



引用格式:何培新,李聪聪,胡晓龙,等. 基于 HS-SPME-GC-MS 的浓香型白酒窖泥中可培养 *Clostridium spp.* 挥发性代谢物成分分析[J]. 轻工学报,2017,32(6):1-11.

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.001

文章编号:2096-1553(2017)06-0001-11

基于 HS-SPME-GC-MS 的浓香型白酒窖泥中可培养 *Clostridium spp.* 挥发性代谢物成分分析

Component analysis of volatile metabolites of culturable *Clostridium spp.* isolated from pit muds of Luzhou-flavor liquor based on HS-SPME-GC-MS

何培新¹,李聪聪¹,胡晓龙¹,迟雷¹,马兆¹,郭燕凤²

HE Pei-xin¹,LI Cong-cong¹,HU Xiao-long¹,CHI Lei¹,MA Zhao¹,GUO Yan-feng²

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 菏泽学院 农业与生物工程学院,山东 菏泽 274000

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

2. College of Agricultural and Biological Engineering, Heze University, Heze 274000, China

关键词:

浓香型白酒;窖泥;梭菌;顶空固相微萃取-气质联用;挥发性代谢产物

Key words:

Luzhou-flavor liquor; pit muds; *Clostridium spp.*; HS-SPME-GC-MS; volatile metabolite

摘要:对某酒企窖泥进行分离纯化培养,得到 88 株细菌纯培养物,通过 16S rRNA 基因序列比对和系统发育树分析,其中 75 株细菌被分为 8 个系统发育簇(cluster I—VIII),其最高相似菌分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri*。采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)对 8 个代表性梭菌菌株的挥发性代谢物进行检测,共检测出 75 种挥发性物质,其中醇类 23 种、酸类 20 种、酯类 14 种、醛类 2 种、酮类 2 种和其他挥发性物质 14 种。通过主成分分析发现,菌株 RL1 (*C. tyrobutyricum*) 和 EL7 (*C. butyricum*) 主要与乙酸和丁酸等化合物的形成有关;EL46 (*C. kluyveri*)、RL20 (*C. acetobutylicum*) 和 RL10 (*C. indolis*) 主要与己酸和己酸乙酯等化合物的形成有关;EL12 (*C. bifermentans*) 和 RL23 (*C. sporogenes*) 主要与硫代醋酸 S-甲酯、1-癸醇和正辛醇有关;而 EL43 (*C. cadaveris*) 主要与多种酯类化合物的合成有关。

收稿日期:2017-08-30

基金项目:中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目(2017JJ012);郑州轻工业学院博士科研基金资助项目(2016BSJJ018);郑州轻工业学院研究生科技创新项目(2016030)

作者简介:何培新(1970—),男,河南省民权县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为生物工程。

通信作者:胡晓龙(1984—),男,河南省杞县人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为白酒酿造工程。

Abstract: A total of 88 pure cultures was obtained from the pit muds of one wine corporation following separation and purification culture. The 75 strains of bacteria were assigned into 8 phylogenetic clusters (cluster I – VIII) based on the analysis of 16S rRNA gene sequences and phylogenetic tree. In them, the most similar bacteria were *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifementans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* and *C. kluyveri*, respectively. The volatile metabolites of 8 representative *Clostridium spp.* were analyzed using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 75 volatile metabolites was detected, including 23 alcohols, 20 acids, 14 esters, 2 aldehydes, 2 ketones and other 14 volatile substances. The principal component analysis revealed that the representative strain RL1 (*C. tyrobutyricum*) and EL7 (*C. butyricum*) were mainly related to the generation of acetic acid and butyric acid, and EL46 (*C. kluyveri*), RL20 (*C. acetobutylicum*) and RL10 (*C. indolis*) mainly contributed to the formation of caproic acid and ethyl hexanoate, and EL12 (*C. bifementans*) and RL23 (*C. sporogenes*) were mainly associated with the S-methyl acetate, 1-Decyl alcohol and octanol, and EL43 (*C. cadaveris*) was mainly correlated to the biosynthesis of various esters.

0 引言

浓香型、酱香型、清香型和米香型是我国白酒4大基础香型,其中,浓香型白酒具有芳香浓郁、绵柔甘冽、香味协调、入口甜、落口绵、尾净余长等风格特征,其产销量占全国白酒总产销量的70%左右。浓香型白酒含有成百上千种香气物质,包括有机酸、酯、醇、醛酮、酚、缩醛及硫化物等^[1-2],其种类与含量影响着浓香型白酒的整体风格和品质。在上述香气物质中,对浓香型白酒风味影响较大的香气物质主要包括具有酸味、奶油等香味的己酸、丁酸、3-甲基丁酸等脂肪酸,以及具有果香和花香等香味的己酸乙酯、丁酸乙酯、辛酸乙酯、戊酸乙酯等酯类化合物。此外,具有甜味、烟熏味等香味的正己醇、3-甲基丁醇、4-乙基愈创木酚和4-甲基愈创木酚对浓香型白酒风味也有较大的贡献度^[3]。

浓香型白酒中复杂香气成分的形成与其独特的酿造工艺密不可分。浓香型白酒的生产可以简单概括为:以粮谷为原料,泥窖为发酵容器,采用多菌种自发发酵的固态发酵模式,经蒸馏、贮存、勾调等环节制成的高度酒精饮料^[4]。在浓香型白酒酿造过程中,大曲和窖泥是微生物的主要来源。大曲中的优势微生物为好氧和兼性好氧的霉菌、酵母、乳酸菌、芽孢杆菌等,其

在发酵过程中形成多种生物酶(淀粉酶、蛋白酶和酯化酶等),主要参与粮谷糖化及酒精发酵过程,同时形成一些香味物质,如乙酸、乳酸、苹果酸、亮氨酸、甘露醇及N-乙酰谷酰胺等^[5]。窖泥中的优势微生物主要为兼性厌氧和专性厌氧的原核微生物,如厚壁菌门(Firmicutes)中的梭菌属(*Clostridium*)和瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)等,拟杆菌菌门(Bacteroidetes)中的普雷沃菌属(*Prevotella*),以及广古菌门(Euryarchaeota)中的甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)等^[6-7]。研究表明,梭菌*Clostridium spp.*是一类能合成多种脂肪酸和醇类物质的微生物类群,如*C. tyrobutyricum*和*C. butyricum*的主要代谢产物为丁酸,同时伴有乙酸的生成^[8-9]; *C. kluyveri*的主要代谢产物为己酸,同时伴有乙酸、丁酸及辛酸的生成^[4]; *C. beijerinckii*能发酵糖类,产生乙醇及丁醇等^[10]。在浓香型白酒酿造过程中,*Clostridium spp.*所产生的脂肪酸和醇类可以直接作为香味物质,同时其在酶促和非酶促反应中还能形成相应的酯类化合物,如丁酸乙酯及己酸乙酯等^[11]。此外,白酒酿造过程中可能会存在一些梭菌属物种,如*C. ghoni*和*C. sordellii*,能产生吡啶和4-甲基苯酚等异嗅物质^[12],影响浓香型白酒的品质。鉴于此,本研

究拟对浓香型白酒窖泥中的 *Clostridium spp.* 进行分离和初步鉴定,并采用顶空固相微萃取-气相色谱-质谱联用法(HS-SPME-GC-MS)对分离菌株的挥发性代谢产物进行分析,为明晰白酒酿造过程中 *Clostridium spp.* 与浓香型白酒风味之间的联动关系,以及为通过调控白酒酿造过程中 *Clostridium spp.* 的定向生物强化及控制手段来提升白酒品质提供一定的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 样品采集 窖泥样品取自某酒业正常发酵窖池底部的窖泥,取出后迅速装入无菌采样袋,置于冰盒内运输至实验室,4℃下保存。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR Master Mix (2×) (K0171)、引物 27F/1492R、DNA 分子量标准 Marker E(200—1500 bp)、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;薄荷醇,购自美国 Sigma 公司;其余试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要仪器 DH-400 恒温培养箱,上海鸿都电子科技有限公司产;LX-C50 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司产;2.5 L 厌氧培养罐,日本三菱化学公司产;TGL-16G 离心机,上海安亭科学仪器厂产;DYY-III-5 型稳压电泳仪,北京六一仪器设备有限公司产;C1000 PCR 仪、GelDoc 1000 凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司产;固相萃取头(50/30 μm DVB/CAR/PDMS)及 SPME 手动进样手柄,美国 SUPELCO 公司产;6890N/5973 气质联用仪,美国安捷伦公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基的制备 参照 X. L. Hu 等^[4]的方法配制增强梭菌培养基,(RCM 培养基)、乙

醇醋酸钠培养基(ES 培养基),RCM 和 ES 固体培养基在相应的 RCM 和 ES 液体培养基的基础上分别添加质量分数为 2% 的琼脂。

1.2.2 窖泥梭菌的纯化培养 称取 10 g 窖泥样品,加入盛有 100 mL 无菌水和 10 粒玻璃珠($\varphi = 3$ mm)的厌氧瓶中,于 25℃ 的摇床上以 200 r/min 振荡 20 min,使之混匀。将窖泥悬浮液放入 80℃ 水浴锅中热处理 10 min 杀死营养体细胞,以质量分数为 5% 的接种量分别接种于 100 mL RCM 和 ES 液体培养基,37℃ 富集培养 3~5 d。将两种富集培养液采用 10 倍梯度法稀释,分别吸取梯度为 10^{-3} ~ 10^{-6} 的稀释液 200 μL,涂布于梭菌对应类型的 RCM 或 ES 固体培养基,将培养皿置于厌氧盒内 37℃ 培养 3 d,然后对各种不同特征的菌落进行平板划线纯化,以获得单菌落。

1.2.3 纯化菌株的发酵培养 将从 RCM 和 ES 固体培养基中分离到的单菌落再分别接种于 15 mL 对应液体培养基中,37℃ 恒温下厌氧培养 48 h。吸取适量发酵液分别用于细菌基因组 DNA 的提取和其挥发性代谢产物的检测。

1.2.4 DNA 提取、PCR 扩增及测序 菌株 DNA 提取:吸取细菌发酵液 1 mL 置于无菌 EP 管中,10 000 r/min 离心 1 min,弃去上清液。使用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒,提取菌体沉淀基因组 DNA。

PCR 扩增:以 27F/1492R 为 PCR 扩增引物,上述纯菌株的 DNA 为模板,PCR 扩增体系及扩增条件参照张会敏等^[13]的报道。

测序:利用 1% 琼脂糖电泳检测扩增产物,目的片段长度约为 1500 bp。利用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 扩增产物,并将纯化后的扩增产物送至上海生工公司进行双向测序。

1.2.5 菌株分子鉴定及系统发育树的构建 将测得的每株单菌株的 16S rRNA 基因序列在

NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 比对分析,并分别下载与其同源性最高的物种的 16S rRNA 基因序列.将测定菌株及与其同源性最高的物种的 16S rRNA 基因序列采用 Mega 5.05 软件的 Clustal W 功能进行比对,然后用 Neighbor-Joining (NJ) 构建系统发育树.

1.2.6 梭菌发酵液挥发性代谢物 HS-SPME-GC-MS 分析 取 10 mL 菌株发酵液,于 4 °C,10 000 r/min 条件下离心 5 min,吸取 8 mL 上清液置于干净无味的顶空瓶中,同时加入 3 g 氯化钠、20 μL 薄荷醇(100 mg/L 内标液)和 1 个磁力转子.采用顶空固相微萃取法(HS-SPME)萃取发酵液中的挥发性物质,采用 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 固相萃取头,于 50 °C 磁力搅拌恒温水浴锅中萃取 30 min,转速 400 r/min.然后将萃取后的固相萃取头插入气相色谱仪进样口热解吸附 5 min,进样口温度 260 °C.

气相色谱及质谱分析条件:除色谱柱改为 DB-FFAP 色谱柱(60 m × 250 μm × 0.25 μm)外,其余条件均与何培新等^[14]报道的条件相同.

2 结果与讨论

2.1 分离菌株 16S rRNA 基因的系统发育分析

窖泥样品悬液经 RCM 和 ES 液体培养基富集后,分别采用相应的分离平板进行分离纯化培养,共获得 88 株纯培养物.将上述纯培养物的 16S rRNA 基因序列提交 NCBI 数据库进行在线 BLAST 比对并进行系统发育树分析,发现其中 75 株纯培养物分属于 8 个系统发育簇(cluster I—VIII),分别与梭菌属中 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri* 聚在不同的发育簇,基于窖泥中 75 株纯培养物 16S rRNA 基因序列的系统发育树分

析如图 1 所示.

本研究从窖泥中筛选出菌株的最高相似菌包括 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. sporogenes* 和 *C. kluyveri*,这些梭菌也存在于四川和江苏等地酒企的窖泥中^[4,15-17],这表明上述菌种是不同区域酒企窖泥中共有的梭菌种属.而梭菌 *C. bifermentans* 和 *C. cadaveris* 是第一次在窖泥中分离得到的,表明这两种菌可能是该酒企特有的梭菌种属.本研究进一步丰富了窖泥中梭菌的多样性.尽管通过可培养或免培养技术检测到窖泥中的多种梭菌种属,但关于其所产生的挥发性代谢物多样性的报道较少.为了进一步明晰上述 *Clostridium spp.* 所产挥发性代谢物对浓香型白酒风味的贡献度,本研究在图 1 所示 8 个系统发育簇选取每个发育簇生长性能优良的代表性菌株,对其进行挥发性代谢物检测.每个系统发育簇中的代表性菌株及其最高相似菌见表 1.其中,6 株代表菌株(RL1, EL7, EL12, RL23, EL43 和 EL46)分别与其最高相似菌的 16S rRNA 基因序列的同源性均 ≥ 99%.因此可将这些菌株初步鉴定到种水平^[18],分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri*.而菌株 RL10 和 RL20 与其最高相似菌(*C. indolis* 和 *C. acetobutylicum*)的同源性、与库中基因序列的同源性均 < 99%,表明这些菌株可能属于梭菌属中新种的种属^[19],其分类地位需要进一步确证.

2.2 菌株 *Clostridium spp.* 所产挥发性代谢物分析

梭菌代表性菌株发酵液中挥发性物质的 HS-SPME-GC-MS 分析见表 2.由表 2 可知,从上述 8 株代表性梭菌菌株发酵液中共检测到 75 种挥发性物质,其中醇类和酸类化合物种类较多,分别为 23 种和 20 种,而酯类、醛类、酮类和其他挥发性物质分别为 14 种、2 种、2 种和 14 种.

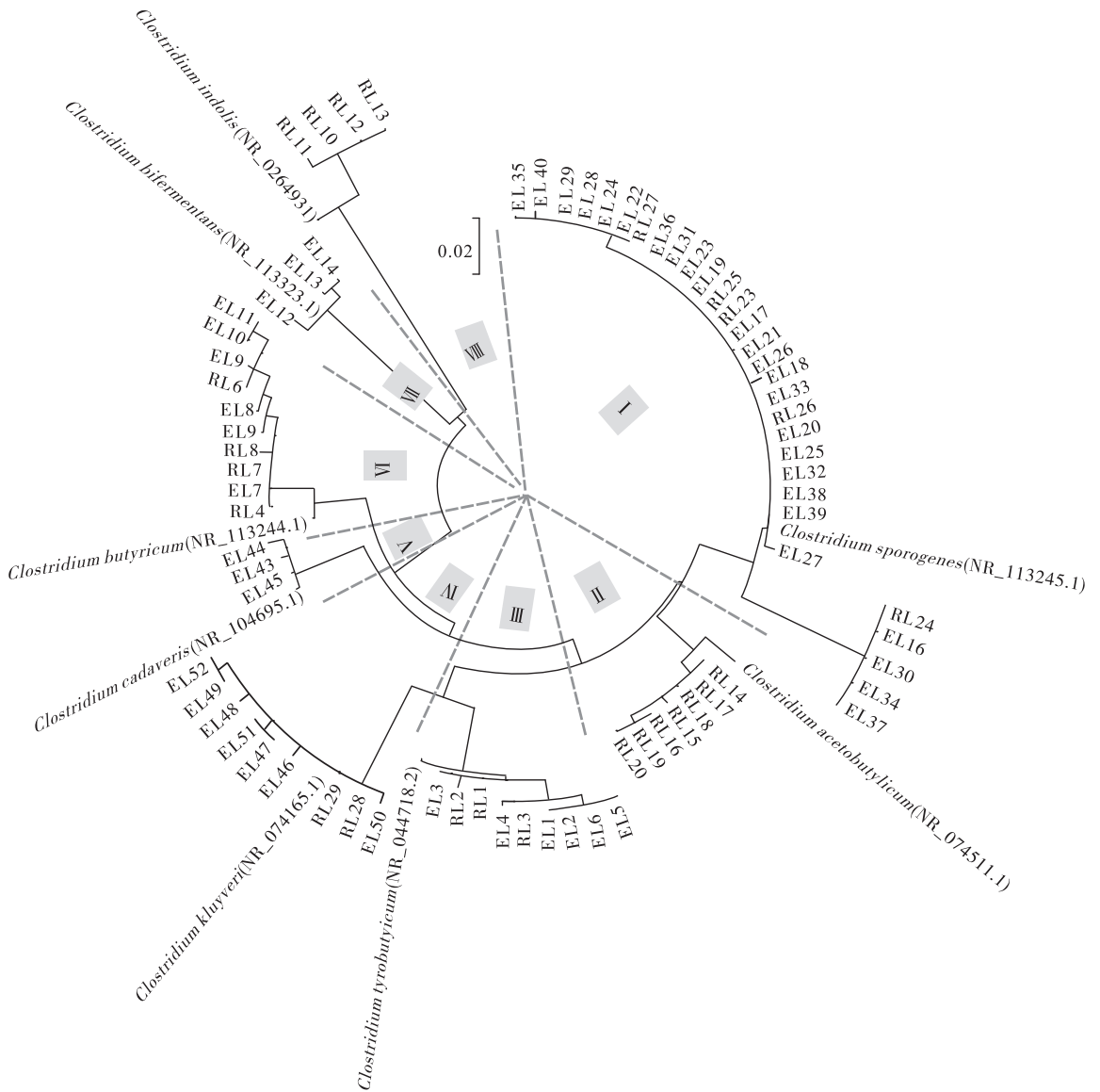


图 1 基于窖泥中 75 株纯培养物 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis based on 16S rRNA gene sequences of 75 pure cultures isolated from pit muds

表 1 代表性菌株的 16S rRNA 基因序列分析结果

Table 1 Analysis of 16S rRNA gene sequences of representative strains

菌株编号	最高相似菌株	相似度	登录号
RL1	<i>C. tyrobutyricum</i>	99%	NR_044718.2
EL7	<i>C. butyricum</i>	99%	NR_113244.1
RL10	<i>C. indolis</i>	95%	NR_026493.1
RL20	<i>C. acetobutylicum</i>	96%	NR_074511.1
EL12	<i>C. bifermentans</i>	100%	NR_113323.1
RL23	<i>C. sporogenes</i>	99%	NR_113245.1
EL43	<i>C. cadaveris</i>	99%	NR_104695.1
EL46	<i>C. kluveri</i>	99%	NR_074165.1

上述 *Clostridium spp.* 的挥发性代谢物在浓香型白酒中已被检出,且被确认为对浓香型白酒香气贡献度较高的化合物为丁酸、戊酸、己酸、己酸乙酯、3-甲基丁醇等^[1-3]。这也表明 *Clostridium spp.* 不仅是窖泥中一类优势微生物类群^[4,6-7,9,17],而且其在浓香型白酒酿造过程中与呈香化合物的形成也密不可分。

在酿造过程中,醇类化合物主要由微生物利用糖、果胶、氨基酸等物质代谢产生,多具有

表2 代表性菌株发酵液中挥发性物质的HS-SPME-GC-MS分析

Table 2 Analysis of volatile compounds in fermentation broth of representative strains using HS-SPME-GC-MS

类别	化合物	RL1	EL7	RL10	RL20	EL12	RL23	EL43	EL46
酯类	己酸乙酯 (V1)	0.01	0.01	0.01	0.07	—	0.02	—	—
	乙酸乙酯 (V2)	—	—	—	—	—	—	0.07	0.03
	丁酸乙酯 (V3)	—	—	—	—	—	—	0.23	—
	乙酸丁酯 (V4)	—	—	—	—	—	—	0.10	—
	丁酸丁酯 (V5)	—	—	—	—	—	—	0.06	—
	乙酸对甲酚酯	0.01	—	—	—	—	—	—	—
	丁酸苯酯	0.02	—	—	—	—	—	—	—
	氯甲酸辛酯 (V6)	—	—	—	—	—	—	0.49	—
	3-苯丙酸乙酯 (V7)	—	—	—	—	0.01	0.01	0.09	—
	3-苯基丙基乙酸酯 (V8)	—	—	—	—	—	—	0.27	—
	二乙基丙二酸二乙酯	—	—	—	—	—	—	—	**
	硫代醋酸S-甲酯 (V9)	—	—	—	—	—	0.13	—	—
	硫代丙酸甲酯	—	—	—	—	0.02	0.01	—	—
	4-甲基戊酸乙酯	—	—	—	—	**	—	—	—
醇类	1-癸醇 (V10)	—	—	—	0.01	0.03	0.06	—	—
	3-苯丙醇 (V11)	—	—	**	**	0.04	0.02	4.37	—
	异丁醇 (V12)	—	—	—	—	—	—	0.18	—
	庚醇 (V13)	—	—	—	—	—	—	0.07	—
	4-苯基丁醇 (V14)	—	—	—	—	—	—	0.13	—
	5-苯基-1-戊醇 (V15)	—	—	—	—	—	—	0.08	—
	丙醇	—	—	—	—	0.02	0.01	—	—
	正辛醇 (V16)	—	—	0.10	**	0.32	0.23	—	**
	3,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇	—	—	—	—	0.01	—	—	—
	十一烯醇	—	—	0.02	—	—	0.02	—	—
	苯甲醇	—	—	**	—	—	**	—	—
	甲基乙酰甲醇	—	—	0.01	—	—	—	—	—
	2,3-丁二醇	—	—	0.01	—	—	—	—	—
	(2R,3R)-(-)-2,3-丁二醇	—	—	0.02	—	—	—	—	—
	香叶醇	—	—	0.01	—	—	—	—	—
	3-甲基丁醇 (V17)	—	—	**	—	—	—	0.18	—
	4-甲基戊醇 (V18)	—	—	—	—	0.04	0.02	0.53	—
	3-甲基己醇 (V19)	—	—	—	—	0.02	0.01	0.47	—
	9-癸烯醇	—	—	—	—	0.01	—	0.03	—
	苯乙醇	0.01	**	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	—
正丁醇 (V20)	**	0.01	—	0.01	0.03	0.01	3.21	**	
正戊醇 (V21)	0.01	—	—	**	—	—	0.64	—	
2-乙基己醇	—	—	—	**	—	—	—	—	
酸类	乙酸 (V22)	0.36	0.26	0.03	0.04	0.05	0.01	0.01	0.03
	丁酸 (V23)	10.61	2.18	0.01	0.57	0.03	0.05	0.45	0.05
	2-丁烯酸	0.03	—	—	—	—	—	—	—
	壬酸	0.01	0.01	—	0.01	0.03	0.01	—	—
	癸酸 (V24)	0.16	0.08	0.01	0.02	0.32	0.08	0.18	—
	4-甲基戊酸 (V25)	—	—	0.01	0.02	1.93	0.93	1.07	0.02
戊酸 (V26)	—	—	—	—	—	—	0.08	—	

续表 2

类别	化合物	RL1	EL7	RL10	RL20	EL12	RL23	EL43	EL46
酸类	十一酸	—	—	—	—	0.01	—	—	—
	3-苯基丙酸	—	—	—	—	—	0.02	—	—
	辛酸 (V27)	0.73	0.21	0.07	0.14	0.07	0.03	—	0.03
	异丁酸	0.01	0.01	—	* *	—	—	—	—
	己酸 (V28)	0.1	0.05	0.02	0.03	0.02	0.01	0.05	1.06
	反-3-癸烯酸	0.04	—	—	—	—	—	—	—
	3-甲基戊酸	0.04	—	—	—	—	—	—	—
	庚酸	0.01	—	—	—	* *	—	—	—
	L-乳酸	—	0.01	—	—	—	—	—	—
	3-甲基己酸 (V29)	—	—	—	—	0.17	0.05	0.21	—
	2-甲基己酸	—	—	—	—	—	0.04	—	—
	4-甲基-2-戊烯酸	—	—	—	—	—	* *	—	—
	十二酸	—	—	—	—	—	0.01	—	* *
醛类	苯甲醛 (V30)	0.07	0.03	0.01	0.02	0.03	—	0.02	—
	2,4,5-三甲基苯甲醛	—	—	* *	—	—	—	—	—
酮类	2-壬酮	—	—	—	—	—	0.02	—	—
	1-巯基-2-丙酮	—	—	—	—	—	* *	—	—
其他类	对甲苯酚	0.03	0.01	* *	* *	0.02	0.02	—	—
	2,4-二叔丁基苯酚 (V31)	0.15	0.16	0.16	0.2	0.14	0.19	—	—
	2,5-二叔丁基苯酚 (V32)	—	—	—	—	—	—	0.16	—
	烯丙苯	—	—	—	—	—	—	0.01	—
	2,3,5,6-四甲基吡嗪	0.01	0.02	—	—	—	—	—	—
	苯并噻唑 (V33)	—	—	0.01	0.08	0.01	0.01	—	—
	二甲基二硫 (V34)	—	—	—	—	—	0.02	0.08	—
	二甲基三硫	—	—	—	—	0.03	0.02	—	—
	吡啶	—	—	—	—	—	* *	—	—
	环辛烷	—	—	0.05	—	—	—	—	—
	4-乙基-2-甲氧基苯酚	—	—	* *	—	—	—	—	—
	2-甲基吡嗪	—	—	—	* *	—	—	—	—
	甲基磺酸酐	0.01	—	—	—	—	—	—	—
2-乙酰基噻唑	—	—	—	0.01	—	—	—	—	

注:表中数字表示相应化合物的相对含量,即其与内标(薄荷醇)峰面积比值;—表示未检测出;* *表示该化合物的相对含量 >0 且 <0.005;V1—V34 表示用于主成分分析的变量

甜味、花香、青草等香味,是酒体中微量香味物质的重要组成部分.由表 2 可知,醇类化合物是上述 8 株代表性梭菌菌株发酵液中挥发性物质最多的一类,包括对浓香型白酒香气贡献度较大的 3-甲基丁醇、2-乙基己醇及正戊醇等^[1,3],也包括在浓香型白酒中很少被报道的醇类,如 9-癸烯醇和 5-苯基-1-戊醇等.不同 *Clostridium spp.* 菌株产生醇类化合物的种类和含量存在明显差异.其中菌株 RL10 (*C.*

indolis), EL12 (*C. bifermentans*), RL23 (*C. sporogenes*) 和 EL43 (*C. cadaveris*) 所产醇类化合物种类较多 (≥10 种),而 RL1 (*C. tyrobutyricum*), EL7 (*C. butyricum*) 和 EL46 (*C. kluyveri*) 仅能产生少数几种醇类化合物 (≤3 种).此外,仅有 3-苯丙醇、正辛醇、苯乙醇和正丁醇 4 种醇类化合物能被 5 种及以上梭菌代表性菌株合成,而 9 种醇类化合物仅能被 1 种梭菌代表性菌株合成,且 EL43 (*C. sporogenes*) 产多种醇类化合

物的能力均高于其他代表性菌株. 这些结果能为通过定向微生物强化来提升浓香型白酒中特定醇类化合物含量提供借鉴.

脂肪酸是所有白酒中含量较高且较为重要的一类化合物,其在白酒中的组成及丰度影响白酒的香型及品质. 例如,脂肪酸可以增加酒的厚重感,削弱或掩盖白酒的邪杂味、爆辣感及苦味等. 此外,脂肪酸也是白酒中重要的呈香物质,是酯类化合物合成的主要前体^[11]. 在浓香型白酒中,具有酸味、奶油味等香味的己酸、丁酸、3-甲基丁酸等脂肪酸对其香气贡献度较高. 由表2可知,上述8株代表性菌株能产生不同碳链长度(C2—C12)的挥发性脂肪酸共20种. 每株代表性菌株均能产生6种以上脂肪酸,且多数脂肪酸(如丁酸、己酸、辛酸、庚酸等)在白酒中均已被检出,这也表明梭菌可能是浓香型白酒酿造过程中产生挥发性脂肪酸的重要来源. 在上述脂肪酸中,乙酸、丁酸和己酸作为浓香型白酒的重要风味成分,可以由上述8株代表性菌株产生. 其中,产己酸最高的为EL46(*C. kluyveri*),其半定量结果为1.06. 目前,梭菌*C. kluyveri*是产己酸梭菌的一个代表菌种,其不同地域产的浓香型白酒中均已被检出^[4]. 产乙酸、丁酸及辛酸能力最高的为RL1(*C. tyrobutyricum*),该梭菌是用于工业发酵产丁酸的主要菌种.

酯类是浓香型白酒中最重要的一类呈香化合物,且大部分酯类化合物沸点较低,经过蒸馏很容易进入基酒中,因此是白酒中含量和数量最多的风味化合物^[20-21]. 由表2可知,本研究共检测到14种酯类化合物,且除EL43(*C. cadaveris*)外,其他梭菌菌株仅形成少数几种酯类化合物(≤4种),表明梭菌对白酒中酯类化合物的形成可能基于间接作用,即主要由醇类和酸类化合物经酶促和非酶促反应中的酯化作用生成.

除上述酸类、醇类及酯类化合物外,上述菌株还产生其他多种挥发性物质,如酚类、醛类和酮类等. 酚类是窖泥中另一类比较重要的化合物,具有芳香气味. 本研究检测到对甲苯酚、2,4-二叔丁基苯酚、2,5-二叔丁基苯酚和4-乙烯基-2-甲氧基苯酚4种酚类物质,其中以RL20(*C. acetobutylicum*)所产2,4-二叔丁基苯酚的含量最高. 除此之外,还检测到苯甲醛和2,4,5-三甲基苯甲醛2种醛类物质,1-巯基-2-丙酮和2-壬酮2种酮类物质,吡啶、2-甲基吡啶、2,3,5,6-四甲基吡啶、苯并噻唑和2-乙酰基噻唑5种苯并杂环化合物,烯丙苯和环辛烷2种烃类化合物,二甲基二硫、二甲基三硫2种含硫类化合物. 其中具有烘烤香气、甜香气的2,3,5,6-四甲基吡啶,有助于丰富白酒的香气^[16]. 具有异嗅味的二甲基二硫、二甲基三硫和吡啶,在一定程度上影响白酒的口感和品质. 因此,明晰不同*Clostridium spp.*所产挥发性代谢物的种类及组成,有助于通过对有益微生物的强化或对有害微生物的控制,实现从白酒酿造源头提升白酒品质.

2.3 主成分分析

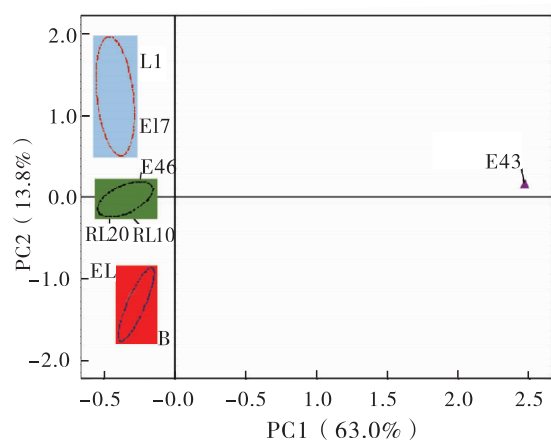
根据表2可知,8株*Clostridium spp.*所产挥发性代谢物的种类和含量存在明显差异. 为了进一步直观反映上述菌株与其挥发性代谢物之间的关联性,选取相对含量大于0.05的挥发性代谢物共34种化合物对这8株*Clostridium spp.*进行主成分分析. 图2为代表性菌株散点图和挥发性代谢物载荷图. 由图2a)可知,主成分1(PC1)和主成分2(PC2)共23个变量,累计代表上述34个变量76.8%的信息. 从图2b)可以看出,上述8株菌株聚为4类. 从主成分1可知,只有菌株EL43(*C. cadaveris*)处于第一象限,其主要与乙酸乙酯(V2)、丁酸乙酯(V3)、乙酸丁酯(V4)、丁酸丁酯(V5)、氯甲酸辛酯(V6)、3-苯丙酸乙酯(V7)、4-甲基戊醇

(V18)、3-甲基己醇(V19)、3-甲基己酸(V29)和二甲基二硫(V34)10个变量呈正相关关系,而其余7株 *Clostridium spp.* 与另外11个变量呈正相关关系,包括己酸乙酯(V1)、硫代醋酸S-甲酯(V9)、1-癸醇(V10)、正辛醇(V16)、乙酸(V22)、丁酸(V23)、辛酸(V27)、己酸(V28)、苯甲醛(V30)、2,4-二叔丁基苯酚(V31)和苯并噻唑(V33)11种化合物.从主成分2可知,菌株RL1(*C. tyrobutyricum*)和EL7(*C. butyricum*)主要与乙酸、丁酸、辛酸和苯甲醛相关;EL46(*C. kluyveri*)、RL20(*C. acetobutylicum*)和RL10(*C. indolis*)主要与己酸、己酸乙酯、2,4-二叔丁基苯酚及苯并噻唑相关;EL12(*C. bifermentans*)RL23(*C. sporogenes*)主要与硫代醋酸S-甲酯、1-癸醇和正辛醇相关;而EL43(*C. cadaveris*)主要与乙酸乙酯、丁酸乙酯、乙酸丁酯、丁酸丁酯、氯甲酸辛酯、3-苯丙酸乙酯、4-甲基戊醇、3-甲基己醇和二甲基二硫这9种化合物有关.

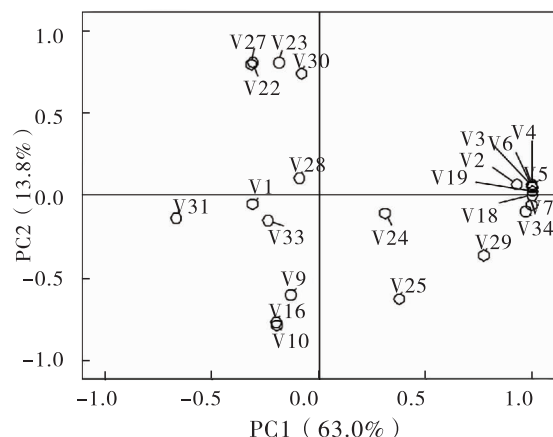
综上所述,基于不同 *Clostridium spp.* 与挥发性代谢物之间的相关性,可以为选择相应的梭菌菌株或种属对浓香型白酒酿造过程中的特定化合物进行微生物定向、强化,提供一定的理论依据.

3 结论

本文从某酒企的浓香型白酒窖泥中分离出88株厌氧细菌,其中75株细菌分属于8个系统发育簇(cluster I—VIII),且不同发育簇的最高相似梭菌 *Clostridium spp.* 分别为 *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. indolis*, *C. acetobutylicum*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. cadaveris* 和 *C. kluyveri*. 其中梭菌 *C. bifermentans* 和 *C. cadaveris* 第一次在窖泥中被检出,进一步丰富了窖泥中梭菌的种类.采用HS-SPME-GC-MS法从上述8株代表性梭菌菌株发酵液中共检测到75种挥



a) 8株代表性菌株散点图



b) 挥发性代谢物载荷图

图2 代表性菌株

散点图和挥发性代谢物载荷图

Fig. 2 The scatter diagram of representative strains and loading plot of volatile metabolites

发性物质,包括醇类23种、酸类20种、酯类14种、醛类2种、酮类2种和其他挥发性物质14种,表明 *Clostridium spp.* 在浓香型白酒酿造过程中,与多种挥发性化合物的形成密不可分.通过主成分分析发现,菌株RL1(*C. tyrobutyricum*)和EL7(*C. butyricum*)与乙酸、丁酸、辛酸和苯甲醛的合成相关性较大;EL46(*C. kluyveri*)、RL20(*C. acetobutylicum*)和RL10(*C. indolis*)主要与己酸、己酸乙酯、2,4-二叔丁基苯酚和苯并噻唑的形成相关;EL12(*C. bifermentans*)RL23(*C. sporogenes*)主要与硫代醋酸S-甲酯、1-癸醇和正辛醇相关;而EL43(*C. cadaveris*)主要与多

种酯类、4-甲基戊醇、3-甲基己醇和二甲基二硫的合成有关。

本研究对窖泥中厌氧梭菌的分离、鉴定和其挥发性代谢物的分析结果,为今后定向生物强化白酒风味物质形成、呈香化合物溯源、控制白酒异嗅物质产生,进而提升浓香型白酒品质,提供了理论依据。

参考文献:

- [1] FAN W L, QIAN M C. Characterization of aroma compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jian-nanchun” liquors by aroma extract dilution analysis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54 (7): 2695.
- [2] ZHENG J, LIANG R, WU C, et al. Discrimination of different kinds of Luzhou-flavor raw liquors based on their volatile features [J]. *Food Research International*, 2013, 56: 77.
- [3] FAN W, QIAN M C. Identification of aroma compounds in Chinese “Yanghe Daqu” liquor by normal phase chromatography fractionation followed by gas chromatography/olfactometry [J]. *Flavour and Fragrance Journal*, 2006, 21 (2): 333.
- [4] HU X L, DU H, XU Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing *bacterium Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 214: 116.
- [5] ZHENG X W, TABRIZI M R, NOUT M J R, et al. Daqu—A traditional Chinese liquor fermentation starter [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, 117 (1): 82.
- [6] HU X, DU H, REN C, et al. Illuminating anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82 (8): 2506.
- [7] TAO Y, LI J, RUI J, et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80 (7): 2254.
- [8] SJÖBLOM M, MATSAKAS L, CHRISTAKOPOULOS P, et al. Production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum*, (ATCC25755) using sweet sorghum stalks and beet molasses [J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 74: 535.
- [9] CAI G, JIN B, SAINT C, et al. Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155 (3): 269.
- [10] LI H G, LI W, GU Q Y, et al. Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 137: 254.
- [11] ZHENG J, LIANG R, ZHANG L, et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses [J]. *Food Research International*, 2013, 54 (1): 660.
- [12] ELSDEN S R, HILTON M G, WALLER J M. The end products of the metabolism of aromatic amino acids by *Clostridia* [J]. *Archives of Microbiology*, 1976, 107 (3): 283.
- [13] 张会敏, 李天婵, 孙美青, 等. 利用非培养技术初步研究古井贡酒窖泥细菌群落结构 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35 (13): 200.
- [14] 何培新, 李芳莉, 郑燕, 等. 浓香型白酒窖泥梭菌的分离及其挥发性代谢产物分析 [J]. *中国酿造*, 2017, 36 (4): 45.
- [15] WANG M Y, ZHANG W X. Analysis of micro-

- al community structure in pit mud from two Chinese Luzhou-flavor liquor producing areas [J]. *Microbiology China*, 2014, 41 (8): 1498.
- [16] WANG C, CHEN Q, WANG Q, et al. Long-term batch brewing accumulates adaptive microbes, which comprehensively produce more flavorful Chinese liquors [J]. *Food Research International*, 2014, 62: 894.
- [17] HU X L, WANG H Y, WU Q, et al. Development, validation and application of specific primers for analyzing the clostridial diversity in dark fermentation pit mud by PCR-DGGE [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 163: 40.
- [18] STACKEBRANDT E, EBERS J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards [J]. *Microbiology Today*, 2006, 33(4): 152.
- [19] LIU C, HUANG D, LIU L, et al. *Clostridium swelffunianum sp. nov.*, a novel anaerobic bacterium isolated from the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor production [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2014, 106(4): 817.
- [20] 肖熙佩, 陈思妘. 白酒中酯类的形成 [J]. *酿酒*, 1981(3): 9.
- [21] 张鹏, 张亮臣, 孙振宇, 等. 浓香型大曲白酒蒸馏过程中四大酯馏出特性的分析 [J]. *食品工程*, 2013 (3): 30.



引用格式:曾田,胡晓龙,马兆,等.浓香型白酒窖泥中“增己降乳”原核微生物群落多样性解析[J].轻工学报,2017,32(6):12-19.

中图分类号:TS261.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.002

文章编号:2096-1553(2017)06-0012-08

浓香型白酒窖泥中 “增己降乳”原核微生物群落多样性解析

Analysis of prokaryotic microbial community diversity with the capability of caproic acid-producing and lactic acid-utilizing in the pit muds of Luzhou-flavor liquor

曾田^{1,4},胡晓龙²,马兆²,崔媛媛²,王京京²,何培新²,
李聪聪²,牛广杰³,李红¹

ZENG Tian^{1,4},HU Xiao-long²,MA Zhao²,CUI Yuan-yuan²,WANG Jing-jing²,
HE Pei-xin²,LI Cong-cong²,NIU Guang-jie³,LI Hong¹

1. 五粮液集团有限公司,四川 宜宾 644000;

2. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

3. 河南省百泉春酒业有限公司,河南 新乡 453000;

4. 河南五谷春酒业股份有限公司,河南 信阳 464000

1. Wuliangye Group Co., Ltd., Yibin 644000, China;

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

3. He'nan Baiquanchun Wine Co., Ltd., Xinxiang 453000, China;

4. He'nan Wuguchun Wine Co., Ltd., Xinyang 464000, China

关键词:

窖泥微生物;高通量测序;浓香型白酒;群落多样性

Key words:

microbe in pit muds;
high-throughput sequencing;
Luzhou-flavor liquor;
community diversity

摘要:以河南某酒企浓香型白酒窖泥样品中的微生物作为出发菌群,分别构建产己酸菌群和降乳酸菌群.基于原核微生物 16S rRNA 基因 V4 可变区,分别对上述两种菌群进行高通量测序分析,结果表明,两种菌群中物种多样性均低于窖泥出发菌群,且优势微生物组成发生了明显改变.产己酸菌群的优势菌主要集中在厚壁菌门中的 *Clostridium* 属和 *Ruminococcus* 属,而降乳酸菌群的优势微生物主要集中在厚壁菌门的 *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Soehngenia*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Paenibacillus*, *Caldicoprobacter*, *Sedimentibacter*, *Dorea*, *Coprococcus* 和 *Tepidimicrobium* 12 个属.本研究结果有助于明晰窖泥中与产己酸和降乳酸有关微生物的分类学地位,并为通过定向组装高产己酸群落和有效降乳酸群落、实现浓香型白酒酿造过程中“增己降乳”提供理论支撑.

收稿日期:2017-08-30

基金项目:中国轻工业浓香型白酒固态发酵重点实验室开放基金项目(2017JJ012);郑州轻工业学院博士科研基金资助项目(2016BSJJ018);郑州轻工业学院研究生科技创新项目(2016030)

作者简介:曾田(1985—),男,重庆市人,五粮液集团有限公司工程师,主要研究方向为白酒酿造.

通信作者:胡晓龙(1984—),男,河南省杞县人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为白酒酿造工程.

Abstract: The caproic acid-producing and lactic acid-utilizing consortiums were constructed based on microbe in pit muds of Luzhou-flavor liquor from one wine corporation in He'nan. The prokaryotic microbial community was analyzed using high-throughput sequencing based on the V4 variable regions of 16S rRNA gene. The results showed that the species diversities in both constructed consortiums were lower than those in pit muds, which was accompanied by the obvious changes in composition of dominant microbe. The dominant prokaryotes in the caproic acid-producing consortiums were the Firmicute *Clostridium* and *Ruminococcus*. The dominant prokaryotes in the lactic acid-utilizing consortiums belonged to the Firmicute *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Soehngenia*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Paenibacillus*, *Caldicoprobacter*, *Sedimentibacter*, *Dorea*, *Coprococcus* and *Tepidimicrobium*. This study will be conducive to clarify the taxonomic status of caproic acid-producing and lactic acid-utilizing consortiums in pit muds, and provide theoretical support for realizing caproic acid-producing and lactic acid-utilizing in production of Luzhou-flavor liquor through microbial directional bioaugmentation.

0 引言

中国白酒历史悠久、工艺独特,是我国独具民族特色的蒸馏酒,与威士忌、伏特加、白兰地、朗姆酒和金酒并称为世界六大蒸馏酒^[1]。基于酿造工艺和风格的差异,白酒又分为4个基本香型,即浓香型、酱香型、清香型和米香型。其中浓香型白酒在中国白酒市场上处于主导地位,其产销量均达70%左右^[2-3]。浓香型白酒的酿造以泥窖为发酵容器,窖泥是浓香型白酒酿造微生物的主要来源之一,其微生物的组成与多样性是决定窖泥质量优劣的重要因素^[4-5]。窖泥菌群十分复杂,栖息着成百上千种微生物。根据窖泥微生物的功能之不同,可以将其分为己酸菌、醋酸菌、乳酸菌、丁酸菌、酵母菌、酯化菌和硫酸盐还原菌等^[6]。根据微生物分类学,窖泥微生物包括原核微生物中的厚壁菌门(Firmicutes)、广古菌门(Euryarchaeota)、拟杆菌门(Bacteroidetes)等33个菌门中的300多个物种^[4-5],以及真核微生物中的子囊菌门(Ascomycota)、接合菌门(Zygomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、壶菌门(Chytridiomycota)中的111个属^[7]。

在上述窖泥微生物中,产己酸微生物和降乳酸微生物一直被认为是浓香型白酒酿造过程

中重要的功能微生物类群。其中,产己酸微生物的代谢产物己酸既是白酒中重要的香气物质,也可以作为浓香型白酒主体香气物质己酸乙酯合成的前体^[8]。己酸乙酯含量的高低决定浓香型白酒的品质,根据浓香型白酒国家标准规定,优级浓香型白酒中己酸乙酯质量浓度应为1.2~2.8 g/L。自1960年代就有白酒工作者针对如何提升浓香型白酒中己酸和己酸乙酯的含量(增己)开展研究,目前发现能产己酸的微生物主要为梭菌属(*Clostridium*),如 *C. kluyveri*, *C. cocleatum* 和 *C. Lushun* 等^[8]。但窖泥是一个复杂的微生态体系,其中除了含有梭菌属外,是否存在与其协同产己酸的其他种属尚不明晰。此外,白酒酿造过程中会有大量乳酸形成和积累,这主要与乳杆菌属(*Lactobacillus*)发酵有关^[4-5]。大量乳酸积累将导致白酒中乳酸和乳酸乙酯含量增高,使白酒中四大酸(乙酸、乳酸、丁酸和己酸)和四大酯(乙酸乙酯、乳酸乙酯、丁酸乙酯和己酸乙酯)的酸/酯比例失衡^[9],白酒呈现明显的酸涩感,从而降低白酒品质。因此,明晰窖泥中与降乳酸相关的微生物菌群的多样性,将有助于从浓香型白酒生产源头上降低乳酸和乳酸乙酯含量(降乳)。本研究以浓香型白酒窖泥微生物为研究对象,构建产己酸菌群和降乳酸菌群,采用高通量测序技术解

析上述菌群中原核微生物群落组成和多样性,进而明晰窖泥中与产己酸和降乳酸相关的微生物种属信息,为通过定向微生物强化和调整窖泥相应理化性质,进而实现浓香型白酒“增己降乳”提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 本研究所用窖泥样品取自河南某酒企两口正常发酵窖池中的窖底泥样品,分别装入无菌取样袋中并标记为 JN₁ 和 JN₂,置于盛有冰袋的泡沫取样箱运至实验室,放入冰箱于 4 ℃ 下保存,用于后续窖泥基因组提取、产己酸菌群和降乳酸菌群的构建。

1.1.2 主要试剂与仪器 酵母粉,购自英国 OXOID 公司;六水合氯化钴、无水氯化钙,均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;土壤 DNA 提取试剂盒(CW2091),购自北京康为世纪生物科技有限公司;515F/806R 引物合成、PCR Master Mix (2X) (K0171) 和其余化学试剂,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

安捷伦 7820A 气相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司产;C1000 Touch™ PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司产;Illumina MiSeq Benchtop 测序仪,美国 Illumina 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基与溶液配制

1.2.1.1 产己酸富集培养基(ES)的配制 准确称取酵母粉 5.000 g, NaCl 0.90 g, (NH₄)₂SO₄ 0.90 g, MgCl₂ · 6H₂O 0.085 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.066 g, MnCl₂ · 4H₂O 0.028 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.020 g, ZnCl₂ 0.009 g, CoCl₂ · 6H₂O 0.002 g, KH₂PO₄ 0.01 g, Na₂CO₃ 0.032 g, 盐酸半胱氨酸盐 0.300 g 加水溶解,定容至 1000 mL,121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,灭菌结束冷却至室温后加入 20 mL 无水乙醇。

1.2.1.2 降解乳酸培养基(YCFAL)的配制^[10]

酪蛋白 1.000 g, 酵母浸出液 0.250 g, NaHCO₃ 0.400 g, 半胱氨酸 0.100 g, K₂HPO₄ 0.045 g, KH₂PO₄ 0.045 g, NaCl 0.090 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.009 g, CaCl₂ 0.009 g, 血红素 1 mg, 生物素 1 μg, 钴胺素 1 μg, 对氨基苯甲酸 3 μg, 叶酸 5 μg, 吡哆胺 15 μg, 硫胺素 0.05 μg, 核黄素 0.05 μg, 刃天青 0.1 mg, 添加质量分数为 0.25% 的乳酸作为碳源。

准确称取酪蛋白,酵母浸出液,NaHCO₃,半胱氨酸,K₂HPO₄,KH₂PO₄,NaCl,MgSO₄ · 7H₂O,CaCl₂,加水溶解,随后加入配置好的血红素和热稳定的维生素,调整 pH = 5.8 ~ 6.1,将培养基分装到滚管中,并用橡胶塞密封,进行气体抽换,实现厌氧条件,115 ℃ 灭菌 20 min,待培养基冷却后,用注射器加入已过滤灭菌的热不稳定的硫胺素和核黄素。

1.2.1.3 溶液配制 质量分数为 5% 的醋酸铜溶液配制:称取 50 g 醋酸铜溶于 1 L 去离子水中,搅拌均匀,置于试剂瓶中待用。

质量分数为 72% 的硫酸溶液配制:准确吸取 163 mL 质量分数为 98% 的浓硫酸缓缓倒入盛有 80 mL 去离子水的烧杯中,冷却后用容量瓶定容至 250 mL,并置于广口试剂瓶中保存。

质量分数为 1% 的己酸溶液配制:准确吸取 1075 μL 的己酸,加入 100 mL 的容量瓶中,再用体积分数 20% 的乙醇溶液定容至 100 mL。

1.2.2 产己酸菌群和降乳酸菌群构建

1.2.2.1 窖泥菌悬液制备 称取窖泥样品 JN₁ 和 JN₂ 各 5 g,分别置于盛有 45 mL 无菌水并带有玻璃珠的三角瓶中,振荡均匀,以备后续窖泥产己酸菌群和降乳酸菌群实验使用。

1.2.2.2 产己酸菌群构建 分别吸取窖泥样品 JN₁ 和 JN₂ 的菌悬液各 10 mL 置于无菌试管中,80 ℃ 水浴 10 min. 将热处理后来源不同的窖泥菌悬液按体积分数 5% 的接种量分别接种

至 100 mL 的 ES 培养基中,置于培养箱中于 37 °C 下培养 5~8 d. 采用醋酸铜显色法初步检测上述发酵液中己酸含量^[11],选取产己酸量最高发酵液中的培养物以体积分数 5% 的接种量分别接种至 100 mL 新 ES 培养基中,每 5~8 d 将获得的产己酸培养物重新转接 1 次,连续转接 3—5 次,以获得稳定的产己酸菌群.

1.2.2.3 降乳酸菌群构建 吸取窖泥样品 JN₁ 和 JN₂ 的菌悬液,按体积分数 5% 的接种量分别接种至 100 mL 的 YCFAL 液体培养基中,置于 37 °C 培养箱中培养,每 2~3 d 将获得的培养物按体积分数 5% 的接种量转接至 100 mL 新 YCFAL 液体培养基中,连续转接 3—5 次,以获得降乳酸能力的稳定菌群.

1.2.3 发酵液中己酸和乳酸的测定

1.2.3.1 己酸的测定 己酸测定标准曲线制作:分别准确吸取 1% 己酸溶液 0 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL 至干净的 10 mL 的容量瓶中,用 ES 培养基定容为不同浓度梯度的己酸标准溶液,每个浓度梯度设 3 个平行.

己酸标准溶液中己酸的萃取:分别吸取 5 mL 上述己酸溶液至 50 mL 干净的离心管中,加入 25 μ L 72% 硫酸、20 μ L 2-乙基丁酸(内标)及 10 mL 乙醚. 涡旋振荡 10 min, 静置 10 min. 用一次性注射器吸取乙醚层并将其经 0.22 μ m 有机滤膜过滤,气相色谱法测定.

发酵液中己酸测定:吸取产己酸菌群的发酵液 10 mL, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液,然后用相同的方法萃取发酵液中的己酸,并用 0.22 μ m 有机滤膜过滤、气相色谱法测定.

气相色谱分析条件如下. J&W DB-WAX 毛细管色谱柱 (30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m), 进样口温度 200 °C, 检测器温度 250 °C, 程序升温条件: 起始温度 100 °C, 保持 1 min, 以 10 °C/min 升至 220 °C, 保持 2 min. 氢气流速 35 mL/min, 空气流速 400 mL/min, 尾吹气流

速 20 mL/min, 进样体积 1 μ L, 分流比 20:1.

1.2.3.2 乳酸的测定 发酵液中乳酸测定采用对羟基联苯比色法,具体实验步骤参考高庆等^[12]报道的实验方法.

1.2.4 基因组提取、高通量测序及数据处理

基因组提取:吸取一定量的产己酸(或降乳酸或窖泥悬浮液)菌群发酵液,离心弃上清,超纯水洗涤沉淀 1 次. 洗涤后的细胞基因组提取及纯化按照土壤基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行提取.

PCR 扩增:采用原核微生物通用引物 515F/806R 对上述基因组进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系及扩增条件参照 Y. D. Nam 等^[13]的报道.

高通量测序分析和数据处理:对上述 PCR 扩增产物进行纯化、连接高通量测序接头、构建 DNA 文库及高通量测序(Illumina Miseq),分析及数据处理等参照 X. Hu 等^[5]报道的方法,其中主成分分析(PCA)方法参照 R. Zhang 等^[14]报道的方法.

2 结果与讨论

2.1 产己酸菌群产己酸能力及降乳酸菌群利用乳酸的效率

将窖泥样品 JN₁ 和 JN₂ 中出发菌群接种至 ES 培养基发酵 6 d 后,己酸产量分别为 0.31 g/L 和 0.39 g/L. 产己酸菌群 1A 和 1B 分别是窖泥 JN₁ 和 JN₂ 中出发菌群经 ES 培养基连续富集培养 4 次后的培养物,其在 ES 培养基中发酵 6 d 后,己酸产量分别为 4.39 g/L 和 4.00 g/L,约为出发菌群己酸产量的 10 倍. 窖泥样品 JN₁ 和 JN₂ 中出发菌群分别接种至 YCFAL 培养基发酵 3 d 后,该培养基中的乳酸含量分别下降 18.29% 和 14.40%. 降乳酸菌群 2A 和 2B 分别是窖泥样品 JN₁ 和 JN₂ 中出发菌群经 YCFAL 培养基连续富集培养 5 次后的培养物,其在 YCFAL 培养基发酵 3 d 后,培养基

中乳酸含量分别下降 60.70% 和 58.56%。上述结果表明,构建的产己酸菌群和降乳酸菌群与窖泥出发菌群相比,产己酸能力和利用乳酸能力存在明显差异,表明窖泥出发菌群在构建上述菌群的过程中,其群落组成可能发生了变化。

2.2 窖泥样品、产己酸菌群和降乳酸菌群中的微生物多样性

2.2.1 微生物群落 α -多样性

窖泥样品、产己酸菌群和降乳酸菌群中微生物多样性分析如表 1 所示。由表 1 可知,本研究供试窖泥样品微生物群落的多样性指数 Chao1, Observed species 和 Shannon 的平均值分别为 1973, 1136 和 6.06,表明供试窖泥样品含有复杂的微生物菌群,这与 C. D. Wang 等^[15]研究四川某酒企窖泥微生物群落多样性指数相似。产己酸菌群和降乳酸菌群中原核微生物多样性指数较窖泥微生物群落多样性指数低,尤其是 Chao1 和 Observed species,均值分别为 521 和 385, 589 和 449,表明上述两种菌群中物种多样性远低于窖泥微生物物种多样性。这主要是由于富集培养基中的理化因子复杂程度远低于窖泥环境,窖泥中除了含有丰富的碳、氮源、无机盐、生长因子外^[4,16],还存在成百上千种挥发性物质(如脂肪酸、酯类、醇类、醛酮类等)^[17],导致出发菌群中大量微生物在富集过程中被淘汰,而某些种属微生物被富集。

2.2.2 微生物群落 β -多样性

2.2.2.1 优势微生物组成

窖泥样品、产己酸菌群和降乳酸菌群中优势微生物门组成如图 1 所示。在门水平上,供试窖泥中优势微生物(相对含量 >0.1%)共 11 个门(图 1a)),其中以厚壁菌门、广古菌门、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门 5 个门为核心微生物门(相对含量 >1%),这与四川和江苏等地域窖泥中的核心微生物门组成一致^[4-5,14]。

表 1 窖泥样品、产己酸和降乳酸菌群中的微生物多样性分析

Table 1 Microbial community diversity in pit muds, caproic acid-producing and lactic acid-utilizing consortiums

多样性指数	Chao1 丰度指数	Goods coverage 指数	Observed species 指数	Shannon 多样性指数	
窖泥样品	JN ₁	1958	0.95	1152	6.22
	JN ₂	1987	0.95	1120	5.90
产己酸菌群	1A	536	0.99	386	4.89
	1B	505	0.99	384	4.79
降乳酸菌群	2A	661	0.99	485	5.59
	2B	517	0.99	412	4.65

产己酸菌群和降乳酸菌群主要为厚壁菌门,含量均达 99.7% 以上,这也表明厚壁菌门中某些种属分别与产己酸和利用乳酸的代谢有关。

产己酸菌群和降乳酸菌群中优势微生物组成如图 2 所示,在纲水平上(图 2a)和 c),产己酸菌群中优势微生物主要为梭菌纲(Clostridia),含量达 99.7%;降乳酸菌群中优势微生物主要为梭菌纲和芽孢杆菌纲(Bacilli),含量达 99.5%。

在属水平上,产己酸菌群中优势微生物主要为梭菌纲中的梭菌属(*Clostridium*)及瘤胃球菌属(*Ruminococcus*),含量达 75.7%(图 2c)),表明这两类微生物与窖泥出发菌群产己酸能力有关。目前已报道的产己酸微生物主要集中在 *Clostridium* 属,如 *C. kluyveri*, *C. sp. BS-1* 和 *C. celerecrescens* 等^[18-19],而未见瘤胃球菌属中的物种产己酸的报道,但该属中的一些物种能利用多种糖类或 H₂/CO₂ 产乙酸和乙醇等代谢物,如 *R. champanellensis*, *R. flavefaciens*, *R. albus*, *R. callidus*, *R. hansenii* 等^[20-21]。其中乙酸和乙醇为产己酸梭菌(如 *C. kluyveri*)合成己酸的主要底物^[22],同时解除 H₂ 的环境胁迫有利于提高己酸产量^[4]。降乳酸菌群优势微生物共 12 个属,其中核心属为 *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Soehngenia*, *Oscillospira* 和 *Ruminococcus*,含量达 76.15%(图 2d))。栗连会^[23]报

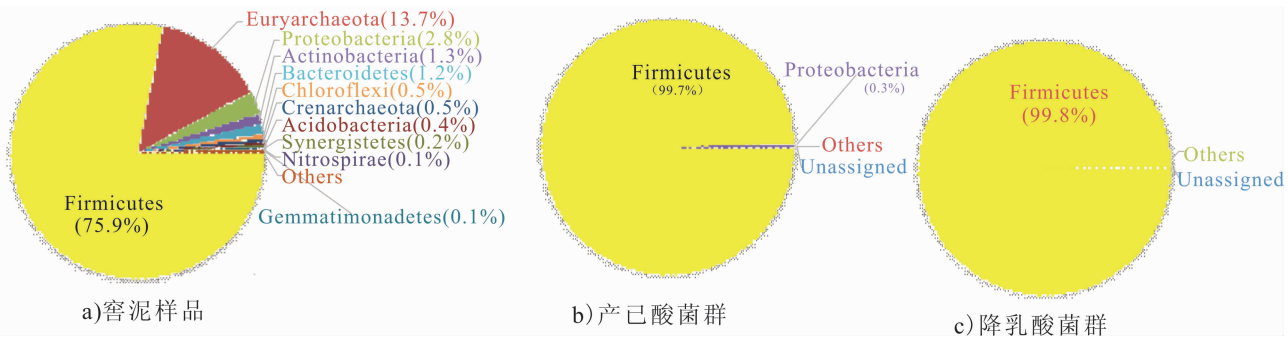


图1 窖泥样品、产己酸和降乳酸菌群中优势微生物门组成

Fig.1 The composition of dominant microbe at phylum level in pit muds, caproic acid-producing and lactic acid-utilizing consortiums

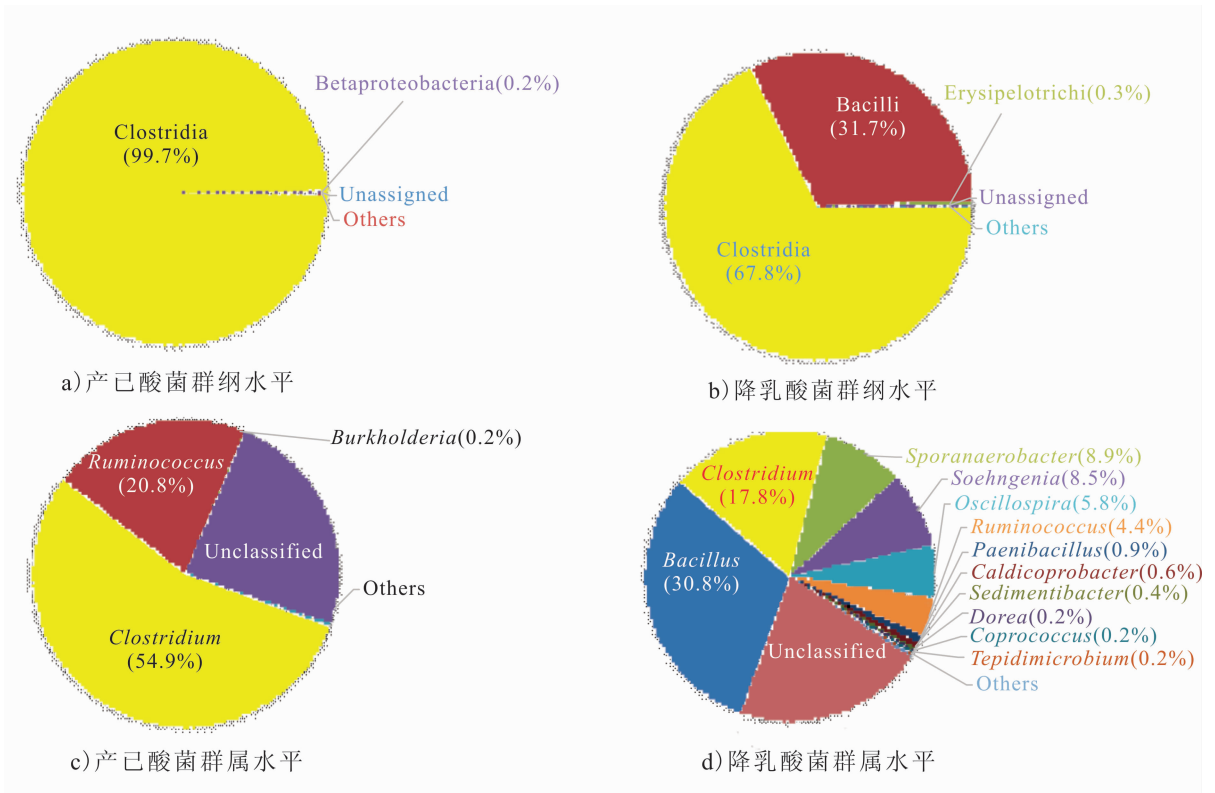


图2 产己酸和降乳酸菌群中优势微生物组成

Fig.2 The composition of dominant microbe in caproic acid-producing and lactic acid-utilizing consortiums

道了浓香型白酒酿造环境中的 *Bacillus* 和 *Clostridium* 等物种具有降乳酸能力,如 *C. cochlearium*,乳酸利用率高达 94.1%,而 *B. amyloliquefaciens* 乳酸利用率仅为 20% 左右,这与本文研究结果基本一致.但其他核心属(如 *Sporanaerobacter* 等)降乳酸能力的研究未见报道,其对乳酸直

接利用或协同利用乳酸情况仍需进一步研究.

2.2.2.2 主成分分析 基于窖泥样品、产己酸菌群和降乳酸菌群中门和纲水平,对优势微生物进行主成分分析,结果如图 3 所示.由图 3a)可知,每类菌群能较好地聚在一起,表明每类菌群中优势微生物存在较大差异.从图 3b)可知,

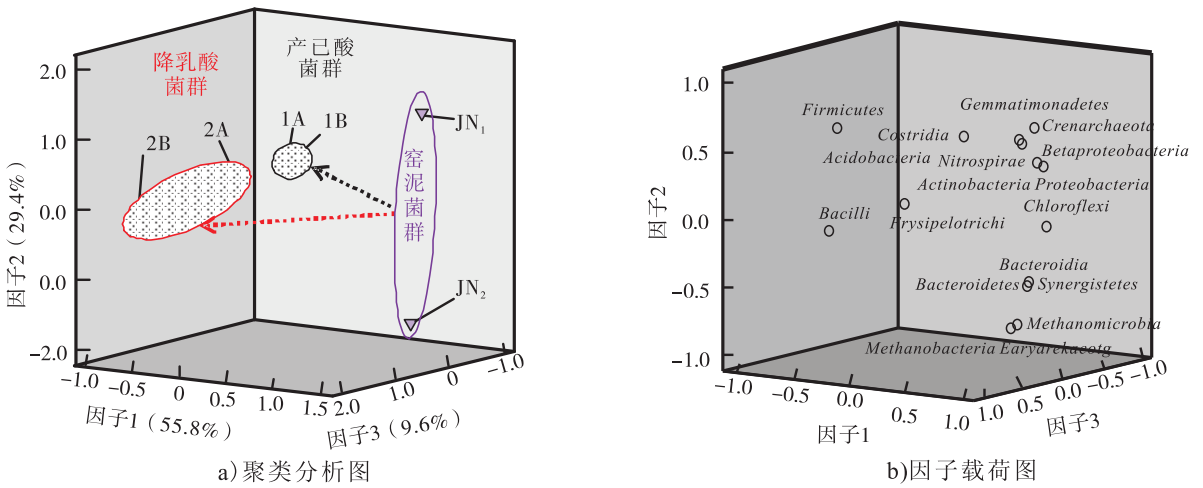


图3 窖泥样品、产己酸和降乳酸菌群中优势微生物的主成分分析

Fig. 3 Principal component analysis (PCA) based on the dominant microbe in pit muds, caproic acid-producing and lactic acid-utilizing consortiums

在窖泥菌群向产己酸菌群转变的过程中,厚壁菌门中的梭菌纲明显增加,而广古菌门中的甲烷杆菌纲和甲烷微菌纲,以及拟杆菌门中拟杆菌纲明显减少.在窖泥菌群向降乳酸菌群转变的过程中,厚壁菌门中的梭菌纲及芽孢杆菌纲含量明显增加,而窖泥菌群中的其他优势门和优势纲原核微生物明显减少.已有研究表明,上述微生物的组成与窖泥的理化性质(pH值, NH₄⁺, 水溶性有机碳,有效磷等)存在显著的相关性,如 Clostridia 纲细菌的含量在一定范围内与 pH 值呈正相关,而与窖泥中水溶性有机碳的含量呈负相关^[4-5].因此,通过调整窖泥的理化性质进而相应改变窖泥菌群的组成,增强窖泥微生物菌群产己酸或降乳酸代谢能力,进而提高窖泥质量,有利于从微生物源头提升浓香型白酒品质.

3 结论

本研究以河南某酒企正常发酵窖池中的窖泥微生物为出发菌群,分别构建了产己酸菌群和降乳酸菌群,其中,产己酸菌群在 ES 培养基中己酸产量达 4.2 g/L,降乳酸菌群对 YCFAL 培养基中的乳酸利用率达 59.7%.基于原核微生物 16S rRNA 基因 V4 可变区的高通量测序

解析了上述菌群中微生物群落组成和多样性.其中,产己酸菌群和降乳酸菌群较窖泥出发菌群的微生物群落多样性降低,且优势微生物均为厚壁菌门.产己酸菌群的优势菌主要集中在厚壁菌门中的 *Clostridium* 属和 *Ruminococcus* 属;而降乳酸菌群的优势菌主要集中在厚壁菌门的 *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporanaerobacter*, *Soehngenia*, *Oscillospira*, *Ruminococcus*, *Paenibacillus*, *Caldicoprobacter*, *Sedimentibacter*, *Dorea*, *Coprococcus* 和 *Tepidimicrobium* 共 12 个属,这表明上述菌群中的优势微生物在窖泥中能直接或协同参与产己酸或降乳酸的代谢过程.窖泥产己酸菌群和降乳酸菌群优势微生物的明晰能为定向组装高产己酸群落和有效降乳酸群落提供一定的理论支撑,有助于从酿造源头上实现浓香型白酒的“增己降乳”目标.

参考文献:

[1] 王传荣. 白酒的香型及其风味特征研究[J]. 酿酒科技, 2008, 171(9): 49.
 [2] ZHAO J S, ZHENG J, ZHOU R Q, et al. Microbial community structure of pit mud in a Chinese strong aromatic liquor fermentation pit[J]. Journal of the Institute of Brewing, 2012, 118

- (4):356.
- [3] 韩金宏,励建荣.我国白酒行业的现状和发展前景[J].农产品加工(学刊),2006,55(2):50.
- [4] TAO Y,LI J B,RUI J P,et al. Prokaryotic communities in pit mud from different-aged cellars used for the production of Chinese strong-flavored liquor[J]. Applied and Environmental Microbiology,2014,80(7):2254.
- [5] HU X,DU H,REN C,et al. Illuminating Anaerobic microbial community and cooccurrence patterns across a quality gradient in Chinese liquor fermentation pit muds [J]. Applied and Environmental Microbiology,2016,82(8):2506.
- [6] WU Y Y,XUE T R,CHEN Z R,et al. Study on distribution and action of anaerobic bacteria in Wuliangye older fermented-pits[J]. Acta Microbiologica Sinica,1991,31(4):299.
- [7] LIU M,TANG Y,ZHAO K,et al. Determination of the fungal community of pit mud in fermentation cellars for Chinese strong-flavor liquor, using DGGE and Illumina MiSeq sequencing [J]. Food Research International,2017,91:80.
- [8] ZHENG J,LIANG R,ZHANG L,et al. Characterization of microbial communities in strong aromatic liquor fermentation pit muds of different ages assessed by combined DGGE and PLFA analyses [J]. Food Research International,2013,54(1):660.
- [9] 李大和.浓香型曲酒乳酸乙酯偏高的原因及解决措施[J].酿酒科技,2007(2):100.
- [10] 刘威.一株猪源性乳酸利用、丁酸产生菌的分离和鉴定及其体外代谢特性的初步研究[D].南京:南京农业大学,2007.
- [11] 吴根福,陈佩华.比色法定量测定己酸含量的初步研究[J].酿酒科技,1995(6):35.
- [12] 高庆,印建和,穆华容,等.对羟基联苯法测定啤酒中乳酸[J].酿酒,2005,32(6):93.
- [13] NAM Y D,LEE S Y,LIM S I. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing [J]. International Journal of Food Microbiology,2012,155(1/2):36.
- [14] ZHANG R,WU Q,XU Y. Aroma characteristics of Moutai-flavour liquor produced with *Bacillus licheniformis* by solid-state fermentation [J]. Letters in Applied Microbiology,2013,57(1):11.
- [15] WANG C D,CHEN Q,WANG Q,et al. Long-term batch brewing accumulates adaptive microbes, which comprehensively produce more flavorful Chinese liquors [J]. Food Research International,2014,62:894.
- [16] 李祖明,刘世云,王磊,等.德山大曲窖泥理化成分的初步研究[J].中国酿造,2011(12):110.
- [17] 范文来,徐岩.白酒窖泥挥发性成分研究[J].酿酒,2010,37(3):24.
- [18] HU X L,DU H,XU Y. Identification and quantification of the caproic acid-producing bacterium *Clostridium kluyveri* in the fermentation of pit mud used for Chinese strong-aroma type liquor production [J]. International Journal of Food Microbiology,2015,214:116.
- [19] XUE Z K. First polyphasic identification of *Clostridium celerecrescens* from Luzhou-flavor liquor pit mud [J]. Journal of Chemical & Pharmaceutical Research,2015,7(4):1222.
- [20] CHASSARD C,DELMAS E,ROBERT C,et al. *Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2012,62(1):138.
- [21] BERNALIER A,WILLEMS A,LECLERC M,et al. *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces [J]. Archives of Microbiology,1996,166(3):176.
- [22] SEEDORF H,FRICKE WF,VEITH B,et al. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features [J]. P Natl Acad Sci USA,2008,105(6):2128.
- [23] 栗连会.泸型酒酒醅中乳酸菌和乳酸降解菌的多样性和代谢特性[D].无锡:江南大学,2016.



引用格式:张俊杰,郭晨,尚益民,等.市售夏黑无核葡萄果表微生物多样性研究[J].轻工学报,2017,32(6):20-26.

中图分类号:TS255.2 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.003

文章编号:2096-1553(2017)06-0020-07

市售夏黑无核葡萄果表微生物多样性研究

Study on the microbial diversity on the grape surface of marketed Summer Black Seedless variety

张俊杰^{1,2,3}, 郭晨¹, 尚益民¹, 杨旭¹, 陈锦永², 张文叶¹,
刘崇怀²

ZHANG Jun-jie^{1,2,3}, GUO Chen¹, SHANG Yi-min¹, YANG Xu¹, CHEN Jin-yong²,
ZHANG Wen-ye¹, LIU Chong-huai²

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009;

3. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南 郑州 450001

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

2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China;

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

关键词:

夏黑无核葡萄表皮;
微生物多样性;高通量测序;病原菌

Key words:

grape surface of Summer Black Seedless variety;
microbial diversity;
high throughput sequencing;
pathogenic bacteria

摘要:运用宏基因组高通量测序技术对市售夏黑无核葡萄表皮菌群 16S rRNA 基因 V3 - V4 可变区进行测序和分析,发现该葡萄表皮的细菌群落具有高度多样性,且优势菌群明显.从门水平上分析,群落主要为厚壁菌门和变形菌门;从纲水平上分析,群落主要为 α , β , γ 变形菌纲、梭菌纲和放线菌纲;从属水平上分析,乳酸球菌属为最优菌属.同时从葡萄表皮检出了 *Escherichia-Shigella* (埃希氏菌属 - 志贺氏菌属) 的致病菌群体.该研究成果对于果蔬采后生物防治和市售果蔬的检验检疫工作有一定的借鉴意义.

收稿日期:2017-05-02

基金项目:河南省自然科学基金项目(162300410330);郑州轻工业学院博士科研启动基金项目(2014BSJJ006)

作者简介:张俊杰(1984—),男,河南省郑州市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为葡萄及葡萄酒微生物资源与分子生态学.

通信作者:刘崇怀(1965—),男,陕西省西安市人,中国农业科学院郑州果树研究所研究员,博士,主要研究方向为葡萄资源与遗传育种.

Abstract: Using the metagenomic high-throughput sequencing technology, the sequencing analysis of the V3-V4 variable regions of 16S rRNA gene of the grape surface microbe of marketed Summer Black Seedless variety was conducted. The results showed that the the grape surface microbes were highly diverse consortium and had obviously dominant microflora. At the phylum level, the dominant microbes were Firmicutes and Proteobacteria. At the class level, the dominant microbes were α , β , γ -Mycetozoa, Clostridium and Actinomycetes. At the genus level, the dominant microbe was *Lactococcus*. Furthermore, the pathogenic bacteria *Escherichia-Shigella* was detected on the grape surface of marketed Summer Black Seedless variety. This study is of reference significance for biological control after fruit picking and inspection and quarantine of market fruit.

0 引言

随着我国食品工业的发展,食品安全问题日益突显,由病原微生物引起的各类疾病的发生率也随之升高^[1].采收后的果实如果存储不当会引起表面菌群的变化,发生腐败,严重影响其食用和商品价值^[2].柑橘、猕猴桃和龙眼等水果食用时需要用手剥皮,如果果皮上有残存农药等有毒有害物质,便存在安全风险^[3-4].水果采后病害生物防治技术可以利用微生物之间的拮抗作用,改变水果表面微生态环境,促进生防菌的繁殖,抑制病原微生物生长,减少病害损失^[5].尽管水果蔬菜表面自然存在的微群落中病原菌的行为还未明确,但目前针对特定微生物种或群的生态定位在形态学、组织结构等方面已有部分研究成果^[6].

葡萄树是中国的重要果树之一,遍布中国广大地区^[7].据联合国粮农组织(FAO)统计,2011年我国葡萄栽培总面积 $5.97 \times 10^9 \text{ m}^2$,居世界第4位;总产量 $9.067 \times 10^6 \text{ t}$,居世界首位^[8].其中,夏黑无核葡萄呈圆形,紫黑色,果肉脆硬,是一种重要的鲜食葡萄品种.因此,对其表皮微生物菌群进行研究不仅可以发现葡萄表皮所含的有益菌,也可以检测其表皮是否含有致病菌,从而为食品安全与品质控制提供有力的技术支撑.

目前针对葡萄发酵过程微生物的研究很多,但主要聚焦在对酵母菌群的研究上.此外,

传统的依靠酵母形态和生理生化特征的鉴定酵母菌种的方法已逐渐被分子生物学技术所取代,主要包括线粒体DNA限制性酶切分析、DNA限制性片段多态性分析(PCR-RFLP)、随机扩增多态性DNA分析、脉冲电泳核型分析(PFGE)、核糖体DNA序列分析、实时PCR技术(Real time PCR)分析等^[9].此外,还有一些其他的分子生物学方法,如刘爱国^[10]、宋育阳^[11]、郑东辉^[12]、徐艳文^[13]、卢军^[14]报道的26S rDNA D1/D2和5.8S-ITS rDNA区序列分析,已被广泛应用于酵母菌的分类鉴定和系统学研究.

近些年,随着高通量测序技术的迅猛发展,宏基因组测序技术已成为研究微生物群体的重要手段.该方法立足样品的总核酸,用分子生物学方法通过PCR反应获得高覆盖度的目的基因片段,然后经过高通量测序获得这些序列的信息,再采用一系列的生物信息学分析手段,最终揭示研究样品的微生物种群组成与丰度等信息.通过该方法得到的微生物菌群信息,更加符合样品表面微生物种群的实际组成,对正确认识样品微生物菌群组成等具有重要意义.

鉴于此,本研究针对市售的鲜食夏黑无核葡萄品种,于无菌条件下收集葡萄表皮样品,经过总DNA提取、PCR扩增16S rRNA基因V3-V4可变区,以及高通量测序与分析,揭示该葡萄品种表皮细菌菌群组成的多样性,最终为果蔬采后生物防治提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 鲜食夏黑无核葡萄品种, 郑州某水果市场, 挑选个大、饱满、无腐烂且无破皮的葡萄(5 串), 购买后用无菌样品袋装好密封, 放入事先准备好的冰盒内, 快速带回实验室。

1.1.2 主要试剂与仪器 E. Z. N. A. Soil DNA Kit, 美国 Omega Bio-Tek 公司产; Qubit 2.0 DNA 检测试剂盒, Taq DNA Polymerase, Qubit 2.0 荧光计, 美国 Thermo 公司产; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 上海生工公司产; TGL-160 型高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂产; JY300C 型电泳仪和 JY-IY5 型转移电泳槽, 北京君意东方电泳设备有限公司产; 荧光定量 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 葡萄表皮的获取 将带回的葡萄样品放入超净工作台内, 用表面经过火焰灼烧消毒的镊子, 分别从 5 串葡萄上随机挑选 30 粒葡萄, 放入经过灭菌的培养皿内; 然后用无菌的镊子, 小心剥落葡萄表皮(尽可能地不含果肉), 并将其迅速放入无菌样品袋内, 密封, 标记, 放入冰箱于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下暂存。

1.2.2 葡萄表皮样品总 DNA 的提取 采用 Omega 的 E. Z. N. A. Soil DNA Kit, 按照试剂盒的说明提取葡萄表皮样品中的总 DNA, 再将提取的 DNA 样品经 nanodrop 检测纯度, 合格后暂存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.3 细菌菌群的宏基因组测定与分析 对于细菌菌群, 宏基因组测定选择的测序对象为 16S rRNA V3-V4 可变区。选择的正向测序引物为 Nobar_341F: 5'-CCTACGG GNGGCWG-CAG-3', 反向测序引物为 Nobar_805R: 5'-GACTA CHVGGGTATCTAATCC-3'。测序采用 Miseq 双端测序法, 读长是 $2 \times 300\text{ bp}$ 。对于获得

的宏基因组测序结果从以下几方面进行分析。

1) 原始数据统计. 将获得的数据以标准的 fastq 文件保存. 以双端测序(PE: paired-end) 数据为例, 每一个样本有 R1.fastq 和 R2.fastq 两个文件, 分别代表 5'→3' 和 3'→5' 的测序结果. R1.fastq 与 R2.fastq 中的文件行数是一致的, 且根据 reads name 一一对应。

2) 数据优化统计. 根据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对的 reads 拼接成一条序列, 并进行质量控制过滤. 数据过滤由以下步骤构成: 将 R1.fastq 与 R2.fastq 进行拼接; 去除 $\leq 50\text{ bp}$ 的短片段序列; 去除融合后的 reads 尾部质量值在 20 以下的碱基; 对低复杂度的序列进行过滤. 拼接使用的软件为 FLASH (FLASH 主要参数设置为 $-x\ 0.1$ <http://sourceforge.net/projects/flashpage/>); 质量控制使用 Prinseq (主要参数设置为 $-lc_method\ dust\ -lc_threshold\ 40\ -min_len\ 50$ <http://prinseq.sourceforge.net/>).

3) 去除嵌合体及靶区域外的序列. 去除预处理后序列中非扩增区域序列, 再对序列进行测序错误校正, 使用的校正软件为 mothur (<http://mothur.org/>) 中的 Pre.cluster, 最后采用 Chimeras. uchime 去除序列中的嵌合体. 其中, Pre.cluster 软件使用的算法为 pseudo-single linkage, 基本原理是丰度越高的序列越容易产生测序错误, 根据序列的丰度排序, 遍历产生的序列列表, 再根据设置的一些阈值, 从中寻找丰度较低的序列. Chimeras. uchime 在给定的 reference 下, 去除序列中的嵌合体。

4) 对得到的数据进行操作分类单元(OTU)分类. 将多条序列按其序列间距进行聚类, 按照 97% 相似性的标准, 将这些序列分为若干个 OTU. 通常序列相似性阈值为 0.97 时, OTU 被认为可能属于属; 序列相似性阈值为 0.99 时, OTU 被认为可能属于种. OTU 聚类采用的软件为 uclust, 该软件首先筛选出序列中最长

的 reads 作为种子序列,找出在该序列相似性阈值范围内的所有序列,将其归为一类,以此类推,直到所有序列均被聚类,每一类作为一个 OTU.

5) 赋予物种分类单元. 对处理后的序列进行物种分类,采用的软件为 RDP classifier. 该软件基于 Bergey's taxonomy, 采用 Naïve Bayesian assignment 算法对每条序列在属水平上计算其分配到 rank 中的概率值,若概率值大于 RDP 分类阈值 0.8, 则说明此分类结果可信度高. Bergey's taxonomy 分为 6 层,依次为域、门、纲、目、科、属. 同时,基于 OTU 聚类的结果,获取每一个 OTU 聚类的代表性序列,分别是长度最长序列(length) 和丰度最大序列(abundance).

2 结果与分析

2.1 葡萄表皮总 DNA 提取与检测分析

按照试剂盒中 DNA 提取的步骤提取果表微生物总 DNA, 然后再经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 初步确认提取 DNA 的量, 经 nanodrop 检测, 葡萄表皮总 DNA 浓度均大于 80 ng/ μ L, 符合测序要求.

2.2 细菌群落宏基因组测定结果分析

经过原始数据的提取和统计, 得到原始 reads 条数为 33 558 条, 平均长度为 459.3 个碱基. 经过对数据的进一步优化处理后, 得到的 reads 条数为 33 534 条, 平均长度为 419 个碱基.

2.3 嵌合体及靶区域外序列的去除结果

经过嵌合体及靶区域外序列的去除后, 共去除嵌合体序列 2743 条, 去除靶区域外序列 191 条, 最终得到的纯净序列系数为 30 600 条.

2.4 OTU 的确定与聚类分析

经过对所得序列进行聚类分析, 共分成了 4310 个 OTU. 通过对样品菌群分布的分类学分析, 列出门、纲和属水平的菌群丰度分布柱状图, 如图 1—3 所示(图中横坐标为样本, 纵坐标

为丰度, 不同颜色表示不同菌群; 图例根据菌群在所有样本中总体 reads 从大到小进行排布; 为了显示效果更好, 将丰度极低的部分合并为 other 显示在图上).

从图 1 可以看出, Firmicutes(厚壁菌门)和 Proteobacteria(变形菌门)约占总菌群数的 85%; 未分类的序列约占总菌群数的 6%; Bacteroidetes(拟杆菌门)和 Chloroflexi(绿弯菌门)约占总菌群数的 5%, 其余均为丰度极低的菌群. 而厚壁菌门、变形菌门也是在葡萄相关微生物研究中占主要优势的菌门, 表明所选取的葡萄果表微生物符合基本规律.

从图 2 可以看出, Bacilli(杆菌纲)为丰度最大的纲, 占比约为 55%; 而 Gammaproteobacteria(γ 变形菌纲)、Clostridia(梭菌纲)和 Alphaproteobacteria(α 变形菌纲)分别占比约为 7%; Actinobacteria(放线菌纲)和 Betaproteobacteria(β 变形菌纲)分别占比约为 4%. 其余均为丰度较低的菌群, 共占比约为 15%.

从图 3 可以看出, *Lactococcus*(乳酸球菌属)占总菌群数量的 30% 以上, *Bacillus*(芽孢杆菌属)占比约为 10%. 而这两个属也是葡萄酒发酵过程中的重要菌属. 芽孢杆菌属在发酵前期其代谢作用对于糖的转化等有重要影响, 而乳酸球菌属则在发酵的整个过程中均有一定的作用, 葡萄酒发酵过程中发酵液一般都呈酸性, 这为其生存提供了很好的环境; 另外, 其对于葡萄酒酸度的调节能起到至关重要的作用. 其次为 *Leuconostoc*(明串珠菌属)、未分类的 *Ruminococcaceae*(瘤胃球菌科)菌群和 *Pseudomonas*(假单胞菌属)共占比约为 10%. 其中假单胞菌属具有保护地上部植物抵御病害的作用, 所以在果表可能会发挥防止果实腐败等作用. 再次为 *Arthrobacter*(节细菌属), *Allobaculum*, *Solibacillus*, *Anderseninella*, *Burkholderia*(伯克霍尔德菌属), *Streptococcus*(链球菌属), 未分类的

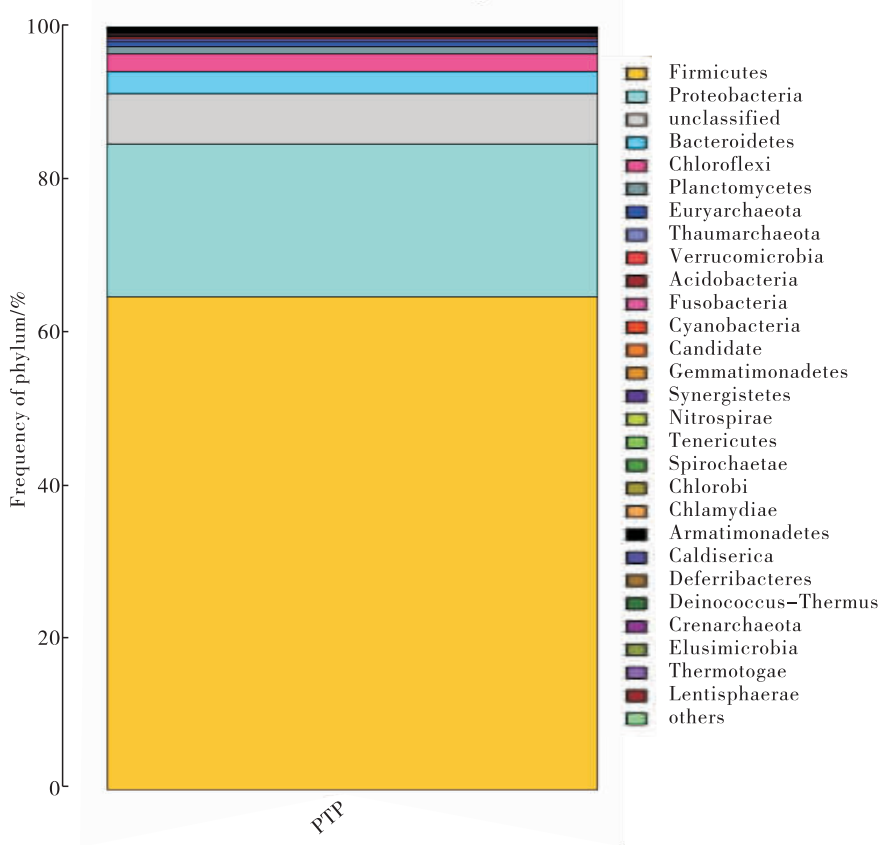
Anaerolineaceae (厌氧绳菌科), *Staphylococcus* (葡萄球菌属), *Lactobacillus* (乳酸菌属), *Escherichia-Shigella* (埃希氏菌属 - 志贺氏菌属), *Olsenella*, *Candidatus*, *Corynebacterium* (棒杆菌属) 和 *Carnobacterium* (肉杆菌属) 等 14 个属的菌群共占比约为 20%。其余均为丰度较低的群体。值得注意的是, *Anderseninella* 最先是分离自海底的沉积物, 而 *Escherichia-Shigella* 则是一对病原菌的组合, 这一发现引发了我们对于食品安全与品质控制问题的担忧。

3 结论

本研究对市售夏黑无核葡萄表皮菌群 16S rRNA 基因 V3 - V4 可变区进行了宏基因组测序和分析, 结果表明, 葡萄表皮细菌群落具有高

度多样性, 且菌群丰度存在明显差异。从门分类水平上分析, 菌群主要为厚壁菌门和变形菌门。从纲分类水平上分析, 菌群主要为杆菌纲、 α 变形菌纲、 β 变形菌纲、 γ 变形菌纲、梭菌纲和放线菌纲, 其中, α 变形菌纲、 β 变形菌纲、 γ 变形菌纲归属于变形菌门。从属分类水平上分析, 乳酸球菌属为优势菌属, 这可能与葡萄含糖量高, 有利于乳酸菌生长有关; 其次是芽孢杆菌属、明串珠菌属、假单胞菌属等, 共占菌群总数的 50% 以上。

值得注意的是, 果皮菌群里还发现了 *Escherichia-Shigella* (埃希氏菌属 - 志贺氏菌属) 的群体, 而多数埃希氏菌属和所有志贺氏菌属的菌群均为致病菌, 能够导致人体消化道感染, 引起腹泻, 甚至危及生命。该致病菌可能来源于以



注: 其中灰色为 unclassified 序列, 即未分类序列

图 1 菌群门水平丰度分布柱状图

Fig. 1 The abundance distribution histogram of bacterial flora at phylum level

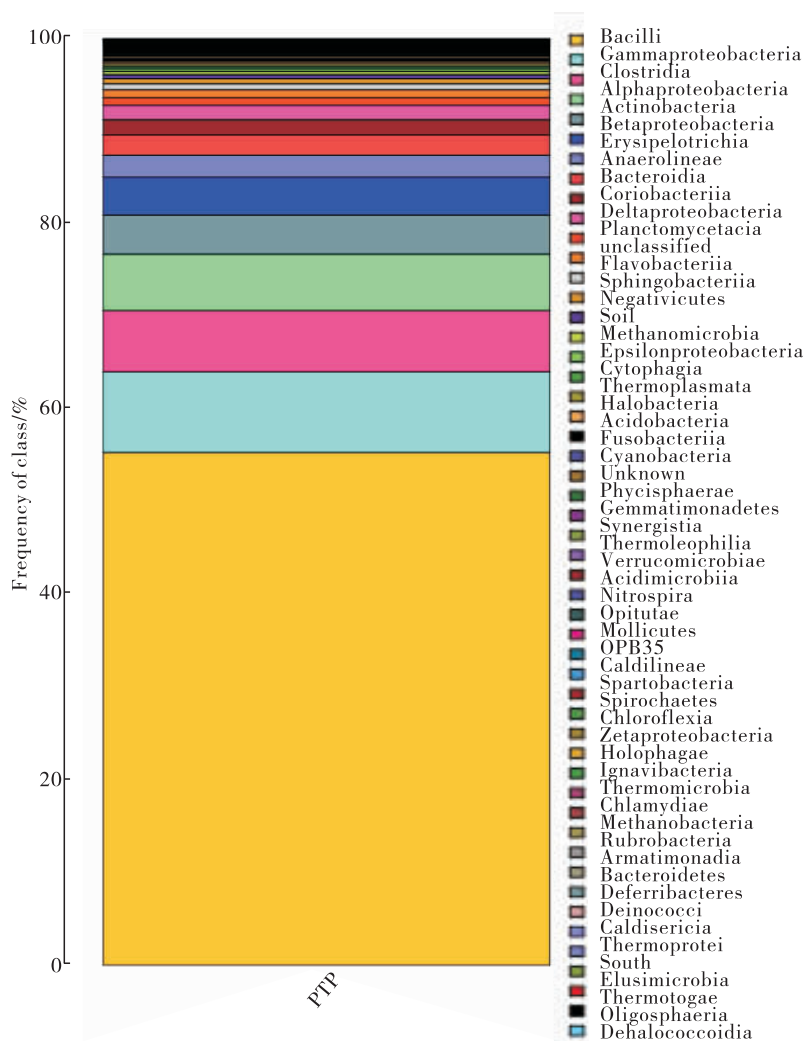


图2 菌群纲水平丰度分布柱状图

Fig.2 The abundance distribution histogram of bacterial flora at class level

下几种途径: 1) 葡萄生长过程中, 土壤中的致病菌群经过动物媒介传到了葡萄果实表面; 2) 葡萄采摘和运输过程中, 采摘工具、盛装葡萄的袋子等卫生条件不合格所致; 3) 葡萄销售过程中, 因消费者手触而传播了病菌等。

综上所述, 尽管葡萄表皮的菌群具有高度多样性, 但仍以有限的优势菌群为主。此外, 葡萄表皮致病菌群的发现提示我们, 在食用葡萄之前, 一定要用清水多次冲洗葡萄表面, 防止因误食含有致病菌的葡萄而引起腹泻等消化道疾病。该研究成果对于果蔬采后生物防治和市售果蔬的检验检疫工作有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] 王新颖, 江志伟, 方龙音, 等. 氯化物与臭氧水果保鲜方法及杀菌效果探究[J]. 食品工业, 2014, 35(3):1.
- [2] 车建美, 郑雪芳, 林抗美, 等. 保险功能微生物对不同鲜切水果保鲜效果的研究[J]. 福建农业学报, 2001, 26(2):260.
- [3] 王诚, 李波, 张卫东. 进口水果果皮表面农药等有毒有害物质残留对于食用安全性的研究[J]. 检验检疫科学, 2006, 16(1):55.
- [4] 彭景贤. 酵母菌对柑橘采后病害的生物防治及防治机理的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2006.

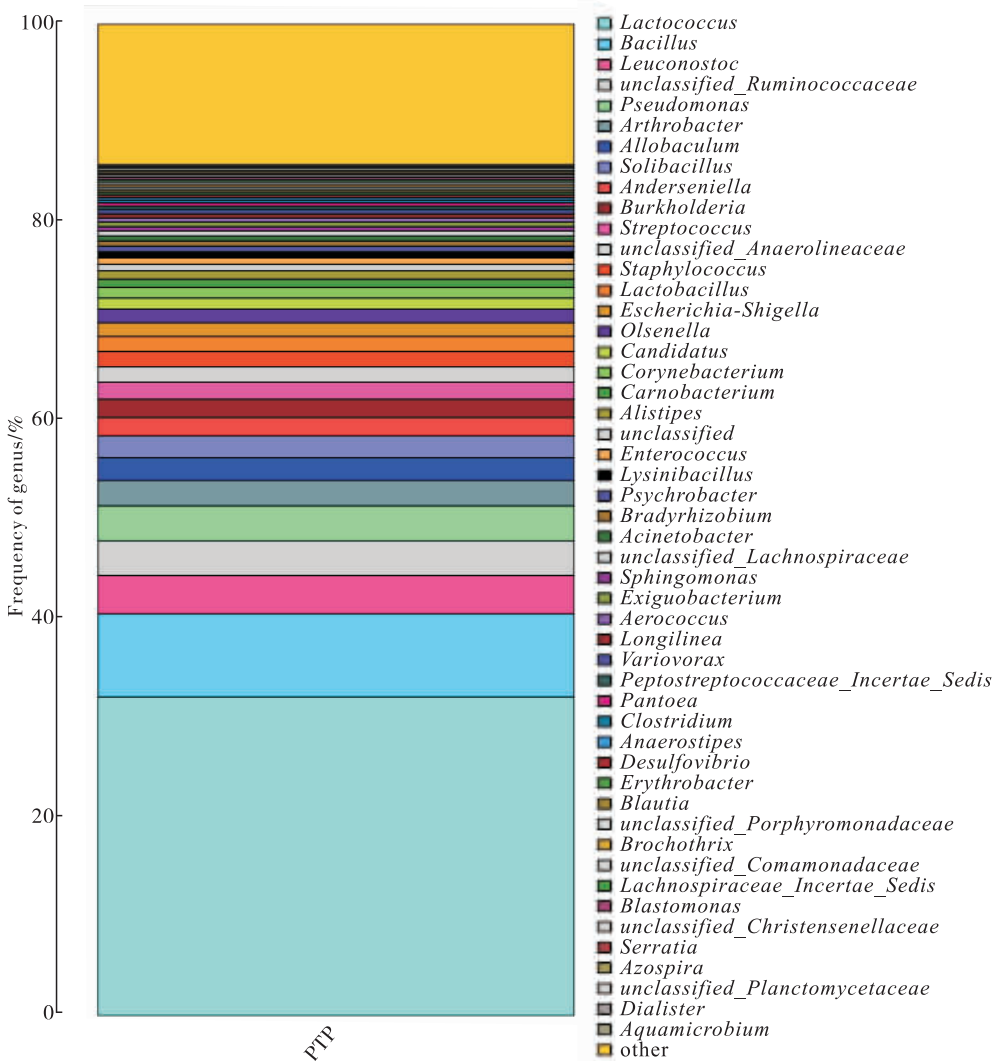


图3 菌群属水平丰度分布柱状图

Fig. 3 The abundance distribution histogram of bacterial flora at genus level

[5] 牛伟,流宇,耿海峰. 水果采后病害生防菌研究进展[J]. 内蒙古农业科技,2010(5):94.

[6] 王树坤,吴献花,杨汝松. 影响蔬菜水果表面人类病原菌存活生长的生态学因子[J]. 中国微生态学杂志,2008,20(3):300.

[7] 李红,张夏兰,李兴红,等. 北京地区一株葡萄酸腐病相关酵母菌的分离鉴定[J]. 食品科技,2015,30(1):36.

[8] 管雪强,王恒振,孙玉霞,等. 中国葡萄品种资源概况[J]. 落叶果树,2014,46(1):1.

[9] 薛军侠,徐艳文,杨莹,等. WL培养基在酿酒酵母筛选中的应用[J]. 中国酿造,2007,26(9):36.

[10] 刘爱国. 宁夏贺兰山东麓葡萄酒酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2008.

[11] 宋育阳,刘延林. 宁夏贺兰山葡萄酒厂酵母菌的鉴定及多样性研究[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2009.

[12] 郑东辉. 乳制品中细菌总数、酵母菌和霉菌快速检测方法的研究[D]. 长春:吉林大学,2013.

[13] 徐艳文. 甘肃地区葡萄酒相关酵母菌的分离及其分类鉴定[D]. 咸阳:西北农林科技大学,2007.

[14] 卢军,李艳. 分子生物学技术在葡萄酒相关酵母菌分类鉴定中的应用及研究进展[J]. 酿酒科技,2009(6):92.



引用格式:刘瑞雪,樊晓敏,李义梦,等.多巯基阳离子共聚物合成与凝胶化反应研究[J].轻工学报,2017,32(6):27-34.

中图分类号:O648.17 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.004

文章编号:2096-1553(2017)06-0027-08

多巯基阳离子共聚物合成与凝胶化反应研究

Study on synthesis and gelation reaction of cationic copolymer containing sulfhydryl groups

刘瑞雪,樊晓敏,李义梦,傅晓明,张晓静

LIU Rui-xue, FAN Xiao-min, LI Yi-meng, FU Xiao-ming, ZHANG Xiao-jing

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:

阳离子共聚物;巯基;
二硫键/离子键协同
作用;巯基-迈克尔
加成;水凝胶

Key words:

cationic copolymer;
sulfhydryl group;
disulfide/ionic bond
coordination;
thiol-Michael
addition; hydrogel

摘要:以 HEMA 和 DMC 为共聚单体,经自由基聚合和巯基转化反应,制备出侧链含有羟基、巯基和铵根阳离子的水溶性共聚物巯基-聚(甲基丙烯酸- β -羟乙酯-co-甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵)(HS-P(HEMA-co-DMC)),通过流变测量和 SEM 研究了 HS-P(HEMA-co-DMC)分别与聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)和表面带有负电荷的片状锂皂石(Laponite RD)发生物理/化学交联反应所形成的两种复合水凝胶的流变性能和形貌,结果表明:HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶在固体物质质量分数为 22% 的凝胶储能模量达 3468 Pa,损耗因子为 0.34,表现出明显的含物理交联点的凝胶黏弹性行为;当固体物质质量分数相同时,HS-P(HEMA-co-DMC)/PEGDA 复合水凝胶的储能模量为 1484 Pa,损耗因子为 0.013,表现出典型的共价交联凝胶的黏弹性行为;HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶比 HS-P(HEMA-co-DMC)/PEGDA 复合水凝胶具有更致密的孔洞结构。

收稿日期:2016-12-16

基金项目:国家自然科学基金项目(21474092);人事部留学归国人员科技活动项目择优资助项目(002422);郑州轻工业学院博士基金项目(13501050013)

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,主要研究方向为功能高分子材料。

Abstract: With HEMA and DMC as comonomers, the water-soluble copolymer mercapto-poly (methacrylic acid- β -hydroxyethyl (HS-P (HEMA-co-DMC))) containing hydroxyl, mercapto and ammonium cations in the side chain was prepared by free radical polymerization and sulfhydryl conversion reaction. The rheological properties and morphology of the two types of composite hydrogels, which were formed by HS-P (HEMA-co-DMC) reacting respectively with polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) and surface-loaded laponite (Laponite RD) by the physical / chemical cross-linking reaction, were measured by rheometry and SEM. The results showed that the gel storage modulus and loss factor of HS-P (HEMA-co-DMC)/LaponiteRD composite hydrogel were respectively 3468 Pa and 0.34 with a solid content of 22%, showing obvious viscoelastic behavior of the crosslinked points. At the same solid content, HS-P (HEMA-co-DMC)/PEGDA composite hydrogel had a storage modulus of 1484 Pa and a loss factor of 0.013, showing the viscoelastic behavior of a typical covalently crosslinked gel. HS-P (HEMA-co-DMC)/Laponite RD composite hydrogel had a denser pore structure than HS-P (HEMA-co-DMC)/PEGDA composite hydrogel.

0 引言

自1960年 *Nature* 报道了由聚甲基丙烯酸- β -羟乙酯制备的首例用作隐形眼镜材料的水凝胶以来^[1],作为一种新材料,这种水凝胶以其良好的生物相容性、多孔性及与生物组织相似的富含水性,已经广泛应用在隐形眼镜、卫生产品、组织工程、药物的输送与控制释放、伤口敷料等生物医药研究和产品开发等方面^[2]。

水凝胶一般经物理法或化学交联法获得。物理水凝胶是由氢键、离子键、偶极-偶极、静电引力、疏水相互作用等次级作用力单独或共同作用于水溶性高分子链而形成的^[3]。该法成型迅速,但需要足够量的键合点才能形成一定强度的水凝胶,且水凝胶容易随环境(如温度、离子强度和pH值)发生可逆变化^[4]。通过化学键交联而形成的水凝胶强度较高,成型后不会发生逆转,可以通过控制交联密度调节水凝胶的强度,但将一些功能基团(如可降解基团)引入主链时,需要加入一些有毒的凝胶促进剂(如小分子的引发剂、交联剂)^[5],因此限制了化学水凝胶在生物医用领域的应用。而疏基-迈克尔加成法^[6]由于具有原料广泛、反应条件温和、无需外加催化剂、反应迅速等特点,在可注射凝胶的药物输送与软组织修复等方面发展迅速。

高性能的水凝胶通常需要物理法和化学法的协同,既能满足成型迅速、又具有共价交联的弹性和强度需求。B. H. Lee等^[7]设计的侧链烯基功能化修饰的P(NIPAm-co-HEMA-acrylate)与侧链疏基功能化的PNIPAm或多疏基化合物,在37℃,pH=7.4,浓度为0.1 mol/L的PBS溶液中形成了物理-化学交联水凝胶,凝胶化反应分别经历了温度诱导的PNIPAm链疏水相互作用(物理交联)和疏基-迈克尔加成(化学交联),形成的水凝胶低溶胀、高弹性。疏基-迈克尔加成反应具有产率高、定向选择性好、可操作性强和反应速率快等优良特性,近年来有飞速的发展。

本文拟合成一种含有羟基、疏基和铵根阳离子的水溶性共聚物疏基-聚(甲基丙烯酸- β -羟乙酯-co-甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵)(HS-P(HEMA-co-DMC)),探索HS-P(HEMA-co-DMC)分别与聚乙二醇双丙烯酸酯(PEGDA)和表面带有负电荷的片状锂皂石(Laponite RD)发生物理/化学交联反应所形成的两种类型复合水凝胶的性能,以期生物软组织替代材料的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

主要试剂:甲基丙烯酸- β -羟乙酯

(HEMA)、甲基丙烯酰氧乙基三甲基氯化铵(DMC)、过硫酸铵(APS)、聚乙二醇二丙烯酸酯(PEGDA),均为分析纯,阿拉丁试剂上海股份有限公司产;硫脲(分析纯),梯希爱(上海)化成工业发展有限公司产;无水甲醇、丙酮、浓盐酸、氢氧化钠,均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司产;无机纳米粒子锂皂石(Laponite RD),科耐欧贸易(上海)有限公司产。

主要仪器:DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司产;DHG-9140A型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司产;DZF-6030型真空干燥箱,上海新苗医疗器械制造有限公司产;AK-1140型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司产;FJ200-S数显高速分散均质机,上海索映仪器设备有限公司产;FD型加热型冷冻干燥机,上海欣谕仪器有限公司产。

1.2 HS-P(HEMA-co-DMC)的合成

共聚物的合成分两步,即先合成 HEMA 和 DMC 的共聚物,而后用巯基取代共聚物链上的部分羟基,得到分子链中同时含有羟基、巯基和铵根阳离子的共聚物 HS-P(HEMA-co-DMC)。其合成路线如下。

1) P(HEMA-co-DMC)的制备:准确称取 HEMA 16.3 g 和 DMC 5.1 g,溶于 23 mL 无水甲醇中,以质量分数 4% 的 APS(0.085 6 g)为引发剂,在 N_2 保护下于 50 °C 条件下的反应瓶中反应 24 h,然后用无水甲醇稀释所得聚合物溶液,用丙酮沉淀,获得白色固体粉末,即 P(HEMA-co-DMC),真空干燥后备用。

2) HS-P(HEMA-co-DMC)的制备:参照文献[8],电磁搅拌下,将 0.570 3 g 硫脲慢慢加入浓盐酸(32 mL)和水(40 mL)的混合溶液中,待硫脲完全溶解后,再缓慢加入预先溶于水中的 P(HEMA-co-DMC)(12.876 0 g),50 °C 下反

应 24 h,得到无色透明溶液。在 N_2 保护下,冰水浴,边搅拌边将 19.1 mL 2 mol/L 的 NaOH 水溶液加入上述溶液中,获得乳白色沉淀物。去除上层溶液,用无水甲醇溶解沉淀物,然后在丙酮中沉淀,反复溶解、沉淀 3 次,得到白色粉状物质,即 HS-P(HEMA-co-DMC),真空干燥后在 N_2 保护下密封、冷藏。

1.3 多种交联模式共存的复合水凝胶的制备

1) 二硫键-离子键交联复合水凝胶的制备。将一定量质量分数为 5% 的 HS-P(HEMA-co-DMC)(或 P(HEMA-co-DMC))水溶液和质量分数为 0.5% 的 Laponite RD 充分混合,调节溶液 pH 值至 8.0,将混合溶液置于 65 °C 水浴中平衡 24 h,得二硫键-离子键交联复合水凝胶 HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 或 P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD。

2) 巯基-迈克尔法制备复合水凝胶。在 N_2 保护下,将 HS-P(HEMA-co-DMC)(或 P(HEMA-co-DMC))配成质量分数为 15% 的水溶液后取 5.222 g 置于小玻璃瓶内,加入 0.18 g PEGDA(为 HS-P(HEMA-co-DMC)中巯基摩尔数的 1/2),0.1 mL 质量分数为 1% 的 APS 水溶液,调节溶液 pH 值为 7.4 后,置于 37 °C 的水浴锅中恒温反应 24 h,得稳定的复合水凝胶 HS-P(HEMA-co-DMC)/PEGDA 或 P(HEMA-co-DMC)/PEGDA。

1.4 表征

采用核磁共振仪,以 D6-DMSO 为溶剂,对共聚物结构进行分析测试。利用元素分析仪对共聚物进行元素分析。采用流变仪对水凝胶进行流变测试:测试温度 25 °C,应变的扫描范围为 0.1% ~ 1000%,频率为 1 Hz。使用扫描电子显微镜对水凝胶内部结构进行表征。

2 结果与讨论

2.1 HS-P(HEMA-co-DMC)的¹H NMR 分析

以 HEMA 和 DMC 为共聚单体,分别经自

由基聚合和巯基转化反应,制备侧链含有羟基、巯基和铵根阳离子的共聚物 HS-P(HEMA-co-DMC),采用 GPC,核磁和元素分析法表征共聚物的结构.其中所用的 P(HEMA-co-DMC)数均分子量为 3.69×10^4 (分子量分布系数 1.61).图 1 为巯基化前后阳离子共聚物的 ^1H NMR 图,所用的溶剂为氘代二甲基亚砜(D6-DM-SO). HS-P(HEMA-co-DMC)与巯基化之前的共聚物 P(HEMA-co-DMC)相比,分别在 $\delta = 2.1 \times 10^{-6}$, 3.2×10^{-6} 和 4.05×10^{-6} 附近出现了新的化学位移,分析认为 4.05×10^{-6} 附近的三重峰为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ 的亚甲基化学位移, 3.2×10^{-6} 附近的多重峰为 $-\text{CH}_2\text{SH}$ 的化学位移, $-\text{SH}$ 基团的化学位移一般在 $0.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-6}$

区间,因此在 2.1×10^{-6} 附近出现的峰为 $-\text{SH}$ 的化学位移^[9].根据核磁分析结果可以初步确定,采用硫脲巯基化反应可将 HEMA 单元上的部分羟基转化为巯基,形成侧基上同时含有羟基、巯基和铵根阳离子的多功能性共聚物 HS-P(HEMA-co-DMC).

2.2 HS-P(HEMA-co-DMC)的元素分析

为进一步验证羟基的巯基转化,巯基化产物提纯后对其进行元素分析,结果为 C(48.19%), N(1.499%), H(15.1%) 和 S(1.274%).巯基化反应之前 P(HEMA-co-DMC)中 DMC 与 HEMA 的单元物质的量比为 $n(\text{DMC}) : n(\text{HEMA}) = 1 : 5$,元素分析实测计算结果显示,共聚物中 $n(\text{DMC}) : n(\text{HEMA}) = 1 : 4.74^*$,接近理

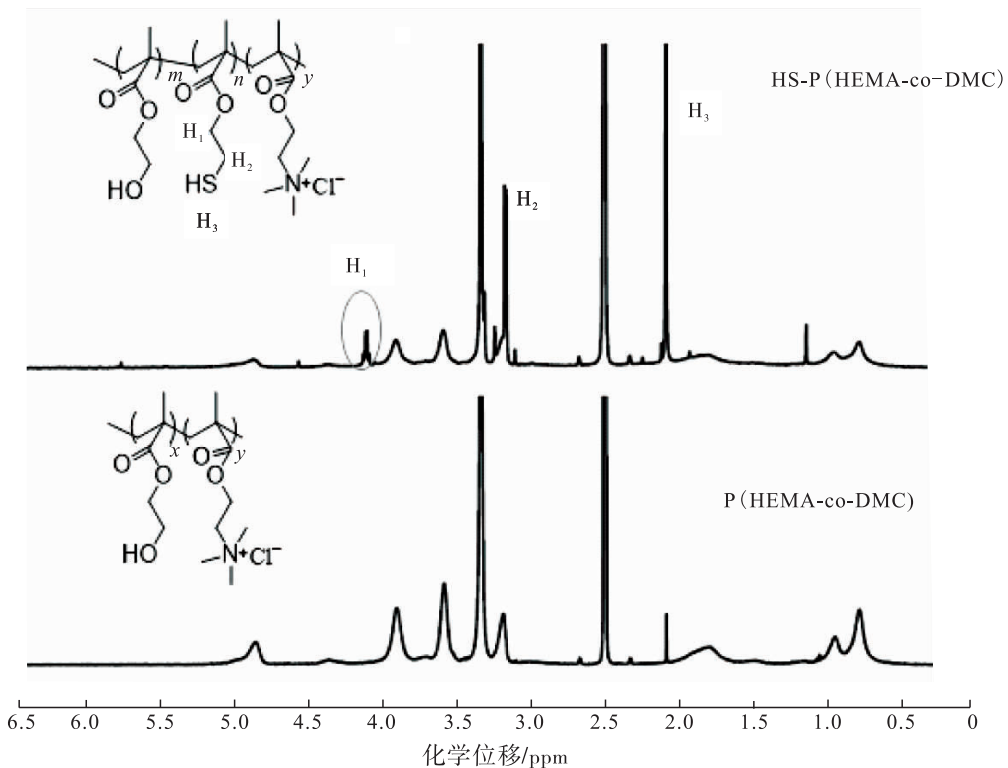


图 1 巯基化前后阳离子共聚物的 ^1H NMR 图

Fig. 1 ^1H NMR of the copolymer before and after thiolation

* 将巯基化共聚物中 DMC 单元摩尔分数设为 f , HEMA 单元摩尔分数为 $1-f$, 因为 HEMA 与 DMC 中 C, H, N 的组成式分别为 $(\text{C}_6\text{H}_{10})_{1-f}$ 和 $(\text{C}_9\text{H}_{18}\text{N})_f$, 所以共聚物中 C 的数目为 $n_C = 6 + 3f$, N 的数目为 $n_N = f$, 即 $n_N/n_C = f/(6 + 3f)$. 选取元素分析的实测值计算得 $n_N/n_C = (1.499/14)/(48.19/12) = 0.0267$, 根据 $n_N/n_C = f/(6 + 3f)$, 求得 $f = 0.1742$, 因此共聚物中 DMC/HEMA 的组成比为 $1.742/8.258$, 即 $n(\text{DMC}) : n(\text{HEMA}) = 1 : 4.74$

论值,证明合成的阳离子共聚物符合预定比例. 巯基化转化反应中,理论上将 HEMA 中羟基的 1/10 转化为巯基,即 HS-P(HEMA-co-DMC) 中硫元素所占比例应为 1.648%,而实际值为 1.274%,稍小于理论值. 这说明,采用这种巯基转化法可以将硫元素引入到共聚物中,实际转化率为 77%,则羟基转巯基的转化率为 7.7%.

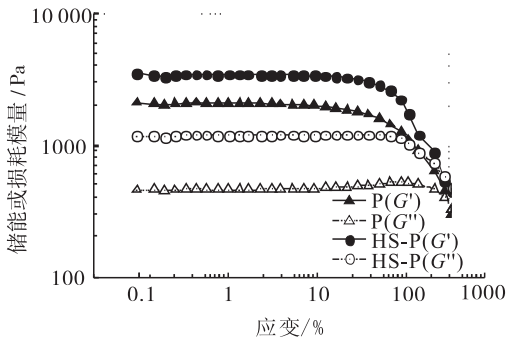
2.3 HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 和 P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶的流变性能分析

Laponite RD 是一种常用的人造纳米锂皂石黏土,其在水中分散,形成表面带有负电荷的直径约 25 nm,厚度约 1 nm 的盘状纳米粒子,常作为纳米粒子增强剂用于制备复合材料^[10]. 带正电的 HS-P(HEMA-co-DMC) 水溶液和带负电的 Laponite RD 水分散体系均为透明的流动液体,两者可以任意比相混合. 在静电引力的作用下,在一合适的比例范围内,混合体系迅速变为非流动的固相状态,若调节体系 pH 值至弱碱性,混合物中的共聚物侧链巯基之间发生偶合,整个体系形成二硫键/离子键协同作用的复合水凝胶. 将质量分数为 5% 的 HS-P(HEMA-co-DMC) 和质量分数为 0.5% 的 Laponite RD 水溶液相混合,调节溶液 pH 值至 8,在 65 °C 下平衡 24 h,获得接近透明的自支撑复合水凝胶,这种水凝胶具有一定的机械强度,但在形成水凝胶的过程中,大量的水被释放出来,根据干燥前后的质量比确定水凝胶网络中含水量为 78% (质量分数). 仅含有铵根阳离子的 P(HEMA-co-DMC) 在相同条件下也可以与 Laponite RD 形成水凝胶,在水凝胶形成过程中脱除部分水分,所得水凝胶的透明度略高于 HS-P(HEMA-co-DMC) 形成的水凝胶.

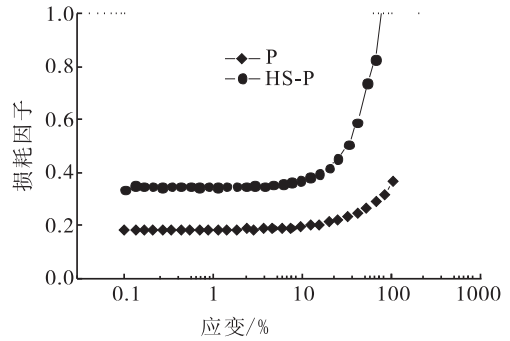
图 2 为巯基化前后的阳离子共聚物与 Laponite RD 形成的复合水凝胶的模量和损耗因子 ($\tan\delta$) 随应变变化的结果. 由图 2a) 可以

看出,两种水凝胶的储能模量 (G') 均大于损耗模量 (G''),且与预测结果一致,由 HS-P(HEMA-co-DMC) 形成的复合水凝胶的 G' ($G' = 3468 \text{ Pa}$) 是 P(HEMA-co-DMC) 形成的复合水凝胶 ($G' = 2100 \text{ Pa}$) 的 1.65 倍,且在应变 $< 30\%$ 时,水凝胶模量几乎不随应变的变化而变化,说明水凝胶内部结构均匀、稳定. 通常,凝胶的储能模量降至应变为 1% 的储能模量的 0.95 倍时对应的应变值,称为临界应变,记为 γ^* ^[11],根据 γ^* 的大小可以衡量凝胶的抗形变能力. HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶 $\gamma^* = 38\%$,而 P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶 $\gamma^* \approx 18\%$,由此可以判定经二硫键/离子键协同作用形成的复合水凝胶具有更好的抗形变能力. 值得一提的是,这种复合水凝胶在应变达到 100% 以上时储能模量和损耗模量相交,这表明水凝胶内部结构完全被破坏,从而充分证明了 Laponite RD 的片层纳米结构的增韧性能.

代表水凝胶黏弹性的损耗因子 $\tan\delta = G''/G'$,该值小于 1 表示体系为有效交联的凝胶网络. 由图 2b) 可知,与 HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶 ($\tan\delta = 0.34$) 相比,P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶具有更好的弹性行为 ($\tan\delta \approx 0.18$). 这可能是由于 HS-P(HEMA-co-DMC) 链段中含有多个巯基,改变体系 pH 值促进巯基氧化形成二硫键,既可能发生在分子间的巯基基团之间,也可能发生在分子内的巯基基团之间. 若发生在分子内的巯基基团之间就会造成共聚物分子环化,弱化共聚物分子链在 Laponite RD 之间的交联作用,使得凝胶黏性增大,表现为 $\tan\delta$ 值较高. P(HEMA-co-DMC) 则由于分子内正电荷的静电斥力,更倾向于吸附在电荷不同的 Laponite RD 表面,从而形成有效的离子键交联, $\tan\delta$ 值相对较小.



a) 复合水凝胶模量随应变的变化



b) 复合水凝胶损耗因子 (tanδ) 随应变的变化

图2 巯基化前后的阳离子共聚物分别与 Laponite RD 形成的复合水凝胶的模量和损耗因子随应变量的变化图

Fig.2 Modulus and loss factor-strain diagram of the composite hydrogel formed by cationic copolymer before and after thiolation and Laponite RD

图3为巯基化前后的阳离子共聚物与 Laponite RD形成的复合水凝胶(固体质量分数为22%)的压缩应力-应变图.由图3可以看出,两种复合水凝胶均具有典型的压缩应力-应变性质、一定的抗压缩变形能力,压缩形变可达93%,但HS-P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD复合水凝胶具有更高的压缩强度(265 kPa),约为P(HEMA-co-DMC)/Laponite RD复合水凝胶压缩强度(69 kPa)的4倍,这充分证明,将巯基引入共聚物分子,在形成凝胶的过程中巯基之间形成二硫键,可使凝胶的力学性能增强.因此,多巯基的共聚物HS-P(HEMA-co-DMC)与Laponite RD形成了力学性能更强的凝胶体系.

2.4 HS-P(HEMA-co-DMC)/PEGDA 复合水凝胶的流变性能分析

利用巯基-迈克尔加成反应形成水凝胶,是凝胶化反应常用的手段^[6].HS-P(HEMA-co-DMC)具有良好的水溶性,与双丙烯酰氧基封端的短链聚乙二醇(PEGDA)相混合发生巯基-迈克尔加成反应,形成透明的交联水凝胶.用P(HEMA-co-DMC)代替HS-P(HEMA-co-DMC),其他反应条件相同,则只得到了乳白色絮状黏性溶液,从而证明微量的过硫酸铵只起

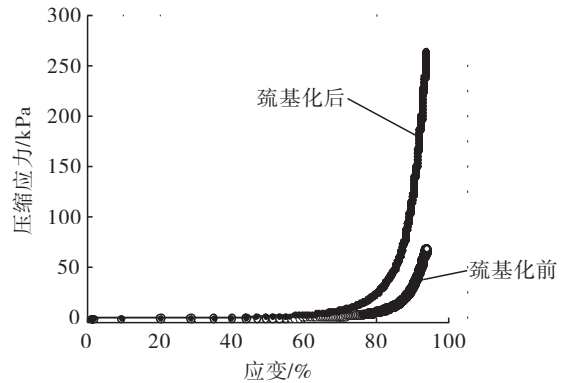


图3 巯基化前后的阳离子共聚物与 Laponite RD 形成的复合水凝胶的压缩应力-应变图

Fig.3 Compression stress-strain diagram of a composite hydrogel formed by cationic copolymer before and after thiolation and Laponite RD

到助引发剂的作用,所得凝胶主要由HS-P(HEMA-co-DMC)链上的巯基和PEGDA的烯基基团之间发生巯基-迈克尔加成,形成均相的透明凝胶.用此方法制备的水凝胶具有一般共价水凝胶的脆性和吸水溶胀性.以质量分数为22%的HS-P(HEMA-co-DMC)形成的水凝胶为例,凝胶干燥后浸泡在水中仍具有较好的吸水性,吸水后凝胶重量约为干凝胶的5倍.

图4为HS-P(HEMA-co-DMC)/PEGDA复

合水凝胶的模量和损耗因子随应变变化曲线图. 由图 4a) 可以看出, 体系中 $G' > G''$, 即采用巯基 - 迈克尔合成法形成了稳定的 HS-P (HEMA-co-DMC)/PEGDA 复合水凝胶, 其储能模量为 1484 Pa. 由图 4b) 可以看出, HS-P (HEMA-co-DMC)/PEGDA 复合水凝胶的损耗因子为 0.013, 具有更好的弹性行为. 这是由于巯基 - 迈克尔法制备的水凝胶为共价交联, 对水凝胶的弹性行为贡献更大.

2.5 复合水凝胶的微观结构分析

图 5 为不同方法制备的复合水凝胶的 SEM 图. 由图 5a) 可以看出, 巯基 - 迈克尔加成法制备的水凝胶为多孔的三维网状结构, 孔径大小

约几十 μm , 但孔径分布不均匀, 孔壁为厚重的橡胶状物质, 说明分子链较为柔软. 与之相比, HS-P (HEMA-co-DMC)/Laponite RD 复合水凝胶的微观结构, 孔径小, 多为几 μm , 壁薄且为坚韧的层状结构, 这与 Laponite RD 的片层纳米颗粒在凝胶形成中的主导作用表现一致.

3 结论

本文经自由基聚合和巯基转化法两步合成了侧基含有巯基、羟基和铵根阳离子的共聚物 HS-P (HEMA-co-DMC). 这种聚合物与无机纳米粒子 Laponite RD 在二硫键/离子键协同作用下形成具有一定机械强度的自支撑复合水凝胶,

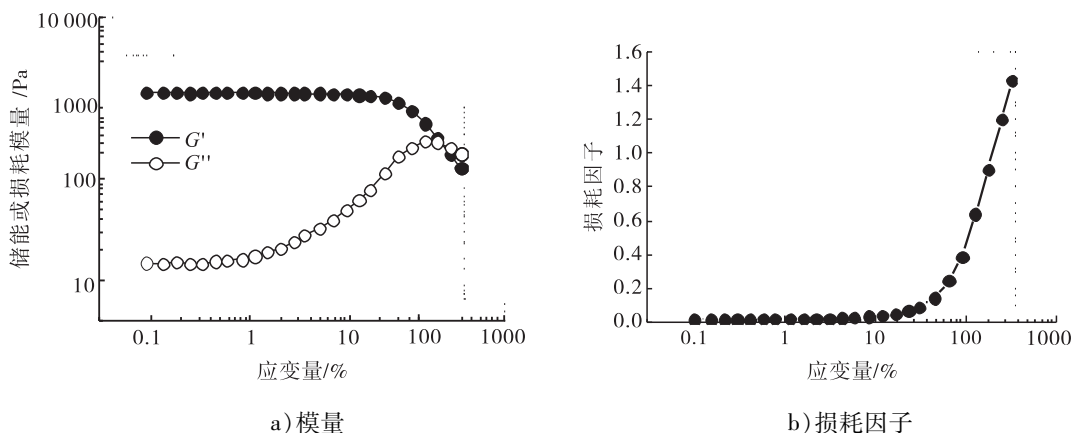


图 4 HS-P (HEMA-co-DMC)/PEGDA 复合水凝胶的模量和损耗因子随应变变化曲线图

Fig. 4 The modulus-strain and the loss factor-strain of the composite hydrogel formed by HS-P (HEMA-co-DMC) and PEGDA

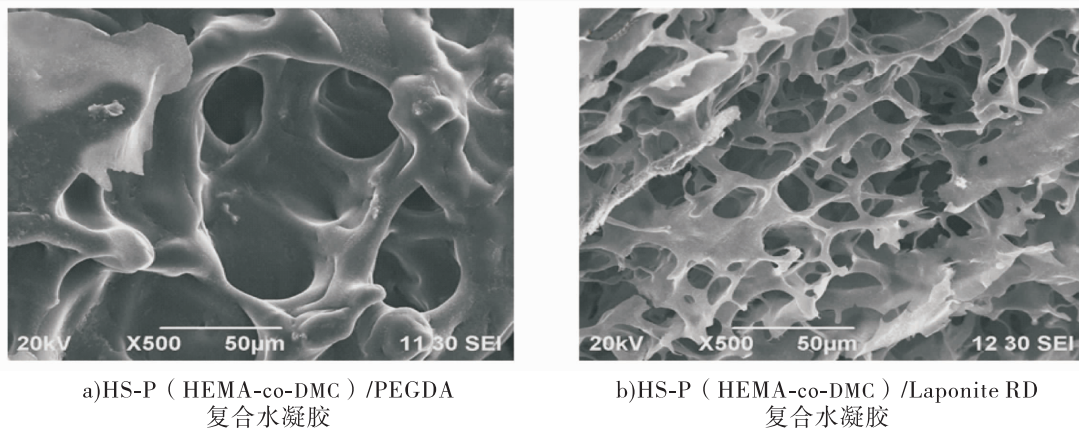


图 5 不同方法制备的复合水凝胶的 SEM 图

Fig. 5 SEM of hydrogel formed with different preparation methods

固体物质质量分数为 22% 的凝胶储能模量达 3468 Pa, 表现出明显的含物理交联点的凝胶黏弹性行为. HS-P(HEMA-co-DMC) 与 PEGDA 经巯基-迈克尔加成法合成共价键交联的水凝胶, 固体物质质量分数相同时其储能模量为 1484 Pa, 为典型的共价交联凝胶的黏弹性行为. 两类凝胶化反应都是在只改变体系 pH 值时就可以发生, 凝胶的微观结构疏松多孔, 有望应用于生物软组织修复及医疗整形等领域. 凝胶的机械性能的调节性和生物相容性有待进一步研究.

参考文献:

- [1] WICHTERLE O, LIM D. Hydrophilic gels for biological use [J]. *Nature*, 1960, 185 (4706): 117.
- [2] CALÓ E, KHUTORYANSKIY V V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products [J]. *European Polymer Journal*, 2015, 65: 252.
- [3] ZHANG Y Y, LI Y M, LIU W G. Dipole-dipole and H-bonding interactions significantly enhance the multifaceted mechanical properties of thermoresponsive shape memory hydrogels [J]. *Advanced Functional Materials*, 2015, 25 (3): 471.
- [4] APPEL E A, FORSTER R A, ROWLAND M J, et al. The control of cargo release from physically crosslinked hydrogels by crosslink dynamics [J]. *Biomaterials*, 2014, 35 (37): 9897.
- [5] LIN C C. Recent advances in crosslinking chemistry of biomimetic poly (ethylene glycol) hydrogels [J]. *Rsc Advances*, 2015, 5 (50): 39844.
- [6] NAIR D P, PODGORSKI M, CHATANI S, et al. The Thiol-Michael addition click reaction: A powerful and widely used tool in materials chemistry [J]. *ChemInform*, 2014, 45 (10): 724.
- [7] LEE B H, WEST B, MCLEMORE R, et al. In-situ injectable physically and chemically gelling NIPAAm-based copolymer system for embolization [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7 (6): 2059.
- [8] KOFOD H. 2-Furfuryl mercaptan [J]. *Organic Syntheses*, 1963 (4): 491.
- [9] O'SHEA T M, AIMETTI A A, KIM E, et al. Synthesis and characterization of a library of in-situ curing, nonswelling ethoxylated polyol thiol-ene hydrogels for tailorable macromolecule delivery [J]. *Advanced Materials*, 2015, 27 (1): 65.
- [10] LIU S, RUSSELL D H, ZINNEL N F, et al. Guest packing motifs within a supra-molecular nano-capsule and a covalent analogue [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135 (11): 4314.
- [11] CHOUGNET A, AUDIBERT A, MOAN M. Linear and non-linear rheological behaviour of cement and silica suspensions—Effect of polymer addition [J]. *Rheologica Acta*, 2007, 46 (6): 793.



引用格式:樊凯奇,贾彩敬,赵帅,等.高弹性双网络水凝胶的制备及其性能研究[J].轻工学报,2017,32(6):35-42.

中图分类号:O645 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.005

文章编号:2096-1553(2017)06-0035-08

高弹性双网络水凝胶的制备及其性能研究

Study on preparation and properties of highly elastic dual-network hydrogels

樊凯奇¹,贾彩敬¹,赵帅¹,岳凡¹,韩光鲁¹,王利霞¹,尹志刚¹,
宋健²

FAN Kai-qi¹, JIA Cai-jing¹, ZHAO Shuai¹, YUE Fan¹, HAN Guang-lu¹,
WANG Li-xia¹, YIN Zhi-gang¹, SONG Jian²

1. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001;

2. 天津大学 化工学院,天津 300072

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

2. School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

关键词:

双网络水凝胶;氧化/
还原引发;丙烯酸;高
弹性凝胶

Key words:

dual-network
hydrogels; oxidation/
reduction initiation;
acrylic acid;
high elasticity gel

摘要:以丙烯酸和琼脂为主要原料、 Fe^{2+} /过硫酸铵为氧化/还原引发体系,制备具有高弹性的双网络水凝胶.通过研究丙烯酸和 Fe^{2+} 含量对水凝胶性能的影响,得出适宜的工艺条件为琼脂溶液质量浓度1%,丙烯酸质量分数30%,过硫酸铵质量分数1.5%, $\text{N,N}'$ -亚甲基双丙烯酰胺质量分数0.3%,硫酸亚铁质量分数0.050%.对该条件下制备的水凝胶的力学性能进行分析测试发现,水凝胶的断裂拉伸率可达225%,抗压能力可达4 MPa,具有良好的拉伸和压缩性能.利用SEM,IR对该水凝胶进行微观形貌分析和结构表征发现,水凝胶的微观形貌具有纤维网络结构,纤维直径约为100 nm,琼脂与聚丙烯酸之间存在分子间氢键作用, Fe^{3+} 与聚丙烯酸分子中的羧酸基因发生了金属络合作用.

收稿日期:2017-09-13

基金项目:国家自然科学基金项目(21276188,21606211);河南省科技攻关项目(152102210358);河南省高等学校重点科研项目(16A530010);郑州轻工业学院科研基金项目(2015XJJZ032);郑州轻工业学院博士基金项目(2014BSJJ061)

作者简介:樊凯奇(1985—),男,山西省运城市人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为复合型软材料.

Abstract: Dual-network hydrogels with high elasticity were prepared by oxidation/reduction (Fe^{2+} /ammonium persulfate) initiation system using acrylic acid and agar as the main raw materials. The optimum conditions were obtained as follows: agar mass concentration was 1%, masacrylic acid concentration was 30% (mass fraction), ammonium persulfate concentration was 1.5% (mass fraction), N,N'-Methylenebisacrylamide concentration was 0.3% (mass fraction), and ferrous sulfate concentration was 0.050% (mass fraction). Through the analysis of the mechanical properties of the gel, it was found that the tensile elongation of the gel was 225% and the compressive capacity was 4 MPa, exhibiting good stretch and compression performance. The microstructure of the hydrogel were analyzed by IR using SEM. The results showed that the hydrogel has a fiber network structure with a fiber diameter of about 100 nm, there was intermolecular hydrogen bonding between agar and polyacrylic acid and the metal complexation between Fe^{3+} and polyacrylic acid molecules.

0 引言

水凝胶是一种交联的具有三维网络结构的聚集体,其交联形式可以是物理交联,也可以是化学交联.这种聚集体能够以多种形式存在,如纤维状、微粒状、纳米粒子状、薄膜等.基于此特性,水凝胶被广泛应用于组织工程、再生医学、食品、化妆品、医药、环保等领域^[1-4],目前其商业化的产品有隐形眼镜、医用关节软骨和水凝胶面膜等^[5-7].

水凝胶的实际应用对水凝胶的力学性能提出很高的要求.例如,当制备隐形眼镜和面膜时,水凝胶至少要具有可维持其物理形貌的力学性能;当用于人工肌肉和骨骼修复时,要求水凝胶必须具有一定的机械强度,可承受较大的形变.然而,传统共价交联水凝胶的力学性能较差.为了解决这一问题,科学家致力于研发具有高弹性、高机械性能的双网络水凝胶. J. P. Gong^[8]最早成功制备出了这种双网络水凝胶,与单一网络的水凝胶相比,双网络水凝胶材料具有良好的拉伸性能和更高的机械强度.通常情况下,双网络水凝胶的制备过程是将一种具有紧密交联网络的水凝胶浸泡到第二种单体溶液里面,然后将第二种单体在第一种网络中交联形成一种相对松散的网络,进而形成双网络结构.第一种高度交联的网络给水凝胶提供了比较高的力学强度,而相对疏松的第二网络在

较大应变下能有效地使应力均匀分布而不是集中在某一处.理论研究表明^[9-10],双网络水凝胶之所以具有高力学强度是因为其变形时会发生一些特定的局部屈服和强化,当第一种网络被损坏形成很多裂纹时,第二种网络将会分散能量,保护整个体系不被破坏.

目前,通常利用热引发聚合来制备双网络水凝胶,但该方法需无氧高温条件,且制备时间较长(≥ 6 h),不利于工业化生产.鉴于此,本文拟采用氧化还原引发体系快速制备一种高弹性、高强度双网络水凝胶,通过研究影响水凝胶力学性能的因素,验证该方法的可行性,为新型高强度水凝胶的制备和应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:丙烯酸、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、硫酸亚铁,均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司产;琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司产.

主要仪器:KQ-50B型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产;AL204型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司产;SZCL-4B型智能磁力加热搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司产;CMT0104微机控制电子万能试验机,深圳市新三思计量技术有限公司产.

1.2 高弹性双网络水凝胶的制备

1.2.1 琼脂溶液的制备 称取 0.5 g 琼脂粉

置于 100 mL 烧杯中,然后加入 50 g 去离子水,在 90 °C 油浴中磁力搅拌使之完全溶解,然后将其置于 65 °C 恒温环境下保存。

1.2.2 双网络水凝胶制备 称取 2.0 g 琼脂溶液,加入一定量的 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、硫酸亚铁和丙烯酸,超声溶解得溶液 A;称取 0.5 g 去离子水,加入一定量的过硫酸铵,超声溶解得溶液 B. 将溶液 A 与溶液 B 快速混合、振荡,静置一段时间后得到高弹性双网络水凝胶。

1.3 测试方法

1.3.1 拉伸性能测试 用于拉伸测试的水凝胶先由厚度为 2 mm 的磨具制备成膜状凝胶,然后再用裁刀将其切割成哑铃状,拉伸速率设置为 20 mm/min,拉伸夹具间距离为 30 mm,宽度为 9 mm. 试样的拉伸应力 σ (载荷) 和应变 ε (拉伸率) 的计算方法如下:

$$\sigma = F/A \quad (1)$$

式中, F 为拉力/kN, A 为横截面积/mm².

$$\varepsilon = \Delta L/L \quad (2)$$

式中, ΔL 为试样的形变量/mm, L 为试样的初始长度/mm.

1.3.2 压缩性能测试 用于压缩测试的水凝胶是在直径 25 mm,高度 14 mm 的磨具中制得的,试样形状为圆柱形. 压缩速率设置为 5 mm/min,压缩夹具之间的距离为 (14 ± 0.5) mm. 测试开始之前把试样放在压缩夹具的正中心,调整上夹具使得上夹具与试样的上表面恰好接触,然后开始进行测试. 压缩应力 σ' 和应变 ε' 的计算方法如下:

$$\sigma' = F'/A' \quad (3)$$

式中, F' 为压力/kN, A' 为横截面积/mm².

$$\varepsilon' = \Delta h/h \quad (4)$$

式中, Δh 为试样的形变量/mm, h 为试样的初始高度/mm.

1.3.3 SEM 测试 首先把制备好的水凝胶样品放入液氮中脆冷,然后把冷冻好的水凝胶放

置在真空冷冻干燥机中,在 -50 °C 条件下真空干燥 24 h,再将样品切成薄片后固定在铜块上,使用 10 kV 扫描电镜进行观察。

1.3.4 IR 测试 取少量制备好的水凝胶碾碎成粉末状,放置在 35 °C 的真空干燥箱中 12 h,使得水凝胶中的水分充分干燥. 在充分烘干的凝胶粉末中加入 KBr 使两者混合均匀,最后将混合物压缩成片材进行测试,测试波长范围为 4000 ~ 400 cm⁻¹.

2 结果与讨论

2.1 双网络水凝胶形成过程分析

双网络水凝胶的形成示意图如图 1 所示. 由图 1 可以看出,首先,含有丙烯酸单体的热溶液在 Fe²⁺ 和过硫酸铵的作用下形成聚丙烯酸,聚丙烯酸中的羧基与氧化反应生成的 Fe³⁺ 形成络合物,构筑第一种网络;随后将体系降温,使琼脂溶液形成凝胶,构筑第二种网络,至此两种互穿网络便形成了双网络水凝胶. 另外,随着 Fe²⁺ 加入量的不断增加,双网络水凝胶的形成速度明显加快,当 Fe²⁺ 的加入量为 1% (如无特指,文中百分数均指质量分数) 时,形成水凝胶仅需 50 s,而通过传统热引发作用形成水凝胶则需数小时. 这是由于氧化/还原引发体系可以在室温条件下、在很短时间内释放出大量的自由基,进而快速引发单体进行聚合,极大地提高水凝胶的形成速度。

2.2 丙烯酸含量对水凝胶性能的影响

丙烯酸是制备高弹性水凝胶的主要单体,在 Fe²⁺/APS 体系的引发下,丙烯酸与交联剂 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺形成具有支链的聚丙烯酸网络,从而形成双网络凝胶中的其中一个网络,因此丙烯酸含量对水凝胶的性能影响很大. 为了了解丙烯酸含量对水凝胶性能的影响,设计如下实验(见表 1),其中只改变丙烯酸的量,而其他反应物的量为定值。

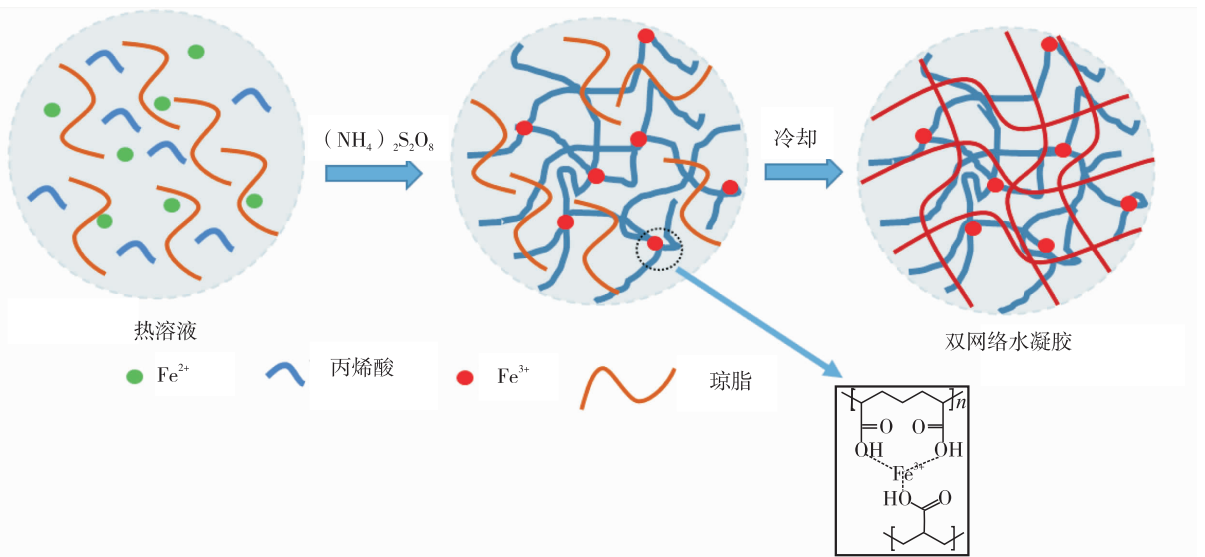


图1 双网络水凝胶的形成示意图

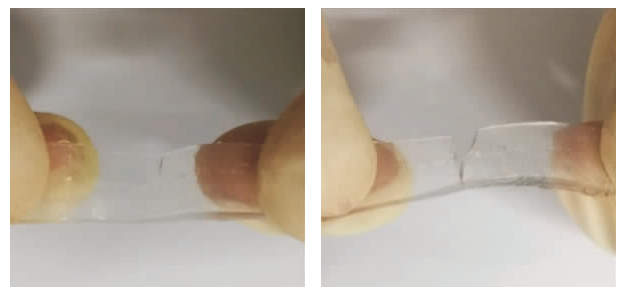
Fig. 1 Scheme of the dual-network structure of the hydrogel

表1 丙烯酸含量对双网络水凝胶性能的影响

Table 1 Effect of acrylic acid content on the property of dual-network hydrogel

序号	1% 琼脂/g	丙烯酸 /%	过硫酸铵 /%	N,N'-亚甲基 双丙烯酸酰胺/%	硫酸亚铁 /%	拉伸率 /%	压缩率 /%
1	2	10	1.5	0.3	0.05	50	50
2	2	20	1.5	0.3	0.05	100	74
3	2	30	1.5	0.3	0.05	214	86
4	2	40	1.5	0.3	0.05	210	85

测试单一琼脂凝胶的力学性能发现,凝胶的强度非常弱,且几乎没有拉伸性能(见图2);向体系加入丙烯酸后,水凝胶的拉伸性能显著增强,且该性能的优劣明显与丙烯酸的含量相关:当丙烯酸的含量逐渐增加时,双网络水凝胶的拉伸性和压缩性都能明显提高;当丙烯酸的含量为30%时,拉伸率、压缩率达最大;当丙烯酸含量高于30%时,水凝胶的黏性变大但拉伸性和压缩性均有所降低.这可能是由于随着丙烯酸含量的增加,聚丙烯酸分子链间作用力增强,导致体系黏度增加,当水凝胶受到外力拉伸或压缩时,体系中存在的双网络相互缠结,此时水凝胶仍然有较高的拉伸率和压缩率.因此选择丙烯酸含量为30%来制备高弹性双网络水凝胶.



a) 拉伸之前的琼脂凝胶 b) 拉伸之后的琼脂凝胶

图2 琼脂凝胶拉伸前后的示意图

Fig. 2 The agar gel before and after stretching






2.3 Fe²⁺含量对水凝胶性能的影响

Fe²⁺可以降低过硫酸铵产生自由基的活化能,使得过硫酸铵在室温条件下快速释放出大量自由基,引发丙烯酸单体聚合,从而使体系迅速形成水凝胶.而氧化/还原引发体系中由

Fe^{2+} 转化而成的 Fe^{3+} 则会与聚丙烯酸中的羧基发生金属络合作用,进而形成水凝胶的动态交联点,这有助于增强凝胶的拉伸性能和抗压性能.因此,硫酸亚铁的含量对水凝胶的性质会产生显著影响.为了了解 Fe^{2+} 对水凝胶性能的影响,仅改变硫酸亚铁的含量,保持其他原料的量不变进行测试,测试数据见表 2.

表 2 Fe^{2+} (即硫酸亚铁)含量对双网络水凝胶性能的影响

Table 2 Effect of ferrous sulfate content on the property of dual-network hydrogel

序号	硫酸亚铁含量/%	反应时间/s	拉伸率/%	压缩率/%	凝胶照片
1	0.025	378	208	81	
2	0.050	280	214	86	
3	0.100	103	100	85	
4	0.500	80	60	73	
5	1.000	50	33	59	

注:所有双网络水凝胶样品中都包括 1% 琼脂 2 g, 丙烯酸 30%, 过硫酸铵 1.5%, N,N'-亚甲基双丙烯酰胺 0.3%

从表 2 可以看出,反应体系中逐渐增加硫酸亚铁的量可以使水凝胶的形成速度不断加快,当硫酸亚铁的含量为 0.500% 时,可以在 80 s 内形成水凝胶.另外,随着硫酸亚铁含量的增加,制备的水凝胶的强度也逐渐增大,但同时水凝胶的颜色逐渐加深.这是由于氧化还原引发体系($\text{Fe}^{2+}/\text{APS}$)的产物 Fe^{3+} ,能够通过金属离子空轨道与羧酸基团中的氧原子发生金属络合作用,形成凝胶网络交联点^[11-12].随着硫酸亚铁含量的增加,金属络合作用的交联程度也逐渐增强,水凝胶的强度也随之增大.当硫酸亚

铁的加入量为 0.050% 时,水凝胶具有最大的拉伸率和压缩率,其拉伸率为 214%,压缩率为 86%.但随着硫酸亚铁加入量的不断增加,水凝胶的力学性能逐渐下降,当硫酸亚铁的加入量为 1.000% 时,拉伸率仅为 33%,压缩率为 59%,这是由于高浓度的硫酸亚铁会导致过硫酸铵在瞬间产生大量的自由基,而高浓度自由基会引发丙烯酸单体快速共聚,致使聚丙烯酸的分子链变短,而较短的聚丙烯酸分子链之间没有足够的缠结力,从而导致水凝胶的力学性能下降^[12].因此,选择硫酸亚铁的含量为 0.050%.

2.4 双网络水凝胶的压缩性能和拉伸性能

为了进一步了解上述双网络水凝胶的压缩性能和拉伸性能,选取适宜的水凝胶制备条件:琼脂溶液质量浓度 1%,丙烯酸含量 30%,过硫酸铵含量 1.5%,N,N'-亚甲基双丙烯酰胺含量 0.3%,硫酸亚铁含量 0.050%,通过特定的模具来制备水凝胶,进而进行压缩实验和拉伸实验,如图 3 所示.由图 3 可以看出,压缩前水凝胶的高度接近 2 cm,水凝胶可被压缩到 1 cm 左右,压缩量接近 50%,且水凝胶表面无明显裂纹,因此该水凝胶具有良好的压缩性能.由图 3c) 可以看出,拉伸前水凝胶的长度约为 3.5 cm;拉伸之后水凝胶长度约为 11 cm,拉伸率为 214%,并且水凝胶在去掉拉力后可以迅速恢复到初始长度和形状.

图 4 是双网络水凝胶的拉伸曲线和压缩曲线.由图 4 可以看出,采用本文方法制备的双网络水凝胶具有良好的抗拉强度和拉伸性,抗拉强度能达到 0.8 MPa,断裂拉伸率可以达到 225%,抗压强度可以达到 4 MPa.

2.5 双网络水凝胶的 SEM 分析

图 5 为双网络水凝胶的 SEM 图.由图 5a) — b) 可以观察到水凝胶的微观结构呈层状分布,凝胶层的厚度大约为 100 nm.由图 5c) — d) 可以观察到水凝胶中的微观纤维网络,其纤维直

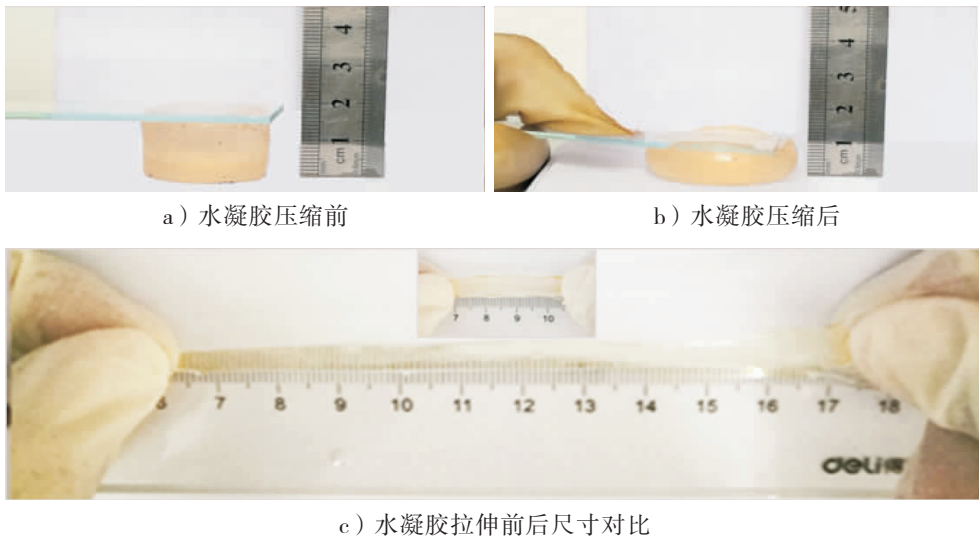


图3 双网络水凝胶的压缩性能和拉伸性能

Fig. 3 Compressive properties and tensile properties of dual-network hydrogels

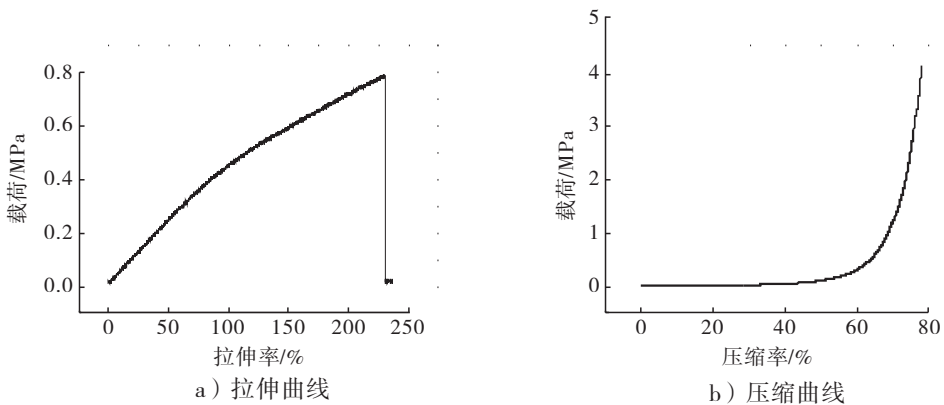


图4 双网络水凝胶的拉伸曲线和压缩曲线

Fig. 4 The tensile curve and compression curve of dual-network hydrogel

径大约为 100 nm. 由图 5 可以看出,随着硫酸亚铁加入量的增多,双网络水凝胶中的微观纤维网络结构明显增多,这些纤维结构可以极大地增强水凝胶的力学性能^[13-14].

2.6 双网络水凝胶的 IR 分析

采用 IR 对双网络水凝胶、单一琼脂水凝胶和聚丙烯酸水凝胶进行表征,结果如图 6 所示. 由图 6 可以看出,琼脂水凝胶中—OH 的伸缩振动峰位于 3602 cm⁻¹处,然而在双网络水凝胶中,琼脂的—OH 振动峰移动到 3620 cm⁻¹处,这可能是由于聚丙烯酸的—COOH 与琼脂的—OH 发生了分子间氢键作用. 相比聚丙烯

酸水凝胶,具有金属络合作用的双网络水凝胶在 1459 cm⁻¹的 N—H 键弯曲振动吸收峰和 1701 cm⁻¹处的 C=O 键弯曲振动吸收峰有明显的偏移,这说明 Fe³⁺ 与聚丙烯酸分子中的—COOH 发生了金属络合作用.

3 结论

本文采用氧化/还原(Fe²⁺/过硫酸铵)引发体系制备了双网络水凝胶材料,通过考察丙烯酸和 Fe²⁺ 含量对水凝胶性能的影响,得出适宜的工艺条件为琼脂溶液浓度 1%,丙烯酸含量 30%,过硫酸铵含量 1.5%,N,N'-亚甲基双

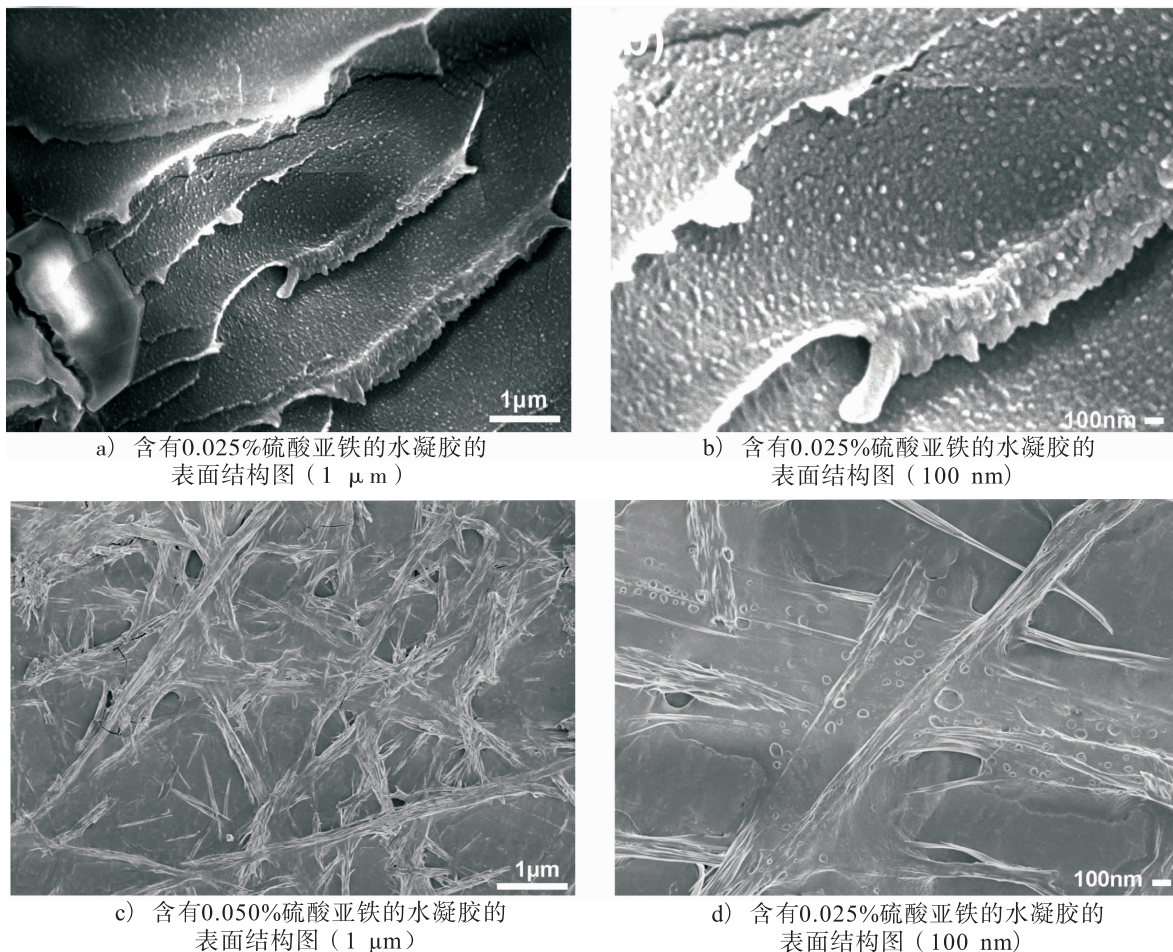


图5 双网络水凝胶的 SEM 图

Fig. 5 SEM of dual-network hydrogels

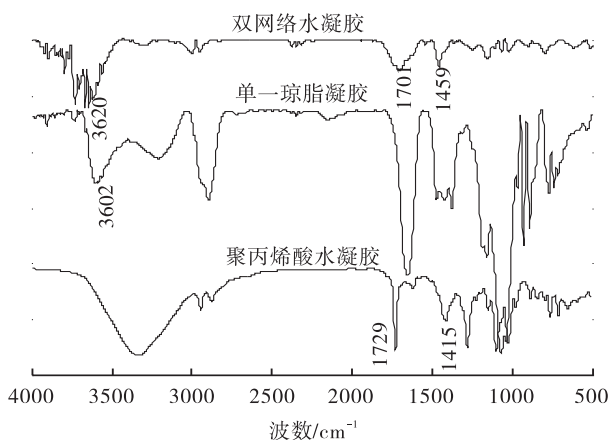


图6 水凝胶、单一琼脂凝胶和聚丙烯酸水凝胶的 IR 图

Fig. 6 IR spectra of hydrogels, agar gel and polyacrylic acid hydrogel

丙烯酰胺含量 0.3%, 硫酸亚铁含量 0.050%。对该工艺条件下制备的水凝胶进行力学性能测试, 结果表明, 其断裂拉伸率可达 225%, 抗压能力可达 4 MPa。利用 SEM 和 IR 对该水凝胶的微观形貌和结构进行分析、表征, 发现: 水凝胶的微观形貌具有纤维网络结构, 纤维直径约为 100 nm; 水凝胶中琼脂分子与聚丙烯酸分子之间存在氢键作用, Fe^{3+} 与聚丙烯酸分子中的羧基因发生了金属络合作用。用本文方法所制备的双网络水凝胶具有高弹性和高强度, 克服了传统热引发聚合所需时间长、高温无氧等缺点, 为开发新型的高弹性凝胶材料提供了技术支撑和理论依据。

参考文献:

- [1] TAN R, NIU X, GAN S, et al. Preparation and characterization of an injectable composite [J]. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, 20(6):1245.
- [2] YOSHIDA K, SEKINE T, MATSUZAKI F. Stability of vitamin A in oil-in-water-in-oil-type multiple emulsions [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1999, 76(2):1.
- [3] DENG J, LUO Y, ZHANG L M. PEGylated poly-amidoamine dendron-assisted encapsulation of plasmid DNA into in situ forming supramolecular hydrogels [J]. *Soft Matter*, 2011, 7(13):5944.
- [4] SLAUGHTER B V, KHURSHID S S, FISHDER O Z. Hydrogels in regenerative medicine [J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(32/33):3307.
- [5] 彭志明, 陈晓明. 水凝胶作为软质隐形眼镜材料的应用 [J]. *武汉工程大学学报*, 2009, 31(7):76.
- [6] 张小铿, 陈乾华, 梁国康, 等. 利用响应面分析法优化聚乙烯醇水凝胶面膜配方 [J]. *广东化工*, 2016, 43(22):24.
- [7] 蔡宏, 娄思权, 王志国, 等. 聚乙烯醇水凝胶弹性体复合物修复关节软骨缺损的实验研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(5):337.
- [8] GONG J P. Why are double network hydrogels so tough? [J]. *Soft Matter*, 2010, 6(2):583.
- [9] FUKASAWA M, SAKAI T, CHUNG U I, et al. Synthesis and mechanical properties of a nanocomposite gel consisting of a tetra-PEG/clay network [J]. *Macromolecules*, 2010, 43(9):4370.
- [10] 王雪珍, 汪辉亮. 具有规整结构和高强度的水凝胶研究进展 [J]. *高分子通报*, 2008(3):1.
- [11] YANG M, LIU C, LI Z Y, et al. Temperature-responsive properties of poly (acrylic acid-co-acrylamide) hydrophobic association hydrogels with high mechanical strength [J]. *Macromolecules*, 2010, 43(24):10645.
- [12] REN X Y, YU Z, LIU B J, et al. Highly tough and puncture resistant hydrogels driven by macromolecular microspheres [J]. *RSC Advances*, 2016, 6:8956.
- [13] LIU P, JIANG L, ZHU L, et al. Novel covalently cross-linked attapulgit/poly (acrylic acid-co-acrylamide) hybrid hydrogels by inverse suspension polymerization: synthesis optimization and evaluation as adsorbents for toxic heavy metals [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2014, 53(11):4277.
- [14] ABDURRAHMANOGLU S, CAN V, OKAY O. Design of high-toughness polyacrylamide hydrogels by hydrophobic modification [J]. *Polymer*, 2009, 50(23):5449.



引用格式:王赫,李晶晶,魏宏亮,等.水凝胶在缓/控释肥料中应用的研究进展[J].轻工学报,2017,32(6):43-55.

中图分类号:TQ440 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.006

文章编号:2096-1553(2017)06-0043-13

水凝胶在缓/控释肥料中应用的研究进展

Applied research progress of hydrogels in slow/controlled fertilizer

关键词:

水凝胶;超吸水高分子;保水缓/控释肥料;复合凝胶;原位包埋;天然高分子

王赫,李晶晶,魏宏亮,王刚,楚晖娟,朱靖

WANG He, LI Jing-jing, WEI Hong-liang, WANG Gang, CHU Hui-juan, ZHU Jing

河南工业大学 化学化工与环境学院,河南 郑州 450001

School of Chemistry, Chemical and Environmental Engineering, He'nan University of Technology, Zhengzhou 450001, China

Key words:

hydrogel; superabsorbent polymer;
water retention and slow/controlled release fertilizer;
composite gel;
in situ encapsulation;
natural polymer

摘要:对水凝胶应用于缓/控释肥料的研究进展进行了综述,发现将水凝胶用于缓/控释肥料制备,可以得到性能优异的保水缓/控释肥料,显著提高肥料和水资源的利用率。但保水缓/控释肥料存在成本高、不适宜工业化生产和不能完全实现肥料的释放周期与农作物的养分需求周期相一致等问题。探索肥料释放的机制与规律,通过控制保水缓/控释肥料特别是水凝胶的结构与组成,调控肥料的释放性能,制备出智能保水缓/控释肥料体系,以满足不同环境变化和不同农作物生长的需求,将是未来研究的重点和方向。

收稿日期:2017-07-20

基金项目:河南省科技攻关项目(152102110073);河南工业大学博士基金项目(2016BS024)

作者简介:王赫(1992—),男,河南省平顶山市人,河南工业大学硕士研究生,主要研究方向为肥料缓释材料。

通信作者:魏宏亮(1968—),男,河南省林州市人,河南工业大学教授,主要研究方向为功能高分子材料。

Abstract: The research progresses of hydrogels applied to slow/controlled release fertilizers were reviewed. It was found that water retention and slow/controlled fertilizer with distinguished properties could be obtained by applying hydrogels to slow/controlled fertilizer, resulting in raising utilization rate of fertilizer and water resources at the same time; and the limitations to the wide application of water retention and slow/controlled fertilizer were high cost, unsuitable to industrial production and difficult to realize the complete accord between release circle of fertilizer and demand circle of crops to nutrients. By exploring mechanism and laws of fertilizer release and controlling structure and component of fertilizer, especially structure and component of hydrogels, tuning its release properties, smart retention and slow/controlled fertilizer system could be fabricated. The fertilizer system can satisfy the need of different surroundings and the growth of different crops, which will be the further focus and direction of research.

0 引言

水凝胶是通过化学或物理交联而形成的亲水性聚合物三维网络,在水溶液中能够吸水溶胀,但不会溶解,可吸收和保留相当多的水或生物流体,甚至在一定压力下也较难释放^[1].由于有着这种特殊的性质,水凝胶被广泛应用于许多领域,比如药物控释^[2]、组织工程^[3]、生物传感器^[4]、重金属和染料吸附剂^[5-6]等.其中,能够吸收并保持自身重量几十倍甚至上千倍的水凝胶称为超吸水水凝胶,也称为超吸水树脂,它在农业生产、卫生用品等领域展示了巨大的应用潜力.

肥料是农作物增产增收的保证,在现代农业生产中发挥着重要作用.然而,肥料特别是氮肥的利用率偏低,这一方面增加了农业生产的成本,另一方面也降低了农作物的品质,同时还会造成地下水污染、湖泊富营养化等环境问题.缓/控释肥料因能实现养分持续释放从而具有提高肥料利用率、减少施肥频率等优点,已成为肥料领域的研究热点.

近年来,随着水凝胶,特别是超吸水水凝胶的发展,出现了一类新型肥料,即保水缓/控释肥料,它将水凝胶的吸水性、保水性与缓释性结合在一起,以水促肥,使营养物质更为有效地释放和吸收,可明显提高肥料的利用效率;同时,水凝胶优异的吸水、保水性可以降低灌溉水的

消耗和农作物的死亡率,改善土壤的物理性质.然而,单独使用水凝胶会增加农民的经济负担,而且农作物增产效果并不明显.但将水凝胶与肥料结合使用,可以减少化肥的用量,从而大大降低农业生产成本^[7].由于保水缓/控释肥料的优良性能及巨大的应用前景,科学工作者对其进行了大量研究.本文拟对近年来水凝胶应用于保水缓/控释肥料的研究成果进行归纳总结,对不同原料类型的水凝胶、不同形成原理的水凝胶、以不同方式与肥料结合的水凝胶在缓/控释肥中的应用进行综述,对该领域研究前景进行展望,以期制备性能优异的保水缓/控释肥,进而提高肥料与水资源的利用率提供参考.

1 不同原料类型制备的水凝胶在缓/控释肥料中的应用

制备保水缓/控释肥料中水凝胶的原料类型很多,可以从小分子单体通过聚合反应来制备,可以通过纤维素、淀粉、壳聚糖等天然高分子材料的交联或接枝共聚得到,也可以在水凝胶中加入一些无机物,得到有机/无机复合水凝胶,以降低成本,改善肥料性能.

1.1 合成高分子型

合成高分子型是指通过单体聚合,将小分子聚合为大分子链/网状聚合物,在其小分子聚合过程中,通过引入营养元素来制备缓/控释肥料. N. E. Rabat 等^[8]通过比较分别由丙烯酸、丙

烯酰胺、丙烯酸-丙烯酰胺形成的水凝胶的性能差异,来探究适合农作物生长的合成方案.研究发现,聚丙烯酸水凝胶具有更好的溶胀能力,而聚丙烯酰胺水凝胶溶胀能力较差;在土壤保水能力测试中发现,聚丙烯酰胺水凝胶拥有最优异的保水能力,在15 d和30 d后,仅分别失水30.84% (下文如无特指,百分数均指质量分数)和44.06%. B. L. Ni等^[9]将丙烯酰胺和丙烯酸聚合得到的水凝胶作为外涂层包覆肥料内核,制得的保水缓/控释肥料其吸水率能达到自身重量的70倍.然而,合成的高分子材料往往降解困难,在土壤中累积会成为污染源,而且成本较高,这就促使人们不断探索,开发利用环境友好的可降解水凝胶.

1.2 天然高分子型

天然高分子广泛存在于自然界中,具有价格低廉、可降解、绿色环保等特点,而且天然高分子含有羟基、羧基、氨基等活性基团,便于进行化学修饰或化学交联.通过天然高分子的接枝共聚,可以得到不同性能和结构的水凝胶.壳聚糖^[10-12]、淀粉^[13-15]、纤维素^[16-18]等天然高分子被广泛用于制备保水缓/控释肥料.近年来,研究人员将研究重点放在以小麦秸秆、玉米秸秆等农业废弃物来制备保水缓/控释肥料方面,以进一步降低肥料成本,且有利于农业废弃物的综合利用.

S. Ibrahim等^[19]使用过氧接枝共聚技术,通过从废弃鸡肉中提取明胶,然后接枝聚丙烯酰胺,制备了低成本绿色水凝胶缓/控释肥料.通过条件优化,水凝胶的溶胀率达到800%.肥料释放速率比较平缓,4 h释放率约25%,10 h释放率约40%.而且,接枝后共聚物的热稳定性得到了显著提高. L. H. Xie等^[20]首先以N,N'-二羟甲基脲和磷酸二氢钾为原料制成新型低水溶性氮磷肥料粉末,然后与羧甲基纤维素充分混合,再加上适量尿素得到肥料内核.以小

麦秸秆、丙烯酸、2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-丙磺酸和N-羟甲基丙烯酰胺为原料合成超吸水水凝胶,将其涂覆在肥料内核上得到保水缓/控释肥料,测试发现,在第1 d,3 d和30 d土壤中的氮释放率分别为10.8%,35.5%和68.6%.当交联剂含量为3%时,降解率最大为47.7%. Y. C. Yang等^[21]研究制备了双涂层水凝胶缓/控释肥料,第一层为由液化玉米秸秆、异氰酸酯、二乙烯三胺合成的生物基聚氨酯,第二层为鸡毛蛋白和丙烯酸聚合形成的水凝胶聚合物.土壤保水能力测试发现,土壤的持水量随双涂层缓/控释肥料用量的增加而增加,200 g土壤加入4 g双涂层缓/控释肥料,相比较200 g土壤来说,保水率增加了36.8%;使用10 g双涂层缓/控释肥料时,保水率达到28.1%;添加20 g双涂层缓/控释肥料时,保水率增加至34.5%.周昌^[22]从新疆昌吉地区废弃棉秆中提取木质素,并将其处理为木质素磺酸钠,然后将其与丙烯酸、丙烯酰胺接枝共聚制得水凝胶.该水凝胶吸水量可达到2176 g/g.以其为包膜材料,包裹微晶石蜡处理过的尿素制得保水缓/控释肥料.该肥料在1~4 d内尿素释放率低于20%,4~12 d尿素释放率为60%,12~68 d尿素释放率为80%.

由于天然高分子有诸多优点,人们在天然高分子型保水缓/控释肥料方面进行了较多的研究,但纯天然高分子的性能往往不能满足保水缓/控释肥料的要求,需要与其他单体接枝共聚以改善其性能.如何控制它们的组成以降低成本、改善性能是人们研究的重要方向.

1.3 复合高分子型

复合高分子型是指将无机填料(如高岭土、膨润土、凹凸棒、蒙脱石等)引入到聚合物基体中,从而得到更高强度和刚度的水凝胶.同时利用矿物质本身较大的空间体积和高比表面积等特点,使制备的保水缓/控释肥料的释放速

率能得到较大提升.

A. Bortolin 等^[23]研究了由聚丙烯酰胺、甲基纤维素和蒙脱石制备的保水缓/控释肥料水凝胶. 研究发现, 不含蒙脱石的缓/控释肥料在 24 ~ 48 h 内释放结束, 而含有蒙脱石的缓/控释肥料释放时间则延长到 72 h, 且释放营养量也有所增加. L. H. Xie 等^[24]将磷酸钙和凹凸棒石混合后涂覆在尿素上作为肥料核, 小麦秆/海藻酸钠混合物用作内涂层, 丙烯酸、N-羟甲基丙烯酰胺、小麦秸秆制备的水凝胶作为外涂层来制备缓/控释肥料. 在 1 d, 3 d 和 30 d 内该肥料

中氮的释放率分别为 30.5%, 40.3% 和 98.5%, 磷的释放率分别为 6.3%, 18.7% 和 42.6%, 表现出优异的缓释性能. A. Rashidzadeh 等^[25]通过海藻酸钠、丙烯酸、丙烯酰胺和斜发沸石的自由基聚合制备了一种新型水凝胶缓/控释肥料. 该水凝胶的溶胀度随着体系 pH 值的增加而增加, pH = 10 时得到最大吸水量, 在第 1 d, 3 d 和 30 d, 肥料释放率分别为 13.44%, 16.12% 和 54.23%.

传统水凝胶较高的生产成本和较低的凝胶强度限制了它们的广泛应用, 将无机填料引入

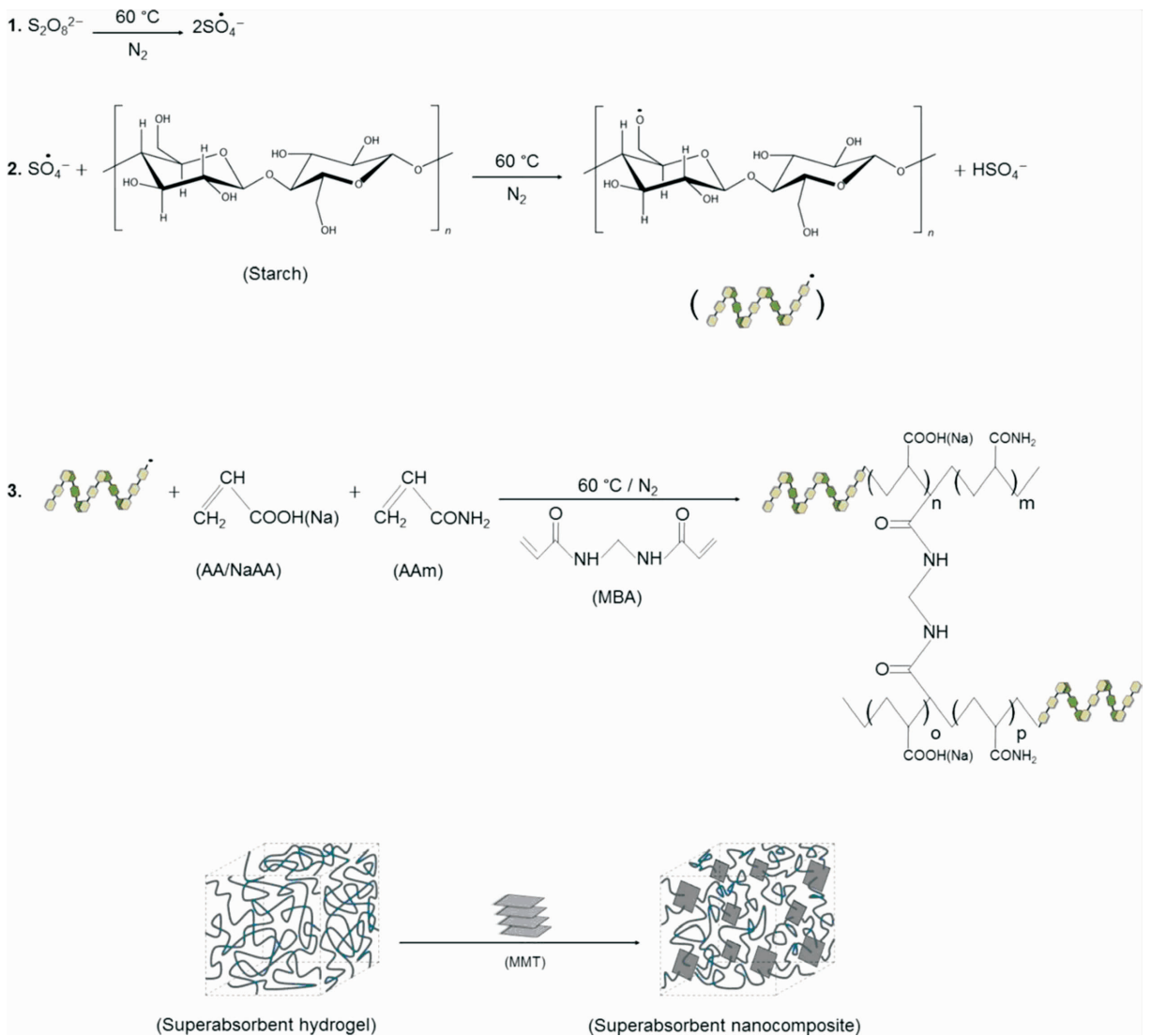


图 1 制备纳米复合水凝胶的接枝共聚机理^[26]

Fig. 1 Graft copolymerization mechanism for synthesis of nanocomposite hydrogel^[26]

聚合物基体,不仅可以降低成本,增加水凝胶的强度和刚度,而且还可以利用矿物质本身较大的空间体积和高比表面积等特点,进一步提升复合材料的释放性能^[26](见图1),使得复合型高分子保水缓/释肥料具有广泛的应用前景。

2 不同形成原理的水凝胶在缓/控释肥料中的应用

水凝胶是保水缓/控释肥料的重要组成部分,其形成原理可分为两大类:物理交联和化学交联。通过物理交联形成的水凝胶机械强度较低,在土壤中使用容易流失,影响肥料的保水与缓释性能,这就限制了物理交联的水凝胶在肥料制备中的应用。而通过化学交联形成的水凝胶有较大的机械强度,在土壤中使用性质比较稳定,因而化学交联形成的水凝胶广泛应用于保水缓/控释肥料的制备。常用的化学交联方法一般有以下4种。

2.1 共价交联型

共价交联是指在小分子交联剂的作用下,使两个或多个分子通过共价键交联为大分子聚合物,常用的交联剂有戊二醛、甲醛、柠檬酸等。

A. M. Senna 等^[27]以醋酸纤维素为原料,用三乙胺催化的乙二胺四乙酸二酐进行酯化交联,制备了可生物降解的水凝胶,然后将该水凝胶浸泡在氮磷钾溶液中,吸附平衡后,得到保水缓/控释肥料。研究发现,该水凝胶在水溶液中的吸水率达到了 $(990 \pm 15)\%$,施用该保水缓/控释肥料的植物,其平均高度生长和平均直径生长均大于不施加保水缓/控释肥料的植物。S. K. Bajpai 等^[28]制备了环氧氯丙烷交联的纤维素水凝胶,并研究其对尿素的控释性能,结果表明,随着交联剂含量增加,水凝胶溶胀度减小,尿素释放速率减小。S. Mohammadi-Khoo 等^[29]以溴乙酰化纤维素为原料,以尿素作交联剂,制备了基于纤维素的水凝胶,然后通过溶胀吸附法制备了载有尿素的保水/缓控释肥料,并研究了其在土壤中的保水性及对尿素的

控释性能:15 d内,0.5%、1%和2%的样品保水率分别为16.85%、19.98%和32.75%;21 d内,0.5%、1%和2%的样品仍含有1.85%、15.47%和22.39%的水。在1 d、3 d、6 d、10 d和21 d后,尿素的累积释放率分别为22.9%、49.5%、75.6%、91.3%和95.71%。

通过交联剂的作用,将原料分子以共价键的形式交联起来,得到三维的网络结构,制备的水凝胶机械强度往往较高,但有些交联剂具有较大毒性,其使用会对环境造成一定的影响。

2.2 离子交联型

离子交联一般是指含有羧基的高分子,通过与金属离子(Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{3+} 等)形成金属键产生交联形成水凝胶。

姜安龙等^[30]以尿素为肥料,将其与海藻酸钠溶液混合后滴入氯化钙溶液中,制得海藻酸钠包裹的凝胶尿素小球。研究发现,相比于尿素颗粒,该实验制备的缓释肥料其尿素释放速率降低了约300倍。D. W. Davidson 等^[31]将羧甲基纤维素水溶液和肥料混合,并使用铁盐和钙盐进行交联得到水凝胶保水缓/控释肥料。研究发现,50 d后,施用该保水缓/控释肥料的植物的高度明显高于未施肥的植物,且产量是未施肥植物的2倍。S. P. Jin 等^[32]首先利用尿素、磷酸和氧化铁合成了一种不溶于水的肥料,随后将其与羧甲基壳聚糖混合后加入氯化钙溶液中,通过离子交联形成肥料颗粒,最后,将羧甲基壳聚糖肥料颗粒放入部分中和的丙烯酸、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺和活性炭混合液中,加入环己烷和Span-80,搅拌升温,制备出具有水凝胶包膜的保水缓/控释肥料。研究发现,该保水缓/控释肥料在第2 d、第5 d和第31 d磷酸盐的释放率分别为9%、14%和40%。Y. Zhang 等^[33]以桑树枝为原料,经预处理后与丙烯酸、丙烯酰胺自由基接枝共聚制备出超吸水水凝胶,然后将该水凝胶与尿素、海藻酸钠混合搅拌,滴加到氯化钙溶液中,制备出尿素保水缓/控

释肥料(见图2)。研究表明,10 d后,不含保水缓/控释肥料的土壤的保水率约为2.0%,而对于每100 g土壤施加0.1 g,0.3 g和0.5 g保水缓/控释肥料的样品,保水率在10 d后分别为22.4%,67.1%和79.0%,在15 d后分别为0.3%,40.5%和59.7%。25 d后,每100 g土壤中施加0.5 g保水缓/控释肥料的样品的保水率仍为7.2%。

离子交联型水凝胶形成速度较快,而且这种交联是可逆的,在一定条件下凝胶能够重新变成溶液。通过离子交联可以制备出具有良好保水缓释性能的肥料,人们之所以对该方法格外关注,一方面是由于其具有反应速度快和反应可逆的特点,另一方面是由于交联剂所含有的金属离子往往也是农作物生长所需的营养元素。

2.3 辐射交联型

辐射交联是指共价键吸收高能辐射线产生活性中心,并以此引发单体聚合形成交联的过程。

N. A. Maziad 等^[34]使用 γ -辐射技术合成羧甲基纤维素/聚丙烯酰胺/二氧化硅的水凝胶,并通过溶胀吸附硝酸钾制备出保水缓/控释肥料。研究发现,溶胀比随着水凝胶中羧甲基纤维素含量的增加而增加,而二氧化硅的加入也极大地影响了水凝胶的溶胀比,其中含有5%的二氧化硅水凝胶具有最好的溶胀能力。P. Wen 等^[35]将含有尿素、部分中和的丙烯酸、膨润土、交联剂、引发剂的溶液与含有棉茎粉末、聚乙烯吡咯烷酮的溶液混合后加入微波反应器中,通过微波辐射引发聚合,制备了半互穿网络保水缓/控释肥料(见图3)。研究发现,在1 d,3 d和30 d内该肥料中尿素释放率分别为11.8%,26.9%和60.8%的肥料,这表明该肥料具有优异的缓释性能。不含保水缓/控释肥料的土壤在12 d后失去所有吸收的水,而当施用2.0 g保水缓/控释肥料时,失水时间延长至27 d。

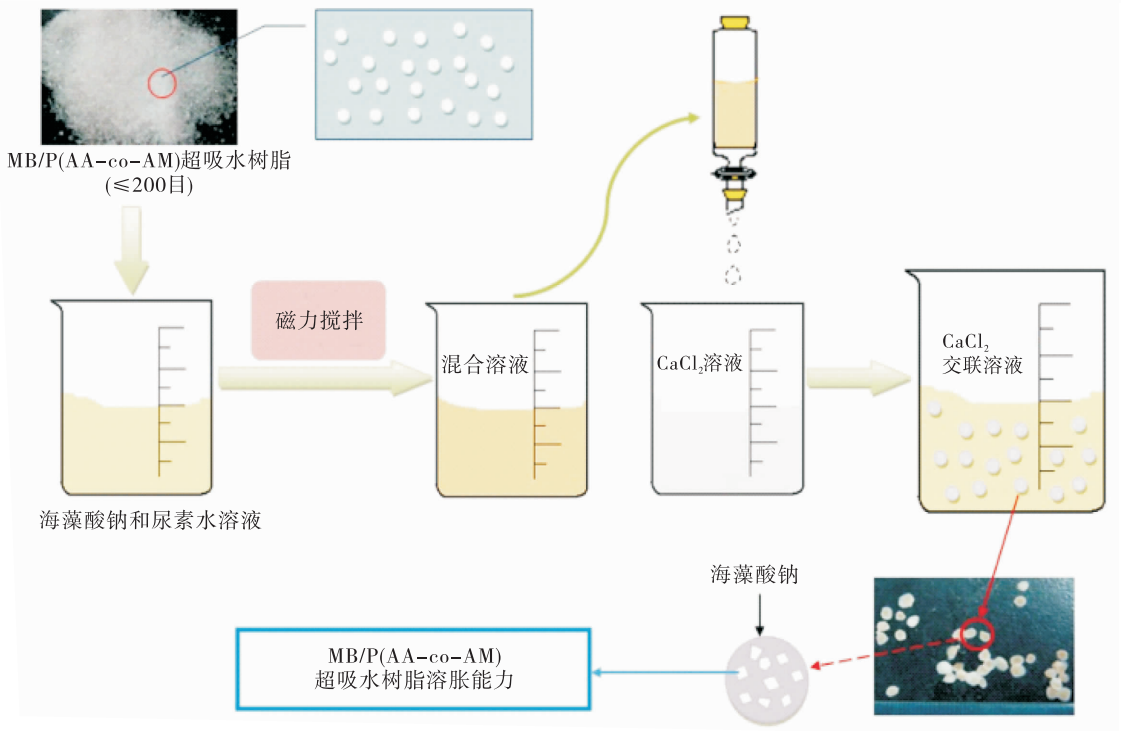
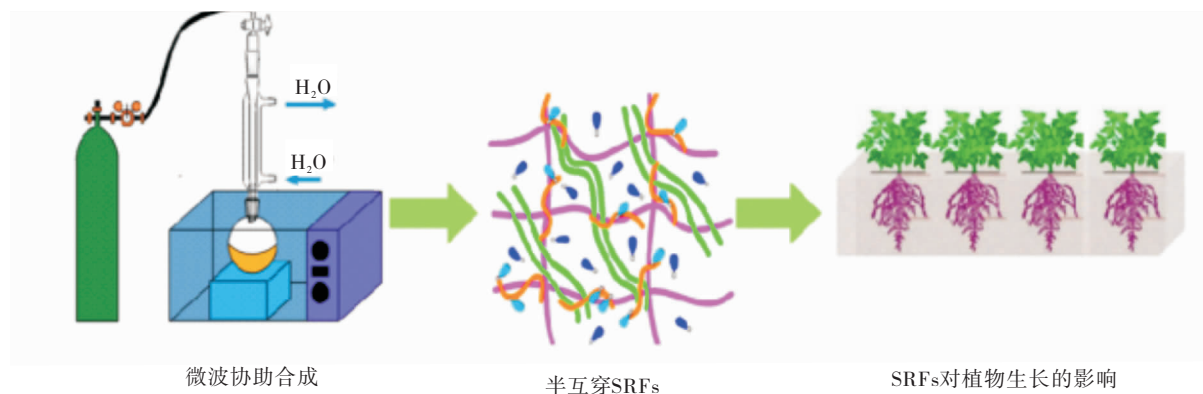


图2 以桑树枝为为原料制备尿素保水缓/控释肥料的过程^[33]

Fig.2 Preparation process of the water retention and slow/control urea fertilizer based on mulberry branches^[33]

图3 微波辐射合成半互穿网络水凝胶过程^[35]Fig. 3 Preparation of semi-IPN hydrogel by microwave radiation^[35]

辐射交联可在低温条件下进行,具有反应不受温度影响、制得的产品较纯净等优点,作为一种绿色的凝胶合成方法而受到广泛关注。

2.4 自由基聚合交联型

自由基聚合交联是指在引发剂作用下,以自由基为活性中心引发单体聚合形成交联。

X. D. Li 等^[36]以过硫酸铵、硝酸铈铵为引发剂, N, N - 亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 小麦秸秆纤维素、部分中和的丙烯酸、聚乙烯醇、尿素、磷酸二氢钾为原料, 通过溶液自由基聚合制得具有半互穿网络结构的氮磷保水缓/控释肥料, 并研究了其在不同盐溶液中的溶胀和控释行为, 结果表明, 该肥料在氯化钠溶液中溶胀能力最强, 其次是氯化钾和硫酸钠溶液, 在氯化钙溶液中溶胀能力最差。肥料中的磷在氯化钙溶液中释放速率最慢, 在氯化钠溶液中释放最快, 其次是氯化钾和氯化钙溶液; 肥料中的氮在氯化钠和氯化钾中释放速率较为接近, 且在氯化钾中释放量更多。S. Ghazali 等^[37]以丙烯酸和丙烯酰胺为单体, N, N - 亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 过硫酸铵为引发剂, 加入热解后的碳颗粒, 通过溶液聚合合成水凝胶, 包覆肥料后制得保水缓/控释肥料。研究表明, 添加碳颗粒后的肥料提高了其吸水值, 但是与不含碳颗粒的肥料相比, 它需要更长的溶胀时间才能得到最大

吸水值。S. Y. Lu 等^[38]以过硫酸铵为引发剂, 基于 L - 天冬氨酸的化合物为新型交联剂, 魔芋葡甘露聚糖为原料制备了水凝胶, 并将其涂覆在肥料上制备出保水缓/控释肥料。研究发现, 在 1 d, 15 d 和 30 d 内, 土壤中氮的释放率分别为 9.32%, 61.8% 和 79.8%, 30 d 后磷的释放率为 64.4%。A. Rashidzadeh 等^[39]以过硫酸铵为引发剂, N, N - 亚甲基双丙烯酰胺为交联剂, 海藻酸钠、丙烯酸、丙烯酰胺和蒙脱石为原料, 通过自由基聚合制备了保水缓/控释肥料。研究表明, 在水溶液中, 该保水缓/控释肥料在第 1 d, 7 d 和 30 d 的释放率分别为 14.66%, 28.54% 和 57.66%; 在土壤中, 该保水缓/控释肥料在第 1 d, 7 d 和 30 d 的释放率分别为 13.7%, 39.42%, 60.69%。在第 15 d 和第 30 d, 含有该保水缓/控释肥料的土壤的保水率分别为 90.44% 和 78.09%。

自由基交联具有适用单体广、操作简单等优点, 而且肥料、无机物的存在往往对聚合反应的发生没有明显影响, 可用于肥料的原位包覆和复合凝胶的制备, 是目前缓/控释肥料制备中应用最广泛的方法。

3 与化肥结合方式不同的水凝胶在缓/控释肥料中的应用

氮、磷、钾是农作物生长所必需的主要营养

元素,除此之外,农作物的正常生长还需多种微量元素,比如硫、铁、硼、锰、锌、钼等.为了制备保水缓/控释肥料,人们尝试通过不同的方法将这些营养元素负载在水凝胶中,常用的方法大致可分为以下4种.

3.1 直接混合法

直接混合法是直接将水凝胶与缓/控释肥料混合在一起使用,通过控制水凝胶与肥料的比例,制备出具有一定保水缓/控释性能的肥料. A. Gunes 等^[40]将高度交联的聚丙烯酰胺和磷肥混合施用来研究水凝胶对磷肥使用效率的影响规律.研究发现,该保水缓/控释肥料的加入使土壤含水量明显增高,农作物灌溉间隔也由6 d增加至11 d.同时,添加水凝胶后磷肥的利用率增加,农作物产量也有所提高.

直接混合法简单易行,但水凝胶与肥料不容易混合均匀,且二者协同作用较小,因此,该法研究和应用较少.

3.2 溶胀吸附法

溶胀吸附法是将制备好的干胶浸泡在含肥料的溶液中,通过水凝胶的溶胀,将肥料吸附进三维网络中,待溶胀平衡后,将生成物干燥、粉碎得到保水缓/控释肥料. A. Pourjavadi 等^[41]在 Salep 淀粉磷酸盐水溶液中加入丙烯酸、N,N-亚甲基双丙烯酰胺和过硫酸铵,经过自由基聚合得到水凝胶,干燥后在硝酸钾水溶液中溶胀,制得保水缓/控释肥料,并对其溶胀性能和缓释行为进行了研究.溶胀吸附法能够减少肥料对水凝胶合成过程的影响,得到的水凝胶性能较好,但肥料在水凝胶中的装载量相对于其他方法来说较少,而且制备所需时间较长.

3.3 原位包埋法

原位包埋法是将肥料与水凝胶原料直接混合在一起,在形成水凝胶的同时得到保水缓/控释肥料. A. Olad 等^[42]以稻壳灰、藻酸钠、丙烯酸、丙烯酰胺和尿素、磷酸二氢钾、磷酸二氢铵

等为原料,通过原位自由基接枝共聚制备保水缓/控释肥料.研究表明,当交联剂含量为0.45%时,溶胀比可达830 g/g;当体系中稻壳灰含量为15%时,溶胀比可达1070 g/g.在水溶液中,第1 d,7 d,30 d内肥料的释放率分别为14.85%,29.36%和70.4%;在土壤中,第1 d,7 d,30 d内肥料释放率分别为14.98%,31.86%和71.26%. P. Wen 等^[43]以处理过的玉米芯、丙烯酸、膨润土、聚乙烯吡咯烷酮、尿素为原料,通过自由基聚合制备出保水缓/控释肥料.研究发现,在1 d,3 d,30 d内,氮肥释放率分别为10.4%,23.8%和56.6%.同时在盆栽实验中也发现,施用该缓/控释肥料的棉花发芽率高达(86.67 ± 5.77)%,棉花苗的株高、根长、鲜重和干重分别提高了37.76%,33.48%,44.07%和64.29%.

相对于溶胀吸附法,原位包埋法能将更多的肥料负载在水凝胶中,增加了保水缓/控释肥料的载肥量,而且制备所用时间较短.不过,肥料的存在有时会对水凝胶的形成反应和水凝胶的性质产生不利影响.

3.4 涂层包膜法

涂层包膜法是以肥料作为内核,水凝胶作为外壳制成的核壳结构保水缓/控释肥料.肥料内核可以是单一的尿素,可以是氮磷钾复合肥,也可以加入一些聚合物、无机物调节其性能.外壳可以是一层吸水保水凝胶,可以是二层或多层,也可以加入一层疏水聚合物以延缓肥料的释放.一般是将肥料内核包裹在具有吸水、保水能力的水凝胶中,使其达到水分缓释的作用.

赵利^[44]以磷酸酯双淀粉为原料,加入部分中和的丙烯酸、交联剂、引发剂,通过紫外光聚合制备复合保水剂,然后以聚乙烯醇为粘合剂,将其包裹尿素颗粒制备出保水缓/控释肥料.杨鸿嘉^[45]以玉米芯为原料,与部分中和的丙烯酸、聚乙二醇二丙烯酸酯共聚合成了水凝胶,并

以聚乙烯醇为粘合剂,将其包裹尿素制备出保水缓/控释肥料.当聚乙二醇二丙烯酸酯相对分子质量为 1000 时,水凝胶的最大吸水量达 3648 g/g,在盐溶液中可达 545.8 g/g. Y. Z. Shen 等^[46]合成了用有机硅氧烷和氮丙啶交联剂改性的水性丙烯酸乳液,然后将其与甲基硅油混合包覆 NPK 肥料颗粒制得保水缓/控释肥料.该肥料显示了优异的释放性能,30 d 的累积营养释放率为 16%,预计营养释放持续时间超过 190 d. A. Rashidzadeh 等^[47]以商业氮磷钾肥料为内核,将通过藻酸钠、丙烯酸、丙烯酰胺和斜发沸石的自由基聚合制备的复合水凝胶涂覆在肥料内核上,制备出新型保水缓/控释肥料.结果表明,在 1 d, 3 d, 30 d, 保水缓/控释肥料在水中的释放率分别为 16.58%, 18.94% 和 76.08%, 该肥料在土壤中的释放率分别为 13.85%, 17.53% 和 56.42%. S. Noppakundilokrat 等^[48]将肥料颗粒浸入质量浓度为 7% 的聚乙烯醇溶液中,移出后在空气中干燥得到聚乙烯醇层,然后再将其浸入壳聚糖的乙酸水溶液中,通过戊二醛交联形成壳聚糖层,最后通过丙烯酰胺、丙烯酸、过硫酸铵、N,N-亚甲基双丙烯酰胺的反相悬浮聚合对肥料进行第 3 次包覆,制备了三涂层包覆的保水缓/控释肥料(见图 4).该肥料在水中浸泡 1 d 后,释放的氮,磷和钾营养物质的质量浓度分别为 (26.2 ± 13) mg/L, (53.5 ± 11) mg/L 和 (18.9 ± 8) mg/L; 在水中浸泡 30 d 后,释放的氮,磷和钾营养物质的质量浓度分别为 (103.9 ± 22) mg/L, (182 ± 30) mg/L 和 (92.7 ± 32) mg/L, 以 30 d 后的总释放百分比来看,营养释放顺序为氮 $((83.9 \pm 18)\%) >$ 磷 $((62.3 \pm 12)\%) >$ 钾 $((36.2 \pm 15)\%)$. B. L. Ni 等^[49]以尿素、磷酸二氢钾和凹凸棒石混合制备肥料内核,瓜尔胶作为肥料内涂层,瓜尔胶、衣康酸、腐植酸和丙烯酰胺为原料制备的水凝胶用作外涂层制备双

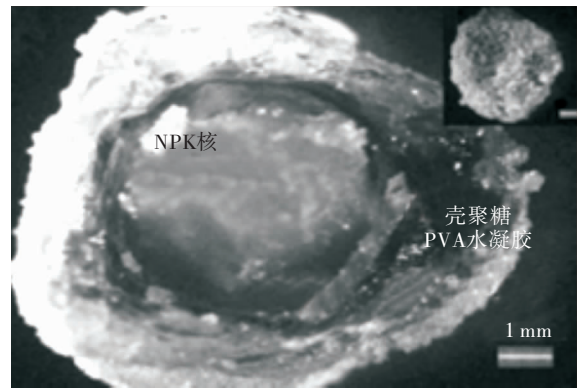


图 4 三层包膜的 NPK 肥料颗粒的光学显微图片^[48]

Fig. 4 Optical microscope image of trilayer-coated NPK fertilizer granule^[48]

涂层保水缓/控释肥料.研究发现,土壤中的氮在 20 d 内达到释放平衡,而钾和磷在 1 个月后分别释放 $(88.2 \pm 2.3)\%$ 和 $(92.4 \pm 2.6)\%$.同时,制备的水凝胶也可作为土壤调节剂将土壤的 pH 值调整至中性. S. Y. Lu 等^[50]将尿素和凹凸棒石混合后作为内核,淀粉乙酸酯为内涂层,羧甲基淀粉交联黄原胶为原料制备的水凝胶为外涂层制备了保水缓/控释肥料.研究发现,未涂覆的肥料第 1 d 氮的释放率为 79.7%,而制备的保水缓/控释肥料在 10 d 达到释放平衡,证明涂层改善了肥料的释放能力.同时,在土壤中施加保水缓/控释肥料有助于提高土壤的保水能力. X. G. Wang 等^[51]以磷酸铵锌和尿素作为肥料内核,乙酸丁酸纤维素作为内涂层,羧甲基壳聚糖、丙烯酸、凹凸棒聚合制备的复合水凝胶作为外涂层,制备了双涂层保水缓/控释肥料.研究发现,该保水缓/控释肥料含量越多的土壤保水量越高.该保水缓/控释肥料在 3 d, 15 d 和 30 d, 氮肥释放率分别为 9.2%, 53.1% 和 81.4%. D. L. Qiao 等^[52]使用丙烯酰胺和 3 种植物来源(玉米,马铃薯和木薯)的淀粉,通过自由基聚合合成淀粉水凝胶,然后以尿素颗粒作为肥料核心,使用乙基纤维素作为内涂层,

淀粉基水凝胶聚合物作为外涂层,制备了保水缓/控释肥料.研究发现,马铃薯淀粉制备的水凝胶具有最好的吸水能力,玉米淀粉和木薯淀粉制备的水凝胶的吸水性相对较小.24 h后,涂有乙基纤维素颗粒的营养物释放量明显减少(约60%).与仅具有乙基纤维素涂层的肥料相比,进一步涂覆水凝胶的肥料在一定程度上延缓了营养释放.

涂层包膜法虽然过程复杂,产品成本较高,但它能够综合各方面的因素,通过不同类型的涂层涂覆,使制备的保水缓/控释肥料具有优良的性能,从而满足对保水与缓/控释两方面的要求,因此受到研究者的广泛关注,成为研究的重要方向.

4 结语

本文综述了近年来保水缓/控释肥料的研究进展,归纳总结了不同类型保水缓/控释肥料的特点及应用,得出将水凝胶用于缓/控释肥料的制备,可以得到具有优异性能的保水缓/控释肥料,从而显著提高肥料和水资源的利用率.

近年来,随着世界人口的增长和人们环保意识、安全意识的增强,许多国家加大了在保水缓/控释肥料研究方面的投入,取得了许多研究成果,但还有一些问题需进一步解决.一是成本问题,保水缓/控释肥料的原料制备过程往往比较复杂,导致其价格较高,只能应用于一些高附加值的农作物生产或园艺种植,不能在农作物生产中广泛推广使用.目前,研究人员逐渐将研究重心转移到以可降解的天然高分子及农业废弃物为主要原料的保水缓/控释肥料的制备中,而且在制备过程中尽量减少有机溶剂的使用,对解决成本高、环境污染等问题有望起到积极的作用.二是目前大多数的研究尚处于实验室阶段,如何将性能更好的保水缓/控释肥料投入到工业生产中,依旧是研究人员所面临的重大

难题.三是目前许多肥料只具有缓释作用,并不能完全控制肥料的释放,不能完全实现肥料的释放周期与农作物的养分需求周期相一致.这就需要探索肥料释放的机制与规律,控制保水缓/控释肥料的结构与组成,特别是通过控制水凝胶的结构与组成,调控肥料的释放性能,制备出智能保水缓/控释肥料体系,以满足不同环境变化和不同农作物生长的需求,这将是以后研究的重点及方向.

参考文献:

- [1] ZHANG M Y, CHENG Z Q, ZHAO T Q, et al. Synthesis, characterization, and swelling behaviors of salt-sensitive maize branpoly (acrylic acid) superabsorbent hydrogel [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62 (35):8867.
- [2] WANG X, WANG C P, WANG X Y, et al. A polydopamine nanoparticle-knotted poly (ethylene glycol) hydrogel for on-demand drug delivery and chemo-photothermal therapy [J]. *Chemistry of Materials*, 2017, 29(3):1370.
- [3] JORDAN A M, KIM S E, DE VAN VOORDE K, et al. In situ fabrication of fiber reinforced three-dimensional hydrogel tissue engineering scaffolds [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2017, 3(8):1869.
- [4] LIAN M L, CHEN X, LU Y L, et al. Self-assembled peptide hydrogel as a smart biointerface for enzyme-based electrochemical biosensing and cell monitoring [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(38):25036.
- [5] LI D K, LI Q, BAI N N, et al. One-step synthesis of cationic hydrogel for efficient dye adsorption and its second use for emulsified oil separation [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(6):5598.
- [6] IM K, DUONG NGUYEN N, KIM S, et al. Gra-

- phene-embedded hydrogel nanofibers for detection and removal of aqueous-phase dyes [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9 (12):10768.
- [7] AZEEM B, KUSHAARI K, MAN Z B, et al. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer[J]. *Journal of Controlled Release*, 2014, 181:11.
- [8] RABAT N E, HASHIM S, MAJID R A. Effect of different monomers on water retention properties of slow release fertilizer hydrogel [J]. *Procedia Engineering*, 2016, 148:201.
- [9] NI B L, LIU M, LYU S. Multifunctional slow-release urea fertilizer from ethylcellulose and superabsorbent coated formulations [J]. *Chemical Engineering Journal* 2009, 155 (3):892.
- [10] ESSAWY H A, GHAZY M B M, ABD EL-HAI F, et al. Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89:144.
- [11] SIAFU S I. Silicone doped chitosan-acrylamide coencapsulated urea fertilizer: an approach to controlled release fertilizers [J]. *Journal of Nanotechnology*, 2017, 2017:1.
- [12] RATTANAMANEE A, NIAMSUP H, SRISOMBAT L O, et al. Role of chitosan on some physical properties and the urea controlled release of the silk fibroin/gelatin hydrogel [J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2015, 23(3):334.
- [13] XIAO X M, YU L, XIE F W, et al. One-step method to prepare starch-based superabsorbent polymer for slow release of fertilizer [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 309:607.
- [14] ZHONG K, LIN Z T, ZHENG X L, et al. Starch derivative-based superabsorbent with integration of water-retaining and controlled-release fertilizers [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 92(2):1367.
- [15] QIAO D L, LIU H S, YU L, et al. Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 147:146.
- [16] IBRAHIM S, NAGIEB Z A, SULTAN M. Eco-friendly hydrogel based on cellulose as controlled-urea release packaging system [J]. *Annals of Advanced Sciences*, 2017, 1(1):18.
- [17] NI B L, LIU M Z, LU S Y, et al. Environmentally friendly slow-release nitrogen fertilizer [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(18):10169.
- [18] BAJPAI S K, SWARNKAR M P, AHUJA S. On-demand release of urea from a cellulosic hydrogel using a sprinkler based irrigation (SBI) model [J]. *Journal of Macromolecular Science Part A—Pure and Applied Chemistry*, 2015, 52(10):779.
- [19] IBRAHIM S, NAWWAR G A M, SULTAN M. Development of bio-based polymeric hydrogel: green, sustainable and low cost plant fertilizer packaging material [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2016, 4(1):203.
- [20] XIE L H, LIU M Z, NI B L, et al. Utilization of wheat straw for the preparation of coated controlled-release fertilizer with the function of water retention [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(28):6921.
- [21] YANG Y C, TONG Z H, GENG Y Q, et al. Biobased polymer composites derived from corn stover and feather meals as double-coating materials for controlled-release and water-retention urea fertilizers [J/OL]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61 (34):8166.
- [22] 周昌. 棉秆基保墒缓/控释肥料的制备及其应用研究 [D]. 昌吉:昌吉学院, 2016.
- [23] BORTOLIN A, AOUADA F A, MATTOSO L H

- C, et al. Nanocomposite paam/methyl cellulose/montmorillonite hydrogel: evidence of synergistic effects for the slow release of fertilizers [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(31):7431.
- [24] XIE L H, LIU M Z, NI B L, et al. New environment-friendly use of wheat straw in slow-release fertilizer formulations with the function of superabsorbent[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012, 51(10):3855.
- [25] RASHIDZADEH A, OLAD A, SALARI D, et al. On the preparation and swelling properties of hydrogel nanocomposite based on sodium alginate-g-poly (acrylic acid-co-acrylamide)/clinoptilolite and its application as slow release fertilizer [J]. *Journal of Polymer Research*, 2014, 21(2):1.
- [26] OLAD A, GHAREKHANI H, MIRMOHSENI A, et al. Superabsorbent nanocomposite based on maize bran with integration of water-retaining and slow-release NPK fertilizer [J/OL]. *Advances in Polymer Technology* [2017 - 03 - 12]. DOI:10.1002/adv.21825.
- [27] SENNA A M, BOTARO V R. Biodegradable hydrogel derived from cellulose acetate and EDTA as a reduction substrate of leaching NPK compound fertilizer and water retention in soil [J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 260:194.
- [28] BAJPAI S K, SWARNKAR M P, AHUJA S. On-demand release of urea from a cellulosic hydrogel using a sprinkler based irrigation (SBI) model [J]. *Journal of Macromolecular Science Part A—Pure and Applied Chemistry*, 2015, 52(10):779.
- [29] MOHAMMADI-KHOO S, MOGHADAM P N, FAREGHI A R, et al. Synthesis of a cellulose-based hydrogel network: characterization and study of urea fertilizer slow release [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016, 133:42935.
- [30] 姜安龙, 易晶晶, 余晓青, 等. 海藻酸钠水凝胶对尿素的缓释效果研究 [J]. *现代化工*, 2015, 35(7):86.
- [31] DAVIDSON D W, VERMA M S, GU F X. Controlled root targeted delivery of fertilizer using an ionically crosslinked carboxymethyl cellulose hydrogel matrix [J]. *Springer Plus*, 2013, 2(1):318.
- [32] JIN S P, YUE G R, FENG L, et al. Preparation and properties of a coated slow-release and water-retention biuret phosphoramidate fertilizer with superabsorbent [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(1):322.
- [33] ZHANG Y, LIANG X Y, YANG X G, et al. An eco-friendly slow-release urea fertilizer based on waste mulberry branches for potential agriculture and horticulture applications [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014, 2(7):1871.
- [34] MAZIAD N A, ABOU E L FADL F I, ELKELESH N A, et al. Radiation synthesis and characterization of super absorbent hydrogels for controlled release of some agrochemicals [J]. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2016, 307(1):513.
- [35] WEN P, WU Z S, HE Y H, et al. Microwave-assisted synthesis of a semi-interpenetrating polymer network slow-release nitrogen fertilizer with water absorbency from cotton stalks [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(12):6572.
- [36] LI X D, LI Q, XU X, et al. Characterization, swelling and slow-release properties of a new controlled release fertilizer based on wheat straw cellulose hydrogel [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2016, 60:564.
- [37] GHAZALI S, JAMARI S, NOORDIN N, et al. Properties of controlled-release-water-retention

- fertilizer coated with carbonaceous-g-poly (acrylic acid-co-acrylamide) superabsorbent polymer [J]. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2017, 8 (2) : 141.
- [38] LU S Y, F C, G C, et al. Multifunctional environmental smart fertilizer based on Laspactic acid for sustained nutrient release [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64 (24) : 4965.
- [39] RASHIDZADEH A, OLAD A. Slow-released NPK fertilizer encapsulated by NaAlg-g-poly (AA-co-AAm) / MMT superabsorbent nanocomposite [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 114 : 269.
- [40] GUNES A, KITIR N, TURAN M, et al. Evaluation of effects of water-saving superabsorbent polymer on corn (*Zea mays* L.) yield and phosphorus fertilizer efficiency [J]. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2016, 40 (3) : 365.
- [41] POURJAVADI A, DOULABI M, SOLEYMAN R, et al. Synthesis and characterization of a novel (salep phosphate) -based hydrogel as a carrier matrix for fertilizer release [J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2012, 72 (10) : 667.
- [42] OLAD A, GHAREKHANI H, MIRMOHSENI A, et al. Synthesis, characterization, and fertilizer release study of the salt and pH-sensitive NaAlg-g-poly (AA-co-AAm) / RHA superabsorbent nanocomposite [J]. *Polymer Bulletin*, 2017, 74 (8) : 3353.
- [43] WEN P, HAN Y J, WU Z S, et al. Rapid synthesis of a corncob-based semi-interpenetrating polymer network slow-release nitrogen fertilizer by microwave irradiation to control water and nutrient losses [J / OL]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2017 (3) : 2. [2017 - 03 - 12]. DOI: 10. 1016/j. arabjc.
- [44] 赵利. 磷酸酯双淀粉复合保水剂及其缓释肥的制备与性能研究 [D]. 长春: 吉林农业大
学, 2015.
- [45] 杨鸿嘉. 玉米芯高吸水树脂的制备及在缓释肥中的应用 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- [46] SHEN Y Z, ZHAO C, ZHOU J M, et al. Application of waterborne acrylic emulsions in coated controlled release fertilizer using reacted layer technology [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2015, 23 (1) : 309.
- [47] RASHIDZADEH A, OLAD A, REYHANITABAR A. Hydrogel/clinoptilolite nanocomposite-coated fertilizer: swelling, water-retention and slow-release fertilizer properties [J]. *Polymer Bulletin*, 2015, 72 (10) : 2667.
- [48] NOPPAKUNDILOGRAT S, PHEATCHARAT N, KIATKAMJORNWONG S. Multilayer-coated NPK compound fertilizer hydrogel with controlled nutrient release and water absorbency [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132 : 41249.
- [49] NI B L, LU S Y, LIU M Z. Novel multinutrient fertilizer and its effect on slow release, water holding, and soil amending [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012, 51 (40) : 12993.
- [50] LU S Y, GAO C M, WANG X G, et al. Synthesis of a starch derivative and its application in fertilizer for slow nutrient release and water holding [J]. *Royal Society of Chemistry*, 2014, 4 : 51208.
- [51] WANG X G, LU S Y, GAO C M, et al. Biomass-based multifunctional fertilizer system featuring controlled-release nutrient, waterretention and amelioration of soil [J]. *RSC Advances*, 2014, 4 (35) : 18382.
- [52] QIAO D L, LIU H S, YU L, et al. Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 147 : 146.



引用格式:许春平,姜宇,曾颖,等.不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和抗氧化性的影响[J].轻工学报,2017,32(6):56-62.

中图分类号:TS41⁺3 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.007

文章编号:2096-1553(2017)06-0056-07

不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和抗氧化性的影响

Effects of different enzymolysis conditions on the protein hydrolysis degree and antioxidant activity of tobacco leaf

许春平¹,姜宇¹,曾颖¹,马扩彦²,谭兰兰³,申屠洪钎³,
曲利利¹,孟丹丹¹,戴亚²

XU Chun-ping¹, JIANG Yu¹, ZENG Ying¹, MA Kuo-yan², TAN Lan-lan³,
SHENTU Hong-qian³, QU Li-li¹, MENG Dan-dan¹, DAI Ya²

- 1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;
 - 2. 四川中烟工业有限责任公司 技术研发中心,四川 成都 610060;
 - 3. 重庆中烟工业有限责任公司 技术研发中心,重庆 400060
1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. Technology Center, China Tobacco Sichuan Industrial Co., Ltd., Chengdu 610060, China;
3. Technology Center, China Tobacco Chongqing Industrial Co., Ltd., Chongqing 400060, China

关键词:
废弃烟叶;烟叶蛋白多肽;酶解;抗氧化性;水解度;清除率

Key words:
discarded tobacco leaf;
tobacco leaf protein polypeptide;
enzymatic hydrolysis;
antioxidant activity;
hydrolysis degree;
clearance

摘要:采用碱溶酸沉法从大田废弃上部烟叶中提取蛋白质,分别使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶对烟叶蛋白进行酶解,研究不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的影响.结果表明:蛋白多肽水解度最优的酶解条件与蛋白多肽对 DPPH 清除率最高的酶解条件不同.以使用木瓜蛋白酶为例,烟叶蛋白水解度最优酶解条件为,酶解温度 50 ℃,酶解时间为 0.5 h,加酶量为底物的 3%,酶解 pH = 8; DPPH 清除率最优酶解条件为,酶解温度 40 ℃,酶解时间 2 h,加酶量为底物质量的 3%,pH = 7.这说明蛋白多肽的水解度高低与其抗氧化性并非正相关,蛋白多肽既可以作为美拉德反应的底物,也可以作为抗氧化剂,可针对不同的应用目的,选择相应的最优酶解条件.

收稿日期:2016-06-23;修回日期:2017-03-26

基金项目:国家自然科学基金联合基金项目(U1604176);重庆中烟合作项目(20151011)

作者简介:许春平(1977—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草工程.

通信作者:戴亚(1946—),男,江苏省盐城市人,四川中烟工业有限责任公司教授,主要研究方向为烟草化学.

Abstract: Tobacco leaf protein was extracted by alkali-solution and acid-isolation method from upper leaves in the field. The tobacco protein was hydrolyzed using trypsin, papain or protamex, respectively. The effect of different enzymolysis conditions on leaf protein hydrolysis degree and the DPPH clearance rate of tobacco leaf protein polypeptide were investigated. The results showed that the optimal enzymolysis conditions of protein peptide were different with those of the highest DPPH clearance rate of protein polypeptide. Using papain as an example, the optimal hydrolysis conditions for tobacco protein hydrolysis degree were enzymolysis temperature 50 °C, hydrolysis time 0.5 h, enzyme amount 3%, pH = 8. The optimal hydrolysis conditions for DPPH clearance rate were temperature 40 °C, enzymolysis time 2 h, enzyme amount 3%, pH = 7. This indicated that the degree of hydrolysis of protein polypeptide was not positively correlated with its antioxidant activity. Protein peptide can be used as substrate for Maillard reaction or antioxidant, and it may be chosen corresponding optimal enzymatic conditions for different purposes.

0 引言

我国烟叶产量大,但工业使用中对农业生产的烟叶要求较高.烟叶生产中打顶会产生部分废弃上部叶^[1],由于其成熟度不够、使用率较低,有时甚至废弃不用,大量废弃烟叶通常制成肥料或作焚烧处理^[2].事实上,烟叶中蛋白质含量非常丰富,有很高的营养价值和药用价值^[3],提取烟叶蛋白并合理利用,不仅能够减轻环境负担,还能创造一定的经济价值.将烟叶蛋白进行控制酶解,得到分子大小适宜且包含特定氨基酸序列的具有较高生物活性的多肽^[4],可进一步提高烟叶蛋白的使用价值.具有生物活性的多肽也有很高的使用价值,可以满足人体的营养需求,对人体的生理功能进行调节^[5].董二慧等^[6]研究低次烟叶中蛋白质的提取工艺,优化了提取缓冲溶液的浓度、液料比和 pH 值,得出烟叶中蛋白质的最高提取率为 10.96 mg/g.饶国华等^[7]以低次烟叶为材料,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计研究了烟叶蛋白最佳提取工艺,结果表明,磨浆工艺的最佳方案为:固液比($m(\text{烟叶}) : m(\text{水})$) 1 : 17;提取温度 60 °C;提取液 pH = 8.0;磨浆 2 次.林晓婕等^[8]采用不同的方法获得烟草色素蛋白复合物 TPP (tobacco pigments protein),并研究其抗紫外性能和机理,得出 pH = 4.5 沉降的 TPP 的酚类物质含量最高,

抗紫外活性也最强.但目前的研究结合酶解技术研究烟叶蛋白抗氧化性的成果很少.本文拟通过碱溶酸沉法从大田废弃上部烟叶中提取蛋白质,研究不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的影响,以期为烟叶蛋白复合物的利用和生物活性的进一步研究提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:上部废弃鲜烟叶(豫烟十号,采摘自许昌市襄城县).

试剂: Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , H_3PO_4 , NaOH , 茚三酮, PBS 缓冲液 (pH = 8), 均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司产;DPPH, 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司产;胰蛋白酶 (250 U/mg), 宝生物科技有限公司产;考马斯亮蓝 G-250, 牛血清白蛋白, 西安国安生物科技有限公司产.

仪器: TDZ5-WS 低速多管架自动平衡离心机, 湘仪离心机仪器有限公司产; SJIA-10N 冷冻干燥机, 宁波市双嘉仪器有限公司产; UV-17001C 紫外分光光度计, 上海凤凰光学科仪有限公司产.

1.2 方法

1.2.1 原料的预处理 将从大田新采摘的上

部废弃鲜烟叶摊开放入烘箱中,105 ℃烘烤15 min 进行杀青处理^[9],40 ℃烘干24 h,打粉,备用。

1.2.2 烟叶蛋白的提取(碱溶酸沉法) 称取50 g 烟叶粉末,加入 pH = 8 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(500 mL)中;用机械搅拌器搅拌24 h,10 000 r/min,4 ℃离心10 min;取上清液,重复上述步骤1次,合并上清液,往上清液中逐滴加入体积分数为85%的 H_3PO_4 ,搅拌,将pH值调至3.0,放置8 h;以10 000 r/min,4 ℃离心10 min,取沉淀部分,冷冻干燥,得到烟叶蛋白,为后续实验备用^[10]。

1.2.3 蛋白质含量测定 用牛血清白蛋白绘制标准曲线.准确称取烟叶蛋白0.2 g,加水溶解,定容到1000 mL,取1 mL用考马斯亮蓝法^[11]测定吸光度.同法,通过标准曲线和稀释倍数计算蛋白质含量,计算公式为

$$\text{蛋白质含量} = (\text{蛋白质浓度} \times \text{稀释倍数} / 1000 \text{ mL}) / 200 \text{ mg}$$

1.2.4 不同酶解条件对蛋白质水解度的影响 蛋白质的酶解实验分为3组,分别为胰蛋白酶组、木瓜蛋白酶组、复合蛋白酶组,每组分别进行酶解单因素实验。

1) 温度对蛋白质水解度的影响实验.取60 mg烟叶蛋白,加入3 mL水溶解,调pH到每组不同酶的最适值(胰蛋白酶 pH = 10,木瓜蛋白酶 pH = 7,复合蛋白酶 pH = 7),预热5 min;对应加入质量分数3%的不同的酶,温度分别为30 ℃,40 ℃,50 ℃,60 ℃进行反应,酶解时间2 h。

2) 时间对蛋白质水解度的影响实验.将酶解温度设置为50 ℃,酶解时间分别为0.5 h,1 h,2 h,3 h,4 h,其他条件与上述相同。

3) 加酶量对蛋白质水解度的影响实验.将酶解温度设置为50 ℃,酶解时间2 h,加酶量(质量分数)分别调至为2%,3%,4%,5%,6%,其他条件与上述相同。

4) pH 值对蛋白质水解度的影响实验.将酶解温度设置为50 ℃,酶解时间2 h,加酶量3%.胰蛋白酶组 pH 值分别调至7,8,9,10,11,12;木瓜蛋白酶组 pH 值分别调至5,6,7,8,9;复合蛋白酶组 pH 值分别调至4,5,6,7,8,9.其他实验条件与上述相同。

1.2.5 完全水解的蛋白水解液的制备与水解度^[12]的测定 1) 完全水解的蛋白水解液的制备.取烟叶蛋白100 mg,放入40 mL耐压瓶中,加入5 mL的6 mol/L盐酸,拧紧瓶盖,110 ℃油浴中水解24 h;冷却,过滤,滤液旋转蒸发至蒸干,加蒸馏水50 mL左右,用1 mol/L NaOH中和至pH = 6,定容至100 mL。

2) 水解度的测定.实验组:茚三酮法测氨基酸浓度,取烟叶完全水解蛋白液0.2 mL,0.4 mL,0.6 mL,0.8 mL,1.0 mL于试管中,蒸馏水补至4.0 mL,加pH = 8缓冲溶液1.0 mL,茚三酮溶液1.0 mL,混匀,沸水浴加热15 min,冷却,用蒸馏水稀释至10 mL,570 nm处测定吸光度(水作参比).对照组:另取100 mg蛋白质,加水100 mL,振荡均匀后过滤,取相应体积的滤液,按上述方法测定吸光度。

取灭酶的水解液1 mL,稀释至50 mL,过滤,取滤液1 mL,加水至4 mL,按上述茚三酮法反应,570 nm处测定吸光度(水作参比).另取同种未水解烟叶蛋白溶液1 mL,按上述方法(茚三酮法)测定吸光度,并计算二者吸光度的差值.以相同体积样品的吸光度之差与烟叶蛋白的含量作工作曲线,取线性部分作标准曲线.然后根据烟叶蛋白水解液中蛋白质浓度与吸光度标准曲线计算得到蛋白质含量,按下式计算水解度:

$$DH = \frac{A}{1000 \times W} \times V_1 \times 50 \times 100\%$$

式中,A为计算得到蛋白质的含量/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$),W为称样重/g, V_1 为水解液的总体积/mL。

1.2.6 不同酶解条件下酶解产物 DPPH 清除率^[13]的计算

对不同条件下的烟叶蛋白水解液稀释 50 倍,测定其 DPPH 清除能力.取 3 组试管,分别为实验组、对照组和空白组.实验组加 1 mL 烟叶蛋白水解液,3 mL DPPH 溶液,漩涡振荡器混匀,避光放置 30 min,以 50% 乙醇溶液调紫外分光光度计为零,于 517 nm 处测定其吸光度,记为 A_i ;对照组加入 1 mL 蒸馏水,3 mL DPPH 溶液,方法同上,测得吸光度记为 A_0 ;空白组加 1 mL 烟叶蛋白水解液,3 mL 50% 乙醇,方法同上,测得吸光度记为 A_j .以不同条件下的烟叶蛋白水解液为研究材料,设置一组实验,每组实验重复 3 次.烟叶蛋白水解液对 DPPH 清除率/% 的计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率} = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 废弃烟叶蛋白提取结果

按照实验 1.2.2 的方法从 50 g 烟叶粉末中提取出 4 g 蛋白质,烟叶蛋白质得率为 8%.由牛血清白蛋白标准液得到的标准曲线为 $y = 0.0075x + 0.9453$, $R^2 = 0.9932$.

取烟叶蛋白水解液中蛋白质含量与吸光度值作图即得图 1,标准曲线为 $y = 0.7313x - 0.0424$, $R^2 = 0.9952$.稀释后的样品平均吸光度为 1.4301,计算得到蛋白质浓度为 64.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,烟叶蛋白含量为 0.3232 mg/g.

2.2 不同酶解条件对烟叶蛋白水解度的影响

图 2 反映 3 种酶在不同实验条件下对烟叶蛋白水解度的影响.图 2a) 中,胰蛋白酶对烟叶蛋白的水解度随酶解温度的升高先增加后减少,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右达到最高值 34.40%;木瓜蛋白酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右达到最高值 41.72%;复合蛋白酶在 40 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 范围内对烟叶蛋白的水解变化不明显,从节约能源考虑,取 40 $^{\circ}\text{C}$ 为最适温度.图 2b) 中,随酶解时间的延长,3 种酶对烟叶

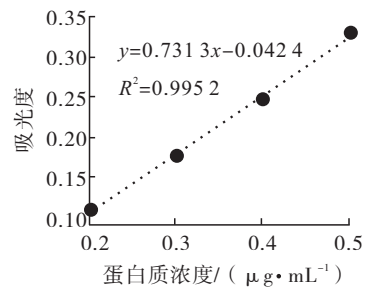


图 1 烟叶蛋白水解液中蛋白质浓度与吸光度标准曲线

Fig. 1 Standard curve of protein concentration and absorbance in tobacco protein hydrolysate

蛋白质的水解度的影响都有所增大:胰蛋白酶组中烟叶蛋白的水解度在 2 h 以后几乎不变,故最适酶解时间为 2 h;木瓜蛋白酶组在酶解时间为 0.5 h 时,烟叶蛋白水解度已经达到较高的水平(39.65%);复合蛋白酶组烟叶蛋白的水解度在 3 h 后相对稳定在较高水平(43.99%),需要的反应时间比较长.从图 2c) 水解度趋势可以看出,最适加酶量分别为:胰蛋白酶为底物质量的 5%,木瓜蛋白酶为底物质量的 3%,复合蛋白酶为底物质量的 5%.从图 2d) 可以看出,胰蛋白酶的最适 pH 值为 10,木瓜蛋白酶的最适 pH 值为 8,复合蛋白酶的最适 pH 值为 7.

综上,在单因素实验的基础上进行测试,结果如下:胰蛋白酶,在酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 2 h,加酶量为底物质量的 5%,pH = 10 的条件下,烟叶蛋白水解度最高为 34.98%;木瓜蛋白酶,在酶解温度 50 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 0.5 h,加酶量为底物质量的 3%,pH = 8 的条件下,烟叶蛋白水解度最高为 43.43%;复合蛋白酶,在酶解温度 40 $^{\circ}\text{C}$,酶解时间 3 h,加酶量为底物质量的 5%,pH = 7 的条件下,烟叶蛋白水解度最高为 41.15%.

2.3 不同酶解条件下烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除能力的影响

图 3 为 3 种酶在不同实验条件下获得的烟

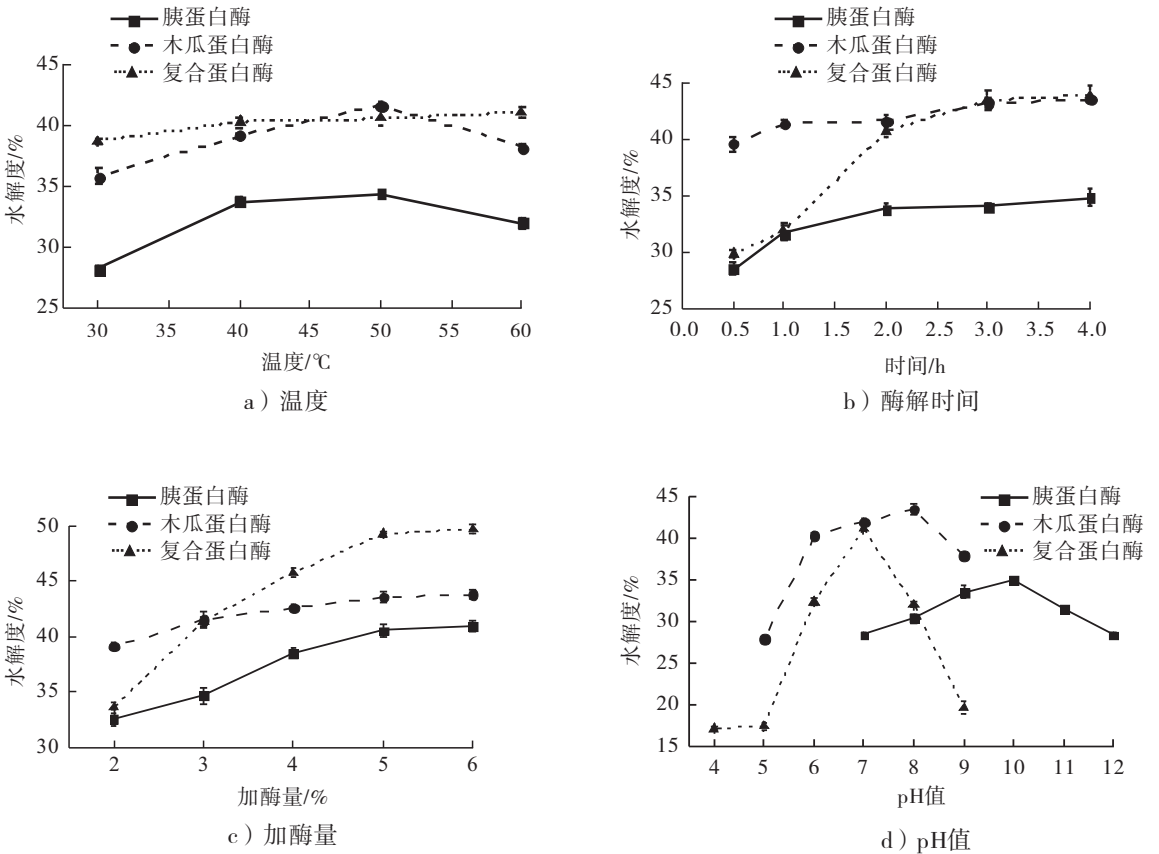


图2 不同酶解条件对烟叶蛋白水解度的影响

Fig.2 Effect of different enzymolysis conditions on hydrolysis degree of tobacco leaf protein

叶蛋白多肽对 DPPH 清除能力的影响. 由图 3a) 可知,胰蛋白酶组烟叶蛋白多肽对 DPPH 的清除能力很低;木瓜蛋白酶组烟叶蛋白多肽对 DPPH 的清除率在 40 °C 时达到最高值 43.51%,也就是说,其他条件不变时,温度为 40 °C 时木瓜蛋白酶对烟叶蛋白质的水解产物抗氧化性最佳;复合蛋白酶组在 50 °C 时达到最高值 28.55%. 从图 3b) 中可以看出,随着酶解时间的增加:胰蛋白酶组多肽对 DPPH 清除率差异仍不显著,且抗氧化性很低;木瓜蛋白酶组在 2 h 左右烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高,为 43.02%;复合蛋白酶组随时间增加抗氧化性先增加后减少,在酶解时间为 1 h 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高为 36.71%. 从图 3c) 中可以看出,胰蛋白酶组的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率很低;木瓜蛋白酶组和复合

蛋白酶组在加酶量 > 3% 时烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率变化趋势相似,清除率分别为 43.30% 和 27.70%;从图 3d) 中可以看出,胰蛋白酶组的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率很低,pH 值的变化对其影响不大;木瓜蛋白酶组在 pH = 7 时,清除率达到最高值为 44.87%;复合蛋白酶组在 pH 为 6 ~ 8 时,清除率变化不显著,pH = 8 时,清除率为 29.33%. 虽然木瓜蛋白酶和复合蛋白酶的酶活力不同,但是在高于 3% 的加酶量后对 DPPH 清除率变化不明显,说明在 3% 的加酶量下,酶活力不是影响烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的主要因素^[14].

综上,在单因素实验基础上进行测试,结果如下:胰蛋白酶在酶解温度 30 °C,酶解时间 4 h,加酶量为底物质量的 2%,pH = 11 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率为 3.56%;木瓜蛋白

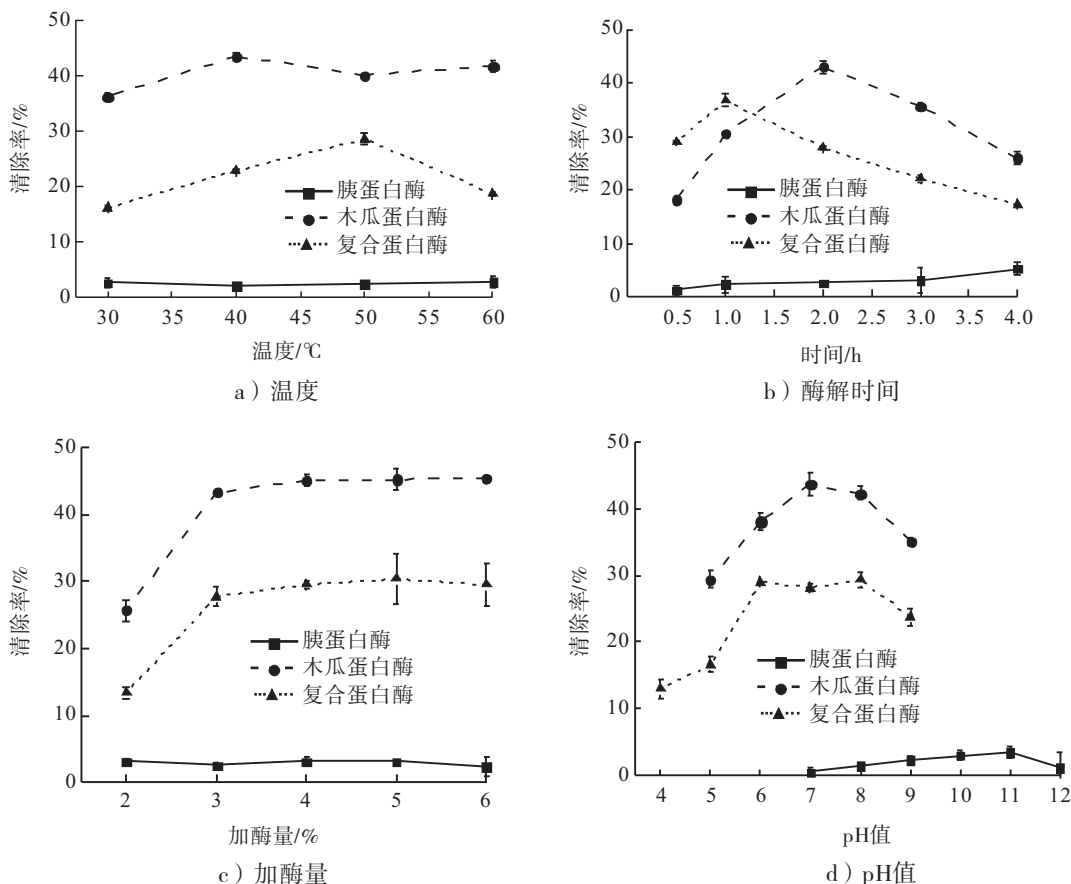


图3 不同酶解条件下获得的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除能力的影响

Fig.3 Effect of scavenging ability of tobacco protein peptides to DPPH under different enzymolysis conditions

酶在酶解温度 40 °C ,酶解时间 2 h,加酶量为底物质量的 3% ,pH = 7 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高,为 45.22% ;复合蛋白酶在酶解温度 50 °C ,酶解时间 1 h,加酶量为底物质量的 3% ,pH = 8 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率为 39.44% .

3 结论

本文采用碱溶酸沉法从大田废弃上部新鲜烟叶中提取蛋白质,分别使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶对烟叶蛋白进行酶解,研究不同酶解条件对烟叶蛋白水解度和不同条件下获得的烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率的影响,得出以下结果:

1)胰蛋白酶,在酶解温度 50 °C ,酶解时间

2 h,加酶量为底物质量的 5% , pH = 10 时,烟叶蛋白水解度最高为 34.98% ;木瓜蛋白酶,酶解温度 50 °C ,酶解时间 0.5 h,加酶量为底物质量的 3% , pH = 8 时,烟叶蛋白水解度最高为 43.43% ;复合蛋白酶,酶解温度 40 °C ,酶解时间 3 h,加酶量为底物质量的 5% , pH = 7 时,烟叶蛋白水解度最高为 41.15% .

2)胰蛋白酶,在酶解温度 30 °C ,酶解时间 4 h,加酶量为底物质量的 2% ,pH = 11 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率为 3.56% ;木瓜蛋白酶,在酶解温度 40 °C ,酶解时间 2 h,加酶量为底物质量的 3% ,pH = 7 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清除率最高,为 45.22% ;复合蛋白酶,在酶解温度 50 °C ,酶解时间 1 h,加酶量为底物质量的 3% ,pH = 8 时,烟叶蛋白多肽对 DPPH 清

除率为 39.44%。

这表明,蛋白多肽水解度最优的酶解条件与蛋白多肽对 DPPH 清除率最高的酶解条件不同,进而说明蛋白多肽的水解度高低与其抗氧化性并非正相关. 蛋白多肽既可以作为美拉德反应的底物,也可以作为抗氧化剂,在具体实验中可以针对不同的应用目的,选择相应的最优酶解条件. 该结果为烟叶蛋白的利用和烟叶蛋白多肽生物活性的进一步研究提供了理论依据. 下一步的研究重点将是多肽的化学组成和抗氧化活性的机理.

参考文献:

[1] PAPENFUS H D. 运用打顶和控制腋芽技术调节烟叶可用性[J]. 烟草科技,1997(1):37.

[2] 李殿殿,李志能,林娟. 利用废弃烟叶栽培糙皮侧耳初探[J]. 食用菌学报,2011,18(4):9.

[3] 田少君,张磊. 烟叶叶蛋白的提取研究[J]. 食品科技,2005(5):15.

[4] 饶国华. 利用低次烟叶蛋白制备生物活性肽及烟用香精的研究[D]. 广州:华南理工大学,2006.

[5] 李建杰,叶磊,荣瑞芬. 生物活性肽的酶法制备及分离鉴定研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(2):195.

[6] 董二慧,谭红,何锦林,等. 响应曲面法优化低

次烟叶可溶性蛋白提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013(2):235.

[7] 饶国华,赵谋明,林伟锋,等. 低次烟叶蛋白质提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005(11):67.

[8] 林晓婕,傅红,杨琳,等. 烟草色素蛋白复合物中多酚类物质对其抗紫外性能的影响[J]. 中国烟草科学,2011(2):57.

[9] 李跃平,徐兴阳,高福宏,等. 烤烟成熟鲜烟叶 10 种化学成分受海拔与叶位的影响研究[J]. 西南农业学报,2012,25(5):1620.

[10] 刘颖,付薇,宋丹丹,等. 限制性酶解米糠蛋白功能性质研究[J]. 食品工业,2016,37(3):141.

[11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem,1976,72:248.

[12] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. 中国油脂,2000,25(6):176.

[13] 勾明玥,刘梁,张春枝. 采用 DPPH 法测定 26 种植物的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业,2010,36(3):148.

[14] 赵谋明,董红竹,郑淋,等. 不同蛋白酶水解高温花生粕和低温花生粕及其水解产物抗氧化活性的对比研究[J]. 现代食品科技,2016,32(4):1.



引用格式:贾春晓,张月丽,陈芝飞,等.卷烟烟气中性香味成分的半制备 HPLC 分离与 GC-MS 测定[J].轻工学报,2017,32(6):63-72.

中图分类号:TS41⁺1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.008

文章编号:2096-1553(2017)06-0063-10

卷烟烟气中性香味成分的 半制备 HPLC 分离与 GC-MS 测定

Determination of the content of neutral aromatic components from cigarette mainstream smoke by the separation of semi-preparative HPLC and GC-MS

贾春晓¹,张月丽²,陈芝飞³,蔡莉莉³,孙志涛³,马宇平³,
毛多斌²

JIA Chun-xiao¹,ZHANG Yue-li²,CHEN Zhi-fei³,CAI Li-li³,SUN Zhi-tao³,
MA Yu-ping³,MAO Duo-bin²

1. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001;

2. 郑州轻工业学院 烟草科学与工程学院,河南 郑州 450001;

3. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心,河南 郑州 450000

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

2. College of Tobacco Science and Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

3. Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China

关键词:

半制备高效液相色谱
分离;气相色谱-质
谱联用;卷烟烟气;中
性香味成分

Key words:

semi-preparative HPLC
(high performance
liquid chromatography)
separation;GC-MS;
cigarette mainstream
smoke;neutral aromatic
components

摘要:将半制备 HPLC 分离与 GC-MS 测定相结合,对某卷烟样品烟气中性香味成分进行分析:先将半制备 HPLC 分离条件中的馏分收集时间优化为 3 个时间段,以保证待测化合物在各馏分中不存在交叉.选择离子流色谱图显示,3 个馏分中各待测化合物可完全分离,满足定量分析要求.通过建立 GC-MS 内标标准曲线进行定量分析,结果表明,各组分线性方程相关系数均大于 0.999 0,检出限为 0.55 ~ 13.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 1.85 ~ 43.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$,说明该方法灵敏度较高.样品测定与回收率实验结果显示,卷烟样品烟气中性香味成分测定平均回收率为 64.39% ~ 93.57%,相对标准偏差均小于 10%,说明该方法能满足痕量成分定量分析要求,重现性较好.

收稿日期:2017-04-09

基金项目:烟草行业烟草工业生物技术重点实验室专项基金资助项目(中烟办[2014]334号)

作者简介:贾春晓(1965—),女,河南省南阳市人,郑州轻工业学院教授,主要研究方向为应用化学和烟草化学.

通信作者:毛多斌(1962—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草化学与烟用香精香料.

Abstract: A method for determination of the content of neutral aromatic components from cigarette mainstream smoke by semi-preparative high performance liquid chromatography (semi-preparative HPLC) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was developed; the fraction collection time was determined to three time periods by optimizing the conditions of semi-preparative HPLC in order to ensure that the compounds to be measured don't cross in the fractions. The selected ion chromatogram showed that all target compounds could be separated completely in three fractions and the method could satisfy the demands of quantitative analysis. Quantitative analysis was performed by establishing a GC-MS internal standard curve. The analysis results showed that the correlation coefficients were greater than 0.999 0, the limits of detection (LOD) were 0.55 ~ 13.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limits of quantitation (LOQ) were 1.85 ~ 43.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$. It showed that the method has high sensitivity. The results of sample determination and recovery experiment showed that the average added standard recovery of the neutral aromatic components from cigarette mainstream smoke was in the range of 64.39% ~ 93.57% and the relative standard deviations were less than 10%. It showed that the method could satisfy the requirement of quantitative analysis of trace compounds, with good reproducibility.

0 引言

在卷烟降焦减害过程中,烟气中的香气会相应减少,损失的香气需要通过加香加料来弥补^[1],而补香的重要前提是对烟气中香味成分的含量有充分的了解,同时结合感官评吸结果和各香味成分代表的香韵得出成品烟的风格特征,以此作为补香和加香的依据即技术支撑^[2].在烟气的诸多香味成分中,中性香味成分对卷烟的香气和吃味有着重要影响,因此,分析和测定烟气中的中性香味成分的含量具有十分重要的意义.

目前,对卷烟主流烟气化学成分分析和含量测定的方法主要有:超声萃取、固相萃取或串联冷阱捕集结合 GC-MS 法^[3-5];水蒸气蒸馏或同时蒸馏萃取结合 GC-MS 法^[6-8];蒸馏萃取、溶剂萃取或顶空固相萃取结合全二维气相色谱-飞行时间质谱(GC × GC-TOF MS)法^[9-12].其中 GC × GC-TOF MS 法虽然分离能力强,但存在定量分析结果欠准确、操作繁琐等问题^[13],所以主要用于分离和定性分析.卷烟烟气成分复杂,大部分成分含量较低,且中性香味成分各成分间没有很好的分离度,直接采用 GC 法或 GC-MS 法许多痕量成分无法进行定性分析和定量测定.相比而言,半制备型 HPLC 法可

以将复杂成分按极性强弱进行分离制备,所得馏分组成相对简单并且各成分含量较高,有利于结合 GC-MS 法对各馏分中的痕量香味成分进行分离与分析,且 GC-MS 法对混合物中各成分的分离效率和定量分析的灵敏度均较高^[14],两种方法相结合测定烟气中性香味成分含量的研究尚未见文献报道.本文拟在前期研究^[15]基础上,建立基于半制备 HPLC 分离的 GC-MS 内标标准曲线,定量分析卷烟样品烟气中性香味成分,以期对复杂体系的成分分析测定、卷烟烟气中香味成分的准确定量分析提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

材料:某品牌成品卷烟(烟支长度为 84 mm),由河南中烟工业有限责任公司提供;进口剑桥滤片($\Phi = 92$ mm).

试剂:二氯甲烷,天津市凯通公司产;正己烷,山东禹王公司产;异丙醚,东京化成株式会社产;异丙醇,德国默克公司产.以上试剂均为色谱纯.

标准品和内标:苯甲醛(1[#])、乙酸糠酯(2[#])、D-柠檬烯(3[#])、4-甲基苯甲醛(4[#])、苯甲酸甲酯(5[#])、异戊酸异戊酯(6[#])、乙酸-2-乙基己基酯(7[#])、乙酸对甲基苯基酯(8[#])、4-

乙基苯甲醛(9[#])、 β -环化柠檬醛(10[#])、桔萆醛(11[#])、苯乙酸乙酯(12[#])、紫苏醛(13[#])、百草香酚(14[#])、2,4-二甲基苯乙酮(15[#])、二氢大马酮(16[#])、2-十三烷酮(17[#])、苯甲酸苄酯(18[#])、黄葵内酯(19[#])、糠酸甲酯(20[#])、6-甲基-5-庚烯-2-酮(21[#])、苯乙醛(22[#])、苯乙酮(23[#])、2-壬酮(24[#])、二氢肉桂醛(25[#])、苯乙酸甲酯(26[#])、4-甲基苯乙酮(27[#])、桂醛(28[#])、2-十一酮(29[#])、香叶基丙酮(30[#])、 β -紫罗兰酮(31[#])、金合欢基丙酮(32[#])、5-甲基糠醛(33[#])、2-乙基己基醇(34[#])、苯甲醇(35[#])、苯乙醇(36[#])、异佛尔酮(37[#])、氧代异佛尔酮(38[#])、薄荷醇(39[#])、香茅醇(40[#])、香叶醇(41[#])、二氢紫罗兰酮(42[#])、二氢猕猴桃内酯(43[#])、6-甲基香豆素(44[#])、金合欢基醇(45[#])，内标 2,6-二氯甲苯，纯度均大于 97%。以上均为百灵威科技有限公司产。

仪器:RM20H 转盘式自动吸烟机,德国 Borgwaldt 公司产;Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司产;Waters 600 半制备型高效液相色谱仪,Waters 科技上海公司产;GC 7890-MS 5977 B 型气相色谱-质谱联用仪,美国 Agilent 公司产;电子天平(感量 0.000 01 g),瑞士梅特勒-托利多公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 混标溶液 I:分别准确称取 1.1 中 1[#]—19[#] 的标准品化合物 29.88 mg, 28.49 mg, 21.57 mg, 25.46 mg, 29.01 mg, 21.49 mg, 21.54 mg, 25.89 mg, 24.70 mg, 30.32 mg, 26.17 mg, 25.69 mg, 24.78 mg, 32.54 mg, 28.27 mg, 23.11 mg, 27.55 mg, 30.11 mg 和 25.43 mg, 用二氯甲烷稀释并定容至 100 mL。

混标溶液 II:分别准确称取 1.1 中 20[#]—32[#] 的标准品化合物 28.43 mg, 21.26 mg, 22.79 mg, 22.24 mg, 22.79 mg, 24.49 mg, 20.14 mg, 24.18 mg, 25.52 mg, 25.14 mg,

21.22 mg, 29.14 mg 和 24.13 mg, 用二氯甲烷稀释并定容至 100 mL。

混标溶液 III:分别准确称取 1.1 中 33[#]—45[#] 的标准品化合物 29.70 mg, 29.66 mg, 26.39 mg, 25.40 mg, 26.54 mg, 41.07 mg, 25.93 mg, 29.37 mg, 24.66 mg, 25.78 mg, 27.82 mg, 24.26 mg 和 20.04 mg, 用二氯甲烷稀释并定容至 100 mL。

内标溶液:准确称取 75.21 mg 内标物 2,6-二氯甲苯,用二氯甲烷溶解并定容至 100 mL,内标物 2,6-二氯甲苯浓度为 0.752 1 mg/mL。

混标标准系列 I—III:分别用移液管准确量取混标溶液 I—III 0.01 mL, 0.05 mL, 0.10 mL, 0.50 mL, 1.00 mL, 3.00 mL, 5.00 mL, 7.00 mL 和 9.00 mL 于 9 个 10 mL 容量瓶中,再各加入 1.00 mL 内标溶液,用二氯甲烷定容至 10 mL,得到 3 个混标标准溶液系列。

1.2.2 样品前处理 按照国标 GB/T 19609—2004 条件,使用 RM20H 盘式自动吸烟机,用剑桥滤片捕集某品牌成品卷烟主流烟气总粒相物(TPM),每个滤片捕集 20 支卷烟的 TPM。然后按文献[15]方法萃取并分离,得到中性成分萃取液。

1.2.3 半制备 HPLC 分离操作 半制备 HPLC 分离条件与文献[15]相同,馏分收集条件为:将中性成分浓缩液进样 0.2 mL,收集 0~160 min 的馏分。鉴于定量分析时某些香味成分同时存在于多个馏分中,计算含量需将其加和,可能有较大误差,因此,本研究对收集馏分的时间段进行选择。在各时间段收集的馏分中分别加入内标溶液 0.05 mL,然后浓缩至 0.5 mL,得到待测液,其中内标物浓度与混标标准系列中内标物浓度相同,然后进行 GC-MS 分析。

1.2.4 GC-MS 分析条件确定 色谱条件如下。Agilent HP-5MS 色谱柱(30 m ×

250 μm \times 0.25 μm);进样口温度 280 $^{\circ}\text{C}$;载气为高纯氦气(99.999%),流速 1.0 mL/min;馏分 I 待测液升温程序:初始温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 4 min,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 98 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 170 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$;馏分 II 和 III 待测液升温程序:初始温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 4 min,以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 100 $^{\circ}\text{C}$ 保持 10 min,以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 140 $^{\circ}\text{C}$,以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 170 $^{\circ}\text{C}$,再以 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 240 $^{\circ}\text{C}$,结束;3 个待测液均为不分流进样,进样量为 1.0 μL .

质谱条件如下:传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度 280 $^{\circ}\text{C}$,四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$;电子倍增器电压 2.28 kV;电离方式为电子轰击(EI),电子能量 70 eV;溶剂延迟 8 min;扫描质量范围(m/z) 35 ~ 500,定量分析时采用选择离子监测(SIM)工作方式.

2 结果与讨论

2.1 收集馏分时间段的选择

按 1.2.3 方法共收集到 12 个馏分,馏分 5—馏分 9 的总离子流色谱图(TIC)的局部图如图 1 所示,其中峰号(化合物编号)与 1.1 节中编号相同.从图 1 可以看出,在选定的 45 种香味成分中,苯甲醛(1 $^{\#}$)、苯乙醛(22 $^{\#}$)和香叶基丙酮(30 $^{\#}$)等存在交叉现象:苯甲醛(保留时间为 10.71 min)存在于馏分 5 中,馏分 6 中未检出;苯乙醛(保留时间为 15.45 min)从馏分 6 开始流出,直到馏分 8,馏分 9 中未检出;香叶基丙酮(保留时间为 50.95 min)从馏分 6 开始流出,直到馏分 7,馏分 8 中未检出.由此可知,如果把馏分 6—馏分 8 合并则苯乙醛和香叶基丙酮将不再交叉,根据同样的分析方法可得,馏分 1—馏分 5 和馏分 9—馏分 12 合并后其他有交叉的待测成分也将分开,这就意味着,把收集

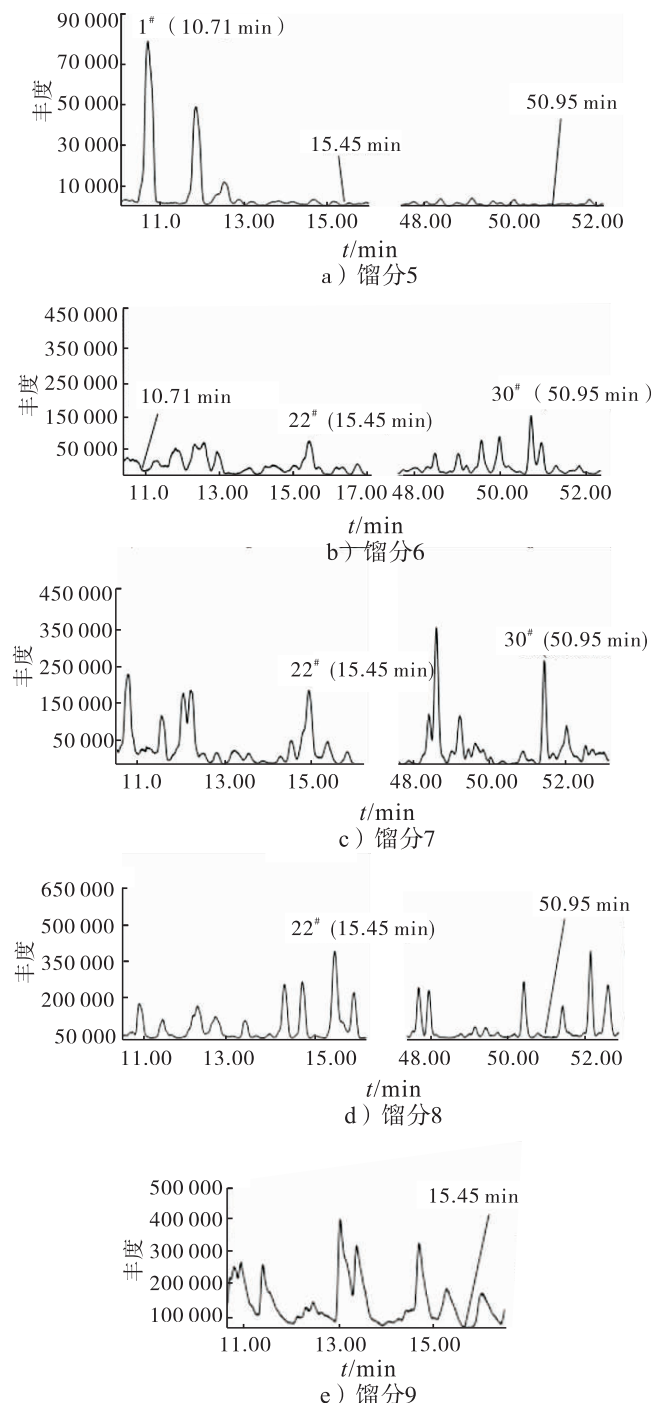


图 1 馏分 5—馏分 9 的局部总离子流色谱图

Fig. 1 Partial TIC of the fraction 5—9

馏分时间调整为 3 个时间段,分别收集 3 个馏分,将不存在交叉现象.因此,经过多次实验最终确定了收集馏分时间段:收集 0 ~ 55 min 的馏分为馏分 I;收集 55 ~ 64 min 的馏分为馏分 II;收集 64 ~ 160 min 的馏分为馏分 III.在此条

件下接收的 3 个馏分的待测液按 1.2.4 节的 GC-MS 分析条件进行分析。

2.2 GC-MS 分析模式

按 1.2.4 节的 GC-MS 分析条件对 3 个馏分进行 GC-MS 分析. 由各自的总离子流色谱图可知,待测定的 45 种化合物在 3 个馏分中不存在交叉现象,可采用与标准品质谱图和保留时间对照并参考库检索的方法对各成分进行定性鉴定。

由定性分析结果确定各馏分中待测香味成

分,再由 3 个馏分中各自含有的待测成分分别配制 3 个混标溶液(方法同 1.2.1 节所述),在与馏分相同的 GC-MS 分析条件下,混标溶液 I 和馏分 I 待测液 TIC 如图 2 所示(馏分 II 和馏分 III 的 TIC 分析同馏分 I,故未给出),其中化合物编号与 1.1 节中编号相同。

由图 2b) 可知,馏分 I 中确定了苯甲醛(1[#])等 19 种待测成分. 其中苯甲醛(1[#])、苯乙酸乙酯(12[#])和苯甲酸苄酯(18[#])等是由烟叶自身所含的香气成分转移而来,它们分别具有

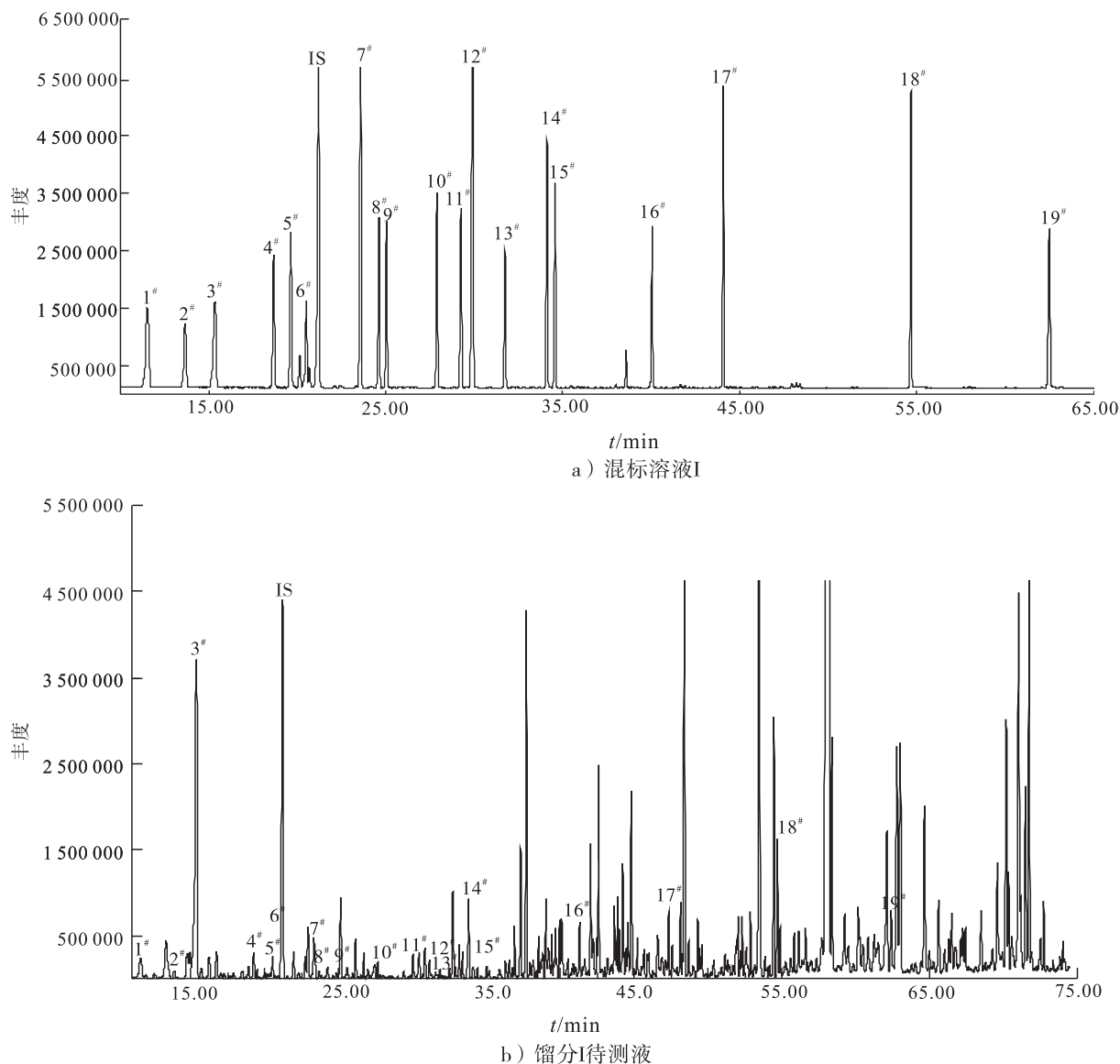


图 2 混标溶液 I 和馏分 I 中香味成分总离子流色谱图

Fig. 2 TIC of the aromatic components in mixed standard solution I and fraction I

杏仁香、甜香和膏香;二氢大马酮($16^{\#}$)和 β -环化柠檬醛($10^{\#}$)等香味成分可能是由烟叶中的类胡萝卜素降解产生,具有典型的清甜香气,这些化合物都是烟气中的关键致香成分^[16]。

由图2还可以看出,由于馏分I中所含中性香味成分较多,尽管对GC-MS分析条件进行了优化,待测定的19种化合物仍然不能完全达到基线分离(另外两个馏分也存在该现象),所以定量分析时采用SIM模式。SIM模式通过

适当选择离子,跳跃式扫描所选离子质量,可消除其他成分对待测成分的干扰,提高待测成分的分度^[17]。选择离子列于表1,所得馏分I中香味成分的选择离子流色谱图如图3所示。

由图3可知,待测定的化合物完全分离,可满足定量分析的要求。馏分II和馏分III的选择离子流色谱图分析同馏分I,故未给出,馏分II和馏分III中各待测成分均能达到基线分离。

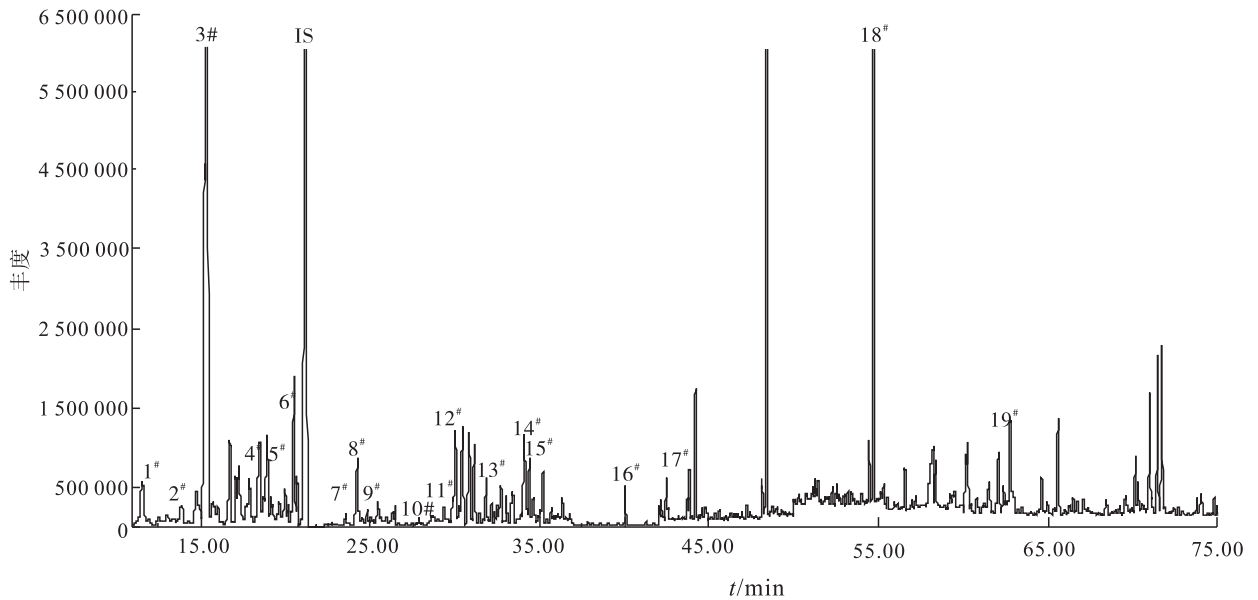


图3 馏分I中香味成分的选择离子流色谱图

Fig. 3 Selected ion chromatogram of the aromatic components in fraction I

表1 各组分的线性方程、相关系数、检出限、定量限、线性范围和选择离子

Table 1 Linear equations, correlation coefficients, limits of detection, limits of quantification linear range and the selection of the components

化合物编号	线性方程	相关系数	检出限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	定量限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	线性范围 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	选择离子 (m/z)
1 [#]	$Y = 20.17X - 1.071 \times 10^{-2}$	0.999 7	3.50	11.66	0.298 8 ~ 268.9	77, 106
2 [#]	$Y = 10.91X - 1.138 \times 10^{-2}$	0.999 5	2.23	7.42	0.284 9 ~ 256.4	81, 98
3 [#]	$Y = 12.33X - 3.003 \times 10^{-4}$	0.999 9	1.23	4.11	0.215 7 ~ 194.1	68, 136
4 [#]	$Y = 17.88X - 1.917 \times 10^{-2}$	0.999 6	2.40	7.98	0.254 6 ~ 230.0	91, 119
5 [#]	$Y = 30.64X - 3.795 \times 10^{-3}$	0.999 9	1.96	6.55	0.290 1 ~ 261.1	77, 105
6 [#]	$Y = 10.62X + 1.640 \times 10^{-3}$	0.999 9	2.19	7.31	0.214 9 ~ 193.4	70, 119
7 [#]	$Y = 10.53X + 1.350 \times 10^{-2}$	0.999 5	3.59	11.97	0.215 4 ~ 193.9	70, 112
8 [#]	$Y = 31.38X - 2.081 \times 10^{-2}$	0.999 8	1.18	3.94	0.258 9 ~ 233.0	108, 150
9 [#]	$Y = 14.23X - 1.735 \times 10^{-2}$	0.999 6	7.37	24.58	0.247 0 ~ 222.3	105, 133

续表 1

化合物 编号	线性方程	相关 系数	检出限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	定量限 $/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	线性范围 $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	选择离子 (m/z)
10 [#]	$Y = 11.21X - 5.878 \times 10^{-3}$	0.999 9	2.22	7.40	0.303 2 ~ 272.9	109,137
11 [#]	$Y = 18.37X - 8.914 \times 10^{-3}$	0.999 9	3.62	12.05	0.261 7 ~ 235.5	105,133
12 [#]	$Y = 33.45X + 5.530 \times 10^{-2}$	0.999 6	6.58	21.93	0.256 9 ~ 231.2	91,164
13 [#]	$Y = 6.299X - 4.083 \times 10^{-3}$	0.999 9	7.28	24.27	0.247 8 ~ 223.0	68,150
14 [#]	$Y = 49.89X + 7.167 \times 10^{-3}$	0.999 7	2.40	8.00	0.325 4 ~ 292.9	91,135
15 [#]	$Y = 30.22X - 8.283 \times 10^{-3}$	0.999 9	3.48	11.60	0.282 7 ~ 254.4	105,133
16 [#]	$Y = 11.31X - 7.045 \times 10^{-3}$	0.999 8	5.05	16.83	0.231 1 ~ 208.0	177,192
17 [#]	$Y = 21.75X + 3.047 \times 10^{-3}$	0.999 7	4.69	15.64	0.275 5 ~ 248.0	58,198
18 [#]	$Y = 27.07X - 4.338 \times 10^{-2}$	0.999 6	7.00	23.32	0.301 1 ~ 271.0	105,212
19 [#]	$Y = 10.87X + 2.670 \times 10^{-3}$	0.999 7	1.26	4.18	0.254 3 ~ 228.9	67,82
20 [#]	$Y = 30.53X + 4.515 \times 10^{-3}$	0.999 9	0.66	2.20	0.284 3 ~ 255.9	95,126
21 [#]	$Y = 8.36X + 9.912 \times 10^{-3}$	0.999 5	2.88	9.60	0.211 6 ~ 190.4	108,126
22 [#]	$Y = 32.4X + 1.333 \times 10^{-2}$	0.999 9	0.66	2.21	0.227 9 ~ 205.1	91,120
23 [#]	$Y = 22.62X + 1.002 \times 10^{-2}$	0.999 9	1.85	6.16	0.222 4 ~ 200.2	105,120
24 [#]	$Y = 17.58X + 1.643 \times 10^{-2}$	0.999 5	0.91	3.03	0.227 9 ~ 205.1	58,142
25 [#]	$Y = 14.52X + 2.553 \times 10^{-3}$	0.999 9	3.42	11.41	0.244 9 ~ 220.4	91,134
26 [#]	$Y = 11.25X + 3.590 \times 10^{-3}$	0.999 8	4.71	15.92	0.201 4 ~ 181.3	105,134
27 [#]	$Y = 27.8X + 3.388 \times 10^{-3}$	0.999 9	3.57	11.89	0.241 8 ~ 217.6	91,150
28 [#]	$Y = 13.55X - 2.629 \times 10^{-2}$	0.999 8	13.06	43.55	0.255 2 ~ 229.7	119,134
29 [#]	$Y = 21.51X + 8.645 \times 10^{-3}$	0.999 8	1.42	4.74	0.251 4 ~ 226.3	58,71
30 [#]	$Y = 9.658X - 1.469 \times 10^{-3}$	0.999 7	4.91	16.37	0.212 2 ~ 191.0	69,151
31 [#]	$Y = 31.11X + 9.952 \times 10^{-3}$	0.999 6	9.20	30.67	0.291 4 ~ 262.3	177,192
32 [#]	$Y = 6.974X - 1.089 \times 10^{-3}$	0.999 6	4.57	15.24	0.241 3 ~ 217.2	69,262
33 [#]	$Y = 18.9X - 1.658 \times 10^{-2}$	0.999 6	4.00	13.34	0.297 0 ~ 267.3	53,110
34 [#]	$Y = 23.21X + 2.635 \times 10^{-4}$	0.999 9	1.43	4.75	0.296 6 ~ 266.9	57,112
35 [#]	$Y = 14.55X - 9.508 \times 10^{-3}$	0.999 8	1.64	5.46	0.263 9 ~ 237.5	79,108
36 [#]	$Y = 33.35X - 2.565 \times 10^{-2}$	0.999 8	1.21	4.03	0.254 0 ~ 228.6	91,122
37 [#]	$Y = 38.73X - 2.667 \times 10^{-3}$	0.999 9	0.55	1.85	0.265 4 ~ 238.9	82,138
38 [#]	$Y = 27.16X + 4.166 \times 10^{-3}$	0.999 9	1.28	4.28	0.410 7 ~ 369.6	95,152
39 [#]	$Y = 11.55X - 3.469 \times 10^{-3}$	0.999 9	2.18	7.27	0.259 3 ~ 233.4	71,138
40 [#]	$Y = 27.19X - 8.963 \times 10^{-3}$	0.999 9	4.60	15.34	0.293 7 ~ 264.3	69,156
41 [#]	$Y = 19.57X - 2.265 \times 10^{-2}$	0.999 8	4.75	15.83	0.246 6 ~ 221.9	69,154
42 [#]	$Y = 13.23X - 1.324 \times 10^{-3}$	0.999 9	1.50	4.99	0.257 8 ~ 232.0	121,194
43 [#]	$Y = 22.24X + 1.331 \times 10^{-3}$	0.999 9	1.41	4.72	0.278 2 ~ 250.4	111,180
44 [#]	$Y = 15.74X - 2.272 \times 10^{-2}$	0.999 7	1.77	5.90	0.242 6 ~ 218.3	132,159
45 [#]	$Y = 7.782X - 1.746 \times 10^{-2}$	0.999 6	1.29	4.32	0.200 4 ~ 180.4	69,136

2.3 线性方程、检出限和定量限分析

按照 1.2.4 节的条件对混标标准系列 I—III 进行分析,分别以相应化合物色谱峰面积与内标的色谱峰面积之比(Y)为纵坐标,以浓度(X)为横坐标拟合标准曲线,再分别按 3 倍信

噪比(S/N)和 10 倍信噪比计算各成分的检出限和定量限.各组分的线性方程、相关系数、检出限、定量限、线性范围和选择离子见表 1,化合物编号同 1.1 节.

由表 1 可知,各组分线性方程的相关系数

均大于0.999 0,这45种化合物的测定线性关系良好且线性范围较宽。从线性方程式中常数项可以看出,该方法系统误差小、准确度较高。该方法的检出限为0.55~13.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为1.85~43.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$,检出限和定量限远远低于各成分的含量(见表2),说明该方法的灵敏度较高。

2.4 样品测定和回收率实验结果

2.4.1 样品测定结果 按照1.2.2节的方法处理卷烟样品,并按1.2.3节的半制备HPLC分离条件得到3个馏分的萃取液,再按1.2.4节中的GC-MS分析条件对3个馏分进行分析。测定样品中45种关键香味成分的含量,平行测定5次,通过内标标准曲线法计算样品中各目

标化合物的平均含量和相对标准偏差 RSD_1 ,结果见表2,化合物编号同1.1节。

2.4.2 回收率实验结果 在实际样品中添加一定量的标样来测定回收率。在截留主流烟气总粒相物的剑桥滤片上加入待测成分的标准品,加入量见表2,按1.2.2节的方法处理,然后再按1.2.3和1.2.4节条件进行分析。重复5次,根据样品中各目标化合物的平均含量、加标量和加标后平均含量计算平均回收率和 RSD_2 ,结果见表2。

由表2可以看出,在所测定的某品牌成品卷烟烟气中,含量较高的成分分别是D-柠檬烯(3[#]) (果香)、苯乙酮(23[#]) (橙花香)、5-甲基糠醛(33[#]) (烤甜香)、苯甲醇(35[#]) (花香)

表2 样品测定、回收率与精密度实验结果($n=5$)

Table 2 Results of samples determination and recovery precision test($n=5$)

化合物编号	化合物平均含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1})$	加标量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1})$	加标后平均含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1})$	平均回收率/%	RSD_1 /%	RSD_2 /%	化合物编号	化合物平均含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1})$	加标量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1})$	加标后平均含量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{支}^{-1})$	平均回收率/%	RSD_1 /%	RSD_2 /%
1 [#]	0.094	0.149	0.207	75.33	3.09	1.72	24 [#]	0.036	0.114	0.137	88.60	3.44	1.47
2 [#]	0.055	0.142	0.153	68.60	5.09	2.78	25 [#]	0.103	0.122	0.188	69.60	1.67	2.80
3 [#]	3.110	0.108	3.211	93.57	1.39	0.98	26 [#]	0.027	0.101	0.108	80.19	1.28	1.81
4 [#]	0.049	0.127	0.155	83.62	4.95	1.75	27 [#]	0.364	0.121	0.460	79.53	0.21	2.86
5 [#]	0.015	0.145	0.113	67.89	5.36	3.14	28 [#]	0.072	0.128	0.182	86.12	0.30	1.09
6 [#]	0.193	0.107	0.282	82.59	2.55	1.19	29 [#]	0.022	0.126	0.111	70.90	5.56	1.35
7 [#]	0.014	0.108	0.095	75.61	2.54	6.57	30 [#]	0.980	0.106	1.051	67.39	5.59	8.26
8 [#]	0.098	0.129	0.210	86.77	5.59	4.90	31 [#]	0.048	0.146	0.151	70.77	0.86	3.78
9 [#]	0.025	0.124	0.113	71.32	5.09	1.40	32 [#]	0.330	0.121	0.418	72.78	0.79	0.62
10 [#]	0.015	0.152	0.115	65.71	2.49	0.88	33 [#]	1.873	0.149	1.997	83.77	1.59	0.35
11 [#]	0.013	0.131	0.097	64.39	1.43	2.01	34 [#]	0.230	0.148	0.365	90.87	0.64	1.10
12 [#]	0.183	0.128	0.279	74.90	2.59	0.47	35 [#]	0.406	0.132	0.514	81.98	1.14	1.29
13 [#]	0.030	0.124	0.135	85.11	1.15	2.07	36 [#]	0.550	0.127	0.660	86.31	0.84	0.74
14 [#]	0.051	0.163	0.180	79.51	6.18	3.11	37 [#]	0.170	0.133	0.272	76.50	3.68	0.54
15 [#]	0.013	0.141	0.106	65.50	2.84	2.47	38 [#]	0.108	0.205	0.240	64.40	1.97	1.80
16 [#]	0.053	0.116	0.152	85.60	1.58	1.01	39 [#]	0.198	0.130	0.303	80.90	0.13	1.15
17 [#]	0.063	0.138	0.166	74.59	8.33	3.77	40 [#]	0.057	0.147	0.168	75.60	5.24	1.30
18 [#]	0.225	0.151	0.326	66.90	4.07	2.80	41 [#]	0.039	0.123	0.150	90.29	6.19	3.60
19 [#]	0.027	0.127	0.143	91.01	8.31	2.10	42 [#]	0.069	0.129	0.161	71.10	0.48	1.39
20 [#]	0.016	0.142	0.136	84.39	2.84	4.44	43 [#]	0.480	0.139	0.580	71.78	0.58	1.47
21 [#]	0.017	0.106	0.086	65.49	1.23	3.25	44 [#]	0.360	0.121	0.463	84.73	7.65	4.02
22 [#]	0.450	0.114	0.530	70.03	1.15	1.73	45 [#]	0.095	0.100	0.172	77.04	0.90	0.68
23 [#]	1.620	0.111	1.711	81.64	6.30	0.50							

和苯乙醇(36[#])(花香)^[16],这些香气成分对该品牌卷烟烟气的风格特征有重要贡献.所测卷烟烟气中,各目标化合物的平均回收率在64.39%~93.57%之间,相对标准偏差均小于10%,说明该方法是一种痕量分析方法(即样品中待测组分含量低于百万分之一的分析方法),重现性好.由于烟气中各致香成分含量低且干扰成分较多,在分离除杂过程中含量有所损失,故某些成分的回收率较低,但是都在64.39%以上,能满足痕量成分定量分析要求.与烟气中性香味成分定量分析文献[7-8]方法相比,本文方法在测定的中性香味成分数量(采用内标标准曲线法)与方法的灵敏度和准确度等方面均有较大提高.

3 结论

本文对卷烟样品主流烟气中性香味成分的半制备 HPLC 与 GC-MS 分析进行了研究.通过对半制备 HPLC 分离馏分收集条件的优化,根据馏分收集时间段的选择,制备出3个馏分.各馏分中的目标化合物能得到很好的分离,且待测45种化合物在3个馏分中不存在交叉现象.馏分中各香味成分含量相对较高且各待测物只存在于1个馏分中,有利于分离与含量测定,待测目标化合物完全分离,可满足定量分析要求.GC-MS 内标标准曲线分析结果表明,各组分线性方程相关系数均大于0.999 0;该方法的检出限为0.55~13.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为1.85~43.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$,远低于各成分含量,说明该方法灵敏度较高.所测定的某品牌成品卷烟烟气中,各目标化合物的平均回收率为64.39%~93.57%,相对标准偏差均小于10%,说明该方法能满足痕量成分定量分析要求,重现性较好.

参考文献:

[1] 谢剑平,王元英,郑新章,等.烟草科学与技术

发展现状与趋势[C]//2009—2010烟草科学与技术学科发展报告.北京:中国烟草学会,2010:45.

- [2] 李莉,张毅,王秀娟,等.烟草制品中香精香料分析方法进展[J].中国卫生检验杂志,2013(2):525.
- [3] 鲁喜梅,谢复炜,刘晖,等.卷烟主流烟气总粒相物中挥发性和半挥发性有机酸的分析[J].烟草科技,2006(6):24.
- [4] 郑阳,许秀丽,纪顺利,等.固相萃取结合气相色谱-串联质谱法测定烟草制品中23种酯类香料[J].色谱,2016(5):512.
- [5] 孙玉利,王晓瑜,刘绍锋,等.串联冷阱捕集-气相色谱/质谱法分析卷烟主流烟气的相成分[J].烟草科技,2016(3):52.
- [6] 洪华俏,郭紫明,易克,等.卷烟主流烟气的中性和碱性香气成分分析[J].湖南农业科学,2008(3):140.
- [7] 洪华俏,郭紫明,易克,等.卷烟主流烟气的中性香气成分分析[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2008(2):164.
- [8] 蔡君兰,赵明月,陈勇,等.卷烟主流烟气和侧流烟气中半挥发性成分的分析研究[J].中国烟草学报,2003(4):3.
- [9] 鹿洪亮,赵明月,刘惠民,等.全二维气相色谱飞行时间质谱分析烤烟半挥发性中性化学成分[J].中国烟草学报,2007(1):20.
- [10] DING Y, ZHU L J, LIU S M, et al. Analytical method of free and conjugated neutral aroma components in tobacco by solvent extraction coupled with comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1280:122.
- [11] LU X, CAI J L, KONG H W. Analysis of cigarette smoke condensates by comprehensive two-

- dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry I acidic fraction[J]. Analytical Chemistry, 2003, 75(17):4441.
- [12] XIANG Z M, CAI K, LIANG G L, et al. Analysis of volatile flavour components in flue-cured tobacco by headspace solid-phase microextraction combined with GC × GC-TOF MS [J]. Analytical Methods, 2014(6):3300.
- [13] 王维刚, 许嵩飞, 唐桂芳. 国内外烟草碱性香味物质分析研究进展[J]. 科技与企业, 2015(16):230.
- [14] 李国政, 邱建华, 张峻松, 等. 气质联用法测定烟用搭口胶热裂解产物中的苯系物[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2014, 29(5):44.
- [15] 贾春晓, 文金昉, 马宇平, 等. 半制备型高效液相色谱结合气相色谱-质谱联用法分析卷烟烟气中性香味成分[J]. 分析试验室, 2016(7):831.
- [16] 毛多斌, 马宇平, 梅业安. 卷烟配方和香精香料[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 89 - 121.
- [17] 陈培榕, 邓勃. 现代仪器分析实验与技术[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999: 271 - 272.

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、91 阅读网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我刊上述声明。



引用格式:黄申,夏璠,魏涛,等.烟叶中西柏三烯-4,6-二醇降解产香菌的分离与鉴定[J].轻工学报,2017,32(6):73-80.

中图分类号:TS41⁺³ 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.009

文章编号:2096-1553(2017)06-0073-08

烟叶中西柏三烯-4,6-二醇降解产香菌的分离与鉴定

Isolation and identification of a cembratriene-4,6-diol degradation and aroma producing strain from tobacco leaf

黄申¹,夏璠^{1,3},魏涛¹,贾春晓²,钱玉梅¹,毛多斌¹

HUANG Shen¹,XIA Fan^{1,3},WEI Tao¹,JIA Chun-xiao²,QIAN Yu-mei¹,MAO Duo-bin¹

1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院,河南 郑州 450001;

2. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001;

3. 湖北中烟有限责任公司 武汉卷烟厂,湖北 武汉 430051

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

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

3. Wuhan Cigarette Factory, China Tobacco HuBei Industrial Co., Ltd., Wuhan 430051, China

关键词:

西柏三烯-4,6-二醇;分离鉴定;降解率;金合欢醛;新鞘氨醇杆菌

Key words:

cembratriene-4,6-diol; isolation and identification; degradation rate; farnesol; *Novosphingobium panipatense*

摘要:采取稀释涂布平板法和平板划线法,从调制陈化后的烟叶中分离得到一株高效降解西柏三烯-4,6-二醇的菌株 YII-3。以西柏三烯-4,6-二醇为唯一碳源,该菌株降解产物主要为金合欢醛(8.57%)。根据形态特征和 16S rDNA 系统进化树分析,初步鉴定菌株 YII-3 为新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium panipatense*)。该菌株在含有西柏三烯-4,6-二醇发酵培养基中培养 66 h 后,底物降解率达到 75.58%。

收稿日期:2016-12-31;修回日期:2017-03-29

基金项目:国家自然科学基金项目(21546012);国家烟草专卖局重点实验室专项项目(中烟办[2014]334号);河南省高等学校重点科研项目(15A180064);郑州轻工业学院博士基金项目(2014BSJJ068,2014BSJJ072)

作者简介:黄申(1981—),男,河南省淮阳县人,郑州轻工业学院讲师,博士,主要研究方向为烟草生物技术和生物化工。

通信作者:毛多斌(1962—),男,河南省南阳市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草化学和烟草香精香料。

Abstract: A high efficient cembratriene-4,6-diol degradation strain Y11-3 was isolated from tobacco leaf with spread plate and streak plate methods. The cembratriene-4,6-diol was the only carbon source, and the major degradation products were farnesal (8.57%). This strain Y11-3 was identified preliminarily as *Novosphingobium panipatense* through the analysis of classical morphology and 16S rDNA sequence of phylogenetic tree. The strain was cultured in the fermentation medium containing cembratriene-4,6-diol, the degradation rate of substrates reached 74.58% after 66 h.

0 引言

西柏烯类化合物是烟草中的一类大环双萜类物质,主要存在于烟叶表面腺毛分泌物中,也存在于烟草种子和烟草花中^[1],总量占烟叶鲜叶重的2%~10%。其中以西柏三烯-4,6-二醇的含量最为丰富,约占烟叶鲜叶重的0.7%^[2-3]。

西柏烯类化合物也是烟草中一类重要的香味前体物质^[4],在烟草生长过程中,其含量逐渐增加,但在调制、陈化过程中会发生一系列降解反应且陈化前期降解速度较陈化后期更快^[5]。降解反应生成了重要的中性香味成分,例如茄酮、茄尼呋喃,以及茄酮的降解产物如降茄二酮^[6]、茄醇、茄酸和酯类等,它们对卷烟的香味、香气品质起着关键的作用。

西柏三烯-4,6-二醇类化合物的降解方式一般有两种:一种是在氧化剂或光作用下进行;另一种是在生物催化作用下进行。经过一系列的转化,西柏三烯-4,6-二醇类物质可以转化为C8—C18碳原子数不同的香味成分。利用CrO₃在硫酸水溶液和丙酮水溶液中氧化西柏三烯-4,6-二醇,得到包括降茄二酮在内的8种主要产物^[7-9]。光催化降解西柏三烯-4,6-二醇后,11,12号位双键易环氧化。利用雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)的植物细胞催化降解西柏三烯-4,6-二醇后发现,11,12号位双键易环氧化,同时发现10,12和13号位键易羟基化。利用美花烟草(*Nicotiana sylvestris*)的植物细胞、细胞均质体、无细胞提取物和细胞小球分别作为催化剂降解西柏三烯-4,6-二醇后,其降

解产物与雷公藤催化降解的产物相似^[10-13]。

目前,鲜见西柏三烯-4,6-二醇生物降解为香味物质的研究。本文拟利用微生物学方法从烟叶中筛选西柏三烯-4,6-二醇降解菌株,并对其进行鉴定和降解能力研究,以期西柏三烯-4,6-二醇生物降解和降解途径的研究提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和仪器

样品的采集:用于筛选西柏三烯-4,6-二醇降解菌的样品主要采集于河南、云南、重庆、四川、广西、湖南、贵州等地的调制后烟叶,其产地与品种见表1,烟叶等级均为C3F。

表1 调制烟叶样品产地与品种
Table 1 Samples of modulated tobacco leaf from different origin and variety

分类	产地	烟叶品种
一	吉林	晒红烟(雪茄)
	许昌	K326
	曲靖	Cc27
	重庆	云烟85
	什邡	古巴4号
二	许昌	中烟100
	陕县	秦烟96
	四川	NC297
	贵州	贵烟6号
	四川	亚布力晒烟
三	衡阳	NC89
	襄县	Y056
	洛阳	云烟87
	陕县	云烟97
	三明	Y077
四	广西	NC102
	湖南	LY30605
	许昌	QF232
	永州	Y8123

试剂和仪器:西柏三烯-4,6-二醇标样,纯度 $\geq 98\%$,郑州轻工业学院相关实验室制;Agilent6890a/5975c GC-MS 色谱联用仪,Agilent 公司产;J6-MI 冷冻离心机,美国 Beckman 公司产;2600 UC/VIS 紫外可见分光光度计,美国 UNIC 公司产;NIE802 显微镜,日本尼康公司产。

富集培养基: K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, $NaNO_3$ 3 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, 蔗糖 30 g/L。

发酵培养基: K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g/L, NaCl 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.65 g/L, $MnSO_4$ 0.001 g/L, $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ 0.5 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.005 g/L。在此基础上加 300 mg/L 西柏三烯-4,6-二醇(纯度 $\geq 98\%$,原料来自三门峡市陕县河南中烟烟叶种植基地,品种为豫烟 100,采集部位为成熟上部叶片)^[14]。

固体培养基:在发酵培养基的基础上添加 2% 的琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 菌种的筛选

1.2.1.1 菌源的富集 按表 1 分类分别称取新鲜烟叶、调制后的烟叶各 10 g,在超净工作台,用剪刀剪碎烟叶,分别放入 250 mL 三角瓶中,依次加入 100 mL 无菌水,浸泡过夜;分别用灭菌枪头移取 200 μ L 到 20 mL 的察式培养基和 LB 培养基内,30 $^{\circ}C$ 转速 150 r/min 条件下培养 2 d,得到菌源。

1.2.1.2 初筛 所有接种工作都在超净工作台上进行。移取 1 mL 经富集培养得到的菌源至 100 mL 发酵培养基中,以不加菌源的发酵培养基和 不加西柏三烯-4,6-二醇作为对照,培养 2 d,通过观察摇瓶的变化,并用 GC-MS 检测,与对照的 GC-MS 检测图进行对比,挑选出能降解西柏三烯-4,6-二醇的样品,分别移取

1 mL 样品到灭菌完成的发酵培养基中,然后依次进行梯度稀释,分别选择 10^{-2} 和 10^{-4} 这两个浓度梯度,在固体培养基上用稀释涂布平板法进行平板涂布,每个浓度梯度平行涂布 3 个平板,同时对不含有底物西柏三烯-4,6-二醇的平板进行涂布并将其作为对照组。将涂布好的平板于 30 $^{\circ}C$ 培养箱中培养 2~3 d,挑选出形态较好的单菌落,用平板划线法反复进行划线分离纯化,直到平板上无杂菌落出现,即可确认为纯培养菌。

1.2.1.3 复筛 将筛选到的单菌落经过活化培养后,接种到 100 mL 发酵培养基内,在 30 $^{\circ}C$,转速 150 r/min 条件下摇床培养 2 d。通过观察摇瓶的变化,并用 GC-MS 检测降解产物,进一步筛选能降解西柏三烯-4,6-二醇的菌株^[15]。

1.2.2 溶液制备

1.2.2.1 西柏三烯-4,6-二醇标准储备液的配制 准确称取西柏三烯-4,6-二醇标准品 65.93 mg,用色谱级 CH_2Cl_2 溶解,并定容到 50 mL 容量瓶中,得到一定浓度的标准储备液,置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱中贮存,备用。

1.2.2.2 不同浓度梯度的西柏三烯-4,6-二醇标准溶液的配制 准确量取西柏三烯-4,6-二醇标准储备液 0.1 mL,0.3 mL,0.5 mL,1.0 mL,3.0 mL,5.0 mL,7 mL,10 mL,用色谱级 CH_2Cl_2 定容到 10 mL 容量瓶中,摇匀,即得到含有不同浓度梯度的西柏三烯-4,6-二醇标准溶液。

1.2.3 降解产物的分析检测

1.2.3.1 降解产物的萃取 取 100 mL 发酵液,在 12 000 r/min 条件下离心 30 min,取上清液与等体积的 CH_2Cl_2 在分液漏斗中进行萃取,缓缓摇晃,使两相混合均匀;静置 10 min 后,收集下层有机相;重复以上步骤 5 次,合并有机相,加入无水硫酸钠干燥,静置过夜;过滤,旋转

蒸发除去 CH_2Cl_2 后,加入 1 mL 色谱级 CH_2Cl_2 溶解,过 0.45 μm 有机系滤膜后即可进行 GC-MS 分析检测. 以上操作均在避光环境中进行.

1.2.3.2 分析检测条件的确定 色谱条件: HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm); 进样口温度 280 $^\circ\text{C}$; 以高纯氮气作载气,流速为 1 mL/min; 升温程序为初始温度 50 $^\circ\text{C}$,以 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 200 $^\circ\text{C}$,以 3 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的升温速度升至 260 $^\circ\text{C}$ 结束;分流比 3:1;进样量为 1 μL ;GC-MS 采用全扫描模式.

质谱条件:传输线温度 280 $^\circ\text{C}$;离子源温度 280 $^\circ\text{C}$,四极杆温度 150 $^\circ\text{C}$;电离方式为电子轰击(EI),电子能量为 70 eV;溶剂延迟时间为 8 min;扫描质量范围(m/z)为 35—550.

1.2.3.3 降解率的测定 以接种的发酵培养基作为实验组,未接种的发酵培养基作为对照组,每次取样 10 mL,12 000 r/min 条件下离心 30 min;取上清液进行萃取、分液,旋转蒸发除去 CH_2Cl_2 后,加入 1 mL 色谱级 CH_2Cl_2 溶解,过 0.45 μm 有机系滤膜后,进行 GC-MS 分析检测,其降解率按下列公式计算:

$$\text{降解率} = \frac{\text{西柏三烯-4,6-二醇的减少量}}{\text{原西柏三烯-4,6-二醇含量}} \times 100\%$$

1.2.4 菌株鉴定

1.2.4.1 形态观察和革兰氏染色 菌株形态在显微镜下观察,菌株的革兰氏染色方法参照文献[15].

1.2.4.2 16S rDNA 序列扩增、测序和系统发育分析 用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒,提取目标菌株基因组 DNA. PCR 反应引物为真菌 16S rDNA 序列通用引物 5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT-3' (上游引物)和 5'-AGGAG-GTGATCCAGCCGCA-3' (下游引物),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成. PCR 反

应体系:Taq 酶 (5 U/ μL)0.2 μL ,上游引物 1 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)0.5 μL ,下游引物 2 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)0.5 μL ,10 \times Buffer (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)2.5 μL ,DNA 模板(50 ng/ μL)0.5 μL ,dNTP(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),ddH₂O(灭菌蒸馏水)19.8 μL . 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成. 系统发育分析根据其 16S rDNA 基因序列用 Mega 5.1 软件构建系统进化树,使用 Neighbor-Joining 法进行 1000 次步长计算.

1.2.5 菌株生长曲线和降解曲线的测定绘制

微生物的生长周期包括延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段. 在适当条件下,根据菌株在发酵培养时随时间增加表现出的群体生长趋势,可以得到菌株的生长曲线

1)将菌株接入富集培养基内,在 30 $^\circ\text{C}$,转速 150 r/min 条件下发酵 24 h.

2)配制 28 份 20 mL 发酵培养基,置于 28 个 50 mL 锥形瓶中,其中 14 瓶每瓶接种 200 μL 富集菌液,作为实验组 1,用来测定绘制降解曲线;另外 14 瓶每瓶接种 200 μL 富集菌液,作为实验组 2,用于测定绘制生长曲线. 以空白富集培养基作为对照. 以上锥形瓶均在 30 $^\circ\text{C}$,转速 150 r/min 条件下培养.

3)无菌条件下操作,分别在接种后 6 h,12 h,18 h,24 h,30 h,36 h,42 h,48 h,54 h,60 h,66 h,72 h,将实验组 1 样品离心取出上清,用 GC-MS 检测其降解率. 另由实验组 2 取出 5 mL 菌液,测其 OD₆₀₀ 值.

横坐标为培养时间,纵坐标分别为西柏三烯-4,6-二醇的含量和 OD₆₀₀ 值,绘制菌株的生长曲线和降解曲线.

2 结果与讨论

2.1 西柏三烯-4,6-二醇标准曲线

根据西柏三烯-4,6-二醇标准溶液 GC-MS 检测所得数据制作标准曲线,见图 1.

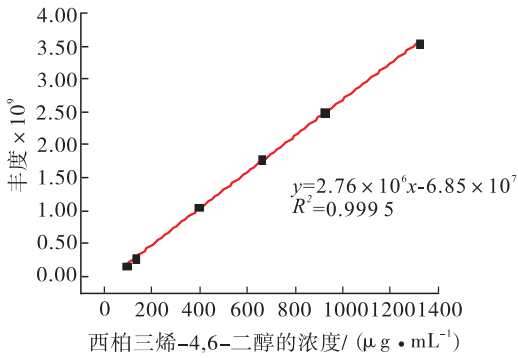


图1 西柏三烯-4,6-二醇的标准曲线

Fig.1 Calibration curve of standard sample of cembratriene-4,6-diol

由标准曲线得到西柏三烯-4,6-二醇线性方程为 $y = 2.76 \times 10^6 x - 6.85 \times 10^7$, 其中, y 为响应值, x 为西柏三烯-4,6-二醇溶液浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$. 所得标准曲线的相对标准偏差为 0.999 5, 说明该标准曲线准确可靠, 可以应用于后续实验.

2.2 西柏三烯-4,6-二醇降解菌的筛选结果

从新鲜烟叶、调制烟叶中共筛选出 11 种降解西柏三烯-4,6-二醇混菌株, 分别接种于含有西柏三烯-4,6-二醇底物的发酵培养基中进行发酵培养, 采用 GC-MS 法测定其降解能力. 这 11 株混菌株降解率的比较如图 2 所示. 由图 2 可知, 混菌株 Y11, Y13, Y16 的西柏三烯-4,6-二醇降解能力较高, 降解率分别为 79.36%, 71.77%, 79.19%.

对这 3 株混菌进行平板涂布, 依次进行梯度稀释, 共得到 5 株单菌落. 经过活化培养, 接种到发酵培养基内, 在 30 °C, 150 r/min 条件下培养 48 h, 采用 GC-MS 法测定其降解能力. 在 Y11 混菌中筛选到 3 株单菌落, 其中 3 号菌降解西柏三烯-4,6-二醇能力较高, 其降解率为 75.58%, 所以将该菌株编号为 Y11-3. 经 GC-MS 分析检测出主要生成物为金合欢醛 (8.57%) (见图 3). 金合欢醛为一种香味物质, 在化妆品和卷烟中有应用.

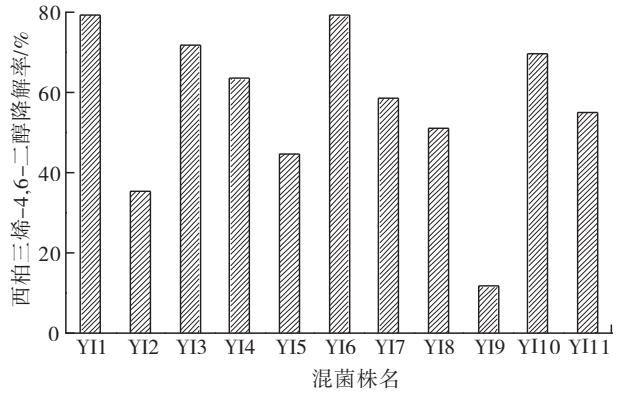


图2 11株西柏三烯-4,6-二醇降解混菌株降解率的比较

Fig.2 Comparison of the degradation rate of 11 cembratriene-4,6-diol degradation strains

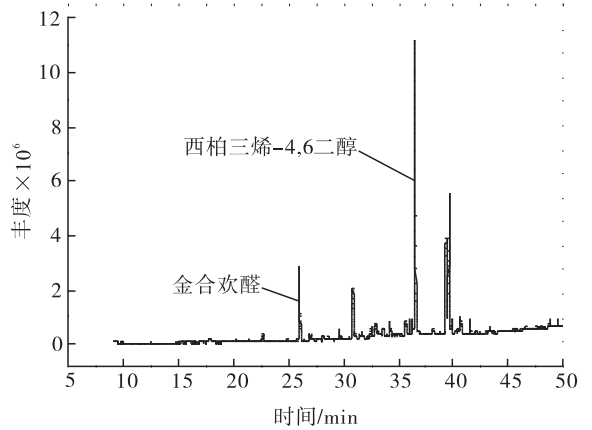


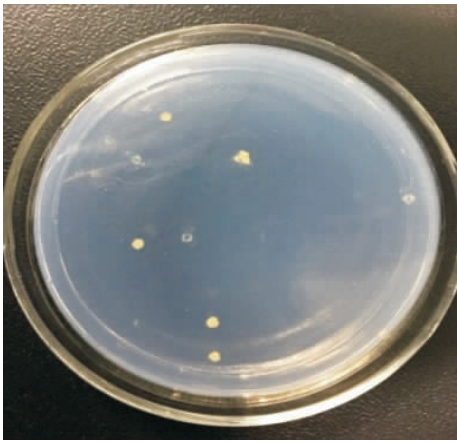
图3 菌株 Y11-3 的 GC-MS 图

Fig.3 GC-MS analysis of the degradation product of Y11-3 strain

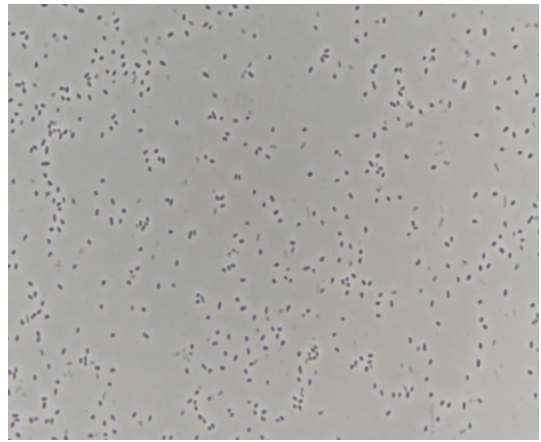
2.3 菌株鉴定

2.3.1 生理特性 将菌株 Y11-3 接种于固体培养基中, 培养 24 h 后长出菌落, 48 h 后观察 (见图 4a): 菌落呈黄色, 表面光亮, 边缘整齐, 不透明, 中央隆起, 容易挑取; 图 4b) 为 100 倍显微镜下观察到的显微形态, 可以看出该菌体大小为 $(1.0 \sim 1.5) \mu\text{m} \times (2.0 \sim 2.5) \mu\text{m}$.

2.3.2 遗传学分析 菌株 Y11-3 的 PCR 扩增电泳图见图 5, 由图 5 可以看到在 1000—1500 bp 有一明显条带. 回收该条带送至生工



a) 菌落形态



b) 细胞形态

图4 菌株 Y11-3 菌落和细胞形态

Fig.4 Colony and cell morphology of Y11-3 strain

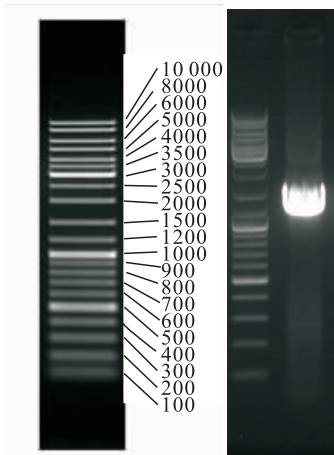


图5 菌株 Y11-3 的 PCR 扩增电泳图

Fig.5 The figure of the amplification electrophoresis of Y11-3 strain

生物工程(上海)股份有限公司武汉分公司进行测序,测序结果表明该条带大小为 1322 bp.

2.3.3 系统进化树分析 将扩增并测序得到的序列提交至 Gene Bank (ID:KY283954). 通过在 NCBI Genbank 数据库中进行 blast 同源性分析发现,菌株 Y11-3 与新鞘氨醇杆菌属 (*Novosphingobium panipatense*) 的同源性在 90% 以上. 系统进化树分析结果(见图 6)表明,菌株 Y11-3 与新鞘氨醇杆菌聚为一类. 基于形态学特征和系统发育分析,菌株 Y11-3 被初步鉴定为新鞘氨醇杆菌.

2.4 菌株的生长曲线和降解曲线

菌株 Y11-3 的生长曲线和降解曲线如图 7 所示. 从图 7 生长曲线可以看出,菌株 Y11-3 培养 18 h 后快速增长,进入对数期,随着时间的延续,菌株在培养基里吸收营养物质(西柏三烯-4,6-二醇作为碳源被利用)不断繁殖生长后导致菌株数量不断增加,到第 48 h 开始进入稳定期,一直到 66 h,并无明显增加的现象. 从图 7 降解曲线可以看出,在 6 h 前,西柏三烯-4,6-二醇降解变化并不明显,6 h 后西柏三烯-4,6-二醇的降解速度开始加快,到 36 h,西柏三烯-4,6-二醇的降解率达到 65%,36 h 后底物降解趋于平衡,继续培养至 66 h 后,西柏三烯-4,6-二醇降解率达到 75.58%.

3 结论

本文从调制陈化后的烟叶中筛选到一株高效降解西柏三烯-4,6-二醇的菌株 Y11-3,对其进行西柏三烯-4,6-二醇降解能力分析,分析与分离鉴定,得到如下结论.

1)以西柏三烯-4,6-二醇的丰度为响应值,利用 GC-MS 检测计算出标准曲线 $y = 2.76 \times 10^6 x - 6.85 \times 10^7$,标准偏差为 0.999 5,

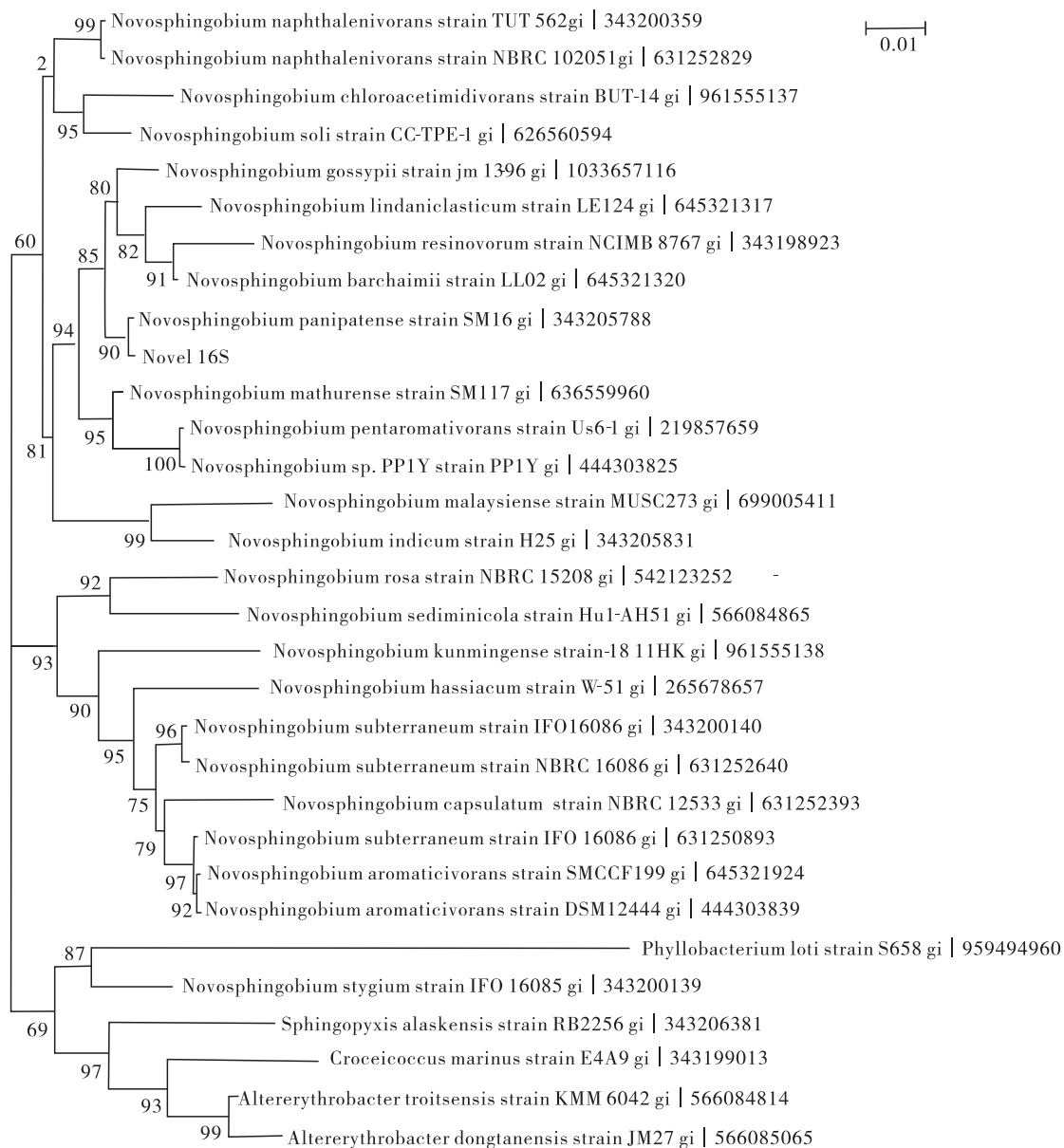


图 6 菌株 YII - 3 16S rDNA 区域序列的系统进化树分析结果(图中 Novel 16S 为 YII - 3)

Fig. 6 The analysis result of phylogenetic tree constructed from 16S rDNA sequence of strain YII-3

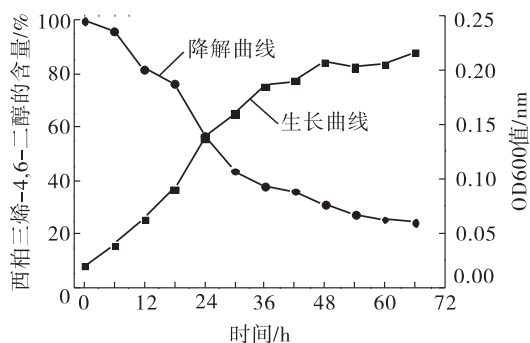


图 7 菌株 YII - 3 的生长曲线和降解曲线

Fig. 7 The growth curve and degradation curve of YII-3

标准曲线准确可靠。

2) 以西柏三烯-4,6-二醇为唯一碳源,菌株 YII - 3 能高效降解西柏三烯-4,6-二醇生成金合欢醛(8.57%)。

3) 根据形态特征和 16S rDNA 系统进化树分析,初步鉴定菌株 YII - 3 为新鞘氨醇杆菌(*Novosphingobium panipatense*)。

4) 新鞘氨醇杆菌培养 18 h 后快速增长,进入对数期,到 48 h 开始进入稳定期;在培养

66 h 后,西柏三烯-4,6-二醇降解率达到 75.58%.

参考文献:

- [1] ENZELL C R, WAHLBERG I, AASEN A J. Isoprenoids and alkaloids of tobacco [M] // Fortschritte der Chemie Organische DNA turstofe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vienna:Springer,1977: 1-79.
- [2] SEVERSON R F, JOHNSON A W, JACKSON D M. Cuticular constituents of tobacco: factors affecting their production and their role in insect and disease resistance and smoke quality [J]. Rev Adv Tob Sci,1985,11:105.
- [3] 闫克玉. 烟草化学[M]. 郑州:郑州大学出版社,2002:1-10.
- [4] ENZELL C R, WAHLBERG I. Tobacco isoprenoids-precursors of important aroma constituents [J]. Pure and Appl Chem,1990,62(7):1353.
- [5] 彭玉富,王根发,刘茂林,等. 不同陈化条件对烤烟烟叶香气成分变化的影响[J]. 河南农业大学学报,2009,43(4):349.
- [6] 毛多斌,张槐岭,贾春晓. 卷烟香味化学[M]. 郑州:河南科学技术出版社,1994:343-345.
- [7] RALDUGIN V A, FEDOROV V K, PENTEGOVA V A. Oxidative transformations of cembranoid diterpenoids I—Oxidation of cembrene with chromium trioxide [J]. Chem Nat Compd,1976,12(3):278.
- [8] RALDUGIN V A, REZVUKHIN A I, KOROTKIKH L Y, et al. Oxidative transformations of cembrane diterpenoids II—Cembra-2, 7, 11-triene-4,5-diols [J]. Chem Nat Compd,1977,13(1):46.
- [9] RALDUGIN V A, REZVUKHIN A I, KOROTKIKH L Y, et al. Oxidative transformations of cembrane diterpenoids III—Epoxycebrene [J]. Chem Nat Compd,1977,13(4):439.
- [10] RALDUGIN V A, SALENKO V L, YAROSHENKO N I, et al. Oxidative transformations of cembrane diterpenoids IV—Photooxidation of cembrene [J]. Chem Nat Compd,1981,17(1):54.
- [11] ADNARP J, CHU W L A, ENZELL C R, et al. Cheminform abstract: tobacco chemistry. Part 76. Biotransformations of tobacco isoprenoids using plant cell cultures of *Tripterygium wilfordii* [J]. Acta Chem Scand,1993,24(42):683.
- [12] ADNARP J, CHU W L A, ENZELL C R, et al. Cheminform abstract: tobacco chemistry. part 77:biotransformations of a major tobacco cembratrienediol using plant cell cultures of *Nicotiana glauca* [J]. Acta Chem Scand,1993,24(42):689.
- [13] ADNARP J, CHU W L A, ENZELL C R, et al. Cheminform abstract: tobacco chemistry. Part 78. biotransformations of tobacco cembranoids using plant cell cultures of *Nicotiana glauca* [J]. Acta Chem Scand,1993,47:793.
- [14] 何峰. 烟草中 $\alpha(\beta)$ -2,7,11-西柏三烯-4,6-二醇的分离纯化与分析及热裂解研究 [D]. 郑州:郑州轻工业学院,2015.
- [15] 贾蓓蕾,魏涛,黄申,等. α -胡萝卜素降解产香菌株的分离、鉴定及发酵条件优化 [J]. 食品与发酵工业,2015,41(1):34.



引用格式:刘绍华,白家峰,杨龙彦,等.天然烟用添加剂的开发与应用研究进展[J].轻工学报,2017,32(6):81-87.

中图分类号:TS426 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.010

文章编号:2096-1553(2017)06-0081-07

天然烟用添加剂的开发与应用研究进展

Research progress of natural tobacco additives development and application

刘绍华¹,白家峰¹,杨龙彦¹,陈义昌¹,许春平²

LIU Shao-hua¹,BAI Jia-feng¹,YANG Long-yan¹,CHEN Yi-chang¹,XU Chun-ping²

1. 广西中烟工业有限责任公司技术中心,广西南宁 530001;

2. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院,河南郑州 450001

1. Technology Center, China Tobacco Guangxi Industrial Co., Ltd., Nanning 530001, China;

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

关键词:

天然烟用添加剂;增香;保润;致香成分

Key words:

natural tobacco additives;
flavoured; humectants;
aroma components

摘要:对天然烟用添加剂中具有增香功能、保润功能、降低刺激型功能和减少杂气功能烟用添加剂的开发与应用研究现状进行了综述,指出相较于天然烟用添加剂丰富的研究成果,其应用方面的研究有待加强。未来需要围绕开发和优化卷烟配方中烟用添加剂的调配工艺并研究其理论机制、优化添加剂的配方并阐明其理论机制、提高烟用添加剂有效成分的纯度、利用微生物发酵技术开发新型烟用添加剂等方面深入开展研究,从而进一步提高卷烟感官品质,形成卷烟风格特色,以满足消费者对卷烟吸味的要求。

收稿日期:2017-03-28

基金项目:国家自然科学基金联合基金项目(U1604176);广西中烟工业有限责任公司项目(201745000034019)

作者简介:刘绍华(1962—),男,广西壮族自治区桂林市人,广西中烟工业有限责任公司研究员,博士,主要研究方向为卷烟增香保润。

通信作者:许春平(1977—),男,河南省焦作市人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为烟草香精香料。

Abstract: The development and application of natural tobacco additive with aroma-improving, moisturizing, stimulation-reducing and reducing-offensive odor functions were reviewed. It was pointed out that compared with the various research achievements of natural tobacco additive, its application needs to be further studied. In future, the focus of study should be on the following aspects: developing and optimizing tobacco additive processing during cigarette blending and clarifying its mechanism; optimizing the additive blending and clarifying its mechanism, improving tobacco purity of effective component and developing new cigarette additives by microbial fermentation technology. All these aims to improve the sensory quality of cigarette, form cigarette style in order to meet the requirements of consumer taste.

0 引言

天然烟用添加剂是从天然植物或动物中以现代分离技术(分子蒸馏、超临界 CO₂ 萃取、旋转锥浓缩)进行精制、加工,保留具有增香保润、降低刺激性、减少杂气、提高卷烟吸食口感等作用的有效部分,剔除对卷烟抽吸具有负面影响的无效部分,获得可彰显卷烟品牌风格特征的重要香原料.天然烟用添加剂的功能主要是增香、保润、降低刺激和减少杂气等,对改善卷烟的吸品质具有较好的应用效果.本文拟对天然烟用添加剂的开发研究进展进行综述,以为卷烟增香和提高卷烟感官品质,满足消费者的吸味要求提供依据.

1 具有增香保润功能烟用添加剂

“卷烟增香保润”是烟草行业研究的“八大重点、九大专项”中重点开展的研究项目之一,对构筑卷烟发展核心技术、形成卷烟产品风格特色起着重要的作用.近年来,中国烟草行业面临着严峻的国际市场竞争,但通过中国烟草科技工作者的艰苦努力,已取得了可喜的成绩,目前与国际知名卷烟品牌相比,中国卷烟产品在香气量、感官舒适度等方面有了突破性进展.

1.1 具有增香功能烟用添加剂

随着人们对“吸烟与健康”的关注不断提高,低危害指数卷烟已成为行业发展的必然趋势.危害性指数与卷烟的焦油含量呈正相关,降低卷烟危害性指数即指降低卷烟焦油含量.但

焦油含量低的卷烟香气量也低,可能使消费者抽吸满足感欠缺.增香烟用添加剂的开发与应用,为卷烟降焦后的增香和彰显卷烟风格特色奠定了良好的基础.

2007年,刘绍华等^[1]从罗汉果中提取的甜味成分对提升卷烟抽吸的香韵、衬托自然烟香、降低烟气在口腔和喉部的干燥感、增加生津感、提高卷烟抽吸舒适度均具有明显的效果.

2012年,刘绍华等^[2-3]研究发现菠萝蜜烟用香料中香气成分对卷烟增香和保润具有较好的效果,具有重要的应用价值,这与菠萝蜜中主要香气成分(乙酸酯类、丁酸酯类、己酸酯类和高级脂肪酸酯类化合物)对卷烟香气的贡献有关.这些香气成分中有的具有苹果香气特征,如2-甲基-丁酸乙酯;有的具有香蕉香气特征,如乙酸乙酯;有的具有天然水果香气特征,如己酸乙酯、2-甲基-丁酸丁酯、3-甲基-丁酸丙酯和丁酸乙酯等.同年,吴丹等^[4-5]采用GC-MS法对烟用桂花香精中的挥发性成分进行分析研究发现,二氢- β -紫罗兰酮具有紫罗兰香气,在卷烟中燃烧后产生的香气能增加卷烟的甜香、花香和木香,这与 β -紫罗兰酮燃烧后产生的香气具有增加烟的甜香、花香和木香效果相关.

2013年,王晓敏等^[6]报道茴香精油对提升卷烟烟气浓度、降低刺激性、丰富烟香、掩盖烟气、提调卷烟的吸食口感具有较好的应用效果.同年,张艳等^[7]报道了山苍子油对增加烟气浓度、提调卷烟的吸食口感效果明显,对彰显卷烟

风格特色具有很好的应用前景。

2014年,刘绍华等^[8]采用GC-MS分析了罗汉果浸膏中的挥发性成分,发现糠醛、(角)鲨烯等香气成分是罗汉果具有的重要香味物质,添加到卷烟中对提高卷烟吸食品质具有很好的效果。同年,许春平等^[9]以白肋烟花蕾为原料,通过美拉德反应法制备烟用香料,经GC-MS分析发现,从不同反应类型的美拉德反应法制备的烟用香料中检出的挥发性香气成分中,含有酯类2种、萜烯类5种、醇类10种、醛类2种、酸类1种、酮类8种、酚类1种、氮杂环化合物5种。感官评吸结果表明,这些香味物质具有改善卷烟香气质、增加抽吸舒适度、增加卷烟抽吸甜润感和细腻感等作用。2014年,罗彩霞等^[10]开发百里香添加剂并适量地添加到烟丝中,丰富了卷烟烟香,除此之外还具有减少杂气、降低刺激性、提高卷烟吸食口感的作用。同年,黄梅桂等^[11]发现薰衣草精油对彰显卷烟风格特色、提高卷烟口感的舒适度具有较好的应用效果。

2015年,刘绍华等^[12]通过GC-MS对藏红花精油中的挥发性成分进行了全面分析,鉴定出26种化合物成分,即藏红花醛、2-羟基-3,5,5-三甲基-2-环己烯-1,4-二酮、2,2,6-三甲基-1,4-环己二酮、2,4,4-三甲基-3-甲醛-5-羟基-2,5-环己二烯-1-酮、二氢- β -紫罗兰酮和异佛尔酮等。实验结果表明,藏红花精油按一定的比例添加到不同产地的烟丝上,能产生不同的加香效果,如广西百色、广西桂林、湖南邵阳、贵州遵义、云南昆明、四川宜宾、湖北孝感7个不同产地的上部烟叶(B₃F)、中部烟叶(C₃F)、下部烟叶(X₃F)烟丝中的加香结果为:在上部烟叶和中部烟叶中,添加量与烟丝比例为 $(3\sim 4)\times 10^{-5}:1$,在下部烟叶中添加量与烟丝比例为 $(7\sim 8)\times 10^{-5}:1$ 时,对提高卷烟的香气质、香气量,减少杂气、降

低刺激性、谐调烟香,降低烟气粗糙感、改善口感等,均具有较好效果。此外,研究还发现,藏红花精油在卷烟烟丝中燃烧后产生的香气成分与卷烟烟丝燃烧后产生的香气成分较接近,这对提高卷烟香气质、改善口感、降低刺激性等具有较好的应用效果^[13-14]。同年,刘绍华等^[15]研究发现枣添加剂也具有增加卷烟烟气浓度、增加甜润口感、柔和并丰富烟香、彰显卷烟风格特色的矫味作用。

2016年,杨晓云等^[16]从烟叶中提取了一种潜香物质植醇,该物质具有显著增进卷烟吸味和提高卷烟香气的效果。同年,梁雯华等^[17]制备的桉树添加剂是一种重要的烟草香原料,具有很强的透发性,对丰富烟香、掩盖烟气,增加卷烟烟气凉感,彰显卷烟风格特色具有较好的应用效果。2016年,郭文龙^[18]制备了柏木添加剂,发现其含有多种重要的致香成分,适量添加能有效提高卷烟的香气量,增加卷烟烟气浓度,使烟香丰满、烟气细腻柔和,可作为一种新型烟用香料应用到卷烟生产中。同年,吴晓菊等^[19]制备了薄荷添加剂并在卷烟中进行应用,发现其具有丰富烟香、改善口感、降低刺激性,增加卷烟清凉感的作用。2017年,刘绍华等^[20]研究发现八角添加剂添加在卷烟中,可赋予卷烟特有的辛香韵味,谐调烟香,柔和吸味,还具特有的烘烤香、花香效果。

1.2 具有保润功能烟用添加剂

卷烟保润是确保卷烟感官品质的一项重要技术内容。如果卷烟烟丝太润,则抽吸时燃烧不完全,烟气刺辣感很强,烟气量不足;如果卷烟烟丝太干燥,则抽吸时烟丝燃烧快,烟气刺激性大,余味不舒适。因此,保润对卷烟的生产和提高感官品质起着重要的作用。目前,我国烟草行业的常规保润剂主要有丙二醇、丙三醇、山梨醇等,这些保润剂对保持卷烟烟丝含水率的稳定、提高卷烟生产过程中烟丝的耐加工性、提升卷

烟感官舒适性具有较好的效果. 通过现代分离技术、纯化技术开发天然烟草保润剂, 再结合使用常规的保润剂, 对提高卷烟的保润性能具有更好的效果.

1999年, 黄强等^[21]以苹果皮渣为原料, 先将苹果皮渣进行酶解, 再经过提取浓缩、酶催化脱脂、活性碳脱色、减压浓缩、喷雾干燥等工艺, 研制出一种果胶类低酯化度的D-吡喃半乳糖醛酸天然烟用保润剂. 该保润剂具有较好的物理保润和感官保润的效果, 还具有一定的降低烟气中CO的效果. 2006年, 阮晓明等^[22]以玉米为原料, 提取其中的吡咯烷酮羧酸, 采用先进的工艺技术, 研制出含有多种天然保湿因子的新型保润剂PDS, 该保润剂比常规保润剂丙二醇、丙三醇的保润效果更好. PDS在卷烟中燃烧后的香气成分与卷烟香气成分匹配, 具有增加香气量、改善吸食口感、降低烟气对口腔和喉部的刺激、减少杂气等效果.

2010年, 刘洋等^[23]以仙人掌为原料, 通过回流提取法研制出一种仙人掌多糖烟用添加剂. 该添加剂在烟丝中具有较好的保润效果, 在干燥条件下可降低烟丝失水率, 在卷烟抽吸中具有增加烟气香气量, 使烟气细腻柔和绵长、增强回甜感、减轻杂气等作用. 同年, 郭国宁等^[24]以魔芋为原料, 提取其中的主要有效成分魔芋葡甘聚糖, 将其改性后研制出一种新型保润剂KSAP-T, 添加到烟丝中, 烟丝含水率最高为7.51%, 水分活度最低为0.392, 水分散失速率明显降低, 对卷烟感官品质无负面影响.

2011年, 崔海滨等^[25]以橄榄果为原料, 研制出一种天然烟用保润剂SLT, 将该保润剂添加到卷烟烟丝中, 具有显著降低卷烟烟气干燥感、减少烟气在口腔和喉部的刺激性等作用. 同年, 黄艳等^[26]以沙参、麦冬和桔梗为原料, 经回流提取、酶解、大孔树脂分离, 研制出一种多糖烟用保润剂. 该保润剂具有降低烟气干燥感、增

加甜润度的效果.

2013年, 迟建国等^[27]以芦荟、仙人掌等为原料, 通过提取、浓缩等工艺技术, 研制出一种具有较好保润性能的天然保润剂CNY-J. 该添加剂具有烟丝保润和防潮的双重效果, 在卷烟抽吸过程中, 达到使烟气细腻柔和、刺激性降低、杂气减少的效果. 同年, 杨君等^[28]以铜藻为原料, 利用超声波辅助提取铜藻后并进行浓缩, 研制出一种铜藻烟用保润剂. 该保润剂具有双重保润效果, 既能在干燥的环境中缓解烟丝中水分的流失, 又能在潮湿条件下有效地减缓烟丝对水分过量的吸收, 保润和防潮效果均令人满意.

2014年, 陈芝飞等^[29]以鸡蛋花为原料, 通过索氏提取器进行提取, 得到鸡蛋花烟用添加剂. 将该添加剂添加于卷烟烟丝中具有较好的物理保润和感官保润的效果, 能够降低烟气对口腔和喉部产生的刺激性、提高卷烟抽吸的舒适性. 同年, 豆康宁等^[30]以甘草为原料, 提取其中的甘草流浸膏添加于卷烟烟丝, 有较好的保润效果, 具有柔和烟气、增加甜润、降低刺激性、减少杂气等作用. 2014年, 蔡君龙等^[31]等发现, 无花果添加剂除具有增加果香和甜润感的作用外, 还具有减少杂气、矫正吸味、减少木质气、降低烟气对口腔和喉部产生的刺激性的效果. 同年, 李明明等^[32]报道小茴香添加剂对提升卷烟烟气浓度、增加烟气在口腔和喉部的甜润感、降低烟气对口腔和喉部产生的刺激性、掩盖烟气、改善吸食口感等具有较好的效果. 同年, 郭玉华等^[33]报道了依兰香添加剂具有浓厚的花香韵, 对降低烟气对口腔和喉部产生的刺激性、提高卷烟甜润口感具有较好的应用效果.

2016年, 魏长宾等^[34]认为菠萝添加剂是烟草行业常用的一种天然烟用添加剂, 对丰富烟香、降低刺激性、减少杂气、增加烟气甜润感、彰显卷烟风格特色具有显著的效果. 同年, 薛晓敏

等^[35]将制备的杏添加剂添加到卷烟烟丝中,发现其具有丰富烟香、柔和烟气、降低刺激性、改善口感和掩盖杂气的效果。

2017年,刘绍华等^[36]以天然蜂胶为原料,通过溶液萃取、超临界CO₂萃取与超声萃取后,得到一种蜂胶类新型烟草保润剂,其保润效果较丙二醇、丙三醇和山梨醇等传统保润剂效果更好。特别地,该保润剂可有效降低卷烟烟气中的自由基含量。同年,刘绍华等^[37-38]充分利用广西特有的,具有止咳、祛痰、润肺功能的高甜度罗汉果制成天然烟用添加剂,将其添加在烟丝上,具有降低烟气干燥感,增强喉部生津感,提高卷烟抽吸舒适度等效果。

2 具有降低刺激功能烟用添加剂

卷烟在抽吸过程中具有一定的刺激性,刺激性的大小是评价卷烟感官品质的一项重要指标,如何降低卷烟烟气对口腔和喉部产生的刺激是烟草科技工作者的重点研究工作。决定卷烟刺激性大小的因素有卷烟叶组配方、三纸一棒和烟用添加剂等,烟用添加剂在降低卷烟刺激性方面起着重要的作用。具有降低刺激功能的烟用添加剂可明显增加卷烟抽吸中的甜润感,降低烟气对口腔和喉部产生的刺辣感,进而提高卷烟的吸品质。

2009年,刘绍华等^[39]以罗汉果为主要原料,研制出一种新型丙纶嘴棒添加剂,该添加剂添加到丙纶嘴棒中,能降低丙纶嘴棒卷烟烟气对口腔和喉部产生的灼热感和刺辣感,且能减少杂气,丰富烟香。2014年,柴玲等^[40]报道了互叶白千层添加剂对丰富烟香、改善口感、降低刺激性、减少杂气具有较好的效果,另外,对提调卷烟香气也具有特别的效果。同年,常培培等^[41]报道了紫色番茄添加剂具有提调烟香、降低刺激性、提高吸食口感的效果。2017年,刘绍华等^[42]充分利用广西特有的丰富的天然植物

资源优势,从具有特别功效的天然植物(如罗汉果、杜仲等)原料中提取有效成分,经科学调配与精制,研制出可减小卷烟刺激性的添加剂。将其添加在烟丝上,既能保持卷烟本身的香吃味,又能显著地减少烟气中的杂气和烟气对口腔、喉部的刺激,提调烟香,使卷烟的烟气细腻,余味舒适、柔和、安全。

3 具有减少杂气功能烟用添加剂

卷烟烟气中的杂气是指与卷烟香气不谐调的气息,如土腥气息、药草气息、木质气息、焦枯气息、花粉气息和青杂气息等,往烟丝中添加一些具有减少杂气功能烟用添加剂将有效地掩盖这些气息,得到口感舒适、烟气细腻柔和、烟气丰富、口感甜润的吸食效果,充分满足消费者的需求。具有减少杂气功能烟用添加剂在掩盖杂气、提升卷烟香气质、改善吸食口感方面具有较好的应用前景。

2012年,苏东赢^[43]报道了枫槭添加剂具有强烈的焦甜香气,可增加卷烟的焦甜香香气,香气质好,细腻柔和,刺激性小,余味舒适,回甜感好^[43]。2015年,牟玉兰^[44]发现含羞草添加剂具有丰富烟香、飘逸烟气的效果,可明显提升卷烟香气质,掩盖杂气,降低刺激性,改善余味^[44]。2017年,万宇俊等^[45]研究表明胡萝卜添加剂用于卷烟加香,具有掩盖杂气、提高卷烟香气质、增加卷烟香气量、减少烟气刺激性、使烟气细腻柔和等效果^[45]。

4 结语

本文对天然烟用添加剂中具有增香功能、保润功能、降低刺激功能和减少杂气功能烟用添加剂的开发与应用研究现状进行了综述,发现天然烟用添加剂的开发研究虽然已取得了丰富的成果,但是在其应用方面还有待进一步提高。

目前,具有增香功能烟用添加剂研究和开发的主要难点和今后的研究方向是如何调配与烟草本香相谐调的添加剂,从而更好地满足消费者的吸味需求;具有保润功能烟用添加剂的研究和应用,今后的方向是添加剂的添加对烟气物理性状和化学成分的影响,以及优化烟用添加剂的调配工艺和确定合适的卷烟配方;具有降低刺激功能烟用添加剂研究和应用,今后的方向是对卷烟烟气和该添加剂中刺激性化学成分的分析、其形成机制的研究和新型添加剂的开发;具有减少杂气功能烟用添加剂,今后的研究方向是围绕开发新型添加剂并提供其理论依据而展开。总之,烟用添加剂今后的研究方向主要集中在优化卷烟配方中烟用添加剂的调配工艺并研究其应用的理论依据;利用感官评价和化学分析的方法,优化添加剂的配方,并从化学分析角度阐明其理论机制;通过卷烟表香调香技术、料香调香技术、梗丝加香技术和薄片加香技术等,提高烟用添加剂有效成分的纯度,研究出具有创新性的、适合卷烟风格特色的天然烟用香料;充分利用微生物发酵技术按设计的反应进程,对选定的烟用香原料进行有效降解,获得需要的烟用添加剂,从而完全降解对卷烟抽吸有负面效果的物质,彰显卷烟产品的风格特色。

参考文献:

- [1] 刘绍华,孟冬玲.一种中草药烟用添加剂:200610124616.5[P].2007-03-21.
- [2] 刘绍华,邹克兴,李志华,等.菠萝蜜烟用香料香气成分的分析及其在卷烟中应用的研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(S):78.
- [3] 刘绍华,邹克兴,李志华,等.一种区域性特色天然烟用香原料添加剂及其制备方法和应用:201110194259.0[P].2012-10-10.
- [4] 吴丹,罗世琼,杨占南,等.银桂花不同组织器官的挥发性化学成分[J].贵州农业科学,2015,43(1):120.
- [5] 陈虹霞,王成章,孙燕.不同品种桂花挥发油成分的GC-MS分析[J].生物质化学工程,2012,64(4):37.
- [6] 王晓敏,李军,高艳明,等.茴香的研究进展[J].河北农业科学,2013,17(5):37.
- [7] 张艳,胡金波,李金凤.山苍子油GC-MS指纹图谱研究[J].中成药,2013,35(11):2452.
- [8] 刘绍华,白家峰,李志华,等.一种含有罗汉果多孔颗粒复合滤棒:201420050441.8[P].2014-07-16.
- [9] 许春平,肖源,孙斯文,等.白肋烟花蕾制备烟用香料[J].烟草科技,2014(11):57.
- [10] 罗彩霞,田永强,潘彦.百里香研究进展[J].安徽农业科学,2014,42(33):11669.
- [11] 黄梅桂,李春阳.新疆不同品种薰衣草精油特征香气成分及感官属性分析[J].现代食品科技,2014,30(12):255.
- [12] 刘绍华,田兆福,李志华,等.一种含有藏红花提取物的多孔颗粒的三元复合滤棒:201420823396.5[P].2015-06-03.
- [13] 刘绍华,黄泰松,邹克兴,等.一种增香保润天然烟用添加剂的应用:201210084800.7[P].2014-07-09.
- [14] 广西中烟工业有限责任公司.广西天然香料[M].北京:科学出版社,2015:245-246.
- [15] 刘绍华,杨靖,白家峰,等.一种获得红枣提取物的新方法和在卷烟中的应用:201510389926.9[P].2015-09-30.
- [16] 杨晓云,胡志刚,赵云川,等.烟草植醇热裂解产物研究[J].云南化工,2016,43(4):68.
- [17] 梁雯华,李先文.桉树叶挥发油的GC-MS分析研究[J].安康学院学报,2016,28(1):99.
- [18] 郭文龙.柏木精油的成分分析及其在卷烟中的应用研究[J].香料香精化妆品,2016(1):12.
- [19] 吴晓菊,金英姿,姜丽.亚临界萃取椒样薄荷天然烟用添加剂的开发与应用研究进展精油的工艺[J].食品研究与开发,2016,37(5):

52.

- [20] 刘绍华,刘鸿编.天然烟用添加剂[M].北京:科学出版社,2017:4-7.
- [21] 黄强,李楠.固定化酶反应器制备新型烟草保润剂的研究[J].郑州工业大学学报,1999,20(4):50.
- [22] 阮晓明,王青海,徐海涛,等.新型天然保润剂PDS在卷烟中的应用[J].烟草科技,2006(9):8.
- [23] 刘洋,刘珊,赵明月,等.仙人掌多糖的提取方法及其在卷烟中的应用:200910172520.X[P].2010-05-12.
- [24] 郭国宁,严恒,蔡冰,等.KSAP-T的保润性能及其应用研究[J].安徽农业科学,2010(12):6569.
- [25] 崔海滨,王学娟,赵世兴,等.保润剂SLT的开发及其在卷烟中的应用[J].中国烟草学报,2011(17):38.
- [26] 黄艳,赵世兴,王学娟,等.复方多糖保润剂的制备及其在卷烟中的应用:201010155428.5[P].2011-10-19.
- [27] 迟建国.天然烟用保润剂的保润性能及应用研究[J].安徽农业科学,2013(10):4599.
- [28] 杨君,黄芳芳,叶超凡,等.铜藻多糖的提取工艺优化及其保润性能[J].烟草科技,2013(4):37.
- [29] 陈芝飞,孙志涛,郝辉,等.鸡蛋花多糖、提取纯化方法及其作为烟草保润剂的应用:201410294952.9[P].2014-09-10.
- [30] 豆康宁,王飞,罗海澜,等.甘草及提取物在食品中的应用进展[J].食品研究与开发,2014,35(21):140.
- [31] 蔡君龙,卢金清,黎强,等.无花果挥发性成分分析[J].中药材,2014,37(7):1205.
- [32] 李明明,罗静,钟永科.固相微萃取-气质联用对小茴香茎中挥发性成分的分析[J].安徽农业科学,2014,42(27):9322.
- [33] 郭玉华,赵俊凌,元超.依兰香花挥发油成分的气相色谱-质谱分析[J].热带农业科学,2014,37(4):17.
- [34] 魏长宾,刘胜辉,陆新华,等.菠萝果实香气成分多样性研究[J].热带作物学报,2016,37(2):418.
- [35] 薛晓敏,韩雪平,王金政.“金凯特”杏果实发育期间香气成分分析[J].山东农业科学,2016,48(11):53.
- [36] 刘绍华,杨靖,白家峰,等.一种新型烟草保润剂及其应用:201410037368.5[P].2017-01-04.
- [37] 刘绍华,黄泰松,邹克兴,等.一种增香保润的天然烟用添加剂:200710052295.7[P].2010-01-20.
- [38] 王勤,肖喜泉,董威,等.罗汉果祛痰作用谱效关系研究[J].广西植物,2017,37(5):606.
- [39] 刘绍华,黄泰松,邹克兴,等.罗汉果提取物在丙纶滤棒中应用的研究[J].中国烟草学报,2009,15(3):19.
- [40] 柴玲,刘布鸣,林霄,等.互叶白千层花、果与叶挥发油成分的对比分析[J].香料香精化妆品,2014(6):1.
- [41] 常培培,张静,杨建华,等.紫色番瓜果实挥发性风味物质分析[J].食品科学,2014,35(14):165.
- [42] 刘绍华,黄泰松,邹克兴,等.一种减少杂气、降低刺激、提升烟香的天然烟用添加剂及其制备方法:200710052294.2[P].2017-10-24.
- [43] 苏东赢.枫槭浸膏热裂解产物分析及其在卷烟中的应用[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2012:27(5):41.
- [44] 牟玉兰.含羞草研究进展[J].民营科技,2015(5):16.
- [45] 万宇俊,殷军艺,聂少平,等.微波提取对胡萝卜中的多糖基本结构特征及固体形貌的影响[J].食品科学,2017,38(7):1.



引用格式:杨存祥,刘树博,张志艳. 基于仿真模型的永磁同步电机失磁故障性能分析[J]. 轻工学报,2017,32(6):88-93.

中图分类号:TM351 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.011

文章编号:2096-1553(2017)06-0088-06

基于仿真模型的 永磁同步电机失磁故障性能分析

Analysis of PMSM performance under demagnetization fault based on simulation model

杨存祥¹,刘树博^{1,2},张志艳¹

YANG Cun-xiang¹,LIU Shu-bo^{1,2},ZHANG Zhi-yan¹

1. 郑州轻工业学院 电气信息工程学院,河南 郑州 450002;

2. 河南省科学院 同位素研究所有限责任公司,河南 郑州 450015

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

2. Isotope Institute Co., Ltd., He'nan Academy of Science, Zhengzhou 450015, China

关键词:

永磁同步电机;失磁故障;输出转矩;收敛性能

Key words:

permanent magnet synchronous motor (PMSM); demagnetization fault; output torque; convergence performance

摘要:为进行永磁同步电机(PMSM)失磁故障性能分析,在建立PMSM数学模型的基础上,搭建了基于Matlab/Simulink平台的PMSM仿真模型.该模型以PMSM磁链为输入参数,通过改变此参数来模拟永磁体失磁故障,设置运行工况进行仿真,得到了PMSM正常工作和发生不同程度失磁故障时的转矩、转速和定子电流等参数特性.仿真结果表明:随着失磁程度的增加,PMSM输出转矩越来越小、波动增大,转速波动增大,电机起动时间延长,定子电流逐渐减小,系统收敛性能越来越差;当失磁程度达到50%以上,电机已无法进入稳定运行状态.

收稿日期:2016-03-02;修回日期:2016-10-09

基金项目:国家自然科学基金项目(51507156);河南省科技计划基金项目(112300410146);郑州轻工业学院研究生科技创新基金资助项目

作者简介:杨存祥(1966—),男,河南省台前县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为电机故障诊断与电气测量.

Abstract: For performance analysis of permanent magnet synchronous motor (PMSM) under demagnetization fault, a simulation model of PMSM was established on the Matlab/Simulink platform based the mathematical model of PMSM. Through changing the flux linkage to simulate demagnetization fault, with PMSM magnetic chain as input parameters, the model simulated the permanent magnet demagnetization fault through changing the parameters, and set up the operation condition to simulate. The characteristics of the torque, rotational speed and stator current of the PMSM were obtained by the simulation. The simulation results showed that with the increase of the demagnetization degree, the output torque were smaller, the fluctuation of output torque and rotational speed increased, the motor starting time was extended, the stator current gradually decreased, and the system convergence performance became worse. When the degree of demagnetization reached more than 50%, the motor could not enter the stable operation state.

0 引言

永磁同步电机 PMSM (permanent magnet synchronous motor) 用永磁体代替了励磁绕组, 避免励磁绕组的损耗, 提高了其运行效率, 同时改变了转子结构, 使得转子的体积变小, 与其他电机相比, 具有效率高、功率密度高、转子结构灵活多样、体积小、重量轻、噪音低、起动转矩大等优点. 因此, PMSM 被广泛应用于电动汽车行业、军工行业和航天航空行业等^[1-2]. PMSM 在恶劣环境和复杂工况下容易发生故障, 其类型大致分为两类: 一类是电磁类故障, 包括定子匝间短路故障和转子失磁故障; 另一类是机械类故障, 包括转子偏心故障和轴承损坏故障.

PMSM 在运行中受到电磁干扰、热量辐射等复杂环境的影响, 永磁体容易发生不可逆失磁故障, 导致 PMSM 性能指标下降、发热, 严重时 PMSM 可能失控和报废^[3-7]. 目前针对永磁体发生失磁故障的研究, 多是根据永磁材料的退磁曲线^[8-11] 建立 PMSM 失磁故障有限元磁模型, 提取其仿真结果参数, 研究对电机运行性能的影响及其故障诊断方法; 而对基于 Matlab 建立的失磁故障模型的研究较少. 文献[12]提出了 PMSM 在 abc 坐标系下的建模及故障仿真, 并对定子绕组匝间短路和定子绕组匝间开路进行了研究; 文献[13]将 PMSM 电机本体数学模型在 Matlab 中进行仿真, 验证了 PMSM

d/q 模型的正确性. 基于此, 本文拟建立以反映永磁体性能强弱的链参数为输入参数的 Matlab/Simulink PMSM 仿真模型, 通过改变输入参数, 模拟不同失磁故障状态下 PMSM 的运行状况, 得到正常运行和发生不同程度失磁时的输出转矩、转速和定子电流, 以期了解永磁体失磁对 PMSM 性能的影响, 为失磁故障的诊断提供依据.

1 PMSM 的 dq 轴数学模型

设转子按照逆时针方向旋转, 取永磁体磁场轴线方向为 d 轴, q 轴沿着旋转方向超前于 d 轴 90° 电角度, dq 坐标系的旋转速度为转子速度^[1]. 不考虑零轴分量时, 按惯例列写电机瞬态方程电压方程为

$$\begin{cases} u_d = R_1 i_d - \omega_r \Psi_q + \frac{d\Psi_d}{dt} \\ u_q = R_1 i_q + \omega_r \Psi_d + \frac{d\Psi_q}{dt} \\ u_{2d} = 0 = R_{2d} i_{2d} + \frac{d\Psi_{2d}}{dt} \\ u_{2q} = 0 = R_{2q} i_{2q} + \frac{d\Psi_{2q}}{dt} \end{cases}$$

式中: u_d 为定子直轴电压, R_1 为定子绕组的相电阻, i_d 为定子直轴绕组电流, ω_r 为转子电角速度, Ψ_d 和 Ψ_q 分别为定子直轴、交轴的磁链, u_q 为定子交轴电压, i_q 为定子交轴绕组电流, u_{2d} 为转子直轴电压, R_{2d} 为转子直轴的电阻, i_{2d}

为定子直轴绕组电流, Ψ_{2d} 为转子直轴的磁链, u_{2q} 为转子交轴电压, R_{2q} 为转子交轴电阻, i_{2q} 为定子交轴绕组电流, Ψ_{2q} 为转子交轴的磁链.

磁链方程为

$$\begin{cases} \Psi_d = L_d i_d + L_{ad} i_{2d} + \Psi_0 \\ \Psi_q = L_q i_q + L_{aq} i_{2q} \\ \Psi_{2d} = L_{2d} i_{2d} + L_{ad} i_d + \Psi_0 \\ \Psi_{2q} = L_{2q} i_{2q} + L_{ad} i_q \end{cases}$$

式中, L_d 为定子直轴同步电感, L_{ad} 为直轴电枢反应电感绕组的电感, Ψ_f 为永磁体磁链幅值, L_q 为定子交轴同步电感, L_{aq} 为交轴电枢反应电感绕组的电感, L_{ad} 和 L_{2q} 分别为转子直轴、交轴绕组的电感.

通过虚位移法和 park 变换后求得的电磁转矩方程为

$$T_{em} = p(\omega_d i_q - \omega_q i_d)$$

忽略铁耗和杂散损耗, 转子机械运动方程为

$$J \frac{d\omega_r}{dt} = p(T_{em} - T_L)$$

式中, T_L 为负载转矩, J 为电机的总转动惯量.

2 PMSM 仿真模型搭建

本文所研究的 PMSM 可用于纯电动汽车, 其额定转速为 3000 r/min, 额定功率为 42 kW, 额定电压为 375 V, 额定转矩为 100 N·m, 磁极对数为 4, 永磁体为内置 V 型结构, 定子槽数为 48, 双层绕组结构.

在 Matlab 2014a 的 Simulink 环境下, 利用 SimPowerSystem 丰富的模块库, 在分析 PMSM 数学模型和坐标变换的基础上, 建立了 PMSM 仿真模型, 框图如图 1 所示, 其内部模块的连接方式如图 2 所示.

3 仿真结果分析

PMSM 仿真参数设置为电机极对数 $p = 4$,

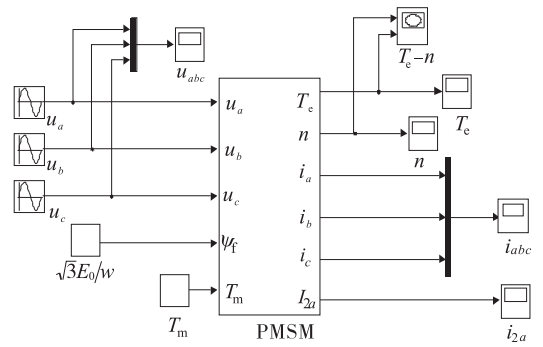


图 1 PMSM 仿真模型框图

Fig.1 Block diagram of simulation model of the PMSM

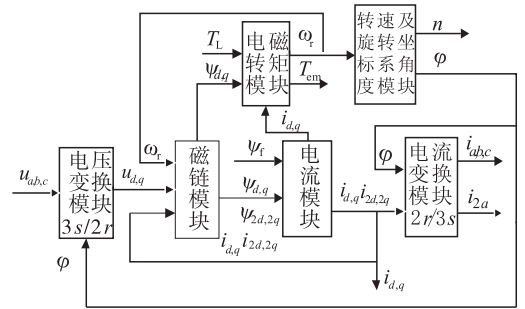


图 2 PMSM 各模块的连接框图

Fig.2 Block diagram of the PMSM

$\Psi_f = 0.175 \text{ Wb}$, $J = 0.0008 \text{ kg} \cdot \text{m}^2$, 定子电阻 $R_s = 2.875 \Omega$, $L = 0.0085 \text{ H}$. 磁链参数的大小表示永磁体运行状态, 通过改变 PMSM 仿真模型中磁链的大小可以实现 PMSM 不同失磁状况的模拟, 从而得到失磁程度对 PMSM 性能的影响. 在额定负载运行状态, 改变磁链参数的大小, 使其分别为 $\Psi_f, 0.75\Psi_f, 0.5\Psi_f, 0.25\Psi_f$, 以模拟 PMSM 正常工作、25% 失磁、50% 失磁、75% 失磁 4 种不同状况, 对 PMSM 正常及不同程度失磁故障时的输出转矩、转速和定子电流进行分析.

3.1 输出转矩与失磁故障之间的关系

输出转矩, 简单地说就是输出转动的力量大小, 是 PMSM 的主要指数之一, 它反映在电动汽车的加速度、爬坡能力和悬挂等性能上. 电动汽车运行过程中的输出转矩发生变化, 会对电动汽车造成很大影响.

对 PMSM 施加三相正弦电压激励,按额定状态设置空载反电动势和转速参数,仿真 PMSM 正常运行状态;改变额定空载反电动势的大小,使其磁链按 25%、50% 和 75% 发生改变,用以模拟不同程度的失磁故障. PMSM 正常工作及不同程度失磁故障工况下的输出转矩如图 3 所示.

从图 3 可以看出,随着失磁程度的增加, PMSM 进入稳态的时间越来越长,进入稳态前的波动越来越大;0.5 s 时刻的转矩数据表明,随着失磁程度的增加,输出转矩随之变小;但当失磁程度达到 50% 和 75% 时,明显可以看出输出转矩很难稳定下来,表明 PMSM 发生 50% 失磁故障时,电机已失去了运行的稳定性.

3.2 转速与失磁故障之间的关系

电机的起动性能是电动汽车正常运行应具备的重要性能之一. 电动汽车在起步、中途临时停车后重新起步时,都需起动电机. 如果电机的起动性能不佳,就会直接影响电动汽车的使用.

电机起动需要足够的电动转速, PMSM 运行在正常状态、25% 失磁、50% 失磁和 75% 失磁故障状态时,其输出转速随时间变化如图 4 所示.

从图 4 可以看出,随着失磁程度的增加,电机从起动到稳定在(额定转速 ± 1) r/min 范围内的时间越来越长,转速波动也随着失磁程度的增大而增加,失磁程度达到 50% 以上时,电机转速已不再稳定.

3.3 定子电流与失磁故障之间的关系

对于交流电机而言,定子、转子磁链都是中间量,真正决定其性能的是在空间产生的磁势(电流),现在 PMSM 故障诊断中,多以定子电流为研究对象. PMSM 运行在正常状态、25% 失磁、50% 失磁和 75% 失磁故障时,其定子 A 相电流随时间变化如图 5 所示.

从图 5 可以看出,随着失磁程度的增加, A 相电流进入稳态前的波动越来越大,稳态运行时的畸变率也越来越大,基波电流越来越小;当永磁体失磁程度达到 50% 以上时,输出的定子电流不再是幅值恒定的正弦波. B 相和 C 相电流变化趋势与 A 相电流一致,故不再赘述.

4 结论

本文基于 Matlab/Simulink 软件平台,通过改变磁链参数模拟不同的失磁状态,对 PMSM

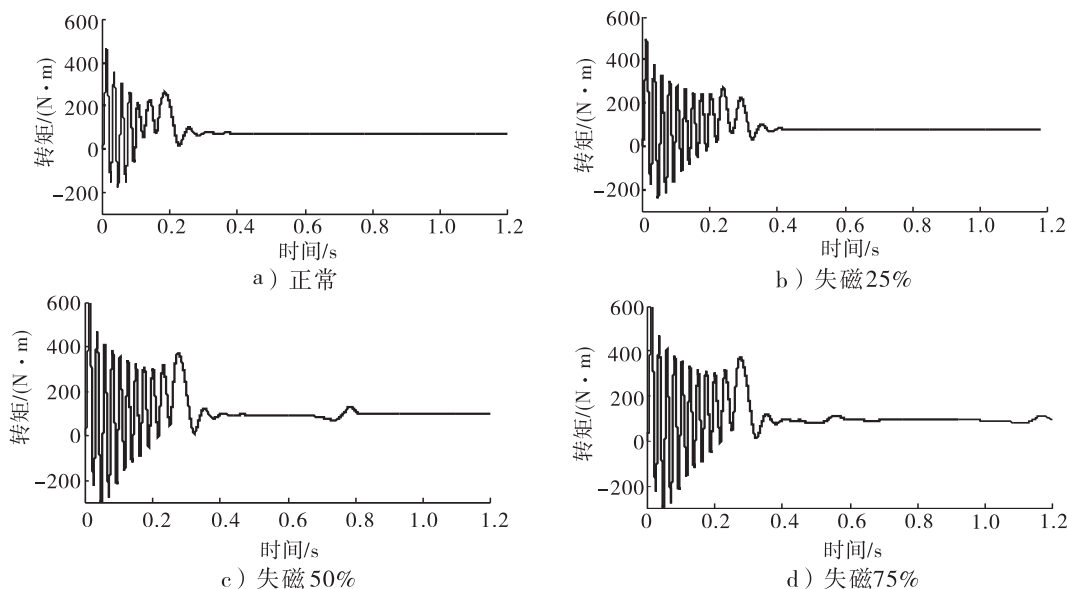


图 3 PMSM 不同运行状况的输出转矩仿真结果

Fig. 3 The simulation results of PMSM rotational output torque under different operation conditions

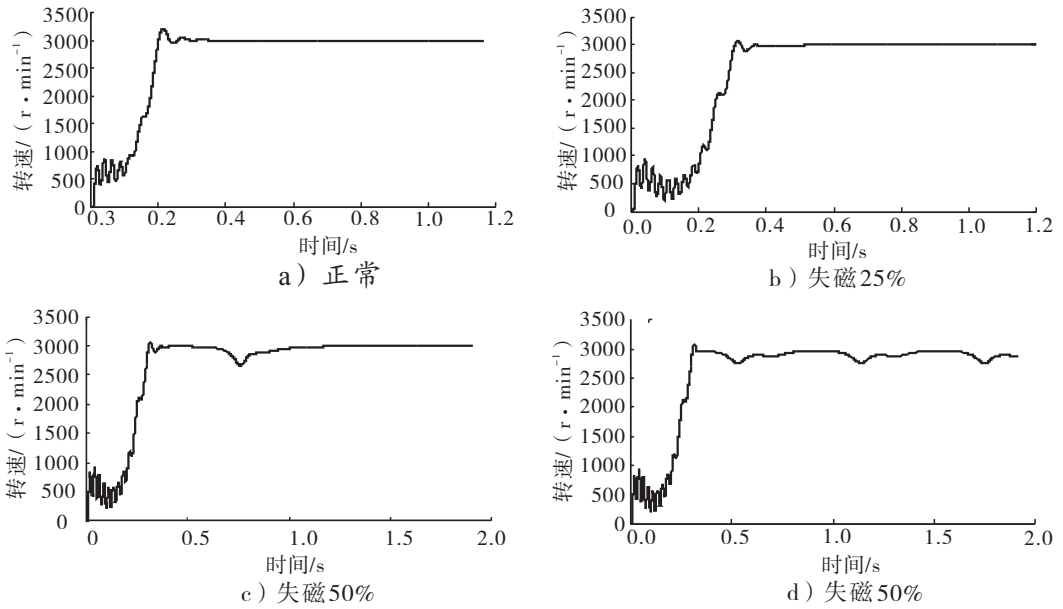


图4 PMSM不同运行状况的转速仿真结果

Fig. 4 The simulation results of PMSM rotational speed under different operation conditions

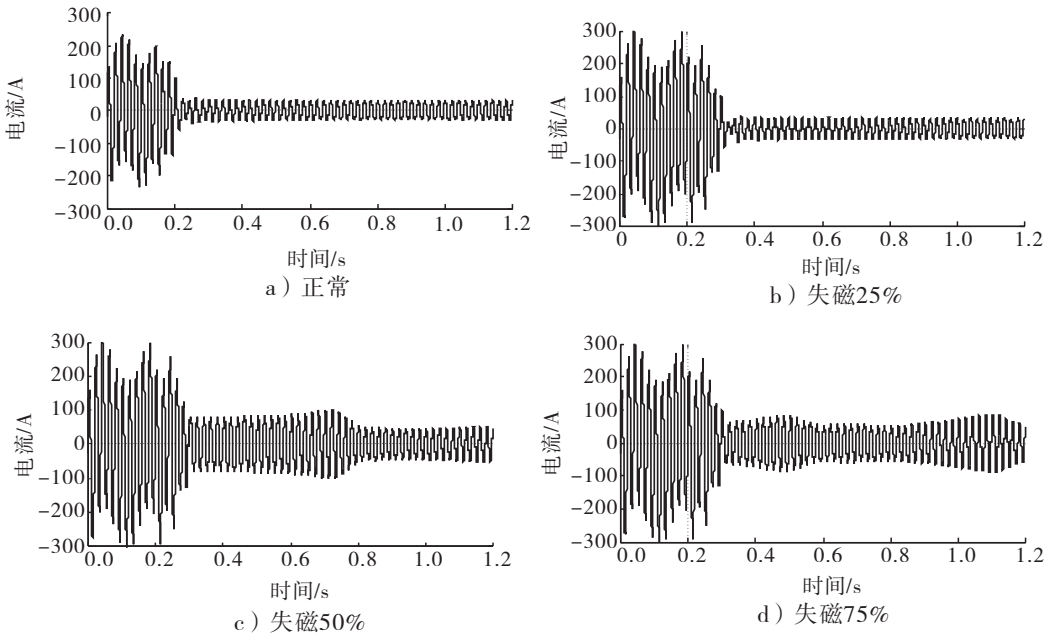


图5 PMSM不同运行状况的定子电流仿真结果

Fig. 5 The simulation results of PMSM stator current under different operation conditions

失磁故障性能进行研究. 选取不同运行状态时的转矩、转速和定子电流作为分析参数, 对PMSM正常及不同失磁故障状态的仿真结果进行对比分析, 结果表明: 随着失磁程度的增加, PMSM进入稳定时间延长, 输出转矩变小, 波动

增大; 转速波动增大, 电机起动时间延长; 定子电流随着失磁程度增加逐渐减小, 进入稳态运行时间变长, 稳态运行畸变率增大. 当PMSM失磁程度达到50%以上时, 电机已不能进入稳定运行状态.

采用 Matlab/Simulink 的 PMSM 失磁故障仿真方法,是以数学方程为基础的一种基于路模型的分析方法,虽然其运算速度快,且能定性得到失磁故障对 PMSM 性能参数的影响,但不能明确区分模拟的是均匀失磁故障还是局部失磁故障,以及失磁故障的部位所在,仅能从总体反映出失磁故障对 PMSM 性能的影响,这将是今后研究工作中需要解决的问题。

参考文献:

- [1] 王秀和. 永磁电机[M]. 北京:中国电力出版社,2007:7-8.
- [2] 王鑫,李伟力,程树康. 永磁同步电动机发展展望[J]. 微电机,2007,40(5):69.
- [3] RAJAGOPALAN S, ROUX W L, HABETLER T G, et al. Dynamic eccentricity and demagnetized rotor magnet detection in trapezoidal flux (brushless DC) motors operating under different load conditions[J]. IEEE Transaction on Power Electron, 2007, 22(5):2061.
- [4] PRIETO M D, ESPINOSA A G, RUIZ J R R, et al. Feature extraction of demagnetization faults in permanent-magnet synchronous motors based on box-counting fractal dimension [J]. IEEE Transactions on Industry Electronics, 2011, 58(5):1594.
- [5] RUOHO S, KOLEHMAINEN J, IKAHEIMO J, et al. Interdependence of demagnetization, loading, and temperature rise in a permanent-magnet synchronous motor [J]. IEEE Transactions on Magnetism, 2010, 46(3):949.
- [6] 卢伟甫,刘明基,罗应立,等. 自起动永磁同步电机起动过程退磁磁场的计算与分析[J]. 中国电机工程学报,2011,31(15):53.
- [7] 肖曦,张猛,李永东. 永磁同步电机永磁体状况在线监测[J]. 中国电机工程学报,2007,27(24):43.
- [8] ROSU M, SAITZ J, ARKKIO A. Hysteresis model for finite-element analysis of permanent demagnetization in a large synchronous motor under a fault condition [J]. IEEE Transactions on Magnetism, 2005, 41(6):2118.
- [9] RUOHO S, DLALA E, ARKKIO A. Comparison of demagnetization models for finite-element analysis of permanent magnet synchronous machines [J]. IEEE Transactions on Magnetism, 2007, 43(11):3964.
- [10] KRAL C, SPRANGERS R, WAARMA J, et al. Modeling demagnetization effects in permanent magnet synchronous machines [C] // The XIX International Conference on Electrical Machines. Piscataway: IEEE, 2010.
- [11] 张志艳,马宏忠,陈诚,等. 永磁电机失磁故障诊断方法综述[J]. 微电机, 2013, 46(3):77.
- [12] 崔胜民,柏睿,崔淑梅. PMSM 在 abc 坐标下的建模及故障仿真[J]. 机械设计与制造, 2011(7):178.
- [13] 张红生,胡炳娇. 永磁同步电机电机本体数学模型在 Matlab 中的仿真[J]. 自动化与仪器仪表, 2012(2):134.



引用格式:肖艳秋,李勇,杜江恒. 基于路段划分的车辆协同感知自组织交通系统构建[J]. 轻工学报,2017,32(6):94-99.

中图分类号:U495 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.012

文章编号:2096-1553(2017)06-0094-06

基于路段划分的 车辆协同感知自组织交通系统构建

Construction of vehicle collaborative sensing self-organizing traffic system based on road division

肖艳秋,李勇,杜江恒

XIAO Yan-qiu, LI Yong, DU Jiang-heng

关键词:

车联网;路段划分;协同感知;车间通信;交通信息系统

郑州轻工业学院 机电工程学院,河南 郑州 450002

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

Key words:

Internet of vehicles (IOV); road division; collaborative sensing; inter-vehicle communication; traffic-information system

摘要:为了降低交通信息传播过程中的延迟,实现在不同交通密度条件下交通信息的大范围高效传播,提出了一种车联网环境下基于路段划分的车辆协同感知方法.该方法将道路划分为多个等长路段并将一定数目的路段设定为一个路段集群,利用路段集群的协同感知来提高数据传输效率.用此方法构建分布式自组织交通系统框架,通过数组形式在数据库中收集交通信息,可改善传统的交通信息传输系统.仿真结果表明,本方法能够实现交通信息大范围的传输,即使在车辆密度较低的环境中也能够保证信息传播的延迟是在合理范围之内.

收稿日期:2017-03-24

基金项目:河南省重点科技攻关项目(152102210142)

作者简介:肖艳秋(1980—),男,河南省郑州市人,郑州轻工业学院副教授,博士,主要研究方向为制造物联、车联网与自动驾驶.

Abstract: In order to reduce the delay in the process of traffic information dissemination, and realize a wide range of efficient dissemination of traffic information under different traffic density conditions, a vehicle collaborative sensing method based on road segmentation and data abstraction in IVO was proposed. This method divided the road into multiple equal-length sections and set a certain number of sections as a road segment cluster, and used the cooperative perception of the road segment to improve the data transmission efficiency. On this basis, the distributed self-organizing traffic system framework was constructed to improve the traditional traffic information transmission system through the array form in the database to collect traffic data. Simulation results showed that this method could realize a wide range of traffic information transmission, even in the vehicle density environment could guarantee the delay of information dissemination within a reasonable range.

0 引言

目前,交通信息主要依靠车载广播和 GPS 数据进行传播,然而这些传统的信息传播方法具有一定的局限性,例如, GPS 系统容易受外界因素影响并且延迟较高. 车联网是以车、路、道路的基本设施为节点组成的网络,用于实现车、人、路三者之间的信息共享^[1]. 将先进的信息技术、通信技术、传感器技术、计算机技术等有效地综合运用于交通运输系统,加强车辆、道路、用户三者之间的联系,有利于数据的大范围传播^[2]. 如何利用车联网实现交通信息的高效传输是业界关注的热点. T. Kosch 等^[3]讨论了用于车辆环境的 AODV 路由的修改方法,即通过修改动态网络拓扑无线路由协议来实现车辆的定位和信息的传播;梁建武等^[4]提出了一种用于 Ad Hoc 网络的 AODV 路由协议的优化方法,可提高 AODV 路由协议对现有网络动态变化的适应能力. 以上方法的共同点是以路由为基础进行数据传播,然而数据传播的范围受到多跳范围的限制,因此在车辆密度低的环境中,传播范围有限. H. Hartenstein 等^[5-7]针对城市交通拥堵问题,设计了自动收集、整合和传播拥堵信息的系统;刘尊民等^[8]提出了一种基于 TCP/HTTP 的交通拥堵信息分享系统. 然而他们都没有考虑在城市环境中数据传播延迟的问题.

针对目前交通信息大范围传输过程中效率低、延迟高等问题,本文拟研究一种基于路段划

分的数据抽象与传播方法,并依据该方法提出基于协同感知的分布式自组织交通系统,以期实现在车辆密度较低的情况下,交通信息数据大范围、低延迟的传播,改善传统交通信息共享系统.

1 基于路段划分的数据传播方法

1.1 基于地图的数据抽象方法

假设每辆车和路侧单元都配备了数字地图,根据地图中道路的类型将道路划分为等长的路段,每一个或几个路段由一个路侧单元负责该段信息的收集与散布,在此基础上将每 I 个路段划分为一个集群 C_i , 其中, I 为集群内路段数目, i 为路段集群编号, 集群中包含 n 个路侧单元 R_n , 集群内的路侧单元通过有线的方式相互连接来实现数据互通, 车辆进入一个集群的通信范围, 通过与路侧单元信息交互, 获取该路侧集群内所有路段的交通信息. 图 1 为一个基于地图的道路分割数据抽象的实例, 其中, 道路路段长度为 100 m, 路段集群 C_1 包含 18#—23#

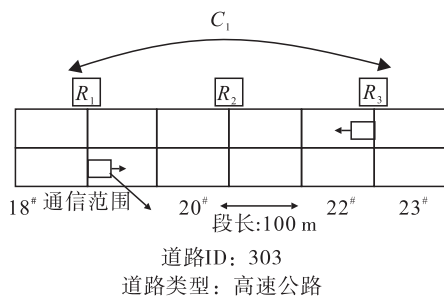


图 1 基于地图的道路分割数据抽象的实例

Fig. 1 An example of road division and data abstraction based on maps

共6个路段,一个路侧单元 R 负责两个路段信息的采集.

一个路段集群所涉及的路段长度均相等,此外,根据不同的道路类型来划分道路段长,如乡村公路选择 200 m 的段长;段长的减少虽然可提高可用信息的详细程度,但要求较高的数据速率,段长增加则会导致相反的效果. 根据数字地图和一个标准化的片段大小的选择,可以为每个路段定义一个标识符(段号)来识别该路段,例如,道路编号、集群号、路侧单元编号和路段数的组合. 每个路侧单元负责传输范围内所有路段信息的散布与接收,这些信息通过自身检测或者对过往车辆进行观察得到. 在数据抽象过程中,应用了数据聚合函数:如果在集群 C_i 中路段 C_i^j 的 m 个信息 d_1, d_2, \dots, d_m 已经在路侧单元 C_i^n 处接收到,新信息 $S_{C_i^n, C_i^j}$ 定义如下:

$$S_{C_i^n, C_i^j} = a(d_1, d_2, \dots, d_m)$$

其中, $i, j, n, m \in \mathbb{N}$. 此外,设置一个时间戳 T_s 作为当前的全球时间(通过全球定位系统),那么,数组 $(S_{C_i^n, C_i^j}, T_s)$ 完全可以描述一个路侧单元在一个路段所接收到的可用信息,当检测到一个事件 $(S_{C_i^n, C_i^j}, T_s)$ 时,通过检测其标识符和时间戳可以迅速判断出该事件的具体位置和是否过期.

1.2 基于道路分割的数据传播方法

信息传播的第二部分就是通过无线网络将信息以路段为单位向周边传播. 为了提高数据的传达率和传输效率,无线通信基于以下两个原则:

1) 本地广播. 所有的数据包以本地广播的形式传输(单跳),节点没有直接寻址并且没有传统(即在网络层上)的数据包和路由.

2) 应用层存储和转发. 所有的数据都是以单跳广播的形式发送的,应用程序负责转发每个段的信息. 在一个节点处接收到的信息总是被分析与当前可用的信息进行比较. 只有当

它仍然是相关的,并且比以前已知的信息更加准确,那么这条信息将会被存储在车载单元中. 如果消息 S 和 K 包含为集群 C_i 在路段 j 处通过传感器 C_i^n 接收到的信息,则数组 $(S_{C_i^n, C_i^j}, T_s)$ 是基于时间戳更新的,信息更新方法定义如下:

$$S_{C_i^n, C_i^j} \leftarrow \begin{cases} K_{C_i^n, C_i^j} & t_k > t_s \\ S_{C_i^n, C_i^j} & \text{otherwise} \end{cases}$$
$$T_s \leftarrow \max(t_k, t_s)$$

其中, $S_{C_i^n, C_i^j}$ 和 $K_{C_i^n, C_i^j}$ 是集群内同路段同节点的消息, (t_k, t_s) 是相应的时间戳.

具体传播过程如下.

1) 信息感知. 当车辆进入新集群路段时,车载单元开始检索当前路段中路侧单元所存储的和其他车辆发送的信息,通过与该集群中的一个路侧单元交互即可获取当前集群中的信息,设置集群内传感器互通可减少所有传感器互通时带来的大量数据冗余,同时也可避免路侧传感没有数据互通时车辆与所有传感器交互所带来的延迟.

2) 信息接收. 车载单元通过感知路段中其他车辆和路侧单元后,开始接收周围设备所传播的信息.

3) 信息检测. 车载单元根据所接收信息的时间戳和路段标识符来匹配本地数据库,若与本地数据库中的信息重复或信息时间戳已过期则忽略该信息;反之则将该信息存储在本地数据库中为应用层提供数据支持.

4) 信息传播. 车辆将本地数据库中信息传播到集群路段内其他的目标车辆,如果目标车辆第一次接收到该信息,即信息时间戳和标识符均没有重复,则车辆在所分配的时隙 T 以概率 1 重播广播事件. 给定车辆 A 和 B 之间的相对距离 $D_{A,B}$,平均传输范围 L 和预定时隙 N, T 的计算如下:

$$\begin{cases} T = S' \cdot \tau \\ S = N \left(1 - \left[\frac{\min(D_{A,B}, L)}{L} \right] \right) \end{cases}$$

其中, τ 是估计的单跳延迟, 包括媒体接入延迟和传播延迟; S' 是分配的时隙数. 这种传播模式的效果如图 2 所示.

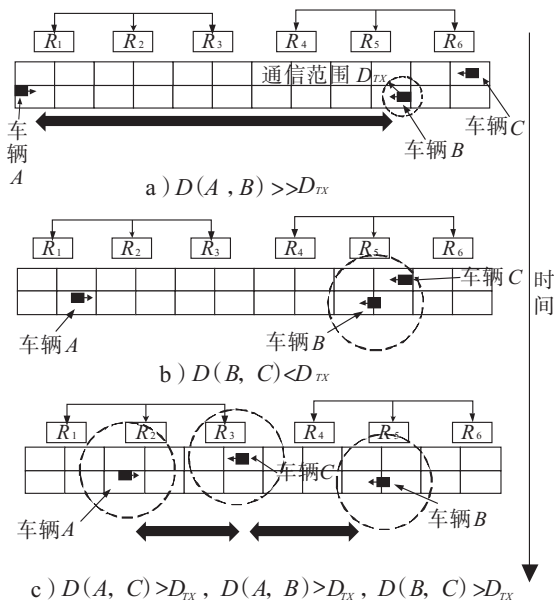


图 2 基于路段划分的信息传播模式

Fig. 2 Information dissemination model based on road division

在图 2a) 中, 车辆 B 和车辆 C 向同一个方向行驶, 且车辆 C 属于逆行, 车辆 A 与车辆 B, C 方向相反, 正常行驶, A, B, C 车辆均装有无线通信模块, 但由于 A 与 B 两车之间距离比传输范围 D_{tx} 大得多, 它们不能直接通信; 在图 2b) 中, 车辆 B 在车辆 C 的通信范围内, 它接收并存储广播每段数据; 在图 2c) 中, 车辆行驶了一段时间, 车辆 A, B, C 之间的距离均大于通信范围, 车辆 B 驶入新的路段集群, 与传感器 R_3 进行通信, 由于路段集群内的传感器可以交互信息, 因此车辆 A 通过与传感器 R_2 通信即可接收车辆 C 的信息.

2 基于协同感知的分布式自组织交通信息系统

目前, 比较常用的交通信息系统一般是基于车载广播的集中式信息广播系统, 通过车载

广播系统收集、散布交通信息, 遇到交通拥堵等状况时, 车辆向信息中心反馈拥堵信息、告知拥堵路段, 信息中心通过无线电广播或蜂窝移动网络向其他车辆发布拥堵信息, 听到广播的车辆根据广播内容来调整行驶路线.

这种方式有着非常明显的局限性, 即只有当车辆遇到交通状况时才会向信息中心反馈交通信息, 这就造成了信息的高延迟; 这种广播模式非常被动, 驾驶员只有打开当地的交通广播才能接收到当前的交通信息; 在一定的宽带条件限制下, 交通信息平台需要覆盖较大的区域. 针对这些问题, 本文在基于路段划分的信息传播方法基础之上, 拟提出一种分布式自组织交通信息系统, 将其运用于交通信息系统当中, 以提高目前交通系统的数据传播效率.

2.1 交通信息采集

根据上述交通信息传播方法, 设计了一种结合无线数字地图、定位系统(如 GPS)、车载无线交换机和车辆间无线 Ad Hoc 通信的分散自组织交通信息系统. 在这种分散的信息传播系统中, 车辆通过自组网相互通报各个路段交通状况. 车辆和路段集群独立地分析当地交通状况. 对于每个路段中行驶的车辆, 路侧单元记录车辆行驶的平均速度, 定义如下:

$$V_{C_i, C_i} = a(d_1, d_2, \dots, d_K) = \frac{1}{K} \sum_{k=1}^K d_k \quad K \in N$$

其中, V_{C_i, C_i} 表示路段集群 C_i 中 K 辆车的平均速度; d_1, d_2, \dots, d_K 分别表示 K 辆车的车速; 设置数据聚合的时间戳为 T_{C_i, C_i} . 结合当前道路类型, 数组 (V_{C_i, C_i}, T_S) 充分表明了道路在该路段某个时间点车辆的平均速度, 根据不同时间点的车辆平均速度变化来预测交通状况.

2.2 分布式自组织交通信息系统结构

图 3 为分布式自组织交通信息系统框架示意图. 它描述了基于协同感知的自组织交通系统的功能结构: 通过数组的形式在数据库中收

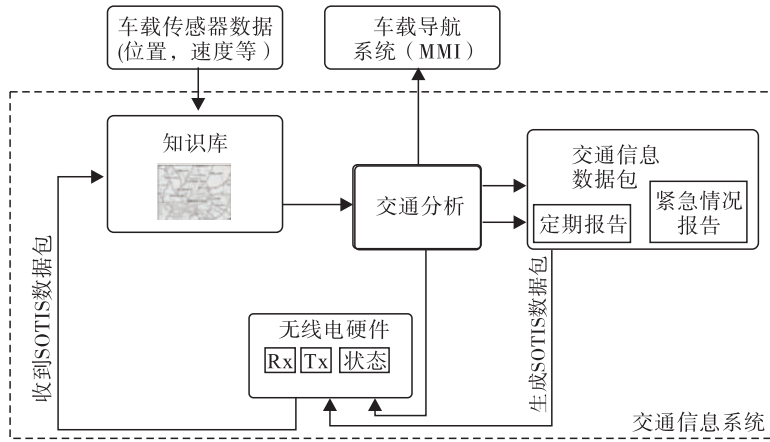


图3 分布式自组织交通信息系统框架

Fig. 3 Distributed self-organized traffic information system

集交通信息, 这些信息包含一定区域内所有路段的交通信息. 如果信息时间戳已经过时或已经达到数据库容量, 则将信息丢弃. 通过接收数据库中的信息, 每个车辆都进行交通分析计算, 以确定哪些信息可以用于下一组的广播数据.

3 仿真结果与分析

为了评估所提出交通信息系统的性能, 本文利用 Matlab 进行了仿真试验. 道路长度设置为 250 km, 车道数为 2, 交通密度分别为低密度 (7.5 辆/(车道 · km)⁻¹)、正常密度 (10 辆/(车道 · km)⁻¹)、高密度 (15 辆/(车道 · km)⁻¹) 3 种路况, 每种路况中均设定配有无线通信网络的车辆, 比例分别为 2%、5% 和 10%. 不同交通密度情况下信息延迟结果见图 4.

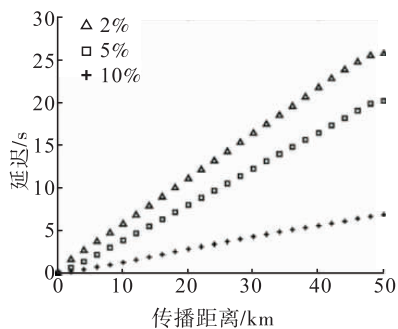
由图 4a) 可知, 在交通密度较低的情况下, 当有 2% 和 5% 的车辆配备无线通信设备时, 交通信息传播的延迟增幅明显. 这是由于当车辆密度较低时, 两辆装有无线通信设备的车辆在彼此通信范围内的概率会降低, 因此, 信息不能通过车车通信来直接传输. 由图 4c) 可知, 在交通密度较高时, 延迟增加的情况与低交通密度时较为类似, 但其原因是由于车辆密度大时车辆间彼此通信概率增加, 信息重复传播而导致车辆通信有一定的延迟. 由图 4b) 可知, 道路内

某路段的交通信息向外传播时, 平均延迟会随着传播距离的增加而线性增长. 当有 10% 的车辆配备无线通信设备时, 信息延迟非常小 (约为 3.5 s/km). 即使只有 2% 的车辆配备无线通信设备, 信息也同样发布成功, 但这种情况下延迟约增加到 27.3 s/km. 考虑到交通状况改变的时间尺度较大, 这种程度的延迟也是可以接受的. 图 4d) 对低交通密度、10% 的车辆配备无线通信设备的情况下进行了对比仿真, 结果表明, 本文所提出的方法较传统基于路由的数据传输方法数据传输效果更好.

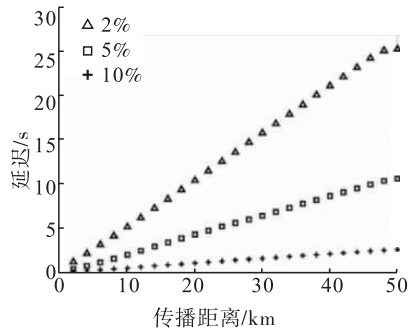
上述仿真结果表明, 本文方法能够将交通信息向周边传播, 即使在装备无线通信设备的车辆密度较低时仍然能够将交通信息成功送达并且保持相对较低的延迟, 相比传统的交通信息广播方法, 本文方法可以实现交通信息大范围、低延迟的传播.

4 结语

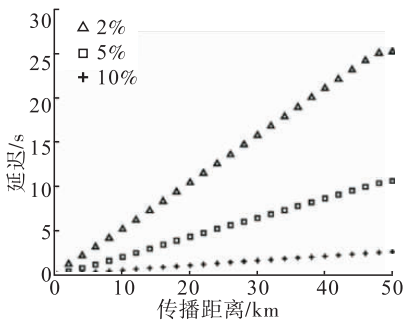
交通信息大范围高效的传播, 有利于人们掌控交通状况、优化出行路线并最终缓解交通拥堵等问题. 本文提出了一种用于车载自组织网络的基于路段划分的数据抽象与传播方法, 用于实现在低密度、大范围的交通环境中交通信息的低延迟传播; 并由此构建了基于协同感知



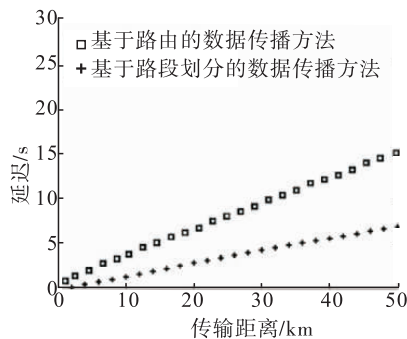
a) 低交通密度条件下具备无线通信能力车辆比例不同时信息延迟



b) 正常交通密度条件下具备无线通信能力车辆比例不同时信息延迟



c) 高交通密度条件下具备无线通信能力车辆比例不同时信息延迟



d) 基于路由的数据传输方法与本文所提出方法在低交通密度环境下传输效果对比

图4 不同交通密度情况下信息延迟结果

Fig. 4 Information delay results under different traffic density

的分布式自组织交通信息系统. 仿真实验结果验证了本方法的有效性. 下一步,我们将构建硬件实验平台,用于完善本文所提出的分布式交通信息传播系统,并模拟真实环境对所提出的方法进行改进.

参考文献:

[1] 胡欣宇,张洁. 车联网的发展与挑战[J]. 物联网技术,2017(2):56.
 [2] 孙小红. 车联网的关键技术及应用研究[J]. 通信技术,2013(4):47.
 [3] KOSCH T, SCHWINGENSCHLÖGL C, AI L. Information dissemination in multihop inter-vehicle networks [C] // The 5th IEEE International Conference on Intelligent Transportation Systems. Piscataway: IEEE Conference Publications, 2002:685.
 [4] 梁建武,马晓亮,徐龙龙. 移动 Ad Hoc 网络

AODV 路由协议的研究与优化[J]. 重庆大学学报(自然科学版),2015,38(4):152.

[5] HARTENSTEIN H, LABERTEAUX K P. VANET: Vehicular applications and inter-networking technologies [M]. Hoboken: Wiley, 2010.
 [6] NADEEM T, SHANKAR P, IFTODE L. A comparative study of data dissemination models for VANETs [C] // 3rd Annual International Conference on Mobile and Ubiquitous System: Networking and Services. Piscataway: IEEE Conference Publications, 2006:1.
 [7] FEKETE S P, SCHMIDT C, WEGENER A, et al. Empowered by wireless communication: Distributed methods for self-organizing traffic collectives [J]. ACM Transactions on Autonomous and Adaptive Systems, 2010, 5(3):11.
 [8] 刘尊民,曲大义,陈秀锋,等. 基于 TCP/HTTP 的交通拥堵信息分享系统[J]. 重庆交通大学学报(自然科学版),2014,33(5):107.



引用格式:毛晓波,李毅丰,杨怡航,等. 灶具防干烧系统红外测温自适应算法研究[J]. 轻工学报,2017,32(6):100-104.

中图分类号:TP277 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.013

文章编号:2096-1553(2017)06-0100-05

灶具防干烧系统红外测温自适应算法研究

Study on adaptive algorithm of infrared temperature measurement for cooker anti-overheating system

毛晓波,李毅丰,杨怡航,朱枫

MAO Xiao-bo, LI Yi-feng, YANG Yi-hang, ZHU Feng

郑州大学 电气工程学院,河南 郑州 450001

School of Electrical Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

关键词:

灶具;防干烧;红外测温;自适应算法

Key words:

cooker; anti-overheating; infrared temperature measurement; adaptive algorithm

摘要:针对灶具防干烧系统红外测温由于火焰不稳定等因素造成的锅底温度测量值波动问题,提出一种红外传感器测温的自适应算法.该算法对历史温度样本加权平均,并选取合适的温度采样频率和自适应系统参数,有效地滤除单次温度检测样本中的随机温度漂移,解决了温度波动造成的干烧信号判断区间增大问题,从而提高了干烧信号检测的灵敏度.实验结果表明,本算法能在5 s内稳定检测到干烧信号,且算法复杂度降至 $O(1)$.

收稿日期:2017-07-21

基金项目:国家自然科学基金项目(61473265);河南省高等学校重点科研项目(17A413011);郑州大学大学生创新创业训练计划项目(201610459008)

作者简介:毛晓波(1965—),男,河南省开封市人,郑州大学教授,主要研究方向为仿生机器视觉、智能仪器仪表.

Abstract: Aiming at the fluctuation of the pot bottom temperature measurement value caused by factors such as flame instability, an adaptive algorithm for temperature measurement of infrared sensor was proposed. By taking weighted average of the historical temperature samples and selecting the appropriate temperature sampling frequency and adaptive system parameters, the algorithm could effectively filter the stochastic temperature drift of the single temperature sample and solve the overheating signal judgement interval increasing caused by the temperature fluctuation so as to improve the sensitivity of overheating signal. Experimental results showed that the proposed algorithm could detect the overheating signal within 5 s, and the complexity of the algorithm was reduced to $O(1)$.

0 引言

随着燃气进入千家万户,在方便人们生活的同时也带来了诸多安全问题.燃气泄漏作为一个重要的安全隐患,学者们对其进行了多方面的研究;而对威胁厨房安全的另一个严重问题——灶具干烧,却鲜有报道.灶具干烧是指灶具上的锅具在被加热过程中由于液体完全蒸发造成超出正常温度使用范围而导致的危险状态.灶具干烧轻则烧坏锅具,重则引发火灾,因此,为灶具增加防干烧的功能十分必要.以电作热源烧热水的电器上多有防止干烧的装置,如电热水壶往往有两套独立的温度检测装置,一套用于检测水的沸点温度,另一套是一次性的高温断路电阻.检测水的沸点过去常用双金属开关,现在则多用居里点为 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的磁性材料.对于灶具中使用的锅具,由于锅内不同食材的沸点不同,其干烧温度无法像水的沸点那样稳定,必须采用其他方法进行检测.在对现有文献^[1-4]进行研究的基础上,本文拟提出一种红外传感器测温的自适应滤波算法,以期可靠地检测出干烧信号,从而为非接触式红外测温灶具防干烧系统提供燃气气路断开和干烧报警的判据.

1 灶具防干烧检测原理

灶具防干烧检测主要有接触式和非接触式两种形式:接触式通过检测专用燃气灶头上的防干烧探头测量锅具温度,以海尔厨电为代

表^[1];非接触式通过压电式无源无线温度传感器测量锅具温度,以方太厨具为代表^[2].结合燃气供气控制,这两种方式都可以实现防干烧的功能,但需要定制灶具或锅具,限制了通用性.笔者设计了非接触式红外测温灶具防干烧系统^[3],并取得了相关专利^[4].该系统只需在现有灶具面板上开设小孔,使内置的红外温度检测传感器能实时监测锅底温度,具有安装方便、非接触等优点.

由于锅底红外辐射信号要通过火焰区域才能到达红外温度传感器,火焰的变化会直接影响温度传感器的读数,造成锅底温度测量值的偏差,实测温度是反映锅底实际温度的一条波动的曲线见图 1^[3].

锅具防干烧的核心问题是测出干烧发生的时刻,即图 1 中温度由阶段 B 到阶段 C 转变的区间 Δt .这个过程中由于锅具内液体被加热蒸发干净,对于热容相对较小的金属锅具来说,温度会急剧上升.但实测温度波动的存在会导致

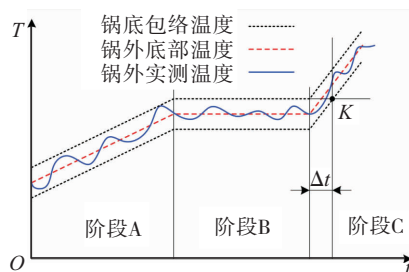


图 1 锅底实测温度与实际温度关系图

Fig. 1 Relationship between the measured temperature and the real temperature of pot bottom

在阶段 B 甚至阶段 A 产生干烧误判. 要解决以上问题, 需要对火焰变化造成的红外温度传感器实测温度的波动值进行过滤. 考虑到火焰变化规律无法预知, 故红外传感器的测温采用自适应滤波算法.

2 红外传感器测温自适应算法

2.1 算法设计

自适应控制是指在对问题进行分析、建模的过程中, 依据问题的本征自动选取算法的各类参数, 使处理过程与问题域对象数据的统计分布特性相吻合, 从而取得最佳处理效果的目标逼近过程. 自适应算法作为自适应控制的核心, 目前常用的算法有迫零算法^[5]、最陡下降算法^[6]、LMS 算法^[7]、RLS 算法^[8]和盲均衡算法^[9]等. 灶具干烧检测的目标非常明确, 即在加热过程中根据锅底温度变化找出阶段 B 到阶段 C 的转折点, 设计方案中选用低功耗的单片机来实现. 自适应检测算法步骤如下.

步骤 1 读红外温度传感器当前温度数据 $T_i (i = 1, 2, 3, \dots, n)$;

步骤 2 求前 δ 次温度数据均值 $T_{w_i} = \frac{1}{\delta} \sum_{i=1}^{\delta} T_i$;

步骤 3 从 $\delta + 1$ 次温度数据开始, $D_{CD_i} = T_i - T_{w_{i-1}}, T_{w_i} = T_{w_{i-1}} + \frac{1}{\delta} \times D_{CD_i}$, 其中 $i = \delta + 1, \delta + 2, \dots, n$;

步骤 4 从第 $\delta + M$ 次开始, 计算前 M 次的 T_w 值的算法平均值 $T_{A_i} = \frac{1}{M} \sum_{k=i-M}^i T_{w_k} (i = \delta + M, \delta + M + 1, \dots, n)$;

步骤 5 从第 $\delta + M + 1$ 次开始, 判断 T_{A_i} 和 $T_{A_{i-1}}$ 的值的的大小, 得 $L_i = \begin{cases} 1 & T_{A_i} > T_{A_{i-1}} \\ -1 & T_{A_i} \leq T_{A_{i-1}} \end{cases} (i = \delta + M + 1, \delta + M + 2, \dots, n)$;

步骤 6 从第 $\delta + M + N + 1$ 次开始, 计算

前 N 次的 L 的和 $S_i = \sum_{k=i-N}^i L_k (i = \delta + M + N + 1, \delta + M + N + 2, \dots, n)$;

步骤 7 从第 $\delta + M + N + K + 1$ 次开始, 设 $Q_i = \sum_{k=i-K}^i S_k (i = \delta + M + N + K + 1, \delta + M + N + K + 2, \dots, n)$, 则

$$B_i = \begin{cases} 0 & Q_i > W \\ 1 & Q_i \leq W \end{cases}$$

其中, B_i 为 B 段信号, 在加热升温 A 段时 B_i 为 0, 在 B 段时 B_i 为 1, 当 B_i 再次为 0 时即进入 C 段, 可作为干烧发生的判断信号.

1.2 参数选择

考虑到算法的运行平台为嵌入式单片机, 在设计算法时需要尽量减少计算量, 以上算法各步骤的参数选择和实现要点如下.

1) 步骤 3 中, D_{CD} 为本次测量温度值与上次温度的加权均值, 对第 $\delta + 1$ 次温度数据来说, 这个加权均值为前 δ 次温度值的平均值. 考虑到用处理器向右移位进行除法运算速度最快, δ 值取 2 的整数幂, 可取 $\delta = 16$, 即 2^4 , 运算时只需将 D_{CD} 右移 4 位即可计算出 $\frac{1}{\delta} \times D_{CD}$ 的值.

2) 系统所选用的红外温度传感器的温度读取周期^[10]为 1.024 ms, 根据这一限制, 按每秒采样 950 次计算. 经验参数表明, 一般的锅具干烧 10 s 以内不会对锅具和锅具内的食材产生破坏, 为安全起见, 控制算法在 5 s 内完成干烧信号的确定, 即干烧信号应该在 4750 个采样周期内产生. 由此选定 $M = 128, N = 128, K = 512$, 则 $\delta + M + N + K + 1 = 16 + 128 + 128 + 512 + 1 = 785$, 折合时间为 $785/950 \text{ s} \approx 0.826 \text{ s}$.

3) 步骤 4, 6, 7 中都有求和运算, 按以上参数选择, 求和项分别达 128, 128, 512. 在一次采样中, 这样的运算量对于单片机来说是个负担, 因此在每次计算时可以保存第 1 项的值与当前值的累加和, 在下次计算时减去上次的第 1 项

值并加上当前最后项即可,这样的算法需要用存储空间来换计算时间,空间需求量即 $M + N + K = 128 + 128 + 512 = 768$ 个存储单元.

通过以上分析,该算法的复杂度为 $O(1)$.

3 算法验证

3.1 实测温度数据

取文献[3]中双层底不锈钢锅作为测试对象,用该锅烧水时,锅底加热面干烧临界温度为 $228.8\text{ }^{\circ}\text{C}$. 为了便于观察,在 60 s 时段内测到用燃气灶大火加热时锅底温度变化的 A, B, C 阶段,通过不断调整锅内水量,反复多次实验后,取阶段 B 为 28 s 左右的一组数据. 实验中温度采样频率为 950 Hz , 共得到 $57\ 000$ 个温度测量值. 为便于呈现,以温度折线图形式表示见图 2.

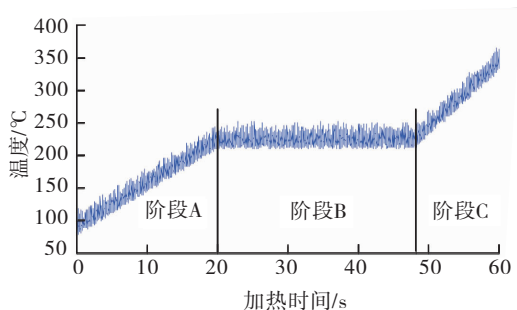


图 2 双层底不锈钢锅锅底实测温度

Fig. 2 The bottom measured temperature of the double bottom stainless steel pot

3.2 算法验算

1) 在 $57\ 000$ 项实测温度数据中,按算法规则,第 16 次才能计算平均温度,这里令前 15 次平均温度直接等于实测温度值,为对比原始温度采样值和平均温度值的不同变化率,列出前 20 次温度测量值如表 1 所示. 由表 1 可以看出,从第 17 次开始,相对于实测温度,平均温度值波动明显减小.

2) 自适应算法中参数的选择会直接影响算法的结果,为比较选取不同参数的效果,取

$\delta = 16$ 和 $\delta = 128$ 两种情况,计算得到的 T_w 值,如图 3 所示. 选定 $M = 128, N = 128, K = 512$, 分别计算 $\delta = 16$ 和 $\delta = 128$ 时 B_i 的值见图 4.

由图 3 可以看出,取 $\delta = 128$ 比 $\delta = 16$ 时的自适应温度曲线更光滑,但 AB 和 BC 段的拐点更为滞后,这是因为 $\delta = 128$ 时的运算量是 $\delta = 16$ 时的 8 倍.

表 1 前 20 次锅底加热实测温度和平均温度

Table 1 The measured temperature and average temperature of pot bottom of the first 20 times

序号	锅底实测温度	平均温度
1	95.72	95.72
2	98.10	98.10
3	106.89	106.89
4	100.31	100.31
5	114.04	114.04
6	115.73	115.73
7	111.10	111.10
8	92.95	92.95
9	96.64	96.64
10	93.16	93.16
11	99.14	99.14
12	96.43	96.43
13	92.67	92.67
14	91.74	91.74
15	87.86	87.86
16	110.33	100.18
17	113.02	101.26
18	99.49	101.34
19	105.24	101.24
20	85.43	100.31

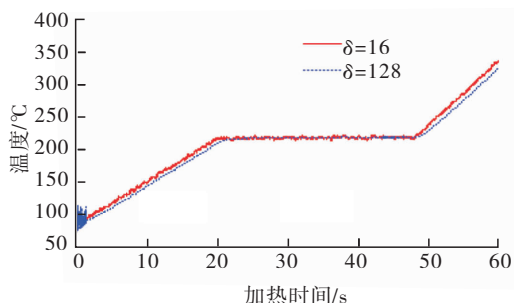


图 3 $\delta = 16, \delta = 128$ 时 T_w 值

Fig. 3 The value of T_w with $\delta = 16$ and $\delta = 128$

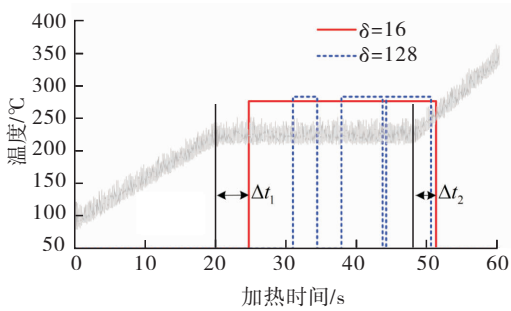


图4 $\delta = 16, \delta = 128$ 时 B 段信号

Fig. 4 The signal of B segment with $\delta = 16$ and $\delta = 128$

由图4可以看出,当 $\delta = 16$ 时,稳定输出B段信号,其中 $\Delta t_1 = 4.63\text{ s}$, $\Delta t_2 = 3.07\text{ s}$ 分别是自适应算法测出锅底温度进入B段和C段时的时滞,显然 $\Delta t_2 < \Delta t_1$,说明算法对从B段到C段的干烧信号更为敏感,且 $\Delta t_2 = 3.07\text{ s} < 5\text{ s}$,实现了设计目标;当 $\delta = 128$ 时,B段信号不能稳定产生,要想稳定产生B段信号,必须增大 M, N, K 的值,这样 Δt_2 的值也会相应增加,不能实现在5s内检测到干烧信号的目标。

4 结语

本文设计了灶具防干烧系统红外测温自适应算法,通过对历史温度样本加权平均,并选取合适的温度采样频率和自适应系统参数,能在5s内稳定检测到干烧信号。选取算法参数时考虑选择单片机的运算能力,用2的整数幂来构成参数,变除法运算为移位运算,从而将算法复杂度降至 $O(1)$ 。

通过观察加热锅底的实测温度可以发现,温度实测值在下界区域时比在上界区域时更加稳定。本算法是针对所有被测温度值进行运算来计算干烧信号的,如果改用下界轮廓值来计算干烧信号,干烧信号的测出时滞 Δt_2 应该会更小,更能提前发现干烧。因此,对锅底实测温

度的下界区域进行误差分析和从下界区域进行干烧信号判定将是下一步的研究方向。

参考文献:

- [1] 张鹏. 防干烧过热保护在大火力家用燃气灶上的应用综述和开发研究[J]. 电器, 2012(S1): 541.
- [2] 宁波方太厨具有限公司. 一种防止锅具干烧的无线测温装置及其工作方法:105784155A [P]. 2016-07-20.
- [3] 李毅丰,毛晓波,杨怡航,等. 非接触式红外测温灶具防干烧系统设计[J]. 郑州大学学报(工学版), 2017,38(5):18.
- [4] 李毅丰,李涛,刘文彬,等. 防止金属锅烧干的报警装置:205211093U [P]. 2016-05-04.
- [5] 芮义,斌李鹏,魏广雷,等. 基于迫零算法的二相码旁瓣抑制滤波器设计[J]. 现代雷达, 2013, 35(8):28.
- [6] 燕飞,赵书敏. 基于最陡下降的稳健 LCMV 波束形成算法[J]. 计算机仿真, 2012, 29(6):117.
- [7] 高利娟,刘云,赵玲. 双向数据挖掘的反馈预测分析[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2011, 26(6): 80.
- [8] 王红星,陆发平,刘传辉,等. 基于 RLS 算法的椭圆球面波调制信号预失真方法[J]. 中国电子科学研究院学报, 2016, 11(1): 98.
- [9] 郭业才,胡苓苓,丁锐. 基于量子粒子群优化的正交小波加权多模盲均衡算法[J]. 物理学报, 2012, 61(5): 054304-1.
- [10] Melexis. MLX90614 family Single and Dual Zone Infra Red Thermometer in TO-39 [EB/OL]. (2015-06-29) [2017-03-20]. <https://www.melexis.com/en/documents/documentation/datasheets/mlx90614>.



引用格式:段淑娟,秦建国.反中心自共轭矩阵的一些性质[J].轻工学报,2017,32(6):105-108.

中图分类号:O151.21 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.6.014

文章编号:2096-1553(2017)06-0105-04

反中心自共轭矩阵的一些性质

Properties on centroskew self-conjugate matrix

段淑娟,秦建国

DUAN Shu-juan, QIN Jian-guo

郑州轻工业学院 数学与信息科学学院,河南 郑州 450002

College of Mathematics and Information Science, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China

关键词:

反中心自共轭矩阵;
翻转矩阵;伴随矩阵;
逆矩阵

Key words:

centroskew self-conjugate matrix;
flip matrix;
adjoint matrix;
inverse matrix

摘要:引入反中心自共轭矩阵的定义和相关矩阵理论,证明了如下命题:1)反中心自共轭矩阵 A 的转置矩阵 A^T ,逆矩阵 A^{-1} ($|A| \neq 0$) 仍为反中心自共轭矩阵;2)任意两个反中心自共轭矩阵的直积为反中心自共轭矩阵;3)反中心自共轭矩阵 A 的伴随矩阵 A^* (当 A 的阶数为偶数时)和 A^m (当 m 为奇数时)仍为反中心自共轭矩阵;4)反中心自共轭矩阵 A 与 $-\bar{A}$ 有相同的特征值,且当 $0 \neq X_0 = (a_1, a_2, \dots, a_n)^T \in C^n$ 是属于反中心自共轭矩阵 $A \in C^{n \times n}$ 的特征值 λ_0 的任一特征向量时, $VX_0 = (a_n, a_{n-1}, \dots, a_1)^T$ 是属于 $-\bar{A}$ 的特征值 λ_0 的特征向量.

收稿日期:2016-09-15

基金项目:国家自然科学基金项目(11501526)

作者简介:段淑娟(1980—),女,河南省新乡市人,郑州轻工业学院讲师,主要研究方向为偏微分方程和矩阵理论及应用.

Abstract: The definition of centroskew self-conjugate matrix and some matrix theories were introduced. It was proved that the transposed matrix A^T , and inversion $A^{-1} (|A| \neq 0)$ of a centroskew self-conjugate matrix A were still centroskew self-conjugate matrix. The direct product of any two centroskew self-conjugate matrix was centroskew self-conjugate matrix. The A^* of an even order centroskew self-conjugate matrix and A^m of the odd number degree power were still centroskew self-conjugate matrix. When the centroskew self-conjugate matrix of A and $-\bar{A}$ had the same characteristic values, and $0 \neq X_0 = (a_1, a_2, \dots, a_n)^T \in C^n$ was a characteristic vector of the characteristic value λ_0 belonging to a centroskew self-conjugate matrix $A \in C^{n \times n}$, $VX_0 = (a_n, a_{n-1}, \dots, a_1)^T$ was also a characteristic vector of the characteristic value λ_0 belonging to $-\bar{A}$.

0 引言

矩阵的各种对称(共轭对称)是矩阵论的重要内容,在数学研究和应用中至关重要.实对称矩阵和 Hermite 矩阵的用途为人们所熟悉,但对于矩阵关于次对角线对称(共轭对称)和中心对称(共轭对称)的用途却有所忽略.而后者在信息论、经济数学、组合矩阵论、辛几何、控制论、物理学等众多学科中同样重要^[1],例如中心对称矩阵和反中心对称矩阵可以是一个矩阵方程(组)的解^[2].目前,已有学者对对称矩阵、次线对称矩阵和中心对称矩阵的性质,以及反中心对称矩阵的性质作了一些研究,取得了良好的结果^[3-4].鉴于此,本文拟在对有关对称矩阵研究的基础上,引入反中心自共轭矩阵的定义并对其进行研究,以期丰富矩阵对称的理论,并为其应用提供参考.

1 主要命题证明

本文约定用 $C^{n \times n}$, $V_n = (\delta_{i,n-j+1})_{i,j=1}^n$, E 和 A^* 分别表示复数域上全体 $n \times n$ 矩阵的集合, n 阶翻转矩阵, n 阶单位矩阵和 n 阶方阵 A 的伴随矩阵.

定义 1 设矩阵 $A = (a_{ij}) \in C^{n \times n}$, 记 $A^\# = V_n A V_n$, 若

$$A^\# = (-\bar{A})\bar{A}$$

则称 A 为反中心自共轭矩阵(或中心自共轭矩阵).其中 V_n 是 n 阶翻转矩阵,即

$$V_n = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \cdots & 1 \\ 0 & \cdots & 1 & 0 \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0 & \cdots & 0 \end{bmatrix}$$

显然,对于矩阵 $A = (a_{ij}) \in C^{n \times n}$, 当且仅当

$$a_{ij} = -\bar{a}_{n-i+1, n-j+1} \quad i, j = 1, 2, \dots, n \quad (2)$$

时, A 为反中心自共轭矩阵.

定义 2^[5] 设 $A = (a_{ij})_{m \times n} \in C^{m \times n}$, $B = (b_{ij})_{p \times q} \in C^{p \times q}$, 则称分块矩阵

$$A \otimes B = \begin{bmatrix} a_{1,1}B & a_{1,2}B & \cdots & a_{1,n}B \\ a_{2,1}B & a_{2,2}B & \cdots & a_{2,n}B \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{m,1}B & a_{m,2}B & \cdots & a_{m,n}B \end{bmatrix} \in C^{mp \times nq}$$

为矩阵 A 与 B 的张量积.

定理 1 设 $A = (a_{ij}), B = (b_{ij}) \in C^{n \times n}$, A 和 B 都是反中心自共轭矩阵, 则 $A \pm B, A^T$ 也是反中心自共轭矩阵.

定理 2 设 $A = (a_{ij}) \in C^{n \times n}$, 且 $A^\# = -\bar{A}$, 则当 n 是奇数时, A^* 是中心自共轭矩阵; 当 n 是偶数时, A^* 是反中心自共轭矩阵.

证明 i) 对于 n 阶方阵 A, B , 有 $(AB)^* = B^* A^*$.

ii) 由翻转矩阵 $V = (\delta_{i,n-j+1})_{i,j=1}^n$ 满足 $VV = E$ 可知, V 是可逆矩阵, 其逆矩阵是它自身, 其伴随矩阵 $V^* = |V|V^{-1} = (-1)^{\frac{(n+2)(n+1)}{2}}^{-1}V$, 则由反中心自共轭矩阵的定义和证明 i) 可得

$$(-\bar{A}^*) = (VAV)^* = V^* A^* V^* =$$

$$(-1)^{\frac{(n+2)(n+1)}{2}-1} \mathbf{VA}^* (-1)^{\frac{(n+2)(n+1)}{2}-1} \mathbf{V} = \mathbf{VA}^* \mathbf{V} \quad \textcircled{3}$$

即 $\mathbf{VA}^* \mathbf{V} = (-\bar{\mathbf{A}})^*$.

iii) $(-\bar{\mathbf{A}})^*$ 中的 (i, j) 元是

$$(-1)^{i+j}.$$

$$\begin{pmatrix} \bar{a}_{1,1} & \cdots & \bar{a}_{1,i-1} & \bar{a}_{1,i+1} & \cdots & \bar{a}_{1,n} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ \bar{a}_{j-1,1} & \cdots & \bar{a}_{j-1,i-1} & \bar{a}_{j-1,i+1} & \cdots & \bar{a}_{j-1,n} \\ \bar{a}_{j+1,1} & \cdots & \bar{a}_{j+1,i-1} & \bar{a}_{j+1,i+1} & \cdots & \bar{a}_{j+1,n} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ \bar{a}_{n,1} & \cdots & \bar{a}_{n,i-1} & \bar{a}_{n,i+1} & \cdots & \bar{a}_{n,n} \end{pmatrix}.$$

$$(-1)^{n-1} = (-1)^{i+j} \bar{M}_{j,i} (-1)^{n-1} =$$

$$(-1)^{n-1} \bar{A}_{j,i}$$

其中, $\bar{M}_{j,i}$ 是 $|\bar{\mathbf{A}}|$ 中的 (j, i) 元 $\bar{a}_{j,i}$ 的余子式, $\bar{A}_{j,i}$

是 $(\bar{\mathbf{A}}^*)$ 的 (i, j) 元. 故由③可得

$$\mathbf{VA}^* \mathbf{V} = (-\bar{\mathbf{A}})^* = (-1)^{n-1} \bar{\mathbf{A}}^* \quad \textcircled{4}$$

于是,当 n 是奇数时, \mathbf{A}^* 是中心自共轭矩阵;当 n 是偶数时, \mathbf{A}^* 是反中心自共轭矩阵.

定理 3 设 $\mathbf{A} = (a_{ij}), \mathbf{B} = (b_{ij}) \in \mathbf{C}^{n \times n}$, 且 $\mathbf{A}^\# = -\bar{\mathbf{A}}, \mathbf{B}^\# = -\bar{\mathbf{B}}$, 则有

$$(\mathbf{AB})^\# = \overline{\mathbf{AB}}$$

证明 由 $\mathbf{VV} = \mathbf{E}, \mathbf{VAV} = \mathbf{A}^\# = -\bar{\mathbf{A}}$ 及 $\mathbf{VBV} = \mathbf{B}^\# = -\bar{\mathbf{B}}$ 知

$$\mathbf{V}(\mathbf{AB})\mathbf{V} = \mathbf{V}(\mathbf{AVVB})\mathbf{V} = (\mathbf{VAV})(\mathbf{VBV}) =$$

$$(-\bar{\mathbf{A}})(-\bar{\mathbf{B}}) = \overline{\mathbf{AB}} = \overline{\mathbf{AB}}$$

所以 $(\mathbf{AB})^\# = \overline{\mathbf{AB}}$ 成立.

特殊地,对于任意正整数 m , $\mathbf{VA}^m \mathbf{V} = (-1)^m \overline{\mathbf{A}^m}$. 当 m 是偶数时, \mathbf{A}^m 是中心自共轭矩阵;当 m 是奇数时, \mathbf{A}^m 是反中心自共轭矩阵.

定理 4 设 $\mathbf{A} = (a_{ij}) \in \mathbf{C}^{n \times n}$, 且 $\mathbf{A}^\# = -\bar{\mathbf{A}}, |\mathbf{A}| \neq 0$, 则 \mathbf{A}^{-1} 是反中心自共轭矩阵.

证明 因为 $\mathbf{A}^\# = -\bar{\mathbf{A}}$, 所以有 $|\bar{\mathbf{A}}| = (-1)^n |\mathbf{VAV}| = (-1)^n |\mathbf{A}|$. 再由④式和 $(\mathbf{VAV})^{-1} = (-\bar{\mathbf{A}})^{-1}$, 有

$$(\mathbf{A}^{-1})^\# = \mathbf{VA}^{-1} \mathbf{V} = \mathbf{V} \frac{1}{|\mathbf{A}|} \mathbf{A}^* \mathbf{V} = \frac{1}{|\mathbf{A}|} \mathbf{VA}^* \mathbf{V} =$$

$$\frac{1}{|\mathbf{A}|} (-1)^{n-1} \overline{\mathbf{A}^*} = (-1)^{n-1} \frac{1}{|\bar{\mathbf{A}}|} \overline{\mathbf{A}^*} =$$

$$(-1)^{n-1} \left(\frac{1}{|\bar{\mathbf{A}}|} \overline{\mathbf{A}^*} \right) =$$

$$(-1)^{n-1} (-1)^n \left(\frac{1}{|\mathbf{VAV}|} \overline{\mathbf{A}^*} \right) =$$

$$- \left(\frac{1}{|\mathbf{V}| |\mathbf{A}| |\mathbf{V}|} \overline{\mathbf{A}^*} \right) = - \left(\frac{1}{|\mathbf{A}|} \overline{\mathbf{A}^*} \right) = -\overline{\mathbf{A}^{-1}}$$

所以, \mathbf{A}^{-1} 是反中心自共轭矩阵.

定理 5 设 \mathbf{A} 和 $\mathbf{B} (\mathbf{B} \in \mathbf{C}^{m \times n})$ 均为反中心自共轭矩阵, 则 $\mathbf{A} \otimes \mathbf{B}$ 是反中心自共轭矩阵.

证明 记

$$\mathbf{V}_{n^2} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \cdots & 0 & \mathbf{V}_n \\ 0 & 0 & \cdots & \mathbf{V}_n & 0 \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ 0 & \mathbf{V}_n & \cdots & 0 & 0 \\ \mathbf{V}_n & 0 & \cdots & 0 & 0 \end{bmatrix} \in \mathbf{C}^{n^2 \times n^2}$$

其中, \mathbf{V}_n 如①式所定义. 利用反中心自共轭矩阵的定义和②式, 可得

$$\mathbf{V}_{n^2} (\mathbf{A} \otimes \mathbf{B}) \mathbf{V}_{n^2} =$$

$$\mathbf{V}_{n^2} \begin{bmatrix} a_{1,1} \mathbf{B} & a_{1,2} \mathbf{B} & \cdots & a_{1,n} \mathbf{B} \\ a_{2,1} \mathbf{B} & a_{2,2} \mathbf{B} & \cdots & a_{2,n} \mathbf{B} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{n,1} \mathbf{B} & a_{n,2} \mathbf{B} & \cdots & a_{n,n} \mathbf{B} \end{bmatrix} \mathbf{V}_{n^2} =$$

$$\begin{bmatrix} a_{n,1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} & a_{n,2} \mathbf{V}_n \mathbf{B} & \cdots & a_{n,n} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \\ a_{n-1,1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} & a_{n-1,2} \mathbf{V}_n \mathbf{B} & \cdots & a_{n-1,n} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{1,1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} & a_{1,2} \mathbf{V}_n \mathbf{B} & \cdots & a_{1,n} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \end{bmatrix} \mathbf{V}_{n^2} =$$

$$\begin{bmatrix} a_{n,n} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n & a_{n,n-1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n & \cdots & a_{n,1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n \\ a_{n-1,n} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n & a_{n-1,n-1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n & \cdots & a_{n-1,1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{1,n} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n & a_{1,n-1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n & \cdots & a_{1,1} \mathbf{V}_n \mathbf{B} \mathbf{V}_n \end{bmatrix} =$$

$$- \begin{bmatrix} a_{n,n} & a_{n,n-1} & \cdots & a_{n,1} \\ a_{n-1,n} & a_{n-1,n-1} & \cdots & a_{n-1,1} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ a_{1,n} & a_{1,n-1} & \cdots & a_{1,1} \end{bmatrix} \otimes \bar{\mathbf{B}} =$$

$$- \begin{bmatrix} -\bar{a}_{1,1} & -\bar{a}_{1,2} & \cdots & -\bar{a}_{1,n} \\ -\bar{a}_{2,1} & -\bar{a}_{2,2} & \cdots & -\bar{a}_{2,n} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ -\bar{a}_{n,1} & -\bar{a}_{n,n-1} & \cdots & -\bar{a}_{n,n} \end{bmatrix} \otimes \bar{B} = \overline{A \otimes B}^{[3]}$$

因此, $A \otimes B$ 是反中心自共轭矩阵.

定理 6 设 $0 \neq X_0 = (a_1, a_2, \dots, a_n)^T \in C^n$ 是属于反中心自共轭矩阵 $A \in C^{n \times n}$ 的特征值 λ_0 的任一特征向量, 则 $\lambda_0 \in \sigma(-\bar{A})$, 且

$$VX_0 = (a_n, a_{n-1}, \dots, a_1)^T$$

是属于 $-\bar{A}$ 的特征值 λ_0 的特征向量.

证明 由上述条件可知, $AX_0 = \lambda_0 X_0$, 在等式两边同时左乘以 V 得

$$VAX_0 = V\lambda_0 X_0 = \lambda_0 VX_0$$

但

$$VAX_0 = VA(VV)X_0 = (VAV)VX_0 = -\bar{A}(VX_0)$$

所以

$$-\bar{A}(VX_0) = \lambda_0(VX_0) \tag{5}$$

⑤式表明 $\lambda_0 \in \sigma(-\bar{A})$, 并由 V 可逆、 $X_0 \neq 0$ 可得, $VX_0 \neq 0$, 从而 $VX_0 = (a_n, a_{n-1}, \dots, a_1)^T$ 是属于 $-\bar{A}$ 的特征值 $\lambda_0 \in \sigma(-\bar{A})$ 的特征向量.

定理 7 若 A 为 Hermite 的反中心自共轭矩阵, 则有

$$I_n(A) = I_n(-\bar{A})$$

其中, $I_n(A)$ 表示 A 的惯性.

证明 由 $-\bar{A} = VAV = \bar{V}^T AV$ 和 $|V| \neq 0$ 可知, A 与 $-\bar{A}$ 是相合的. 而相合的矩阵具有相同的惯性^[6], 于是

$$I_n(A) = I_n(-\bar{A})$$

2 结论

本文引用反中心自共轭矩阵的定义和相关矩阵的理论, 证明了如下命题: 1) 反中心自共轭矩阵 A 的转置矩阵、逆矩阵仍为反中心自共轭矩阵; 2) 任意两个反中心自共轭矩阵的直积为反中心自共轭矩阵; 3) A 的伴随矩阵 A^* (当 A 的阶数为偶数) 和 A^m (当 m 为奇数时) 仍为反中心自共轭矩阵; 4) 反中心自共轭矩阵 A 与 $-\bar{A}$ 有相同的特征值, 且当 $0 \neq X_0 = (a_1, a_2, \dots, a_n)^T \in C^n$ 是属于反中心自共轭矩阵 $A \in C^{n \times n}$ 的特征值 λ_0 的任一特征向量时, $VX_0 = (a_n, a_{n-1}, \dots, a_1)^T$ 是属于 $-\bar{A}$ 的特征值 λ_0 的特征向量. 本文研究结果丰富了矩阵对称的理论, 可为其应用提供参考.

参考文献:

[1] 袁晖坪. 次亚正定矩阵[J]. 数学杂志, 2001, 21(1): 29.

[2] QIN J G, SONG G A. The general and centro (skew) symmetric solutions to a system of matrix equations over an arbitrary skew field [J]. Chin Quart J of Math, 2006, 21(1): 66.

[3] 周永安, 秦韬. 关于中心对称矩阵的几个性质 [J]. 数学的实践与认识, 2008(8): 186.

[4] 谭瑞梅, 薛雪莉. 关于反中心对称矩阵的某些性质探讨[J]. 大学数学, 2010, 26(4): 173.

[5] 程云鹏, 张凯院, 徐仲. 矩阵论[M]. 西安: 西北工业大学出版社, 2006.

[6] 陈公宁. 矩阵理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2007.