electron Devices,2005,52(2):2763.
- [8] 汪波,胡安,唐勇,等.IGBT电压击穿特性分析[J].电工技术学报,2011,26(8):145.
- [9] 窦智峰,翟朝伟,崔光照,等.IGBT现场失效短路结温测量方法研究[J].轻工学报,2017,32(4):73.
- [10] AMMOUS A, AMMOUS K, MOREL H, et al. Electro-thermal modeling of IGBTs: application to short-circuit conditions[J]. IEEE Transac-

- tions on Power Electronics, 2000, 15(4):778.
- [11] RACITI A, MUSUMECI S, CRISTALDI D. Modeling and simulation of IGBT thermal behavior during a short circuit power pulse [C] // 2015 International Conference on Clean Electrical Power (ICCEP), Taormina; IEEE, 2015: 542 - 547.
- [12] CLEMENTE S. Transient thermal response of power semiconductors to short power pulses [J]. IEEE Transactions on Power Electronics, 1993, 8(4):337.
- [13] 唐云宇, 林燎源, 马皓. 一种改进的并联 IGBT 模块瞬态电热模型 [J]. 电工技术学报, 2017, 32(12):88.
- [14] 唐勇, 汪波, 陈明. IGBT 开关瞬态的温度特性与电热仿真模型 [J]. 电工技术学报, 2012, 27(12):146.
- [15] SANO K, HAYASHI K, KAWAFUJI H, et al. Ultra-small compact transfer molded package for power modules [C] // 2008 58th Electronic Components and Technology Conference, Lake Buena Vista; IEEE, 2008:1832.
-
- (上接第 100 页)
- [18] JEPPSSON U, PONS M N. The COST benchmark simulation model-current state and future perspective [J]. Control Engineering Practice, 2004, 12(3):299.
- [19] HAN H G, QIAO J F. A structure optimization algorithm for feedforward neural network construction [J]. Neurocomputing, 2013, 1(99):347.
- [20] CHEN C, YAN X. Optimization of a multilayer neural network by using minimal redundancy maximal relevance-partial mutual information clustering with least square regression [J]. IEEE Transactions on Neural Networks and Learning Systems, 2015, 26(6):1177.