



引用格式:杜少平,胡海艳,甘祥武,等. 重组毕赤酵母产 β -甘露聚糖酶的高密度发酵研究[J]. 轻工学报,2020,35(4):1-7.

中图分类号:TS201.3 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.001

文章编号:2096-1553(2020)04-0001-07

重组毕赤酵母产 β -甘露聚糖酶的高密度发酵研究

Study on high-density fermentation of β -mannanase produced by constitutive *Pichia pastoris*

杜少平,胡海艳,甘祥武,黄秀敏,叶俊豪

DU Shaoping, HU Haiyan, GAN Xiangwu, HUANG Xiumin, YE Junhao

广州市微生物研究所,广东 广州 510663

Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou 510663, China

关键词:

β -甘露聚糖酶;毕赤酵母;高密度发酵;发酵调控

Key words:

β -mannanase;
Pichia pastoris;
high-density
fermentation;
fermentation control

摘要:通过摇瓶实验,对重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α -Man26A-39 发酵培养基的碳源、氮源进行筛选,并在 50 L 发酵罐中采用间歇流加策略,对其发酵条件进行调控,以实现重组毕赤酵母高密度发酵产 β -甘露聚糖酶.结果表明:葡萄糖为发酵培养基的最适碳源,其初始添加质量浓度为 30 g/L;初始质量分数为 6% 的玉米浆作为发酵培养基的氮源较为适宜;在间歇补料发酵调控中,通过间歇流加体积分数为 25% 的氨水、质量分数为 50% 的葡萄糖溶液和质量分数为 20% 的玉米浆,可使发酵液 pH 值维持在 5.0~5.5 之间,且保证发酵培养基的碳源、氮源充足;发酵 60 h 时采取放罐措施,此时酶活力可达 2 685.5 U/mL,菌体质量浓度达 331.1 g/L, OD_{600} 达 302.8,实现了 β -甘露聚糖酶的高效表达.

收稿日期:2020-05-21

基金项目:广州市科技计划项目(201710010154)

作者简介:杜少平(1974—),男,广东省丰顺县人,广州市微生物研究所高级工程师,主要研究方向为微生物技术与相关检测.

通信作者:胡海艳(1985—),女,湖南省株洲市人,广州市微生物研究所工程师,主要研究方向为微生物代谢产品利用与微生物防控.

Abstract: The carbon and nitrogen sources of the constitutive *Pichia pastoris* X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 fermentation medium were optimized by shake flask experiment, and the fermentation conditions were regulated in a 50 L fermentor by using intermittent feeding strategy, in order to realize high-density fermentation of constitutive *Pichia pastoris* to produce β -mannanase. The results showed that glucose was the most suitable carbon source for fermentation medium, and its initial concentration was 30 g/L; corn syrup was the most suitable nitrogen source, and its initial mass fraction was 6%; during the regulation of intermittent fed fermentation, the pH value of bacteria could be maintained between 5.0 ~ 5.5 by intermittent flow adding 25% ammonia hydroxide, 50% glucose solution and 20% corn syrup, and make sure the carbon and nitrogen sources of the fermentation medium were sufficient; after 60 h fermentation, took measures to put the fermenter tank, at this time, the maximum enzyme activity was 2 685.5 U/mL, the mass concentration of bacteria reached 331.1 g/L, and the OD_{600} reached 302.8, which achieved the high expression of β -mannanase.

0 引言

甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分^[1-2],广泛存在于各种植物组织中^[3].甘露聚糖是籽实类植物细胞壁的主要组成成分,在豆粕、芝麻粕、油菜籽粕等常用饲料原料中含量丰富.甘露聚糖在单胃动物的消化道内会呈凝胶状,使消化道内容物具有较强的黏性,从而影响单胃动物对营养物质的消化吸收,最终影响单胃动物的生长和饲料的利用率^[4]. β -甘露聚糖酶能够水解甘露聚糖类有机物,将广泛存在于豆类籽实中的甘露聚糖等多糖降解为甘露寡糖等低聚糖,消除甘露聚糖对单胃动物消化道内各种营养物质的抗营养作用.同时,生成的甘露低聚糖不仅对促进单胃动物的生长起着重要作用,而且具有促进单胃动物肠道内以双歧杆菌为代表的有益菌群的增殖、改善肠道内菌群结构、排除体内毒素、增强机体免疫防御能力等多种功能,已被广泛应用于饲料、医药、食品、精细化工等领域^[5-6].

由于单胃动物摄食和饲料加工的特殊需求,业界要求应用于饲料生产的工业用 β -甘露聚糖酶具有耐热、耐酸和高酶活力的特性,因此,如何获得产耐热、耐酸且酶活力较高的 β -甘露聚糖酶的菌株成为研究热点^[7-8].由于大多数 β -甘露聚糖酶在原始菌株中表达较低,

利用基因工程菌毕赤酵母进行表达以提高 β -甘露聚糖酶的产量是目前普遍采用的方法.本研究团队前期以 β -甘露聚糖酶的成熟肽序列为对象,根据毕赤酵母密码子偏爱性,人工设计合成了该酶的基因,以毕赤酵母 X-33 为宿主菌,选用 GAP 启动子,构建了能高效表达的重组工程菌株,再通过易错 PCR 对 β -甘露聚糖酶进行定向突变和筛选,获得产耐热、耐酸且酶活力较高的 β -甘露聚糖酶的突变菌株,即含有 β -甘露聚糖酶基因的重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39.鉴于目前鲜见具有耐热、耐酸和高酶活力的 β -甘露聚糖酶工业化量产的相关报道^[9],本文在前期实验的基础上,拟通过摇瓶实验进一步筛选重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39的碳源、氮源,确定 50 L 发酵罐中的发酵调控策略,以获得 β -甘露聚糖酶的高密度发酵工业化量产工艺,实现重组毕赤酵母高密度发酵表达 β -甘露聚糖酶,为 β -甘露聚糖酶的工业化生产提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种与试剂 菌种:重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 (*Pichia pastoris* 26A-39),由广州市微生物研究所实验室保存.

主要试剂: β -甘露聚糖酶,美国 Sigma 公

司产;酵母提取物、蛋白胨,湖北安琪酵母股份有限公司产;玉米浆,山东康源生物科技有限公司产;博莱霉素(Zeocin),美国 Intitrogen 公司产;其他试剂,均为国产分析纯或生化试剂。

1.1.2 培养基 斜面培养基(YPD 培养基):葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母提取物 10 g,琼脂粉 20 g,去离子水定容至 1000 mL。

YPDS 培养基:在 YPD 培养基中添加质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Zeocin。

PTM1 溶液: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g, NaI 0.08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, H_3BO_3 0.02 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ZnCl_2 20.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.0 g, 体积分数为 98% 的 H_2SO_4 5.0 mL, 去离子水定容至 1000 mL。

BSM 培养基^[8]:葡萄糖 20 g, 质量分数为 85% 的 H_3PO_4 26.7 mL, KOH 4.13 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, CaCl_2 0.38 g, K_2SO_4 18.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.9 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.93 g, PTM1 溶液 4 mL, 去离子水定容至 1000 mL。

种子培养基(改良的 BSM 培养基):葡萄糖 20 g, 酵母提取物 3 g, 蛋白胨 3 g, 质量分数为 85% 的 H_3PO_4 27 mL, CaSO_4 4 g, K_2SO_4 20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 g, KOH 4 g, PTM1 溶液 0.45 mL, 调 pH 值为 5.0, 去离子水定容至 1000 mL。

碳源选择培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, K_2SO_4 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 另在其中添加质量浓度分别为 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L 的葡萄糖或甘油作为碳源, 生物素 1 mg, 消泡剂 0.25 mL, PTM1 溶液 4.3 mL, 消泡后调 pH 值为 5.3 ~ 5.4, 去离子水定容至 1000 mL。

氮源选择培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, K_2SO_4 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 另在其中添加质量分数分别为 2%, 4%, 6% 的棉籽粉、豆粉或玉米浆作为氮源, 生物素

1 mg, 消泡剂 0.25 mL, PTM1 溶液 4.3 mL, 消泡后调 pH 值为 5.3 ~ 5.4, 去离子水定容至 1000 mL; BSM 培养基; YPD 培养基。

发酵培养基:葡萄糖 30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, K_2SO_4 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 生物素 1 mg, 消泡剂 0.25 mL, PTM1 溶液 0.45 mL, 去离子水定容至 1000 mL。

营养盐溶液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 g, KH_2PO_4 100 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 70 g, 去离子水定容至 1000 mL。

发酵补料流加液配方: V (质量分数为 50% 的葡萄糖溶液) : V (营养盐溶液) = 10 : 1。

以上培养基于 121 $^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 20 min, 其中, 葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 单独灭菌, 生物素经过滤膜除菌后添加, PTM1 溶液于添加消泡剂后加入。

1.1.3 仪器与设备 LRH-250 型生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司产; DHZ-DA 型水平摇床, 江苏太仓市实验设备厂产; PHS-3C 型 pH 计、752N 型紫外分光光度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司产; SMART 型显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司产; 5427R 型高速低温离心机, 德国 Eppendorf 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化与种子液的制备方法 将毕赤酵母 X-33/pGAPZ α -Man26A-39 菌种转接入 YPDS 培养基平板中, 于 28 $^\circ\text{C}$ 条件下培养 3 d; 挑取平板培养基上较大的单菌落, 接入 YPD 液体培养基装液量为 5 mL 的 50 mL 摇瓶中, 于 30 $^\circ\text{C}$, 180 r/min 条件下振荡培养至 OD_{600} 为 2.0 左右, 再转接至种子培养基中, 于 28 $^\circ\text{C}$, 200 r/min 条件下振荡培养至 OD_{600} 为 4.0 ~ 6.0; 最后进行镜检, 若视野中的毕赤酵母菌饱满、均匀、单个或两个成串, 则此时的种子培养液可以作为发酵种子液备用。

1.2.2 培养基碳源的筛选方法 将种子液分别转接至添加了葡萄糖或甘油的碳源选择培养基中,接种量为2%,装液量为100 mL(500 mL摇瓶),于30 ℃,180 r/min条件下振荡培养72 h,每隔12 h取样,测试其酶活力。

1.2.3 培养基氮源的筛选方法 将种子液分别转接至添加了棉籽粉、豆粉或玉米浆的氮源选择培养基和BSM培养基中,以YPD培养基为对照。接种量为2%,装液量为100 mL(500 mL摇瓶),于30 ℃,180 r/min条件下振荡培养72 h,每隔12 h取样,测试其酶活力。

1.2.4 间歇补料发酵调控方法 发酵条件:将种子液转接至50 L发酵罐中,接种量为10%,通气量为1.1~1.5 vvm,溶氧30%~80%,用体积分数为25%的氨水维持发酵液pH值为5.0~5.5,发酵培养基的初始体积为20 L。

间歇补料发酵调控:当菌株开始生长后,溶氧会降低,此时间段为10~14 h。待葡萄糖质量分数降至1%后,开始流加质量分数为50%的葡萄糖溶液(含PTM1溶液),并保持葡萄糖在1%~3%之间,且每次补料葡萄糖后可保持残糖质量浓度为2 g/L;待玉米浆质量分数降至4%后,开始流加质量分数为20%的玉米浆(含PTM1溶液),并保持玉米浆在4%~8%之间。保持溶氧在20%以上,当溶氧低于20%时,可通过加大转速、降低温度、降低菌株的比生长速率等,待溶氧恢复后继续进行发酵补料流加。

1.2.5 测试方法 菌体质量浓度测定:采用湿重法,取10 mL发酵液,于9000 r/min条件下离心5 min,弃去上清液,称菌体湿重。

酶活力测定^[7]:将45 ℃,pH值为5.0的条件下,每min水解底物产生1 μmol甘露聚糖所需的酶量定义为1个酶活力单位(U/mL)。取直径为15 mm的15 mL的洁净刻度试管,分别标记空白组、对照组、测试组,分别加入1.5 mL质量分数为0.5%的甘露聚糖溶液(pH值为

5.0)作为底物,于45 ℃水浴预热5 min;仅在测试组中加入稀释适当倍数的0.5 mL β-甘露聚糖酶液(已预热),在45 ℃水浴下反应10 min,反应期间需间歇轻轻摇晃均匀,10 min后立即分别加入2 mL DNS溶液终止反应;仅在对照组中加入0.5 mL β-甘露聚糖酶液,立即置于沸水中煮沸15 min进行显色反应后,迅速用冰水或者流水冷却至室温,再用蒸馏水定容至15 mL,颠倒混匀;以空白组为基准调零,在分光光度计540 nm波长处测定其吸光度值。

还原糖测定^[10]:采用DNS法,DO值、pH值等由探头直接读取。

2 结果与分析

2.1 培养基碳源的筛选结果分析

与乙醇氧化酶AOX1启动子仅能靠甲醇诱导表达不同,pGAP(三磷酸甘油醛脱氢酶启动子)重组表达选用GAP启动子可以利用甘油、葡萄糖、甲醇为碳源。本实验在摇瓶中重点比较了不同碳源(甘油和葡萄糖)对β-甘露聚糖酶表达的影响,结果如图1所示。由图1可以看出,重组毕赤酵母在利用甘油与葡萄糖高密度发酵产β-甘露聚糖酶的差异不明显,但在达到酶活力峰值时,葡萄糖的质量浓度为25 g/L,甘

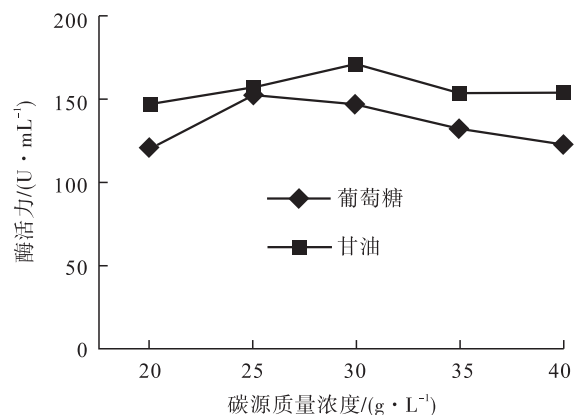


图1 不同碳源对β-甘露聚糖酶表达的影响

Fig. 1 The influence of different carbon sources on β-mannanase expression

油质量浓度为 30 g/L. 虽然葡萄糖对 β -甘露聚糖酶表达的影响稍低于甘油,但性价比却优于甘油. 综合考虑,选择葡萄糖作为培养基的碳源较为适宜.

不同初始葡萄糖质量浓度对菌体生长的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出,菌体在前 36 h 基本都以指数形式快速增长,36 h 后增长较为平缓. 不同初始葡萄糖质量浓度下菌体的生长动力学参数见表 1. 由表 1 可知,当添加质量浓度为 25~30 g/L 的葡萄糖时,最大细胞生产强度较高,能够以较快的速度产生菌体. 而在重组毕赤酵母发酵生产中,补料流加前需要进行一段分批发酵,使菌体生长达到后续补料流加工

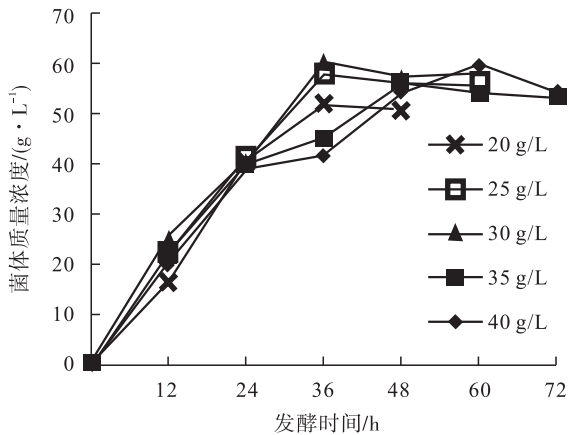


图 2 不同初始葡萄糖质量浓度对菌体生长的影响

Fig. 2 The influence of different initial glucose concentration on the growth of bacteria

表 1 不同初始葡萄糖质量浓度下菌体的生长动力学参数

Table 1 The bacteria kinetic parameters of different initial glucose concentration

初糖质量浓度/ (g·L ⁻¹)	残糖质量浓度/ (g·L ⁻¹)	最大菌体质量浓度/ (g·L ⁻¹)	达到最大生物量的时间/h	最大细胞生产强度/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	细胞平均产率/ (g·g ⁻¹)
20	1.59	52.01	36	1.44	2.83
25	1.77	57.56	36	1.60	2.48
30	2.05	60.21	36	1.67	2.15
35	2.30	55.97	48	1.17	1.71
40	2.51	59.38	60	0.99	1.58

艺所需的菌体质量浓度. 综合考虑,选择初始葡萄糖质量浓度为 30 g/L.

2.2 培养基氮源的筛选结果分析

不同氮源对 β -甘露聚糖酶表达的影响如图 3 所示. 由图 3 可以看出,因 YPD 培养基中有蛋白胨和酵母提取粉作为氮源,故其对重组毕赤酵母高密度发酵产 β -甘露聚糖酶的影响最显著,酶活力可达 420 U/mL;BSM 培养基由于缺乏氮源,酶活力仅为 60 U/mL;添加不同质量分数的棉籽粉、豆粉或玉米浆均能促进细胞产酶,但酶活力均低于 YPD 培养基,其中,当添加质量分数为 6% 的玉米浆时,可以较好地促进 β -甘露聚糖酶的表达,此时酶活力可达 352 U/mL,是 YPD 培养基酶活力的 84%. 考虑到玉米浆相对于蛋白胨和酵母提取粉作为氮源更为廉价,故在下一步的间歇补料发酵调控中,选择初始质量分数为 6% 的玉米浆作为培养基的氮源.

2.3 间歇补料发酵调控结果分析

基于现有生产设备条件,间歇补料发酵仍是业界经常采用的补料策略. 重组毕赤酵母间歇补料发酵曲线如图 4 所示. 由图 4 可以看出,发酵过程中,酶活力由 5.0 U/mL 一直增至 2 685.5 U/mL,在发酵的前 12 h,酶活力基本保

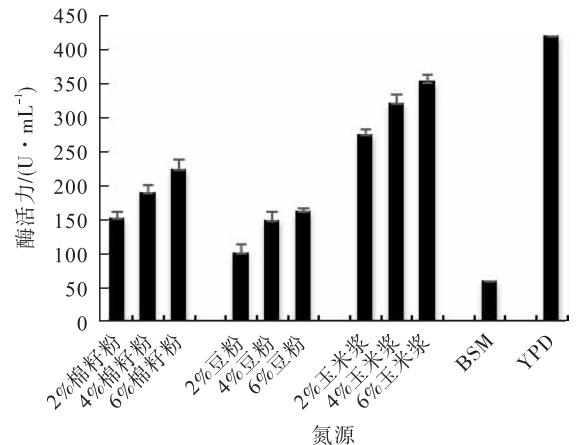


图 3 不同氮源对 β -甘露聚糖酶表达的影响

Fig. 3 The influence of different nitrogen sources on β -mannanase expression

持稳定,12 h 后开始急速增加,54 h 后增长趋缓;菌体质量浓度由 11.2 g/L 一直增至 331.1 g/L,在发酵的前 14 h,菌体质量浓度基本保持稳定,14 h 后迅速增加,40 h 后基本保持稳定; OD_{600} 由初始的 2.1 增加到 302.8,在发酵的前 12 h, OD_{600} 基本保持不变,随后一直保持增加的趋势.间歇补料发酵罐上的监测指标如图 5 所示.由图 5 可以看出,溶氧由开始发酵时的 86% 一直减少到 13%,在发酵的前 22 h,溶氧均控制在 30% 以上,而在发酵的 24~48 h 内基本能控制在 20% 左右,此时发酵罐的通气量达到最大值 2500 L/min,转速达到 350 r/min.开始发酵时,葡萄糖质量分数约为 3%,10 h 时降到 1%,到 18 h 时,葡萄糖消耗过快,开始流

加质量分数为 50% 的葡萄糖溶液,使其基本维持在 1%~3%,同时,间歇补加 20% 的玉米浆,以保证发酵培养基的碳源、氮源充足.通过流加体积分数为 25% 的氨水,可使 pH 值维持在 5.0~5.5,但发酵末期 pH 值有上升的趋势,最终升至 5.7.由于发酵过程中溶氧降低,且发酵体积近 35 L,体积较大,不利于继续高密度发酵和间歇流加营养物质,故在发酵 60 h 时采取了放罐措施,此时酶活力达 2 685.5 U/mL,菌体质量浓度达 331.1 g/L, OD_{600} 达 302.8.

3 结论

本文在前期筛选获得产耐热、耐酸且酶活力较高的 β -甘露聚糖酶的突变菌株重组毕赤

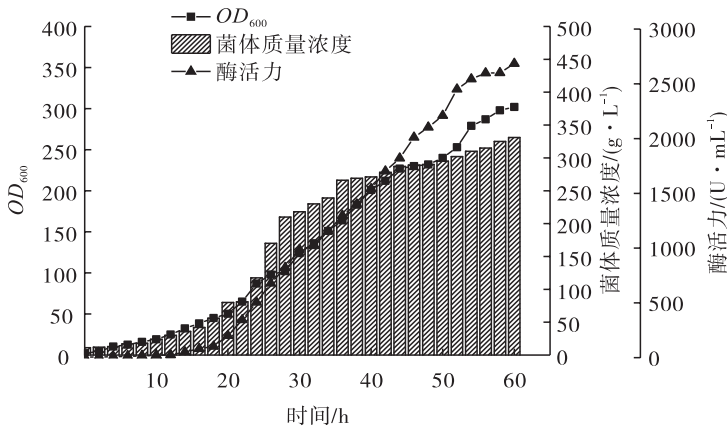


图 4 间歇补料发酵曲线

Fig. 4 The curve of intermission fed-batch fermentation

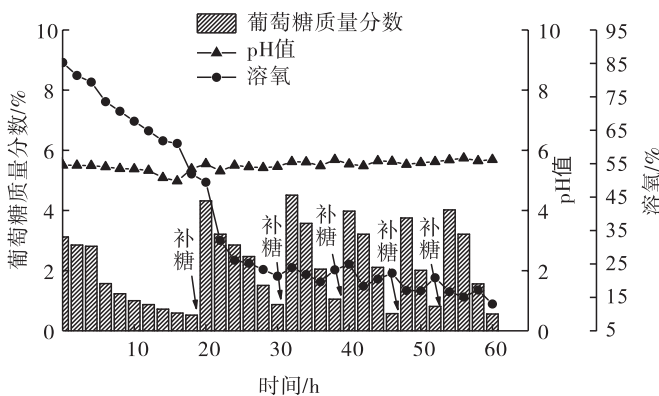


图 5 间歇补料发酵罐上的监测指标

Fig. 5 Monitoring indicators of intermission fed-batch fermentater

酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 基础上,通过摇瓶实验,重点比较了不同碳源、不同氮源对重组毕赤酵母发酵产 β -甘露聚糖酶的影响,并在 50 L 发酵罐中采用间歇流加策略对发酵条件进行调控,结果表明,葡萄糖更适合作为发酵培养基的碳源,且其初始最适质量浓度为 30 g/L;初始质量分数为 6% 的玉米浆作为发酵培养基的氮源较为适宜;在间歇补料发酵调控中,通过间歇流加体积分数为 25% 的氨水、质量分数为 50% 的葡萄糖溶液和质量分数为 20% 的玉米浆,可使发酵液 pH 值维持在 5.0 ~ 5.5,且保证发酵培养基的碳源、氮源充足;在发酵 60 h 时采取放罐措施,此时最大酶活力可达 2 685.5 U/mL,菌体质量浓度达 331.1 g/L, OD_{600} 达 302.8,实现了重组毕赤酵母高密度发酵产 β -甘露聚糖酶. 本研究可为 β -甘露聚糖酶工业化生产提供参考,对满足单胃动物摄食和饲料加工的特殊需求,进而推动饲料、食品等领域相关产品的研发具有重要意义.

参考文献:

- [1] SCHELLER H V, ULVSKOV P. Hemicelluloses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 263.
- [2] STÅLBRAND H, SIIKAAHO M, TENKANEN M, et al. Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Biotechnology, 1993, 29(3): 229.
- [3] KANSOH A L, NAGIEB Z A. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 85(2): 103.
- [4] NUNES C S, MALMLÖF K. Effects of guar gum and cellulose on glucose absorption, hormonal release and hepatic metabolism in the pig [J]. British Journal of Nutrition, 1992, 68(3): 693.
- [5] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(5): 355.
- [6] 熊进, 黄魁英, 夏枫耿, 等. 耐高温 β -甘露聚糖酶 M27-8 菌株发酵条件的优化 [J]. 中国饲料, 2017, 19: 13.
- [7] 吴秀秀, 吕晓慧, 胡亚冬, 等. 耐高温耐酸稳定假密环菌 (*Armillariella tabescens*) MAN47 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(3): 83.
- [8] ZHAO W, ZHENG J, ZHOU H B, et al. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 7538.
- [9] ZHENG J, ZHAO W, GUO N, et al. Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant β -mannanase by *Pichia pastoris* [J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 257.
- [10] 赵凯, 许鹏举, 谷光桦. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534.



引用格式:胡海艳,甘祥武,黄秀敏,等. 基于易错 PCR 的 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化研究[J]. 轻工学报,2020,35(4):8-15.

中图分类号:TS201.3;Q789 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.002

文章编号:2096-1553(2020)04-0008-08

基于易错 PCR 的 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化研究

Study on directed evolution of β -mannanase in vitro by error-prone PCR

胡海艳,甘祥武,黄秀敏,叶俊豪,谢万勇

HU Haiyan, GAN Xiangwu, HUANG Xiumin, YE Junhao, XIE Wanyong

广州市微生物研究所,广东 广州 510663

Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, 510663, China

摘要:采用易错 PCR 方法,对 β -甘露聚糖酶进行体外分子定向进化,通过调整 dNTP 比例和加入不同浓度的 Mn^{2+} ,向 β -甘露聚糖酶中随机引入突变,构建突变文库,并对筛选得到的突变菌株的突变酶学性质进行研究.结果表明:在突变文库的构建过程中,当 Mn^{2+} 浓度为 0.01 mmol/L 时,阳性转化率最高,达到 80%,氨基酸的突变个数为 2.0 个,符合易错 PCR 突变文库的构建原则;经过两轮易错 PCR 构建的突变文库容量约为 4000,从中筛选出的突变毕赤酵母菌 X-33/pGAPZ α A-GwMan26A-27 的突变酶 GwMan26A-27 具有耐酸、耐高温且酶活力较高的特性;与突变前相比,GwMan26A-27 具有较宽的酶促反应温度范围和适宜 pH 值范围,热稳定性和 pH 稳定性均有较大提升;在胃蛋白酶液和胰蛋白酶液中水浴 2 h,GwMan26A-27 的消化酶稳定性较突变前也均有所提升.

关键词:

β -甘露聚糖酶;易错 PCR;定向进化

Key words:

β -mannanase; error-prone PCR; directed evolution

收稿日期:2020-05-21

基金项目:广州市科技计划项目(201710010154)

作者简介:胡海艳(1985—),女,湖南省株洲市人,广州市微生物研究所工程师,主要研究方向为微生物代谢产品利用与微生物防控.

Abstract: Error-prone PCR was used to directed evolution β -mannanase in vitro, random introduction of mutations into β -mannanase by adjusting dNTP ratio and setting Mn^{2+} of different concentrations, a mutant library was constructed, and the enzymatic properties of the mutant enzymes were studied. The results showed that during the construction of the mutation library, the positive conversion rate could reach the highest 80% and the number of amino acid mutations was 2.0 with the concentration of Mn^{2+} 0.01 mmol/L, which was in accordance with the general principles of error-prone PCR mutation libraries; after two rounds of error-prone PCR, a storage capacity of 4000 was constructed, the mutant enzymes GwMan26A-27 of mutant *Pichia pastoris* X-33/pGAPZ α A-GwMan26A-27 with acid resistance, high temperature resistance and high enzyme activity was finally selected; compared with before mutation, GwMan26A-27 has a wider enzymatic reaction temperature before the mutation and a suitable pH range, the thermal stability and pH stability also had been greatly improved; in the pepsin solution and trypsin solution for water bath 2 h, the digestive enzymes stability of GwMan26A-27 had also been improved.

0 引言

甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分^[1-2],广泛存在于各种植物组织中^[3]。 β -甘露聚糖酶因能够水解甘露聚糖类有机物,被广泛应用于饲料、医药、食品、精细化工等领域^[4-5]。将 β -甘露聚糖酶添加至饲料中,可消除甘露聚糖的抗营养作用,提高饲料的利用率,促进肠道内有益菌群的增殖。随着 β -甘露聚糖酶在饲料、食品等领域应用的不断深入,对 β -甘露聚糖酶酶学性质的要求也越来越高^[6-9]。例如,在饲料领域,要求 β -甘露聚糖酶具有较高的酶活力、较好的热稳定性、较宽泛的 pH 作用范围、较强的蛋白酶抗性等。然而,目前常见的 β -甘露聚糖酶在高温或极端 pH 条件下稳定性较差,易丧失活性,这限制了其在饲料加工行业中的应用。因此,对 β -甘露聚糖酶进行改造,获得耐酸、pH 作用范围广、耐热性较好、酶活力较高的 β -甘露聚糖酶已成为业界研究的热点。

酶的改造方法主要包括理性设计方法和非理性设计方法,其中,理性设计需要清楚蛋白质的三维结构,且确定蛋白质结构与功能之间的关系,再通过定点诱变改变蛋白质中的个别氨基酸,以产生更加理想的酶学性质;非理性设计

则不需要了解蛋白质结构与功能之间的关系,可以在实验室中模拟自然进化的过程,随机突变、重组和选择,在短时间内即可模拟完成漫长的自然进化过程^[10]。易错 PCR (error-prone PCR) 属于非理性设计方法,可对酶分子编码基因进行定向进化与选择,改善酶的稳定性^[11-12]、底物特异性^[13]等,是蛋白质工程的重要研究工具。以易错 PCR 为基础的体外分子定向进化可以以最小的序列变化产生较大的表型差异,定向筛选出目标菌株,很大程度上简化了序列的比较分析工作。目前,关于 β -甘露聚糖酶结构方面的研究鲜有报道,业界对 β -甘露聚糖酶的蛋白质三维结构、催化机制等信息的了解还不够深入,因此很难运用理性设计方法对其进行定点突变。

鉴于此,本研究拟采用非理性设计方法(易错 PCR)对 β -甘露聚糖酶进行体外分子定向进化,通过调整 dNTP 比例和加入不同浓度的 Mn^{2+} ,向 β -甘露聚糖酶中随机引入突变,构建库容量为 4000 的突变文库,定向筛选出产耐酸、pH 作用范围广、热稳定性较好、酶活力较高和消化酶稳定性较高的 β -甘露聚糖酶的突变菌株,以满足饲料加工过程中对 β -甘露聚糖酶的酶学性质需求,加速 β -甘露聚糖酶在工业生产中的应用进程。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

毕赤酵母 X-33 (*Pichia pastoris* X-33), 表达载体 pGAPZ α A, 美国 Invitrogen 公司产; 大肠杆菌 DH5 α , 由广州市微生物研究所实验室保存.

1.2 主要试剂

小量质粒抽提试剂盒、PCR 所用试剂、PCR 产物快速胶回收试剂盒、山梨醇, 生工生物工程(上海)股份有限公司产; 酵母质粒抽提试剂盒, 美国 Biomega 公司产; T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I, 线性化酶 *Bln* I, 日本 Takara 公司产; Taq DNA 聚合酶, 日本 Toyobo 公司产; 博莱霉素(Zeocin), 美国 Intitrogen 公司产; 酵母提取物、蛋白胨, 湖北安琪酵母股份有限公司产; 琼脂, 广东环凯微生物科技有限公司产; 其他试剂, 均为国产分析纯或生化试剂.

1.3 培养基

LB 培养基、LBZ 培养基、YPD 培养基、YPDS 培养基均按照《Invitrogen 公司操作手册》推荐方法配制.

LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, pH 值为 7.2~7.5, 去离子水定容至 1000 mL. LBZ 培养基需在 LB 培养基中另加入 Zeocin 0.025 g.

YPD 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 去离子水定容至 1000 mL. YPDZ 培养基需在 YPD 培养基中另加入 Zeocin 0.1 g.

YPDS 培养基: 蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 20 g, 山梨醇 186 g, 琼脂 20 g, 去离子水定容至 1000 mL. YPDSZ 培养基需在 YPDS 培养基中另加入 Zeocin 0.1 g.

以上培养基于 121 $^{\circ}$ C 条件下灭菌 20 min, 其中, 葡萄糖单独灭菌.

1.4 仪器与设备

LRH-250 型生化培养箱, 上海一恒科学

仪器有限公司产; DHZ-DA 型水平摇床, 江苏太仓市实验设备厂产; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司产; 752N 型紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司产; SMART 型显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司产; 5427R 型高速低温离心机, 德国 Eppendorf 公司产.

1.5 实验方法

1.5.1 易错 PCR 引物的设计方法

根据已知 *man* 基因序列, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计易错 PCR 引物. 在引物的末端分别引入限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 的酶切位点(下划线所示): 上游引物 5'-GAAGGGG-TATCTCTCGAGAAAAGA-3'; 下游引物 5'-CT-GAGATGAGTTTTTGTCTAGAGC-3'.

1.5.2 易错 PCR 扩增方法

易错 PCR 反应体系: 总体积为 50 μ L, 其中, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dATP (10 mmol/L) 和 dGTP (10 mmol/L) 各 1 μ L, dCTP (10 mmol/L) 和 dTTP (10 mmol/L) 各 5 μ L, 模板 1.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 10.5 μ L, MnCl₂ (2 mmol/L) 0 μ L、0.25 μ L、1.25 μ L、2.50 μ L、3.75 μ L、5.00 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L, dd H₂O 17.50 μ L、17.25 μ L、16.25 μ L、15.00 μ L、13.75 μ L、12.50 μ L.

易错 PCR 循环程序: 降落 PCR, 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 循环 1 次; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 变性 100 s, 每个循环退火温度降低 1 $^{\circ}$ C, 循环 5 次; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 变性 100 s, 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 循环 1 次.

1.5.3 易错 PCR 突变文库的构建方法

本研究中的表达宿主毕赤酵母 X-33 为分泌型酵母, 外源蛋白可以直接分泌到培养基中, 有利于后续大容量突变文库的筛选.

毕赤酵母 X-33 感受态细胞的制备:挑取 YPD 培养基平板上的单克隆菌种毕赤酵母 X-33 接种于 5 mL YPD 液体培养基中,于 28 °C,180 r/min 条件下过夜培养活化;取活化后的菌液接种于 20 mL YPD 液体培养基中,于 28 °C,180 r/min 条件下培养至 OD_{600} 达 1.0 ~ 1.3;再于 4 °C,5000 r/min 条件下离心 5 min,弃上清液,用 20 mL 预冷的无菌水重悬浮菌体,即得毕赤酵母 X-33 感受态细胞。

重组质粒的构建与转化:用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 双酶切易错 PCR 扩增产物,得到纯化后的易错 PCR 扩增产物,将其与同样经双酶切的穿梭分泌表达载体 pGAPZ α A 混合均匀,用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 条件下过夜连接后,将所构建的重组质粒命名为 pGAPZ α A-Man. 将 pGAPZ α A-Man 热激转化得到的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞涂布在 LBZ 培养基平板上,于 37 °C 条件下培养 16 h 后,将 LBZ 培养基平板上的所有克隆转入含有 Amp (氨苄西林) 的 LB 液体培养基中,于 37 °C,180 r/min 条件下培养过夜;提取大肠杆菌 DH5 α 中的重组质粒,采用电转化的方式转入毕赤酵母 X-33 感受态细胞中,迅速加入 850 μ L 已预冷的 1 mol/L 的山梨醇,再加入 500 μ L 的 YPD 液体培养基,转移至 2 mL 的无菌 Eppendorf 管中,于 30 °C,180 r/min 条件下振荡培养 1 h;取 110 μ L 培养液涂布在 YPDSZ 培养基平板上,于 30 °C 条件下培养 3 ~ 4 d,即完成重组质粒的转化。

1.5.4 重组子的鉴定方法

挑取 YPDSZ 培养基平板上的单克隆,提取质粒,采用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 进行双酶切与 PCR,鉴定含有突变基因的重组质粒 pGAPZ α A-Man 是否构建成功。

1.5.5 易错 PCR 突变文库的筛选方法

1.5.5.1 突变酶的初筛 目的:重点筛选耐酸性较好(当 pH 值为 3.0 时,可耐受 1 h)的突变

克隆子。

菌株培养:为了提高效率,挑取在 YPDSZ 培养基平板上生长的单克隆,接种于装有 3 mL YPD 液体培养基的 15 mL EP 管中,于 30 °C,200 r/min 条件下培养 48 h 后,取上清液,以便快速、准确地完成高通量初筛工作。

酶的耐酸性处理:用 pH 值为 2.5 的磷酸缓冲液将上清液样品稀释至 pH 值为 3.0 后,于 37 °C 条件下水浴 1 h,再用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液稀释至 pH 值为 5.0。

酶活力的测定:取 1.5 mL pH 值为 5.0 的质量分数为 0.5% 的甘露聚糖底物溶液加入 15 mL 比色管中,于 45 °C 条件下预热 3 min 后,加入 0.5 mL 的稀释酶液(已预热 3 min),混匀后于 45 °C 条件下反应 10 min,加入 2 mL DNS 溶液(还原糖测试溶液,含 3,5-二硝基水杨酸)立刻混匀终止酶反应,再置于沸水浴中反应 15 min,冰水冷却后定容至 15 mL,混匀。以 β -甘露聚糖酶空白样作为对照,测定 550 nm 处的吸光度值,每个样品做 3 个平行。

1.5.5.2 突变酶的复筛 目的:筛选耐酸性较好(当 pH 值为 3.0 时,可耐受 2 h)、耐高温(当温度为 90 °C 时,可耐受 10 min)、酶活力较高的突变克隆子。

菌株培养:因为需要筛选酶活力较高的突变菌株,继续采用小规模的培养方式将会使酶活力测定产生较大的误差。因此,在复筛过程中,挑取在 YPDZ 培养基平板上生长的单克隆,接种于装有 50 mL YPD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,于 30 °C,200 r/min 条件下培养 48 h 后,取上清液,用 pH 值为 2.5 的磷酸缓冲液将样品上清液稀释至 pH 值为 3.0,再于 37 °C 条件下水浴 2 h 后,用 pH 值为 7.0 的磷酸缓冲液稀释至 pH 值为 5.0,测定酶活力。

酶的耐高温处理:取菌株培养上清液,于 10 000 r/min 条件下离心 5 min,取上清液,用

pH 值为 5.0 的磷酸缓冲液将样品上清液稀释至合适倍数,置于 90 °C 水浴锅内水浴 10 min 后,测定酶活力。

1.5.6 突变酶学性质的研究方法

1.5.6.1 温度和 pH 值对突变酶活力的影响 将稀释至一定浓度的突变酶溶液分别置于 0 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C 温度下反应后,测定不同反应温度下的残余酶活力,将残余酶活力最高者设为 100%,计算其他温度下的相对残余酶活力。

配制 pH 值分别为 2.0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 的磷酸盐缓冲液,以上述缓冲液配制相应的底物溶液,测定不同 pH 值下的残余酶活力,将残余酶活力最高者设为 100%,计算其他 pH 值下的相对残余酶活力。

1.5.6.2 突变酶的热稳定性和 pH 稳定性

将突变酶溶液分别置于 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C 温度下保温 5 ~ 60 min,测定不同反应温度下的残余酶活力,将未经热处理的酶活力设为 100%,计算其他温度下的相对残余酶活力。

将突变酶溶液分别置于 pH 值为 2.0, 3.0, 4.0 的磷酸盐缓冲液中 30 ~ 120 min,测定不同 pH 值下的残余酶活力,将未经 pH 处理的酶活力设为 100%,计算其他 pH 值下的相对残余酶活力。

1.5.6.3 消化酶对突变酶活力的影响

将突变酶溶液分别置于质量浓度为 0.5 mg/mL 的胃蛋白酶液(由 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液配制)与质量浓度为 2.5 mg/mL 的胰蛋白酶液(由 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液配制)中,于 37 °C 温度下水浴保温 2 h,分别以不添加胃蛋白酶的 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液与不添加胰蛋白酶的 pH 值为 6.0 的磷酸缓冲液为对照,测定残余酶活力,将未经放置处理的酶活力设 100%,计算经消化酶处理的突变酶相对残余酶

活力。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 突变文库的构建结果分析

2.1.1 易错 PCR 条件的确立

在易错 PCR 反应体系中,调整 dNTP 的比例,使 dCTP、dTTP 的浓度增大到 1 mmol/L,以促进碱基错配的倾向性。此外,在易错 PCR 反应体系中分别加入浓度梯度为 0 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.10 mmol/L, 0.15 mmol/L, 0.20 mmol/L 的 $MnCl_2$,以得到不同突变频率的文库。用不同 Mn^{2+} 浓度的易错 PCR 扩增产物构建表达载体,分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,从突变文库中的每个 Mn^{2+} 浓度中随机挑取 10—20 个克隆子进行菌落 PCR,检测其阳性转化率;再从中各挑选 3 个阳性克隆子进行测序。在易错 PCR 突变文库的建立中,要考虑的重要因素是突变频率的控制,一般来说,突变基因控制在 1—5 个碱基,对应的氨基酸突变数为 1.0 ~ 2.0 个比较合理。不同 Mn^{2+} 浓度的易错 PCR 反应体系的阳性转化率和氨基酸的突变个数如表 1 所示。由表 1 可知,当添加 Mn^{2+} 的浓度为 0.01 mmol/L 时,阳性转化率最高,达到 80.0%,且氨基酸的突变个数为 2.0 个,符合易错 PCR 突变文库的一般构建原则。

表 1 不同 Mn^{2+} 浓度的易错 PCR 反应体系的阳性转化率和氨基酸的突变个数

Table 1 Positive conversion rate and mutation number of amino acids of the error-prone PCR reaction system with different Mn^{2+} concentration

Mn^{2+} 浓度/ (mmol · L ⁻¹)	阳性转 化率/%	氨基酸的 突变个数/个
0	40.0	2.0
0.01	80.0	2.0
0.05	60.0	4.6
0.10	13.3	3.5
0.15	5.0	2.0
0.20	13.3	3.0

2.1.2 易错 PCR 突变文库的建立

在易错 PCR 反应体系中添加浓度为 0.01 mmol/L 的 $MnCl_2$, 进行易错 PCR 突变; 将突变产物克隆至表达载体 pGAPZ α A 上获得重组质粒, 并将此重组质粒在大肠杆菌 DH5 α 中扩增后电转化至毕赤酵母 X-33 感受态细胞中; 将电转化后的感受态细胞涂布在 YPDSZ 培养基平板上, 于 30 $^{\circ}C$ 条件下培养 3~4 d. 用灭菌后的牙签挑取单菌落点植至 YPD 固体培养基平板上, 经过两轮易错 PCR 所构建的突变文库如图 1 所示, 其库容量约为 4000.

2.2 易错 PCR 突变文库的筛选结果分析

在约 4000 个突变克隆子中, 初步筛选出约 200 株耐酸性较好的突变克隆子进入复筛. 复筛后得到 5 株突变性能较好的克隆子, 再经酶学性质分析, 筛选出突变毕赤酵母菌 X-33/pGAPZ α A-GwMan26A-27. 该毕赤酵母菌的突变酶 GwMan26A-27 具有耐酸、耐高温且酶活力较高的特性: 将突变酶 GwMan26A-27 放置于 pH 值为 3.0 的缓冲液中 2 h, 相对残余酶活力由突变前的 0.23% 提升到 30.00%; 将该突变酶于 90 $^{\circ}C$ 条件下水浴 10 min, 残余酶活力由 370 U/mL 提升至 430 U/mL, 相对残余酶活力由突变前的 34.00% 提升到 72.00%.

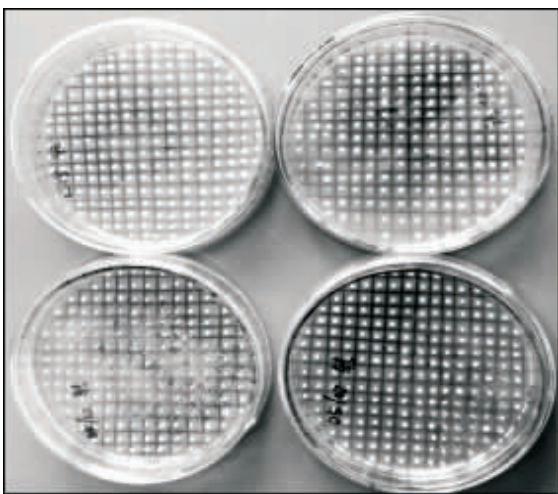


图 1 易错 PCR 突变文库

Fig. 1 Mutation library of error-prone PCR

2.3 突变酶酶学性质的研究结果分析

2.3.1 温度和 pH 值对突变酶酶活力的影响

结果分析 温度对突变酶相对残余酶活力的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出, 突变酶 GwMan26A-27 比突变前的酶 GwMan26A 有较宽的酶促反应温度范围: GwMan26A-27 的相对残余酶活力在 60.00% 以上的酶促反应温度范围为 30~60 $^{\circ}C$, 而 GwMan26A 的相对残余酶活力在 60.00% 以上的酶促反应温度范围为 30~55 $^{\circ}C$.

pH 值对突变酶相对残余酶活力的影响如图 3 所示. 由图 3 可以看出, GwMan26A-27 的适宜 pH 值范围也相应扩大, 在 pH 值为 3.0 的酸性环境下, 其相对残余酶活力达到 54.00%; 在 pH 值为 2.0 的酸性环境下, 其相对残余酶活

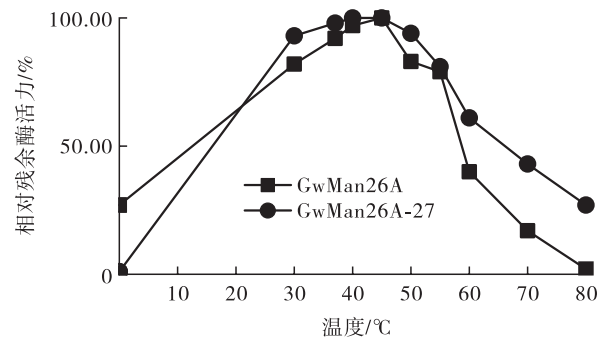


图 2 温度对突变酶相对残余酶活力的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the relative residual enzyme activity of mutant enzymes

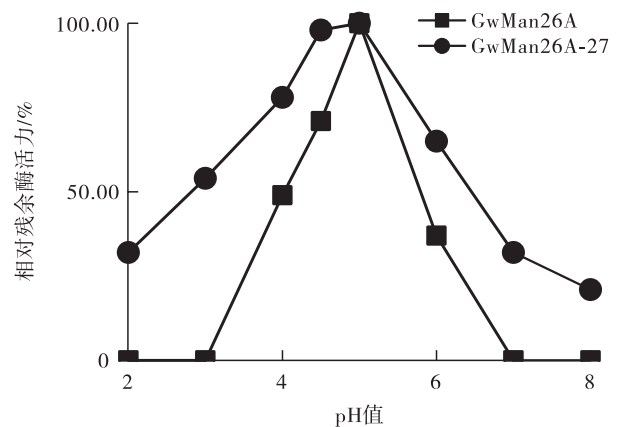


图 3 pH 值对突变酶相对残余酶活力的影响

Fig. 3 Effect of pH value on the relative residual enzyme activity of mutant enzymes

力为 32.00% ,而 GwMan26A 在此 pH 环境下无酶活.

2.3.2 突变酶的热稳定性和 pH 稳定性结果分析

与其他 β - 甘露聚糖酶相比,由于 GwMan26A-27 基因在毕赤酵母中表达,在胞外分泌过程中出现了高度的糖基化,而糖基化可使该突变酶具有较好的耐热性. 突变酶的热稳定性如图 4 所示. 在突变筛选前, GwMan26A 在 90 °C 条件下处理 10 min 仍有 35.00% 以上的相对残余酶活力. 由图 4 可以看出, GwMan26A-27 的热稳定性进一步提升,在 90 °C 条件下处理 10 min 仍有 72.00% 以上的相对残余酶活力,而良好的耐热性能使其能适应后续提取纯化和饲料加工造粒处理中的高温环境.

研究突变酶 pH 稳定性的主要目的是筛选出能够耐受畜禽消化道中酸性环境的酶. 突变酶的 pH 稳定性如图 5 所示. 在突变筛选前, GwMan26A 在 pH 值为 2.0 的酸性环境下无酶活,而当放置于 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液中 120 min 时,其相对残余酶活力仅为 0.32%. 由图 5 可以看出,经过突变筛选, GwMan26A-27 对 pH 值为 4.0 的环境具有很好的耐受性,放置 120 min 基本无影响;当放置于 pH 值为 3.0 的磷酸缓冲液中 120 min 时,其相对残余酶活力为 30.00%;当放置于 pH 值为 2.0 的磷酸缓冲液中 120 min 时,其相对残余酶活力为 21.00%. 相较于突变前, GwMan26A-27 的 pH 稳定性均有较大的提升.

2.3.3 消化酶对突变酶活力的影响结果分析

突变酶的消化酶稳定性如图 6 所示. 由图 6 可以看出, GwMan26A-27 的消化酶稳定性均有所提升: 当在胃蛋白酶液中水浴 2 h 时,其相对残余酶活力由突变前的 52.33% 提升至 65.51%; 当在胰蛋白酶液中水浴 2 h 时,其相对残余酶活力由突变前的 67.82% 提升至 74.75%.

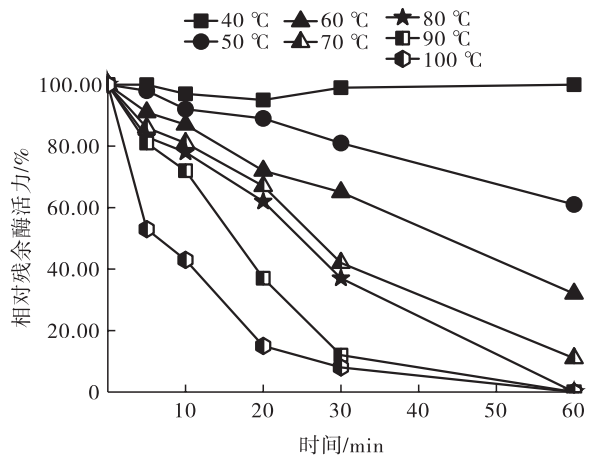


图 4 突变酶的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of mutant enzymes

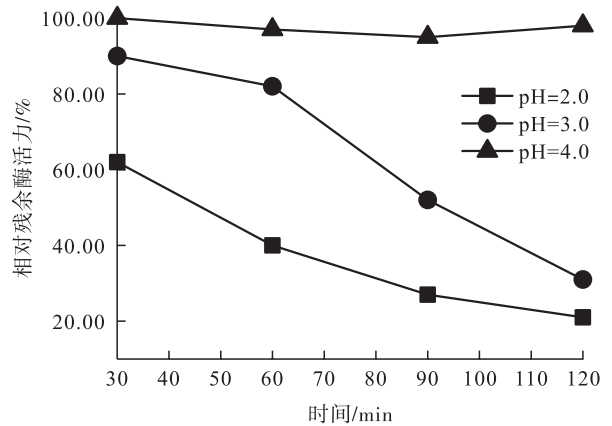


图 5 突变酶的 pH 稳定性

Fig. 5 pH stability of mutant enzymes

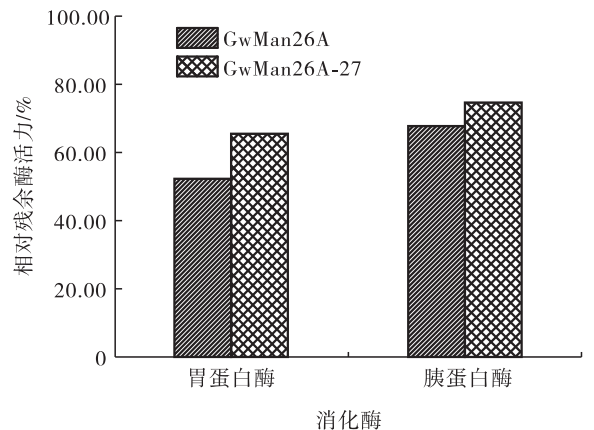


图 6 突变酶的消化酶稳定性

Fig. 6 Digestive enzymes stability of mutant enzymes

3 结论

本研究采用非理性设计方法(易错 PCR)

对 β -甘露聚糖酶进行了体外分子定向进化,经过两轮易错 PCR 构建了库容量约为 4000 的突变文库,并对筛选得到的突变毕赤酵母菌 X-33/pGAPZ α Z-GwMan26A-27 的突变酶 GwMan26A-27 的酶学性质进行了研究.结果表明:在突变文库的构建过程中,当添加 Mn^{2+} 的浓度为 0.01 mmol/L 时,阳性转化率最高(为 80%),氨基酸的突变个数为 2.0 个,符合易错 PCR 突变文库的一般原则;GwMan26A-27 具有耐酸、耐高温且酶活力较高的特性;与突变前酶 GwMan26A 相比,GwMan26A-27 具有较宽的酶促反应温度范围和适宜 pH 值范围,热稳定性和 pH 稳定性均有较大提升;在胃蛋白酶液和胰蛋白酶液中水浴 2 h,GwMan26A-27 的消化酶稳定性较突变前也均有所提升.

本研究可以简单、快速和较准确地完成高通量筛选工作,并且成功获得了耐酸、pH 作用范围广、热稳定性较好、酶活力较高和消化酶稳定性较高的突变酶 GwMan26A-27,解决了 β -甘露聚糖酶工业化生产和实际推广应用中的瓶颈问题.

参考文献:

- [1] SCHELLER H V, ULVSKOV P. Hemicelluloses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 263.
- [2] STÅLBRAND H, SIIKAAHO M, TENKANEN M, et al. Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Biotechnology, 1993, 29(3): 229.
- [3] KANSOH A L, NAGIEB Z A. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 85(2): 103.
- [4] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(5): 355.
- [5] 熊进,黄魁英,夏枫耿,等.耐高温 β -甘露聚糖酶 M27-8 菌株发酵条件的优化[J].中国饲料,2017(19):13.
- [6] YÁEZ J L, BELTRANENA E, CERVANTES M, et al. Effect of phytase and xylanase supplementation or particle size on nutrient digestibility of diets containing distillers dried grains with solubles cofermented from wheat and corn in ileal-cannulated grower pigs [J]. Anim Sci, 2011, 89: 113.
- [7] KIARIE E, NYACHOTI C M, SLOMINSKI B A, et al. Growth performance, gastrointestinal microbial activity and nutrient digestibility in early-weaned pigs fed diets containing flaxseed and carbohydrase enzyme [J]. Anim Sci, 2007, 85: 2982.
- [8] LEE J T, BAILEY C A, CARTWRIGHT A L. Beta-mannanase ameliorates viscosity-associated depression of growth in broiler chickens fed guar germ and hull fractions [J]. Poult Sci, 2003, 82(12): 1925.
- [9] ZOU X T, QIAO X J, XU Z R. Effect of beta-mannanase (Hemicell) on growth performance and immunity of broilers [J]. Poult Sci, 2006, 85: 2176.
- [10] KONG X D, LIU Y M, GOU X J, et al. Directed evolution of a-aspartyl dipeptidase from *Salmonella typhimurium* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(1): 137.
- [11] EIJSINK V G, GSEIDNES S, BORCHERT T V, et al. Directed evolution of enzyme stability [J]. Biomol Eng, 2005, 22(1/3): 21.
- [12] ARNOLD F H, WINTRODE P L, MIYAZAKI K, et al. How enzymes adapt: Lessons from directed evolution [J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(2): 100.
- [13] TURNER N J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis [J]. Trends Biotechnol, 2003, 21(11): 474.



引用格式:葛珍珍,王维静,郑岩,等. 葡萄果冻的研制及其工艺配方的优化[J]. 轻工学报, 2020,35(4):16-22.

中图分类号:TS255.43 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.003

文章编号:2096-1553(2020)04-0016-07

葡萄果冻的研制及其工艺配方的优化

Development of grape jelly and optimization of its technical formula

葛珍珍^{1,2,3}, 王维静¹, 郑岩¹, 余敏敏¹, 张晓敏¹, 纵伟^{1,2,3}
GE Zhenzhen^{1,2,3}, WANG Weijing¹, ZHENG Yan¹, YU Minmin¹, ZHANG Xiaomin¹,
ZONG Wei^{1,2,3}

1. 郑州轻工业大学 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
 2. 河南省食品生产与安全协同创新中心, 河南 郑州 450001;
 3. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南 郑州 450001
1. *College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;*
2. *He'nan Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Zhengzhou 450001, China;*
3. *He'nan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450001, China*

关键词:

葡萄果冻; 结冷胶;
凝胶特性; 感官品质

Key words:

grape jelly; gellan gum;
gelation property;
sensory quality

摘要:以葡萄为主要原料,采用单因素试验研究结冷胶添加量、白砂糖添加量、柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的综合影响,进而采用正交试验对葡萄果冻的工艺配方进行优化.结果表明:该葡萄果冻的最佳工艺配方为结冷胶添加量0.75%,白砂糖添加量8.00%,柠檬酸添加量0.26%.依据此工艺配方制作的葡萄果冻颜色鲜艳,富有光泽,具有葡萄特有的香气,酸甜可口,健康营养.

收稿日期:2020-01-03

基金项目:河南省科技创新杰出人才计划项目(174200510002);河南省食品加工过程安全控制技术创新团队项目(C20150024);郑州轻工业大学博士科研启动基金项目(2018BSJJ018)

作者简介:葛珍珍(1990—),女,河南省新乡市人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为果蔬深加工.

通信作者:纵伟(1965—),男,安徽省蚌埠市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为果蔬深加工.

Abstract: With grape as the main raw material, a single-factor test was used to study the comprehensive effects of gellan gum, white granulated sugar and citric acid on the gelation property and sensory quality of grape jelly. Then optimization of the technical formula of grape jelly was made by orthogonal test. The results showed that the best technical formula of grape jelly was 0.75 % gelatin gum, 8.00% white granulated sugar and 0.26% citric acid. The grape jelly made according to this technical formula was bright in color, full of luster, with unique grape aroma, sweet and sour, healthy and nutritious.

0 前言

果冻作为一种休闲食品,深受广大消费者喜爱.我国已研制出的果冻主要有猕猴桃/苹果风味醋果冻、西红柿芦荟果肉果冻、银杏香橙果冻、绣球菌风味果冻等^[1-4],原料多样、口味丰富.此外,也有研究者研究制作出了一系列具有保健功能的果冻,例如,富含猕猴桃果水溶多糖的营养型保健果冻^[5]、蜂蜜雪梨果冻^[6]、火龙果低糖保健果冻^[7]等.然而,目前市场上的果冻仍然存在品种单一、营养缺乏等问题.随着生活水平的提高,消费者对于果冻类产品的要求也越来越高,开发天然、营养、健康的新型保健果冻已成为业界的一项重要课题^[8].

葡萄是人们喜食的一种水果品类,不仅味美可口,而且营养价值很高.成熟的葡萄浆果中含糖量(以葡萄糖为主)高达10%~30%,同时,葡萄还含有多种矿物质、维生素和人体所需的氨基酸,常食葡萄对缓解神经衰弱、疲劳过度等大有裨益.

结冷胶最早被称为多糖S-60,分子链由重复的四糖单元构成,每个四糖单元依次由 β -D-葡萄糖、 β -D-葡萄糖醛酸、 β -D-葡萄糖和 α -L-鼠李糖通过糖苷键连结而成^[9-10].天然的结冷胶也称高酰基结冷胶,分别在其四糖单元中的 β -1,3-D-葡萄糖残基C-2上连结一个甘油酰基取代基,在C-6上连结一个乙酰基取代基,再经热碱溶液处理后,即可得到低酰基结冷胶,也称商品结冷胶^[11-12].低酰基结冷胶于1996年被我国《食品添加剂使用标

准》^[13]纳入食品添加剂范畴,可在各类食品中按生产需要适量使用.结冷胶发酵生产周期短,风味释放性好,凝胶能力强,透明度高,稳定性强,但它是一类脆性胶体,机械强度差,且需高温处理才能制备凝胶^[14].然而,若将结冷胶与其他胶体(如卡拉胶、魔芋胶)一起应用于果冻生产,不仅可以降低胶体的使用量,还可以赋予果冻独特的口感和风味^[15-16].魔芋胶(主要成分葡甘露聚糖)作为一种非离子型水溶性高分子多糖,是我国目前所发现的功能性最齐全的全天然水溶性高膳食纤维性食用胶类^[17],也是目前市场上果冻的主要添加胶体.有研究表明^[18],当结冷胶与质量分数为3.00%的魔芋胶复配时,产生的协同增效作用可提高结冷胶的凝胶强度和热稳定性,改善单一胶体在应用中的缺陷.

本文拟以葡萄为原料研制葡萄果冻,通过添加魔芋胶改善结冷胶的机械强度,并对葡萄果冻的工艺配方进行优化,以期制成口感良好、富含葡萄多重营养的果冻,既满足消费者对更天然、更健康饮食的追求,也为业界追求果冻类休闲食品的多样化提供参考和借鉴.

1 材料与方法

1.1 实验材料

葡萄、白砂糖,市售;CaCl₂、柠檬酸,河南万邦实业有限公司产;低酰基结冷胶、魔芋胶,河南旗诺食品配料有限公司产.以上实验材料均为食品级.

1.2 仪器与设备

AL204型电子天平,梅特勒-托利多仪器

(上海)有限公司产;HR 1861 型榨汁机,飞利浦(中国)投资有限公司产;TA - XT Plus 型物性分析仪,英国 Stable Micro Systems 公司产;HH - S4 型数字恒温水浴锅,金坛市医疗仪器厂产;BC/BD - 429H 型冰柜,青岛海尔股份有限公司产;LDZX - 50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂产。

1.3 实验方法

1.3.1 葡萄果冻的制备工艺

选择成熟度适宜的葡萄,洗净,放入沸水中预煮 10 s 后,榨汁过滤,即得实验所需葡萄汁;将结冷胶、魔芋胶、白砂糖、CaCl₂ 按照一定配比加入到葡萄汁中,再在熬制过程中缓慢添加柠檬酸,搅拌均匀,避免局部酸度过高,用小火熬制煮沸,趁热灌装密封;将密封罐置于 80 ℃ 水浴锅中灭菌 15 min,取出冷却至室温后,转移至 4 ℃ 冰箱中冷藏,检验无缺陷(表面平整光滑,无气泡)后,即得葡萄果冻样品^[19-21]。

1.3.2 单因素试验设计

1.3.2.1 结冷胶添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质影响的试验方法 取葡萄果冻混合原料 150 g,其中魔芋胶 3.00% (如无特指,百分数均表示质量分数,下同),白砂糖 8.00%,柠檬酸 0.26%,CaCl₂ 0.05%,分别加入 0.30%,0.45%,0.60%,0.75%,0.90% 的结冷胶,进行 5 组对比试验,测定结冷胶添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的影响。

1.3.2.2 白砂糖添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质影响的试验方法 取葡萄果冻混合原料 150 g,其中结冷胶 0.60%,魔芋胶 3.00%,柠檬酸 0.26%,CaCl₂ 0.05%,分别加入 6.00%,8.00%,10.00%,12.00%,14.00% 的白砂糖,进行 5 组对比试验,测定白砂糖添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的影响。

1.3.2.3 柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质影响的试验方法 取葡萄果冻混合

原料 150 g,其中结冷胶 0.60%,魔芋胶 3.00%,白砂糖 8.00%,CaCl₂ 0.05%,分别加入 0.18%,0.22%,0.26%,0.30%,0.34% 的柠檬酸,进行 5 组对比试验,测定柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的影响。

1.3.3 正交试验设计

在单因素试验的基础上,根据正交试验原理对葡萄果冻的工艺配方进行优化处理,以综合评分为指标,选取结冷胶添加量(A)、白砂糖添加量(B)、柠檬酸添加量(C)3 个因素进行三因素三水平 L₉(3³) 正交试验设计,以确定制作葡萄果冻的最佳工艺配方. L₉(3³) 正交试验因素和水平如表 1 所示。

表 1 L₉(3³) 正交试验因素和水平表

Table 1 The factors and levels table of L₉(3³) orthogonal test

水平	因素		
	A	B	C
1	0.60	6.00	0.22
2	0.75	8.00	0.26
3	0.90	14.00	0.30

1.3.4 测试与评价方法

1.3.4.1 葡萄果冻的凝胶强度测试 采用物性分析仪对葡萄果冻样品进行质构测试,并记录葡萄果冻的凝胶强度.凝胶强度越大,果冻成胶效果越好.每组测试均做 5 次平行测定,试验结果取平均值.测试条件:探头类型为 P/R 0.5;测试速度为 1.00 mm/s;目标模式为 distance,距离为 15.0 mm;触发值为 5 g.

1.3.4.2 葡萄果冻的感官评价 葡萄果冻的感官评分标准见表 2.由 10 名感官评价员打分,最后结果取平均值,分数越高代表葡萄果冻的感官品质越好。

1.3.4.3 综合评价 综合评分 = (感官评分平均值/最高感官评分) × 50% + (凝胶强度平均值/最大凝胶强度) × 50%.综合评价分数越高代表葡萄果冻品质越好。

表2 葡萄果冻的感官评分标准

Table 2 Sensory scoring criteria for grape jelly

项目	评分标准	分数/分
色泽 (20分)	果冻呈浅紫色,均匀一致,天然纯正,鲜艳,富有光泽	17~20
	果冻呈浅紫色,鲜艳,富有光泽	13~16
	果冻不呈浅紫色,没有光泽	1~12
香味 (20分)	果冻具有葡萄特有的香气且香味纯正	17~20
	果冻具有较淡的葡萄香气	13~16
	果冻具有令人不愉快的气味	1~12
组织 状态 (30分)	果冻呈半透明状,不流散,不析出汁液,无糖结晶,无杂质	24~30
	果冻呈半透明状,有少量汁液析出,无杂质	13~23
	果冻不呈半透明状,易流散,易析出汁液,有糖结晶,有杂质	1~12
滋味 与口感 (30分)	果冻酸甜可口,味感甘爽纯正,口感细腻润滑	24~30
	果冻口味稍淡,口感适中	13~23
	果冻口味过淡,无留味,风味不正,甜酸失调	1~12

1.4 数据处理

采用 SPSS 19.0 中的单因素 ANOVA 进行数据分析,试验数据以(平均值±标准偏差)表示;使用 LSD 多重检验分析各组间差异, $P < 0.05$ 时代表具有显著性差异;使用 Origin 8.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 结冷胶添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的影响

不同结冷胶添加量对葡萄果冻凝胶强度的影响如图 1 所示。由图 1 可以看出,凝胶强度随结冷胶添加量的增加呈先增大后保持平缓的态势。这可能是由于 Ca^{2+} 定位于结冷胶双螺旋内外两侧,随着结冷胶添加量的增加,结冷胶双螺旋分子交联密集程度也随之增加^[22]。当结冷胶添加量为 0.30% 和 0.45% 时,凝胶强度较小,且两组之间没有显著性差异($P > 0.05$);当结冷胶添加量为 0.60% 时,凝胶强度与前两组相比显著增大($P < 0.05$);当结冷胶添加量为

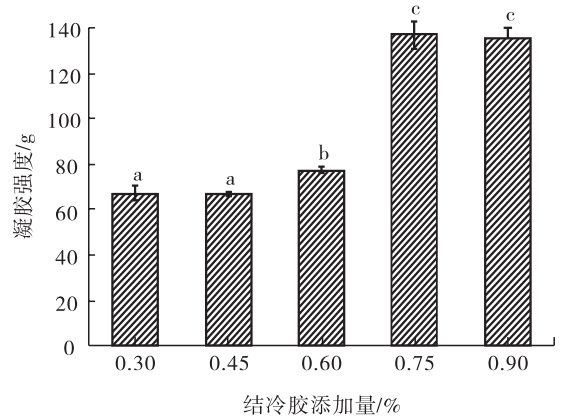


图1 不同结冷胶添加量对葡萄果冻凝胶强度的影响

Fig. 1 Effect of different gellan gum addition on gel strength of grape jelly

0.75% 和 0.90% 时,凝胶强度均较大,且两组之间没有显著性差异($P > 0.05$),但与前 3 组相比,凝胶强度的差异显著增大($P < 0.05$)。

结冷胶添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的综合影响见表 3。由表 3 可知,随着结冷胶添加量的增加,产品的感官评分呈现先上升后下降的趋势。当结冷胶添加量为 0.60% 时,葡萄果冻感官评分最高,达到峰值;而当添加量为 0.30% 和 0.45% 时,感官评分则相对较低。由综合评分可知,当结冷胶添加量为 0.60%, 0.75%, 0.90% 时,综合评分均相对较高,表明在这 3 个结冷胶添加量下制作的葡萄果冻品质较好。

2.1.2 白砂糖添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的影响

不同白砂糖添加量对葡萄果冻凝胶强度的影响如图 2 所示。由图 2 可以看出,随着白砂糖添加量的增加,凝胶强度呈现先减小后增大的趋势。其中,当白砂糖添加量为 6.00% 时,凝胶强度达到最大值;当白砂糖添加量为 14.00% 时,凝胶强度相对较大,且与白砂糖添加量为 6.00% 时没有显著性差异($P > 0.05$);当白砂糖添加量为 8.00% 时,凝胶强度显著减小($P <$

0.05);当白砂糖添加量为10.00%和12.00%时,凝胶强度显著减小($P < 0.05$),但两组之间没有显著性差异($P > 0.05$),其中,当白砂糖添加量为12.00%时,凝胶强度达到最小值。

白砂糖添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的综合影响见表3。由表3可知,随着白砂糖添加量的增加,感官评分呈现先上升后下降的趋势。其中,当白砂糖添加量为12.00%时,感官评分最高,而当添加量为14.00%时,感官评分开始降低。这可能是因为当白砂糖添加量过多时,会掩盖葡萄本身的独特风味,果冻失去最适甜酸比,不易受欢迎。由综合评分可知,当白砂糖添加量为6.00%,8.00%,14.00%时,综合评分均相对较高,表明在这3个白砂糖添加量下制作的葡萄果冻品质较好。

2.1.3 柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的影响

不同柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶强度的影响如图3所示。由图3可以看出,随着柠檬酸添加量的增加,凝胶强度呈现先增大后减小的趋势。这可能是因为柠檬酸柔和的酸味使果冻胶液的pH值降低,胶体发生水解而使得果冻胶液变稀,从而影响葡萄果冻的胶体成型。其中,当柠檬酸添加量为0.26%时,凝胶强度达到

最大值;当柠檬酸添加量为0.18%,0.22%,0.30%时,凝胶强度显著降低($P < 0.05$),但这3组之间没有显著性差异($P > 0.05$);当柠檬酸添加量为0.34%时,与其他4组相比凝胶强度显著降低($P < 0.05$)。

柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官

表3 结冷胶、白砂糖、柠檬酸不同添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的综合影响

Table 3 The comprehensive effects of the different addition of gellan gum, white granulated sugar and citric acid on the gelation property and sensory quality of grape jelly

因素/%	凝胶强度/g	感官评分/分	综合评分/分	
结冷胶	0.30	67.0 ± 3.2	78.9 ± 3.7	73.3
	0.45	66.9 ± 1.2	79.1 ± 4.1	73.4
	0.60	77.5 ± 1.8	80.9 ± 2.4	78.4
	0.75	136.9 ± 5.9	79.4 ± 3.7	99.1
	0.90	135.2 ± 4.7	80.4 ± 2.6	99.2
白砂糖	6.00	153.1 ± 8.5	77.2 ± 4.1	98.7
	8.00	127.3 ± 8.2	78.1 ± 4.3	90.8
	10.00	98.3 ± 5.1	79.1 ± 4.0	82.0
	12.00	93.8 ± 2.0	79.3 ± 4.4	80.6
	14.00	142.4 ± 2.8	78.4 ± 3.7	96.0
柠檬酸	0.18	127.3 ± 0.5	80.0 ± 6.6	88.3
	0.22	135.2 ± 13.3	79.0 ± 5.7	90.2
	0.26	156.6 ± 8.2	83.0 ± 3.3	99.4
	0.30	127.0 ± 4.4	84.0 ± 3.4	90.6
	0.34	97.2 ± 5.5	83.0 ± 2.7	80.5

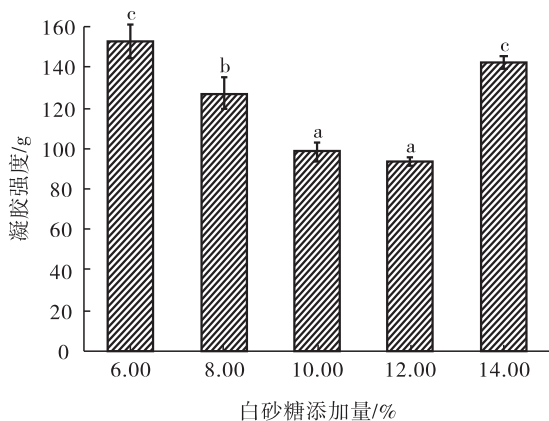


图2 不同白砂糖添加量对葡萄果冻凝胶强度的影响

Fig. 2 Effect of different white granulated sugar content on gel strength of grape jelly

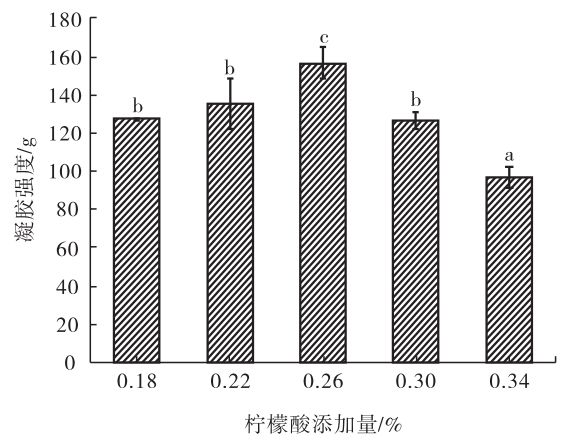


图3 不同柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶强度的影响

Fig. 3 Effect of different citric acid addition on gel strength of grape jelly

品质的综合影响见表3。由表3可知,当柠檬酸添加量为0.30%时,感官评分最高;当柠檬酸添加量为0.22%时,感官评分相对较低。不同添加量的柠檬酸对葡萄果冻感官品质的影响相比前两个单因素(结冷胶添加量和白砂糖添加量)差异更加明显。柠檬酸添加量较少时,果冻酸味不足;柠檬酸添加量过多时,果冻凝胶强度和弹性都有一定程度的下降,同时太酸也会影响果冻口感。由综合评分可知,当柠檬酸添加量为0.22%,0.26%,0.30%时,综合评分均相对较高,表明在这3个柠檬酸添加量下制作的葡萄果冻品质较好。

2.2 正交试验结果分析

正交试验结果见表4。由表4极差分析的 R 值可知, $C > A > B$,说明3个因素中白砂糖添加量对葡萄果冻品质的影响最大,其次是结冷胶添加量,柠檬酸添加量对葡萄果冻品质的影响最小。根据各因素 k 值的大小可知,最优组合为 $A_2B_2C_3$,即结冷胶添加量为0.75%,白砂糖添加量为8.00%,柠檬酸添加量为0.26%。依据该工艺配方制作出的葡萄果冻综合评分最高,

表4 正交试验结果

Table 4 Result of orthogonal test

试验号	A	B	C	综合评分/分
1	1	1	1	74.0
2	1	2	2	78.0
3	1	3	3	82.8
4	2	1	2	75.8
5	2	2	3	98.6
6	2	3	1	68.8
7	3	1	3	78.7
8	3	2	1	66.6
9	3	3	2	80.7
K_1	234.8	228.5	209.4	
K_2	243.2	243.2	234.5	
K_3	226.0	232.3	260.1	
k_1	78.27	76.17	69.80	
k_2	81.07	81.07	78.17	
k_3	75.33	77.43	86.70	
R	5.73	4.90	16.90	

颜色鲜艳,富有光泽,具有葡萄特有的香气,酸甜可口,健康营养。

3 结论

本文以葡萄为原料,通过添加魔芋胶改善结冷胶的机械强度,对结冷胶添加量、白砂糖添加量、柠檬酸添加量对葡萄果冻凝胶特性和感官品质的综合影响进行研究以确定葡萄果冻的工艺配方。结果表明:葡萄果冻的最佳工艺配方为结冷胶添加量0.75%,白砂糖添加量8.00%,柠檬酸添加量0.26%。依据此配方制作的葡萄果冻颜色鲜艳,富有光泽,具有葡萄特有的香气,酸甜可口,健康营养。本文研制的葡萄果冻可增加市场上的果冻品种,满足消费者对天然、健康饮食的追求,同时为新型保健果冻的研制提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 徐清萍,胡风城. 猕猴桃/苹果风味醋果冻的研制[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版),2012,27(5):18
- [2] 王菲菲. 西红柿芦荟果肉果冻的研制[J]. 江苏调味副食品,2019(1):17.
- [3] 王慧敏,吴志豪,陈婷钰,等. 银杏香橙果冻的研制[J]. 轻工科技,2019(10):9.
- [4] 王晨昕,张玉仙,李宗浩,等. 绣球菌风味果冻的研制[J]. 农产品加工,2019(16):10.
- [5] 田龙,杜敏华. 富含猕猴桃果水溶多糖营养型保健果冻的研制[J]. 安徽农业科学,2007(8):2401.
- [6] 陈景鑫,张睿. 蜂蜜雪梨果冻的研制[J]. 江苏调味副食品,2019(2):11.
- [7] 何玲玲,倪团结,游海燕. 火龙果低糖保健果冻的研制[J]. 农产品加工,2019(7):1.
- [8] 田华,黄珍. 保健果冻研究现状与展望[J]. 食品研究与开发,2019,40(4):215.
- [9] JANSSON P E, LINDBERG B, SANDFORD P

- A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea* [J]. *Carbohydrate Research*, 1983, 124 (1): 135.
- [10] ONEILL M A, SELVENDRAN R R, MORRIS V J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea* [J]. *Carbohydrate Research*, 1983, 124 (1): 123.
- [11] KUO M S, MORT A J, DELL A. Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum [J]. *Carbohydrate Research*, 1986, 156:173.
- [12] 詹晓北. 结冷胶[J]. *中国食品添加剂*, 1999 (2): 66.
- [13] 中国国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准食品添加剂使用标准:GB 2760—2014 [S]. 北京:中国标准出版社,2014.
- [14] 刘三宝,郭娜,朱桂兰,等. 低酰基结冷胶-瓜尔豆胶复配体系的凝胶特性与流变特性研究[J]. *农产品加工*,2019(16):6.
- [15] 文春溪,刘钟栋. 结冷胶研究进展[J]. *中国食品添加剂*,2014(1):204.
- [16] 蔡云升,张国佩,刘学珍. 结冷胶在果冻、果酱等食品中的应用[J]. *食品工业科技*,2005 (11):172.
- [17] 陈运忠,侯章成. 魔芋胶(魔芋葡甘聚糖)在食品工业中的应用[J]. *食品工业*,2003(3):28.
- [18] 张晨. 糖醇类物质对结冷胶凝胶的影响及结冷胶的应用[D]. 无锡:江南大学,2014.
- [19] 王雪媛,高贵田,耿鹏飞,等. 葡萄味软枣猕猴桃果肉果冻的研制[J]. *农产品加工*,2015 (13):19.
- [20] 冷桂华,叶文峰,徐文明. 猕猴桃保健果冻的研制[J]. *食品科学*,2007(10):656.
- [21] 董晓静,盛杰. 海参银耳保健果冻的生产工艺研究[J]. *保鲜与加工*,2019(5):93.
- [22] 潘晓军,李利敏. 结冷胶在双层果冻中的应用研究[J]. *食品工业*,2017,38(2):111.
- [23] 郭楠楠,游新侠,黄伟杰. 杂粮果冻的加工工艺研究[J]. *粮食与油脂*,2019,32(2):38.



引用格式:卢艳慧,李迎秋.带鱼蛋白酶解工艺条件的响应面优化[J].轻工学报,2020,35(4):23-33.

中图分类号:TS254.4 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.004

文章编号:2096-1553(2020)04-0023-11

带鱼蛋白酶解工艺条件的响应面优化

Response surface optimization of proteolysis technological conditions of hairtail

卢艳慧,李迎秋

LU Yanhui, LI Yingqiu

齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院,山东 济南 250353
College of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Science), Ji'nan 250353, China

关键词:

带鱼;蛋白酶解;碱性蛋白酶;响应面优化

Key words:

hairtail; proteolysis;
alkaline protease;
response surface
optimization

摘要:以带鱼为原材料,从6种蛋白酶中筛选出碱性蛋白酶作为带鱼蛋白酶解的最佳蛋白酶,进而利用单因素试验和响应面试验优化带鱼蛋白酶解的工艺条件。结果表明:带鱼蛋白酶解的最佳工艺条件为底物质量分数5.3%,蛋白酶质量分数2.7%,酶解pH值8.3,酶解温度63℃,酶解时间168min,在该工艺条件下,带鱼蛋白水解度达到37.07%,与响应面优化试验回归模型的预测值基本一致。

收稿日期:2020-02-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31371839);山东省重点研发计划项目(2018YYSP001)

作者简介:卢艳慧(1995—),女,山东省烟台市人,齐鲁工业大学硕士研究生,主要研究方向为食品生物技术。

通信作者:李迎秋(1972—),女,山东省菏泽市人,齐鲁工业大学教授,博士,主要研究方向为食品生物技术。

Abstract: Taking hairtail as raw material, alkaline protease was selected from 6 kinds of proteases as the best protease for hairtail proteolysis, and the technological conditions of hairtail proteolysis were optimized by single factor test and response surface test. The results showed that the optimum conditions for proteolysis of hairtail were as follows: the substrate mass fraction was 5.3%, the protease mass fraction was 2.7%, the pH value of hydrolysis was 8.3, the hydrolysis temperature was 63 °C, and the hydrolysis time was 168 min. Under these conditions, the hydrolysis degree of hairtail protein reached 37.07%, which was basically consistent with the predicted value of regression model of response surface optimization test.

0 引言

海洋生物约占全球生物的1/2,从海洋生物中摄取功能性蛋白和生物活性物质是沿海国家开发海洋资源的目的之一^[1].海洋生物蛋白种类多样,是制备生物活性肽的理想材料^[2].在海洋生物蛋白的氨基酸序列中,潜藏着很多具有生物活性的多肽片段,利用生物技术(如采用蛋白酶进行水解)可将这些多肽片段释放出来,以开发高附加值的生物活性肽.

目前,采用酶解的方法从海洋生物蛋白中获取生物活性肽一直是国内外业界的研究热点.研究表明,从海洋生物蛋白中提取的生物活性肽,具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、调节免疫、降血压、降血脂等功能^[3].不同的蛋白酶对酶解产物的性质会有很大影响,故蛋白酶的选择在海洋低附加值鱼类蛋白酶解工业中至关重要^[4].常用的蛋白酶主要有微生物蛋白酶(如酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶等)、植物蛋白酶(如木瓜蛋白酶等)和动物蛋白酶(如胃蛋白酶、胰蛋白酶等)^[5].其中,碱性蛋白酶虽属于微生物蛋白酶(胞外酶),但它同时具有动植物源蛋白酶的全部特性,以及更强的水解能力和耐碱能力,此外,它还具有较强的耐热性、高产菌株选育简单、来源广、产量高、下游技术处理相对简单、价格低廉、海洋生物蛋白提取率较高等优点,易于实现工业化生产^[6].G. A. Gbogouri等^[7]研究发现,采用碱性蛋白酶对鱼蛋白进行水解,可得到低分子肽和氨基酸,实现低附加值鱼类的有效加工.张群飞等^[8]利用

碱性蛋白酶对虾籽进行酶解后,具有提鲜效果的天冬氨酸和谷氨酸含量明显提高,这为调味料的生产提供了重要的依据.M. Ovissipour等^[9]利用碱性蛋白酶对黄鳍金枪鱼内脏进行水解,水解度超过53%,水解液中蛋白质含量(72.34%)较高,氨基酸含量丰富,脂肪含量(1.43%)较低,可作为宠物食品的原料.

带鱼是我国盛产的经济鱼种之一.近年来,过度捕捞使得捕捞的带鱼体型较小,而这些小带鱼通常会被加工成鱼粉等系列产品,造成带鱼蛋白资源的浪费.因此,业界越来越关注如何进行小带鱼深加工、提高小带鱼附加值等问题.使用碱性蛋白酶对带鱼蛋白进行酶解以获取带鱼蛋白肽是一种有益的探索,但目前对该类研究鲜有报道.鉴于此,本文拟以带鱼为材料,从6种蛋白酶中筛选出带鱼蛋白酶解的最佳蛋白酶,进而利用单因素试验和响应面试验优化带鱼蛋白酶解的工艺条件,以期小带鱼深加工研究和小带鱼附加值的提高提供参考,同时为带鱼蛋白肽粉的工业化生产提供数据支撑.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

带鱼,购于超市;NaOH, HCl, 浓 H₂SO₄, 均为分析纯,天津市大茂化学试剂有限公司产;正己烷,分析纯,国药集团化学试剂有限公司产;碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶,成都诺维信科技有限公司产;胰蛋白酶,杭州三叶新材料股份有限公司产.

1.2 仪器与设备

AL-204 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;DS-1 型高速组织绞碎机,上海标本模具厂产;DK-98-II A 型数显恒温水浴锅,金坛市金南仪器厂产;PB-10 标准型 pH 计,德国赛多利斯有限公司产;GZX-9140MBE 型数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂产。

1.3 实验方法

1.3.1 样品预处理

剔除带鱼的鱼鳞、鱼骨、鱼鳍和鱼皮后,于 65 ℃ 条件下烘干,粉碎后过 60 目筛,收集带鱼粉末;在带鱼粉末中加入正己烷($m(\text{带鱼粉}) : V(\text{正己烷}) = 1 \text{ g} : 4 \text{ mL}$)进行脱脂后,真空抽滤,于 65 ℃ 条件下烘干,得到脱脂带鱼粉,备用。

1.3.2 最佳蛋白酶的筛选

取 7 份相同质量(2 g)的脱脂带鱼粉为底物,除第 1 份不加蛋白酶(自溶)以外,其余 6 份分别加入单位酶活为 50 000 U/mL 的木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶。在底物质量分数为 4.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解时间为 180 min,酶解温度为 50 ℃,酶解 pH 值为 8.0 的条件下,测定并计算各蛋白酶酶解之后的带鱼蛋白水解度(DH),通过比较带鱼蛋白水解度,从中筛选出最佳蛋白酶。

运用 pH-stat 法^[10]测定带鱼蛋白水解度(DH),公式如下:

$$DH = \frac{B \times C}{M \times \alpha \times h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

式中, B 为维持 pH 值时加入的 NaOH 体积/mL; C 为 NaOH 的浓度/(mol · L⁻¹); M 为蛋白质的质量/g; α 为蛋白质水解时的氨基解离度; h_{tot} 为每 g 蛋白中肽键的物质的量/mmol, h_{tot} (带鱼) = 8.17 mmol^[11]。

1.3.3 单因素试验

1.3.3.1 底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

在酶解过程中,底物质量分数对酶解过程有非常大的影响。在蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解 pH 值为 8.0,酶解温度为 50 ℃,酶解时间为 180 min 的条件下,设置底物质量分数分别为 4.0%,4.5%,5.0%,6.0%,7.0%,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的底物质量分数。

1.3.3.2 酶解温度对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

温度对蛋白酶活性的影响很大,温度过高或过低都会降低蛋白酶的活性,即作用效果。毋瑾超等^[12]研究了鲢鱼降血压肽的酶解条件,确定其最佳酶解温度为 60 ℃;王雪芹等^[13]在鲐鱼蛋白酶解工艺优化及其抗氧化活性测定中发现,鲐鱼蛋白酶酶解的最佳温度为 55 ℃。因此,本研究在底物质量分数为 5.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解 pH 值为 8.0,酶解时间为 180 min 的条件下,设置酶解温度分别为 40 ℃,50 ℃,60 ℃,65 ℃,70 ℃,75 ℃,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的酶解温度。

1.3.3.3 酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

在酶解的过程中,并非酶解时间越长酶解效果就越好,还需要寻找最佳的酶解时间。在底物质量分数为 5.0%,蛋白酶质量分数为 2.5%,酶解温度为 50 ℃,酶解 pH 值为 8.0 的条件下,设置酶解时间分别为 90 min,120 min,150 min,180 min,240 min,270 min,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的酶解时间。

1.3.3.4 蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

在酶解温度和酶解 pH 值一定的条件下,当底物质量分数远远大于蛋白酶质量分数时,反应速度与蛋白酶质量分数呈正比。在底物质量分数为 5.0%,酶解 pH 值为 8.0,酶解温度为 50 ℃,酶解时间为 180 min 的条件下,设置蛋白酶质量分数分别为 1.1%,1.3%,

1.7% ,1.9% ,2.1% ,2.3% ,2.5% ,2.7% ,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的蛋白酶质量分数.

1.3.3.5 酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响 在底物质量分数为 5.0% ,蛋白酶质量分数为 2.5% ,酶解温度为 50 °C ,酶解时间为 180 min 的条件下,用浓度为 2.0 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值,设置酶解 pH 值分别为 6.5,7.0,7.5,8.0,8.5,9.0,9.5,通过比较带鱼蛋白水解度,从中选取最佳的酶解 pH 值.

1.3.4 响应面法优化试验

在单因素试验的基础上,利用 Design Expert 8.0.6.0 响应面软件,选择底物质量分数(X_1)、蛋白酶质量分数(X_2)、酶解 pH 值(X_3)、酶解温度(X_4)、酶解时间(X_5)5 个因素为响应面优化试验设计中的关键因素,以带鱼蛋白水解度(Y)为响应值,进行带鱼蛋白酶解工艺条件的优化,同时,绘制响应面图和等高线图,分析各因素间的交互作用.响应面自变量因素编码和水平见表 1.

表 1 响应面自变量因素编码和水平表

Table 1 Factors encoding and levels table in response surface methodology

水平	因素				
	X_1 /%	X_2 /%	X_3	X_4 /°C	X_5 /min
-1	4.5	2.4	7.5	55	120
0	5.0	2.5	8.0	60	150
1	5.5	2.6	8.5	65	180

1.4 数据处理与分析

每个实验均重复进行 3 次,所得数据用 Origin 8.0 软件进行统计和方差分析(ANOVA),结果用(平均值 ± 标准误差)表示,并采用回归分析确定 5% 可信区间的显著性差异($P < 0.05$).利用 Microsoft Excel 2010 软件绘图,图中数据添加误差线.响应面试验采用 Design Expert 8.0.6.0 软件对数据进行回归分析.

2 结果与分析

2.1 最佳蛋白酶筛选结果

不同蛋白酶对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 1 所示.由于不同蛋白酶的切割位点和专一性不同,所以不同蛋白酶酶解蛋白质产生的多肽也会不同.由图 1 可以看出,脱脂带鱼粉自溶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶对应的带鱼蛋白水解度依次为 3.94% ,9.93% ,13.37% ,14.12% ,17.03% ,18.87% ,21.54% ,这表明经碱性蛋白酶酶解脱脂带鱼粉后,带鱼蛋白水解度最大,酶解效果最好,这再次验证了碱性蛋白酶应用于海洋生物蛋白提取的优势.因此,选取碱性蛋白酶作为酶解脱脂带鱼粉的最佳蛋白酶.

2.2 单因素试验结果分析

2.2.1 底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 2 所示.由图 2 可以看出,当底物质量分数从 4.0% 增加到 5.0% 时,带鱼蛋白水解度从 14.71% 增加到 15.18% ;当底物质量分数从 5.0% 继续增加到 7.0% 时,带鱼蛋白水解度从 15.18% 减少到 12.14% .这说明当底物质量分数为 5.0% 时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度

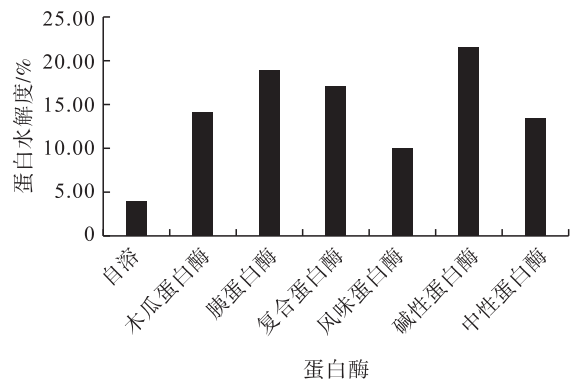


图 1 不同蛋白酶对脱脂带鱼粉酶解效果的影响
Fig. 1 Effect of different proteases on the hydrolysis of defatted hairtail meal

最大(为 15.18%)。这可能是因为酶解反应过程中水必须作为反应底物参与整个带鱼蛋白酶解过程,加水量的多少直接影响带鱼蛋白酶解生成氨基酸和多肽,但这并不意味着加水量越多越好。因此,选取底物质量分数 5.0% 作为响应面试验设计的中心值。

2.2.2 酶解温度对脱脂带鱼粉蛋白酶解效果的影响分析

酶解温度对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 3 所示。由图 3 可以看出,当酶解温度从 40 ℃ 升高到 60 ℃ 时,带鱼蛋白水解度从 33.60% 增加到 35.56%;当酶解温度从 60 ℃ 继续升高到 75 ℃ 时,带鱼蛋白水解度从 35.56% 减少到 32.78%。这说明当酶解温度为 60 ℃ 时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度最大(为 35.56%)。这可能是因为酶解温度是决定酶催化活性的重要参数之一,温度过高或过低

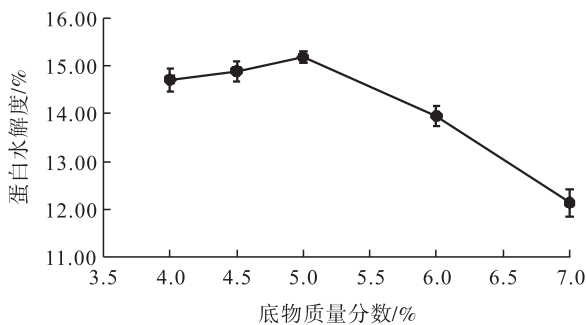


图 2 底物质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 2 Effect of substrate mass fraction on the hydrolysis of defatted hairtail meal

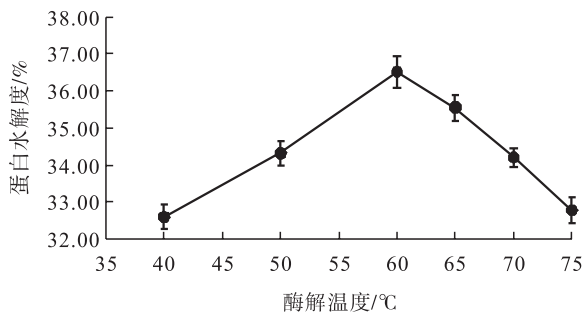


图 3 酶解温度对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 3 Effect of hydrolysis temperature on the hydrolysis of defatted hairtail meal

均会抑制酶活性甚至使酶失活,导致酶解效果变差^[14]。因此,选取酶解温度 60 ℃ 作为响应面试验设计的中心值。

2.2.3 酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 4 所示。由图 4 可以看出,当酶解时间从 30 min 增加到 150 min 时,带鱼蛋白水解度从 15.28% 增加到 21.21%;当酶解时间从 150 min 增加到 210 min 时,带鱼蛋白水解度变化很小。应当承认,酶解时间越长酶解得越彻底,但酶解时间过长会产生苦味氨基酸,且造成能源的严重浪费^[15]。因此,选取酶解时间 150 min 作为响应面试验设计的中心值。

2.2.4 蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出,当蛋白酶质量分数从 1.3% 增加到 2.5% 时,带鱼蛋白水解度从 29.37% 增加到 35.94%;当蛋白酶质量分数从 2.5% 继续增加到 2.7% 时,带鱼蛋白水解度从 35.94% 减少到 34.01%。这表明当蛋白酶质量分数为 2.5% 时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度最大(为 35.94%)。这可能是因为其他条件一定的情况下,随着蛋白酶质量分数的增加,蛋白酶与底物充分接触,带鱼蛋白水解度

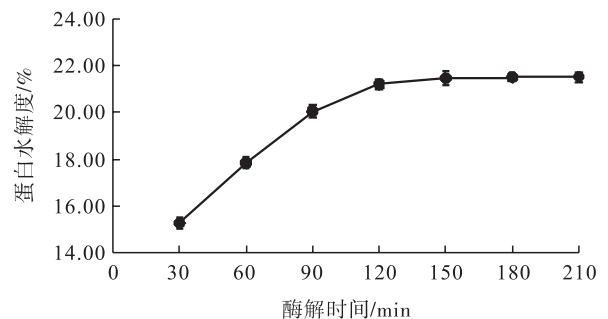


图 4 酶解时间对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 4 Effect of hydrolysis time on the hydrolysis of defatted hairtail meal

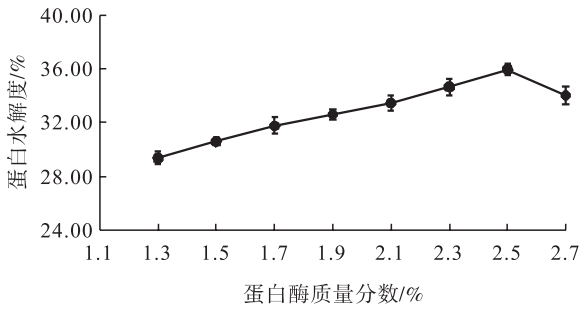


图5 蛋白酶质量分数对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 5 Effect of protease mass fraction on the hydrolysis of defatted hairtail meal

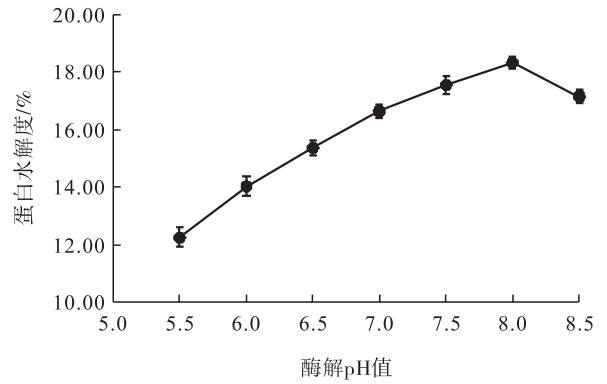


图6 酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响

Fig. 6 Effect of hydrolysis pH value on the hydrolysis of defatted hairtail meal

呈上升的趋势,但当蛋白酶质量分数超过一定值时,过量的碱性蛋白酶可能会削弱酶对底物的作用.另外,蛋白酶质量分数过大不仅造成蛋白酶的浪费,还会产生苦味氨基酸,影响酶解效果^[16].因此,选取蛋白酶质量分数2.5%作为响应面试验设计的中心值.

2.2.5 酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响分析

酶解 pH 值对脱脂带鱼粉酶解效果的影响如图6所示.由图6可以看出,当酶解 pH 值从5.5增加到8.0时,带鱼蛋白水解度从12.25%增加到18.32%;当pH值从8.0继续增加到8.5时,带鱼蛋白水解度从18.32%减少到17.15%.这表明当酶解 pH 值为8.0时,酶解效果最好,带鱼蛋白水解度最大(为18.32%).这可能是因为碱性蛋白酶活性很大程度上取决于酶解 pH 值,酶解 pH 值可显著影响碱性蛋白酶活性位点的氨基酸电离状态,而且酶解 pH 值在维持酶的正常构象方面也起着重要作用^[17];另一方面,酶解 pH 值会影响脱脂带鱼粉的溶解度,酶解 pH 值过低会使带鱼蛋白之间的静电斥力减小而发生聚集沉降,进一步影响带鱼蛋白水解度,而过高的酶解 pH 值又会使带鱼蛋白变性,黏度增大,影响带鱼蛋白的酶解过程.酶解 pH 值过高或过低还会造成环境污染,加大生产成本.因此,选取酶解 pH 值8.0

作为响应面试验设计的中心值.

2.3 响应面优化试验结果分析

带鱼蛋白水解度的响应面设计方案和结果见表2.利用 Design Expert 8.0.6.0 响应面软件对表2所示试验结果进行回归分析,得到带鱼蛋白水解度对底物质量分数、蛋白酶质量分数、酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间五因素的二次多项回归方程,即

$$\begin{aligned}
 Y = & 38.21 + 0.27X_1 + 0.099X_2 + 0.22X_3 + \\
 & 0.21X_4 + 0.11X_5 - 0.11X_1X_2 - 0.22X_1X_3 - \\
 & 0.28X_1X_4 - 0.36X_1X_5 - 0.032X_2X_3 - 0.14X_2X_4 - \\
 & 0.28X_2X_5 - 0.22X_3X_4 - 0.13X_3X_5 - 0.28X_4X_5 - \\
 & 0.70X_1^2 - 0.60X_2^2 - 0.48X_3^2 - \\
 & 0.72X_4^2 - 0.79X_5^2
 \end{aligned}$$

带鱼蛋白水解度的回归模型方差分析见表3.由表3可知,带鱼蛋白水解度的二次多项式相关系数 $R^2 = 0.9378$,这表明带鱼蛋白水解度对5个自变量因素的二次多项回归模型具有良好的拟合度.模型 $P < 0.0001$,表明带鱼蛋白水解度的回归模型极显著,可以较好地分析和预测带鱼蛋白酶解工艺条件.此外,回归模型的一次项 X_1 是极显著的 ($P < 0.0001$), X_3, X_4 和 X_5 是显著的 ($P < 0.05$), X_2 是不显著的 ($P > 0.05$);二次项 $X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2$ 和 X_5^2 均是显著的;交互项 $X_1X_3, X_1X_4, X_1X_5, X_2X_5, X_3X_4$ 和

表2 带鱼蛋白水解度的响应面设计方案和结果

Table 2 Response surface design and results of hairtail protein hydrolysis degree

试验号	因素					蛋白水解度/%	试验号	因素					蛋白水解度/%
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5			X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	
1	-1	-1	0	0	0	36.63 ± 0.03	24	0	1	1	0	0	37.15 ± 0.03
2	1	-1	0	0	0	37.29 ± 0.04	25	-1	0	0	-1	0	36.05 ± 0.04
3	-1	1	0	0	0	36.99 ± 0.04	26	1	0	0	-1	0	37.26 ± 0.03
4	1	1	0	0	0	37.21 ± 0.02	27	-1	0	0	1	0	36.66 ± 0.04
5	0	0	-1	-1	0	36.25 ± 0.03	28	1	0	0	1	0	36.75 ± 0.05
6	0	0	1	-1	0	37.29 ± 0.06	29	0	0	-1	0	-1	36.78 ± 0.02
7	0	0	-1	1	0	37.22 ± 0.05	30	0	0	1	0	-1	37.23 ± 0.07
8	0	0	1	1	0	37.38 ± 0.02	31	0	0	-1	0	1	36.96 ± 0.06
9	0	-1	0	0	-1	36.01 ± 0.04	32	0	0	1	0	1	36.91 ± 0.02
10	0	1	0	0	-1	37.12 ± 0.01	33	-1	0	0	0	-1	35.91 ± 0.03
11	0	-1	0	0	1	36.88 ± 0.02	34	1	0	0	0	-1	37.25 ± 0.01
12	0	1	0	0	1	36.89 ± 0.03	35	-1	0	0	0	1	36.94 ± 0.01
13	-1	0	-1	0	0	36.22 ± 0.03	36	1	0	0	0	1	36.85 ± 0.03
14	1	0	-1	0	0	37.12 ± 0.06	37	0	-1	0	-1	0	36.46 ± 0.02
15	-1	0	1	0	0	37.36 ± 0.07	38	0	1	0	-1	0	36.89 ± 0.04
16	1	0	1	0	0	37.37 ± 0.04	39	0	-1	0	1	0	37.23 ± 0.04
17	0	0	0	-1	-1	36.02 ± 0.02	40	0	1	0	1	0	37.08 ± 0.02
18	0	0	0	1	-1	37.18 ± 0.02	41	0	0	0	0	0	38.26 ± 0.05
19	0	0	0	-1	1	36.89 ± 0.05	42	0	0	0	0	0	38.19 ± 0.07
20	0	0	0	1	1	36.93 ± 0.01	43	0	0	0	0	0	38.11 ± 0.04
21	0	-1	-1	0	0	36.96 ± 0.02	44	0	0	0	0	0	38.33 ± 0.03
22	0	1	-1	0	0	36.98 ± 0.06	45	0	0	0	0	0	38.02 ± 0.05
23	0	-1	1	0	0	37.26 ± 0.03	46	0	0	0	0	0	38.36 ± 0.03

表3 带鱼蛋白水解度的回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model for the hydrolysis degree of hairtail protein

差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	差异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	14.73	20	0.74	18.85	<0.000 1	X_3X_4	0.19	1	0.19	4.95	0.035 3
X_1	1.18	1	1.18	30.13	<0.000 1	X_3X_5	0.06	1	0.06	1.60	0.217 6
X_2	0.16	1	0.16	4.04	0.055 2	X_4X_5	0.31	1	0.31	8.03	0.009 0
X_3	0.75	1	0.75	19.15	0.000 2	X_1^2	4.24	1	4.24	108.47	<0.000 1
X_4	0.69	1	0.69	17.63	0.000 3	X_2^2	3.14	1	3.14	80.24	<0.000 1
X_5	0.19	1	0.19	4.90	0.036 2	X_3^2	2.03	1	2.03	51.86	<0.000 1
X_1X_2	0.05	1	0.05	1.24	0.276 3	X_4^2	4.57	1	4.57	116.93	<0.000 1
X_1X_3	0.20	1	0.20	5.07	0.033 4	X_5^2	5.44	1	5.44	139.17	<0.000 1
X_1X_4	0.31	1	0.31	8.03	0.009 0	残差	0.98	25	0.04		
X_1X_5	0.51	1	0.51	13.08	0.001 3	失拟	0.89	20	0.05	2.59	0.147 2
X_2X_3	0.00	1	0.00	0.11	0.745 0	纯误差	0.09	5	0.02	18.85	<0.000 1
X_2X_4	0.08	1	0.08	2.15	0.154 8	总和	15.70	45	0.74	30.13	<0.000 1
X_2X_5	0.30	1	0.30	7.74	0.010 1						

注: $P < 0.001$ 表示极显著, $P < 0.05$ 表示显著, $P > 0.05$ 表示不显著.

X_4X_5 是显著的, X_1X_2 , X_2X_3 , X_2X_4 和 X_3X_5 是不显著的. 通过上述分析可知, 二次多项回归模型

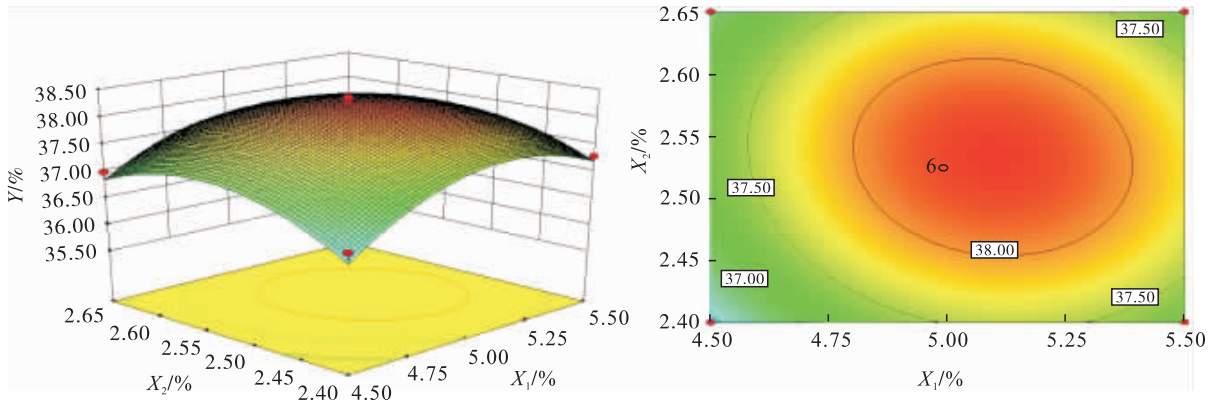
显著, 影响酶解效果的各因素对带鱼蛋白水解度的影响不是简单的线性关系, 其中, 底物质量

分数、酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间是影响带鱼蛋白酶解工艺的重要因素。

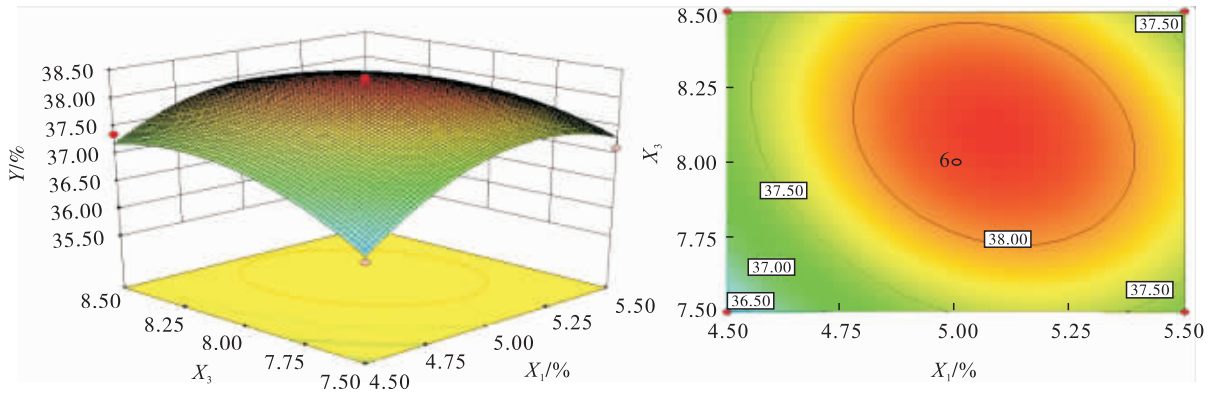
根据带鱼蛋白水解度的回归模型,利用 Design Expert 8.0.6.0 响应面分析软件绘制各因素交互作用的响应曲面图和等高线图,如图 7 所示. 在响应曲面图中,对蛋白水解度影响越大的因素,其曲线变化趋势越大. 在等高线图中,轴向等高线越密集,说明该因素对蛋白水解

度的影响越显著^[18]. 从图 7 的响应曲面图可以看出, X_1, X_3, X_4, X_5 对蛋白水解度影响显著, X_2 对蛋白水解度影响不显著;从图 7 的等高线图可以看出, $X_1 X_3, X_1 X_4, X_1 X_5, X_2 X_5, X_3 X_4, X_4 X_5$ 之间交互作用显著, $X_1 X_2, X_2 X_3, X_2 X_4, X_3 X_5$ 之间交互作用不显著.

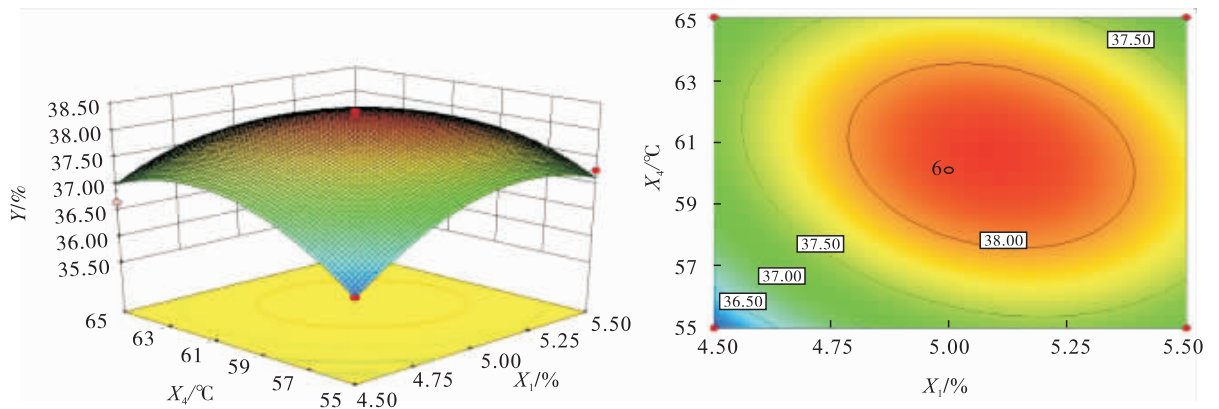
响应面优化试验结果表明,当底物质量分数为 5.29%,蛋白酶质量分数为 2.66%,酶解



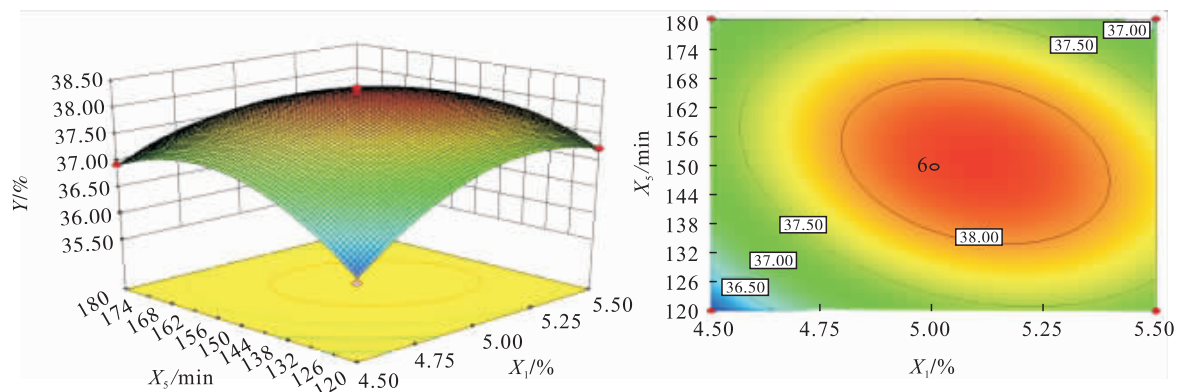
a) 底物质量分数与蛋白酶质量分数的交互作用



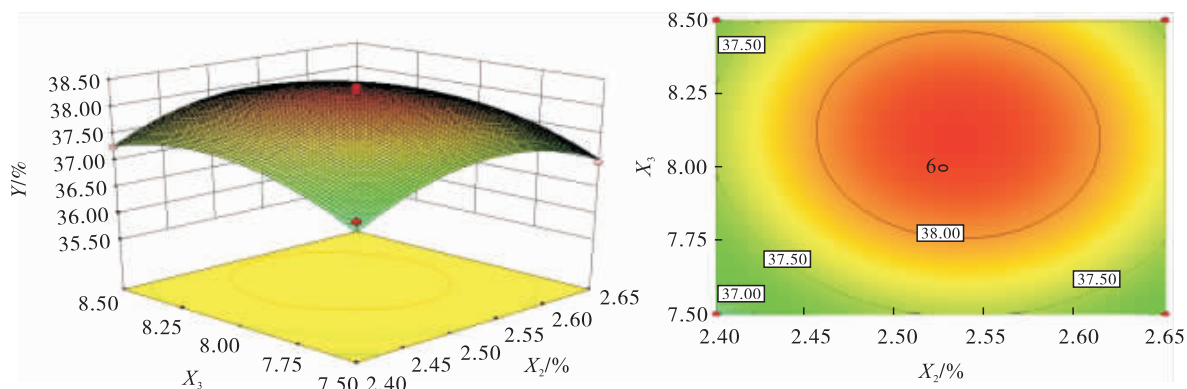
b) 底物质量分数与酶解pH值的交互作用



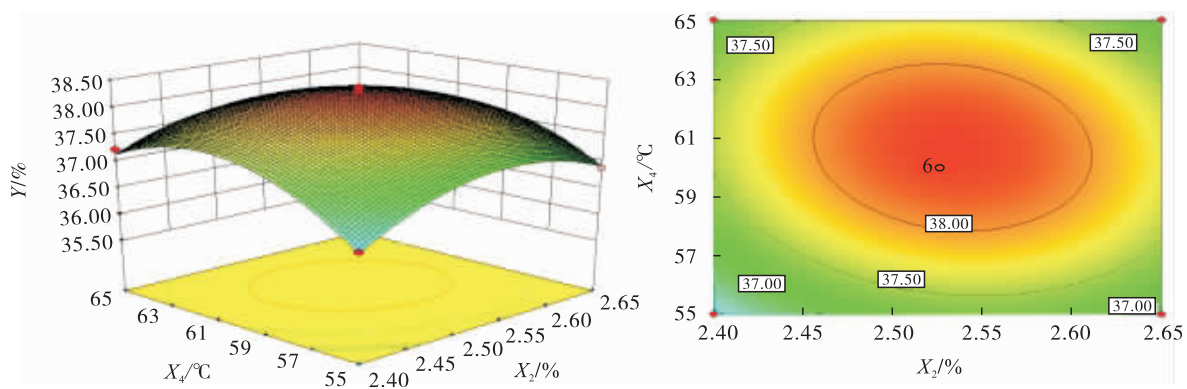
c) 底物质量分数与酶解温度的交互作用



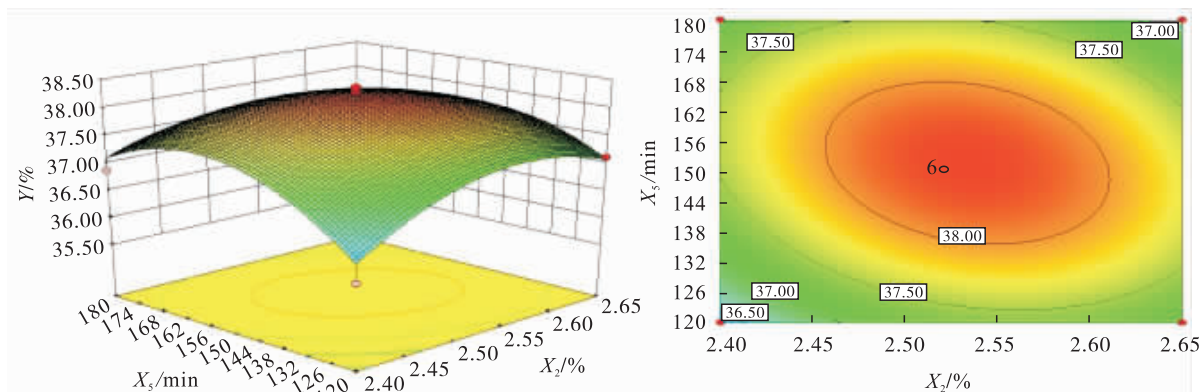
d) 底物质量分数与酶解时间的交互作用



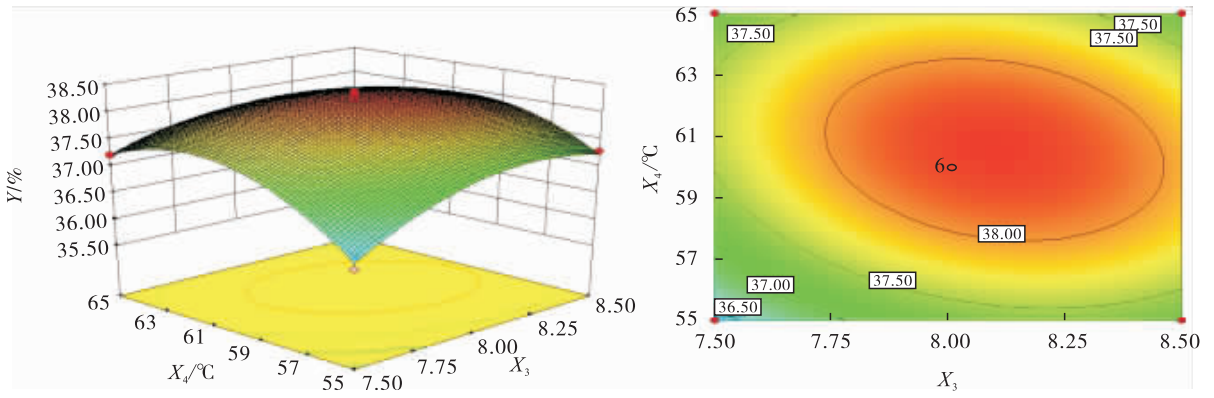
e) 蛋白酶质量分数与酶解pH值的交互作用



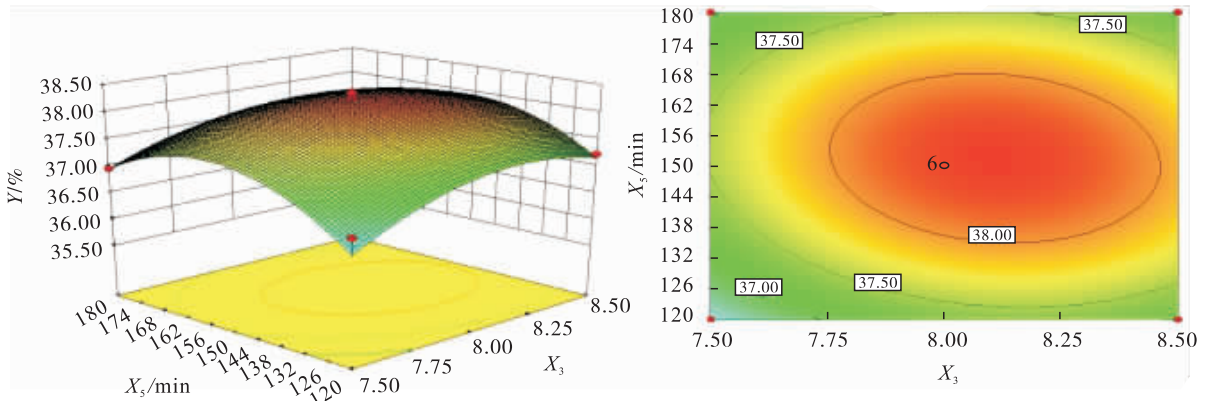
f) 蛋白酶质量分数与酶解温度的交互作用



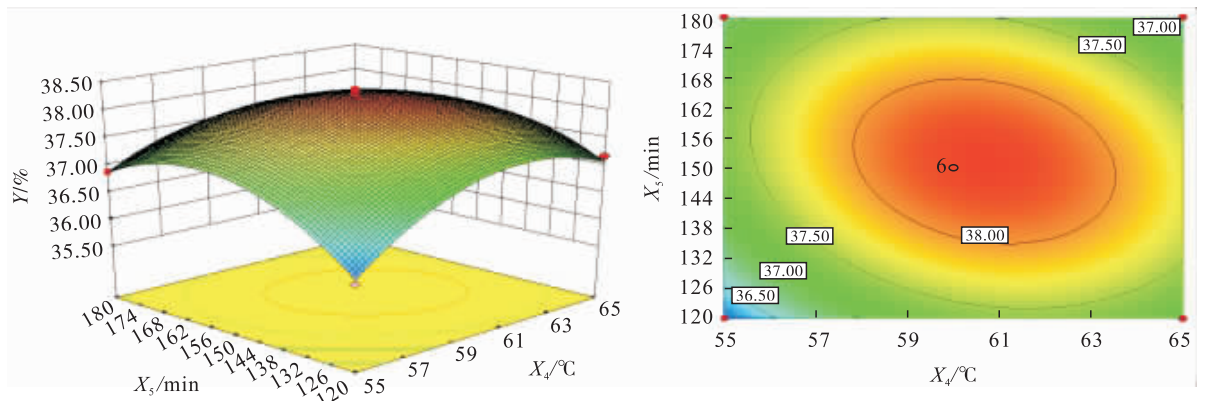
g) 蛋白酶质量分数与酶解时间的交互作用



h) 酶解pH值与酶解温度的交互作用



i) 酶解pH值与酶解时间的交互作用



j) 酶解温度与酶解时间的交互作用

图7 各因素交互作用的响应曲面图和等高线图

Fig. 7 Response surface plots and contour plots for the interaction of various factors

pH 值为 8.29, 酶解温度为 62.95 °C, 酶解时间为 167.69 min 时, 理论上带鱼蛋白水解度最高, 为 36.49%. 为了便于试验操作, 将最优酶解工艺条件修正为底物质量分数为 5.3%, 蛋白酶质量分数为 2.7%, 酶解 pH 值为 8.3, 酶解温度为 63 °C, 酶解时间为 168 min. 在该酶解条件下, 进行了 3 次平行验证试验, 得到带鱼蛋白

水解度为 37.07%. 验证试验的结果与响应面优化试验回归模型预测值之间的差异不显著 ($P > 0.05$), 说明该模型适用于带鱼蛋白酶解工艺的分析 and 预测.

3 结论

本文以带鱼为原材料, 从 6 种蛋白酶中筛

选出碱性蛋白酶作为带鱼蛋白酶解的最佳蛋白酶,进而利用单因素试验和响应面试验优化了带鱼蛋白酶解的工艺条件.结果表明:带鱼蛋白酶解的最佳工艺条件为底物质量分数 5.3%,蛋白酶质量分数 2.7%,酶解 pH 值 8.3,酶解温度 63 ℃,酶解时间 168 min.在此条件下,带鱼蛋白水解度达到 37.07%,与响应面优化试验回归模型预测值基本一致.该研究有望减少带鱼蛋白资源的浪费,为使用碱性蛋白酶酶解带鱼蛋白获取带鱼蛋白肽提供了参考,为开发带鱼蛋白肽粉等海洋功能性蛋白产品提供了借鉴.

参考文献:

- [1] 刘云国,李八方,汪东风,等.海洋生物活性肽研究进展[J].中国海洋药物,2005,24(3):52.
- [2] HARNEDY P A, FITZGERALD R J. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review[J]. Journal of Functional Foods, 2012, 4(1):6.
- [3] 崔欣,效梅,安立龙,等.海洋生物活性肽的生理功能及其应用研究进展[J].广东农业科学,2013,40(9):103.
- [5] GILDBERG A, ARNESEN J A, CARLEHOG M M. Utilisation of cod backbone by biochemical fractionation[J]. Process Biochemistry, 2002, 38:475.
- [4] 管华诗,韩玉谦,冯晓梅.海洋活性多肽的研究进展[J].中国海洋大学学报,2004,34(5):761.
- [6] 邱秀宝,袁影,戴宏,等.嗜碱性芽孢杆菌碱蛋白酶的研究Ⅱ:诱变株选育及产酶条件[J].微生物学报,1990,30(2):129.
- [7] GBOGOURI G A, LINDER M, FANNI J, et al. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 2004, 69(8):615.
- [8] 张群飞,徐大伦,杨文鸽.响应面法优化碱性蛋白酶酶解虾籽的工艺条件[J].核农学报,2014,28(5):876.
- [9] OVISSIPOUR M, ABEDIAN K A, MOTAMED-ZADEGAN A, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) [J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(2):696.
- [10] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986:116.
- [11] 林慧敏.带鱼下脚料酶解小肽亚铁螯合物结构鉴定及其生物活性研究[D].福州:福建农林大学,2012.
- [12] 毋瑾超,汪依凡,方长富.鲢鱼降血压肽的酶解条件[J].湛江海洋大学学报(自然科学),2006(1):67.
- [13] 王雪芹,邢荣娥,刘松,等.鲑鱼蛋白酶解工艺优化及其抗氧化活性测定[J].现代食品科技,2013,29(5):1023.
- [14] 朱少娟,施用晖,乐国伟.超声波对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响[J].食品与生物技术学报,2005,24(2):116.
- [15] 李学鹏,刘晏玮,高郡焕.美拉德反应改良四角蛤蜊酶解液的风味[J].食品科学,2018,39(16):82.
- [16] 魏鉴腾,刘永峰.酶解法制备鱼籽多肽的工艺研究[J].食品工业,2015,36(1):71.
- [17] KRAJEWSKA B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(2):126.
- [18] WETTASINGHE M, VASANTHAN T, TEMELLI F, et al. Volatiles from roasted by products of the poultry processing industry[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48(8):3485.



引用格式:李春光,王霏显,郜海民,等. 一种新的烟草感官品质对比评价方法[J]. 轻工学报, 2020,35(4):34-39.

中图分类号:TS432 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.005

文章编号:2096-1553(2020)04-0034-06

一种新的烟草感官品质对比评价方法

A new comparative evaluation method of tobacco sensory quality

李春光¹,王霏显¹,郜海民²,丁美宙¹,熊安言¹,王二彬¹,
文秋成¹,鲍文华²

LI Chunguang¹, WANG Peixian¹, GAO Haimin², DING Meizhou¹, XIONG Anyan¹,
WANG Erbin¹, WEN Qiucheng¹, BAO Wenhua²

- 1. 河南中烟工业有限责任公司 技术中心,河南 郑州 450000;
- 2. 河南中烟工业有限责任公司 黄金叶生产制造中心,河南 郑州 450000
- 1. *Technology Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China;*
- 2. *Gold Leaf Manufacturing Center, China Tobacco He'nan Industrial Co., Ltd., Zhengzhou 450000, China*

关键词:

卷烟制品;感官品质;
对比评价;评价指标;
评价方法

Key words:

cigarette product;
sensory quality;
comparative evaluation;
evaluating indicator;
evaluation method

摘要:针对现有卷烟感官品质评价方式的评价结果差异不明显和变化趋势不明确的问题,建立了一种新的烟草感官品质对比评价方法:采用专家咨询法并结合实际评吸经验,根据消费者的关注程度对优雅度、满足感、舒适感和轻松感各感官品质评价指标赋予权重,利用数理统计方法对各评吸人员的评价结果进行计算,得出卷烟各感官品质评价指标小项和总体得分,并根据各项得分判定实验样品间感官品质差异程度和变化方向. 可行性验证结果表明:该方法即使在感官品质变化较小时,也能够较好地分分值上进行区分;其既能反映整体感官品质的差异程度,又能反映总体或单个感官品质评价指标的变化趋势,且感官品质差异性的区分度也较明显,可应用于卷烟产品的研发和品质控制.

收稿日期:2019-11-29

基金项目:河南中烟工业有限责任公司研究项目(ZW201802)

作者简介:李春光(1976—),男,河南省郑州市人,河南中烟工业有限责任公司高级工程师,主要研究方向为烟草工程.

通信作者:熊安言(1969—),男,河南省郑州市人,河南中烟工业有限责任公司高级工程师,主要研究方向为烟草工程;王

二彬(1969—),男,河南省郑州市人,河南中烟工业有限责任公司工程师,主要研究方向为卷烟配方与调香.

Abstract: Aiming at the problems that the evaluation results of the existing cigarette sensory quality evaluation methods were not obvious and the change trend was not clear, a new comparative evaluation method of tobacco sensory quality was established. The specific process was as follows: using the expert consultation method and combining with the actual evaluation experience, according to the degree of consumer concern, each sensory quality evaluating indicator of elegance, satisfaction, comfort and ease was given weight. The evaluation results of each smoking evaluation person were calculated by mathematical statistics method, and the sub items and overall scores of each sensory quality evaluating indicator were obtained. According to the scores, the difference degree and change direction of sensory quality were determined. The feasibility verification results showed that the method could distinguish the sensory quality from the score when the change of sensory quality was small. It could not only reflect the difference degree of the overall sensory quality, but also reflect the change trend of the overall and individual sensory quality evaluation indicators, and the differentiation of sensory quality differences was obvious. This method could be applied to the development and quality control of cigarette products.

0 引言

在卷烟产品设计、维护、工序评价、异线加工等过程中,常采用三点检验和对比评吸的方法来评价产品感官品质的一致性 or 变化趋势。《烟草及烟草制品 感官评价方法》(YC/T 138—1998)^[1]规定,三点检验、A-非A检验和成对比较检验是当前产品维护、工序评价、异线加工阶段产品感官评价的常规手段和主要方法,在产品感官品质一致性评价方面发挥了重要作用。《烟草在制品 感官评价方法》(YC/T 415—2011)^[2]规定了卷烟9分制评分法,在附录B中特别明确了一种对比评吸方法,用来评价产品加工过程中感官品质的变化趋势,是工序评价、异线加工过程中感官品质评价的重要方法。有学者以星形图^[3]、雷达图^[4]和脸谱法^[5]来表征和比较卷烟感官品质,直观地对比感官品质的差异,但存在结果量化困难的问题。浙江中烟工业有限责任公司^[6]建立了一种优化卷烟感官评价的分析方法,该方法对卷烟样品在香气品质、烟气特性、吃味、风格等方面的评价指标进行打分,并对其评价指标赋予权重;经过统计分析,计算产品整体感官品质和各指标均值,并与标准分进行对比以反映其变化趋势,

给出明确的产品中心值、目标值和下限值,能够较全面地比较卷烟产品与标准样品间感官品质的差异性。《基于消费体验的中式卷烟感官评价方法》(YC/T 564—2018)^[7]规定了基于消费者体验的卷烟轻松感、舒适感和满足感各指标的分数赋值和评价方法,该方法从消费者的角度对卷烟的感官品质进行评价,更接近消费者的真实感受。申玉军等^[8]研究了基于卷烟感官品质偏离评价指标D的评价方法,该方法能够判定各感官品质指标和总体感官品质的偏离程度,适用于测试样品与对照样品间感官特性偏离程度的评价,可应用于卷烟制品和卷烟成品的品质控制。

以上评价方法虽然能对卷烟产品感官品质进行对比检验,但多数评价结果在整体上差异不明显,并且变化趋势也不明确。鉴于此,本文拟建立一种新的烟草感官品质对比评价方法,从卷烟感官品质的优雅度、满足感、舒适感、轻松感等方面进行评价,利用数理统计方法对各评吸人员的评价结果进行计算,得出卷烟各感官品质评价指标小项和总体得分,并根据各项得分判定实验样品间感官特性差异程度和变化方向,以期达到增强卷烟感官品质评价的真实性、便于感官品质直观真实评价的目的。

1 评价方法的建立

1.1 评价指标的确定与分数赋值

针对河南中烟黄金叶品牌风格,结合长期工作经验,主要设定四类评价指标,分别是优雅度、满足感、舒适感和轻松感。其中,优雅度包括香气质、杂气、协调性、细腻程度;满足感包括香气量、浓度、成团性、劲头;舒适感包括刺激性、干燥感、甜度、干净程度;轻松感包括流畅感、透发性。

借鉴文献[9]中关于香气风格的评价方法,将以上除劲头外的13项感官指标小项描述分为基本一致、明显改善、明显变差、显著改善、显著变差,相应分数赋值分别为0, +1, -1, +2, -2;劲头描述分为基本一致、明显增大、明显减小、显著增大、显著减小,相应分数赋值分别为0, +1, -1, +2, -2。

1.2 各感官品质评价指标小项的权重赋值

在烟草及其制品感官品质评价过程中,各感官品质评价指标小项分别反映烟草及其制品感官特性的不同方面。借鉴层次分析法^[10]、德尔菲法^[11]、专家咨询法等,可确定各感官品质评价指标小项的权重。本研究采用专家咨询法并结合实际评吸经验,根据消费者的关注程度对各感官品质评价指标小项进行权重赋值,结果见表1。由于劲头大小没有好坏之分,不进行权重赋值,仅作为评价参考项。

1.3 样品的制备及其含水率的平衡

卷烟样品的制备:按照《烟草在制品 感官评价方法》(YC/T 415—2011)^[2]、《卷烟 第4部分:感官技术要求》(GB 5606.4—2005)^[12]和

《卷烟工艺测试与分析大纲》^[9]的要求制备样品。

卷烟样品含水率的平衡:样品的含水率按照《烟草及烟草制品 调节和测试的大气环境》(GB/T 16447—2004)^[13]规定的方法进行平衡。

1.4 评价方法的设计

评吸人员为9名优级评吸员。

评吸环境:符合《烟草及烟草制品 建立感官分析实验室的一般导则》(YC/T 565—2018)^[14]的要求。

对照样品的选择:根据不同的评价目的,选取能作为标杆的样品为对照样品,如进行产品开发或维护时,选竞品或正常样品为对照样品;工艺参数优化时,以优化前的样品为对照样品;进行设备参数梯度实验时,可以选取最大(或最小)设定值条件下的样品为对照样品等。

评价方法:采用测试样品与对照样品对比评吸的方式进行评价,对照样品的各感官品质评价指标小项分数均设为0,将测试样品各感官品质评价指标小项分别与对照样品进行比较,按照1.1的赋值方法进行打分。为了保证评吸结果的准确性,优选待测样品1或2个,不得超过3个。

1.5 评价结果的确定

按式①计算各感官品质评价指标小项的单项得分。

$$x_i = \frac{\sum_{y=1}^n y_i}{n} \times 10 \tag{①}$$

其中, x_i 为第*i*个评价指标小项的总体评价结

表1 各感官品质评价指标小项的权重赋值

Table 1 Weight assignment for the sub items of each sensory quality evaluating indicator

项目	优雅度				满足感				舒适感				轻松感	
	香气质	杂气	协调性	细腻程度	香气量	浓度	成团性	劲头	刺激性	干燥感	甜度	干净程度	流畅感	透发性
权重	0.80	0.75	0.70	0.80	0.75	0.70	0.70	—	0.85	0.85	0.75	0.85	0.80	0.70
总权重	3.05				2.15				3.30				1.50	

果; y_i 为第 y 个评吸人员对第 i 个评价指标小项的评价结果。

假设评吸人员对差异判断的准确率为80%,根据假设检验的理论^[15],可根据 $|x_i|$ 的区间范围判断测试样品与对照样品的差异情况。按照置信度95%进行单侧假设检验,确定测试样品与对照样品对比时某一小项感官品质基本一致、差异明显、差异显著的得分区间分别为: $0 \leq |x_i| < 2.3, 2.3 \leq |x_i| < 6.7, 6.7 \leq |x_i|$ 。除劲头外,当 x_i 为正值时,样品感官品质越来越好,当 x_i 为负值时,样品感官品质越来越差。

某待测样品与对照样品感官品质对比评价的总体得分为

$$c = \sum_{i=1}^{13} x_i q_i \quad (2)$$

其中, q_i 为第 i 个评价指标小项的权重。

根据单项打分规则,结合各小项的权重值,经过统计分析,当 $0 \leq |c| < 10$ 时,认为该测试样品与对照样品的感官品质基本一致;当 $10 \leq |c| < 17.2$ 时,认为该测试样品与对照样品的感官品质有明显差异;当 $17.2 \leq |c|$ 时,认为该

测试样品与对照样品的感官品质差异显著。当 c 为正值时,样品的感官品质越来越好;当 c 为负值时,样品的感官品质越来越差;劲头得分作为香气风格是否发生变化的参考,结合总体评价得分判断香气风格是否发生明显或显著变化。

2 评价方法的可行性验证

2.1 实验样品制备

实验所用卷烟为黄金叶二类卷烟。实验设置4个干燥强度梯度,由弱到强将样品依次编号为 G_0, G_1, G_2, G_3 ,其中 G_0 为对照样品。干燥强度以不同的叶丝滚筒干燥实验参数设置来体现(如表2所示)。

2.2 本文方法的评价结果

在实际的应用中一般邀请9名或以上评吸专家进行评价,本次评价邀请技术中心15位评吸专家按照表1的赋值规则对待测样品进行对比打分,然后对每个样品的各指标小项和总体得分进行统计。

不同干燥强度卷烟感官品质对比评价结果见表3。由表3可知,与 G_0 对照样品相比, G_1 样

表2 不同叶丝滚筒干燥实验参数设计表

Table 2 Design table of drying test parameters for different impeller drum

样品 编号	隧道式叶丝回潮		叶丝干燥			
	入口物料 含水率/%	工作蒸汽 压力/MPa	筒壁温度/°C	热风温度/°C	排潮风门 开度/%	出口物料 含水率/%
G_0	17.99	0.4	120.95	105.00	64.55	12.87
G_1	17.99	0.6	125.10	105.00	64.55	12.93
G_2	18.06	0.6	124.08	110.01	69.96	12.73
G_3	18.49	0.6	127.64	110.00	64.56	12.65

表3 不同干燥强度卷烟感官品质对比评价结果

Table 3 Sensory quality evaluation of cigarettes with different drying strength

样品 编号	优雅度				满足感				舒适感				轻松感		总体 得分
	香气质	杂气	协调性	细腻程度	香气量	浓度	成团性	劲头	刺激性	干燥感	甜度	干净程度	流畅感	透发性	
G_0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G_1	+1.3	+3.3	0	+2	+1.3	+1.3	+1.3	+0.7	+2.0	+0.7	+2.7	+0.7	+0.7	+1.3	14.30
G_2	+1.3	-2.7	0	+4	-1.3	0	-0.7	-1.3	-3.3	-1.3	+3.3	+1.3	+0.7	+0.7	1.47
G_3	+2.0	-2.0	0	+4	-2.0	-1.3	-0.7	-0.7	-1.3	0	+2.7	+0.7	+1.3	+1.3	3.87

品的杂气和甜度明显改善,其他指标差异不明显; G_2 样品细腻程度和甜度明显改善,但刺激性和杂气明显增大; G_3 样品细腻程度和甜度明显增加,其他指标差异不明显. 总体上, G_1 样品感官品质明显变好,结合劲头得分,其风格未发生变化,可以认为在保持原有风格基础上,品质有所提升; G_2 和 G_3 样品感官品质未明显改善. 由评价结果可知,随着干燥强度的增大,卷烟的感官品质先变好后变差,主要体现在优雅度和舒适感.

2.3 可行性验证

为进一步验证本文感官品质对比评价方法的可行性,评吸人员分别采用国标和文献[8]中的感官品质评价方法对实验样品进行评价.

将实验样品按照《卷烟 第4部分:感官技术要求》(GB 5606.4—2005)^[12]进行打分,不同干燥强度卷烟感官品质国标计分统计结果见表4. 由表4可知,与对照样品相比, G_1 样品的感官品质得分提高1.8分,感官品质变好,主要体现在杂气和余味变好; G_2 和 G_3 样品的感官

表4 不同干燥强度卷烟
感官品质国标计分统计结果

Table 4 Statistical results of national standard score for sensory quality of cigarettes with different drying strength 分

样品编号	光泽	香气	协调	杂气	刺激性	余味	合计
G_0	5.0	29.0	5.5	10.5	18.5	22.5	91.0
G_1	5.0	29.2	5.5	11.2	18.9	23.0	92.8
G_2	5.0	29.0	5.5	10.1	18.0	23.3	90.9
G_3	5.0	28.9	5.5	10.2	18.5	23.1	91.2

品质得分差异不大,与本文感官品质对比评价方法的样品评价结果基本一致. 但是,国标感官评价方法是对感官品质主要指标进行打分,评价结果仅能体现感官品质的整体和单项指标发生较大变化时的趋势,其区分度较低,当感官品质发生的变化较小时,不易从分值上进行区分,用作对比评价时有一定的局限性. 而本文评价方法在感官品质发生的变化较小时,也能够较好地

从分值上进行区分. 将实验样品按照文献[8]基于卷烟感官品质偏离评价指标 D 的感官品质评价方法进行统计打分,不同干燥强度卷烟样品感官评价 D 值结果见表5. 由表5中的总体 D 值可知,与对照样品相比,3个样品之间的感官品质差异不大, G_2 样品感官品质变化最明显, G_1 样品感官品质变化最小. 主要表现在,与对照样品相比, G_1 样品的杂气、细腻程度、刺激性和回甜有明显差异,其他指标差异不明显; G_2 样品的杂气、细腻程度、刺激性和甜度有明显差异; G_3 样品的香气质、香气量、杂气、细腻程度、刺激性和回甜有明显差异. 由 D 值可知,随着干燥强度的增大,卷烟样品感官品质与对照样品相比偏离程度有增大的趋势,但无法判断是变好还是变差;另外,各评价指标小项只显示有差异性,无一定的规律可循. 与文献[8]的评价方法相比,本文方法不仅能判断卷烟感官品质的差异性,还能判断其变化方向,并且感官品质差异性的区分度较明显;能客观地反映单个感官品质指标的差异程度和变化趋势.

表5 不同干燥强度卷烟样品感官评价 D 值

Table 5 D value of sensory evaluation of cigarette samples with different drying strength

样品编号	香气特性					烟气特性				口感特性				总体 D 值
	香气风格	香气质	香气量	透发性	杂气	劲头	浓度	细腻程度	成团性	刺激性	干燥感	回甜	残留	
G_0	—	8.00	8.00	8.00	8.00	7.00	8.00	8.00	7.00	8.00	8.00	8.00	7.00	0.00
G_1	0.00	0.07	0.07	0.07	0.17	0.03	0.07	0.10	0.07	0.10	0.03	0.13	0.03	0.98
G_2	0.01	0.07	0.07	0.03	0.13	0.07	0.00	0.20	0.03	0.17	0.07	0.17	0.07	1.14
G_3	0.00	0.10	0.10	0.07	0.10	0.03	0.07	0.20	0.03	0.10	0.00	0.13	0.03	1.01

3 结论

本文建立了一种烟草感官品质对比评价方法,以卷烟感官品质的优雅度、满足感、舒适感和轻松感为评价指标,利用数理统计方法对各评吸人员的评价结果进行计算,得出卷烟各感官品质评价指标小项和总体得分,并根据各项得分判定实验样品间感官特性差异程度和变化趋势.将该方法与国标评价方法和文献[8]评价方法进行比较,得到如下结论:

1)与国标评价方法相比,本文方法在感官品质发生的变化较小时,也能够较好地从业值上实现区分,进行评价.

2)与文献[8]的评价方法相比,本文方法不仅能客观判断卷烟感官品质的差异性,而且还能准确评价卷烟感官品质的变化趋势.

本文建立的烟草感官品质对比评价方法,更便于直观真实评价卷烟制品的感官品质,有望应用于工艺优化样品和异线加工产品的感官评价分析,以及新产品研发和产品维护等方面.

参考文献:

- [1] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 感官评价方法:YC/T 138—1998[S].北京:中国标准出版社,1998.
- [2] 国家烟草专卖局.烟草在制品 感官评价方法:YC/T 415—2011[S].北京:中国标准出版社,2011.
- [3] 云南中烟工业有限责任公司.一种卷烟感官品质的星形图识别法:201510825476.3[P].2016-04-20.
- [4] 乔学义,王兵,马宇平,等.烤烟烟叶质量风格特色感官评价方法的建立与应用[J].烟草科技,2014(9):5.
- [5] 武怡,杨乾栩,王猛,等.脸谱法在卷烟风格特征中的应用[J].烟草科技,2019,52(11):96.
- [6] 浙江中烟工业有限责任公司.一种优化卷烟感官评价的分析方法:201710514788.1[P].2017-09-08.
- [7] 国家烟草专卖局.基于消费体验的中式卷烟感官评价方法:YC/T 564—2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [8] 申玉军,邓国栋,陈良元,等.一种烟草感官评价分析方法的建立及应用[J].烟草科技,2011(5):15.
- [9] 秦前浩.卷烟工艺测试与分析大纲[M].成都:四川大学出版社,2004.
- [10] 侯定丕.层次分析[M].合肥:安徽科学技术出版社,1990.
- [11] 赵松山,白雪梅.用德尔菲法确定权数的改进方法[J].统计研究,1994(4):46.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.卷烟 第4部分:感官技术要求:GB 5606.4—2005[S].北京:中国标准出版社,2005.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.烟草及烟草制品 调节和测试的大气环境:GB/T 16447—2004[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [14] 国家烟草专卖局.烟草及烟草制品 建立感官分析实验室的一般导则:YC/T 565—2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [15] 李忠范,高文森,杨荣,等.应用数理统计[M].北京:高等教育出版社,2009.



引用格式: 崔春, 楚文娟, 田海英, 等. 打孔方式对细支卷烟滤嘴通风率及感官品质的影响 [J]. 轻工学报, 2020, 35(4): 40 - 45.

中图分类号: TS452.1 文献标识码: A

DOI: 10.12187/2020.04.006

文章编号: 2096 - 1553(2020)04 - 0040 - 06

打孔方式对细支卷烟滤嘴通风率及感官品质的影响

Effects of perforation on filter ventilation rate and sensory quality of slim cigarette

崔春, 楚文娟, 田海英, 高明奇, 付瑜锋, 李禄成, 鲁平

CUI Chun, CHU Wenjuan, TIAN Haiying, GAO Mingqi, FU Yufeng, LI Lucheng, LU Ping

河南中烟工业有限责任公司 技术中心, 河南 郑州 450000

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

关键词:

打孔方式; 细支卷烟;
滤嘴通风率; 稳定性;
感官品质

Key words:

perforation;
slim cigarette;
filter ventilation rate;
stability;
sensory quantity

摘要:为选择合适的打孔方式以提升细支卷烟的质量水平, 考察了在线激光打孔、激光预打孔、静电打孔、等离子体打孔对细支卷烟滤嘴通风率、通风率稳定性和感官品质的影响. 结果表明: 4种打孔方式均可满足滤嘴通风率的设计需要; 对于同一接装纸透气度, 采用等离子体打孔和静电打孔的细支卷烟的滤嘴通风率较高; 采用等离子体打孔和在线激光打孔的细支卷烟的滤嘴通风率稳定性相对较好; 等离子体打孔和在线激光打孔更有利于改善细支卷烟的感官品质, 当滤嘴通风率较低时, 两种打孔方式的细支卷烟感官品质相当, 而当滤嘴通风率较高时, 采用在线激光打孔的细支卷烟的感官品质优于等离子体打孔. 综上所述, 等离子体打孔和在线激光打孔整体优于静电打孔和激光预打孔, 是细支卷烟生产中的优选打孔方式.

收稿日期: 2020 - 03 - 23

基金项目: 中国烟草总公司重大专项项目(110201601013(XZ-04)); 河南中烟工业有限责任公司重点科技项目(ZW2016004)

作者简介: 崔春(1986—), 女, 河南省驻马店市人, 河南中烟工业有限责任公司工程师, 主要研究方向为卷烟材料.

通信作者: 鲁平(1971—), 女, 河南省南阳市人, 河南中烟工业有限责任公司高级工程师, 主要研究方向为卷烟材料.

Abstract: In order to choose an appropriate perforation for improving the quality of slim cigarettes, effects of online laser, off-line laser, plasma and static electricity perforations on filter ventilation efficiency, filter ventilation rate stability and sensory quantity for slim cigarettes were investigated. The results showed that all of the four perforations could meet the design needs of filter ventilation rate. Higher filter ventilation rate could be achieved of slim cigarettes perforated by plasma and static electricity when air permeability of tipping paper was fixed. Filter ventilation rate stability of slim cigarettes perforated by plasma and online laser was better comparatively. It was more beneficial for improvement of sensory quantity of slim cigarettes perforated by plasma and online laser. Sensory quantity of slim cigarettes perforated by these two ways was corresponded when the filter ventilation rate was lower, and that perforated by online laser was superior to perforated by plasma when the filter ventilation rate was higher. In conclusion, plasma and on-line laser perforations were better than static electricity and off-line laser perforations as a whole, and were the preferred punching methods in the production of slim cigarette.

0 引言

滤嘴通风技术作为一种重要的减害降焦手段^[1-3],主要是通过特定的打孔技术在接装纸上打孔,形成一排或几排连续的孔,抽吸时空气从小孔进入滤棒,从而达到稀释主流烟气、降低焦油和CO的目的^[3-5]。常用的打孔技术有激光打孔、静电打孔、等离子体打孔等,其中激光打孔又分在线激光打孔和激光预打孔两种。

目前,关于不同打孔参数和打孔方式对卷烟滤嘴通风率,以及主流烟气释放量、有害成分释放量、过滤效率等的影响的研究已经比较详尽^[6]。魏玉玲等^[7]研究发现,接装纸打孔位置距唇端距离是打孔参数中影响滤嘴通风率的高度显著因素。高明奇等^[8]前期考察了在线激光打孔参数对细支卷烟通风率、通风率稳定性和主流烟气成分释放量的影响,发现,与常规卷烟相比,打孔位置对卷烟理化指标影响较小;通风率均值随打孔数量和激光脉冲持续时间的增加而增大。在不同打孔方式的对比研究中,冯文等^[9]提出接装纸激光打孔和静电打孔方式所得卷烟的物理检测和常规烟气成分检测结果基本一致,且应用通风稀释技术时还应考虑烟气组成和香气质的变化影响。刘建福等^[10]考察了接装纸静电打孔、激光打孔和自然透气3种方式对

卷烟主流烟气中焦油、7种有害成分和危害性指数的影响,发现相对于静电打孔和激光打孔,自然透气接装纸具有较好的降焦减害性能。解晓翠^[11]对比分析了等离子体打孔和激光打孔卷烟的物理指标、烟气指标、感官品质和上机卷制情况,并实现了等离子体打孔接装纸在中南海(5 mg)卷烟上的正式应用。严志景等^[12]系统评价了激光预打孔和在线激光打孔卷烟的理化指标、烟气指标、感官质量,发现两种方式制备的卷烟各项指标无显著性差异,而在线激光打孔生产的烟支通风率符合性和稳定性更好,能缩短新产品的研发周期,降低接装纸和滤棒采购成本。

但目前关于打孔方式对卷烟品质的影响的研究多集中于常规卷烟,对细支卷烟品质的影响报道较少。鉴于此,本文拟对在线激光打孔、激光预打孔、静电打孔和等离子体打孔这4种打孔方式对细支卷烟滤嘴通风率稳定性和感官品质的影响进行对比研究,确定卷烟生产中适宜的打孔方式,为细支卷烟产品的设计开发和质量稳定性控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

主要材料:细支卷烟烟丝、细支醋纤滤棒(圆周长为16.9 mm),河南中烟工业有限责任公

司自制;未打孔接装纸(宽度为74 mm),河南省新郑金芒果实业总公司产;细支卷烟用卷烟纸(宽度为19.0 mm),牡丹江恒丰纸业股份有限公司产。

主要仪器:PROTOS70型卷接机组,常德烟草机械有限责任公司产;ML204型电子分析天平,瑞士Mettler Toledo公司产;JK350PD/PS-70型在线激光打孔装置,南京瑞驰电子技术工程实业有限公司产;SODIMAX型多功能综合测试台,法国Sodim Instrumentation公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备 取河南中烟工业有限责任公司某在产规格细支卷烟若干,分别采用在线激光打孔、激光预打孔、静电打孔和等离子体打孔4种方式,制备滤嘴通风率分别为10%、20%、30%、40%的细支卷烟样品,其中,在线激光打孔的4种滤嘴通风率梯度通过调整打孔排数、打孔时间和打孔数量等参数实现,其他3种打孔方式通过制备不同透气度的接装纸实现,细支卷烟样品参数的具体设计值见表1。按照 $(m_{\text{平均}} \pm 0.02) \text{g}$ 、 $(FVR_{\text{设计}} \pm 2)\%$ 对细支卷烟样

品进行分选后作为待测样, $m_{\text{平均}}$ 为30支卷烟的平均质量, $FVR_{\text{设计}}$ 为滤嘴通风率设计值。受卷烟加工水平的影响,个别细支卷烟滤嘴通风率的实测平均值整体偏高或偏低,对于超出上述挑选范围的细支卷烟,按照 $(m_{\text{平均}} \pm 0.02) \text{g}$ 、 $(FVR_{\text{设计}} \pm 5)\%$ 的标准挑选细支卷烟样品。

1.2.2 接装纸透气度和卷烟样品滤嘴通风率的测定方法 按照《卷烟纸、成形纸、接装纸及具有定向透气带的材料 透气度的测定》(GB/T 23227—2008)^[13]的方法测定接装纸的透气度;按照《卷烟和滤棒物理性能的测定 第15部分:卷烟 通风的测定 定义和测量原理》(GB/T 22838.15—2009)^[14]的方法测定细支卷烟样品的滤嘴通风率。

1.2.3 细支卷烟感官品质评价方法 由河南中烟评吸委员会成员依据《烟草在制品 感官评价方法》(YC/T 415—2011)^[15]的方法对待测细支卷烟样品的感官品质进行评价。

2 结果与分析

2.1 打孔方式对细支卷烟滤嘴通风率的影响

按照表1方案共制备了16种细支卷烟样品,其使用的接装纸透气度实测值(10个检测点的平均值)、滤嘴通风率实测值(每种细支卷烟共30支的实测平均值)见表2。由表2可知,4种打孔方式制得的细支卷烟样品的滤嘴通风率均可满足设计需求。

由表2还可知打孔方式对细支卷烟滤嘴通风率的影响,当接装纸透气度基本相同时,整体上等离子体打孔和静电打孔所得的细支卷烟滤嘴通风率较大,激光预打孔的细支卷烟滤嘴通风率较小。这可能是因为相同的接装纸透气度条件下,等离子体打孔和静电打孔得到的孔数相对较多,通风面积更大,具有更好的扩散性能。因此,当透气度相同时,等离子体打孔和静电打孔这两种打孔方式的通风效率更高。

表1 细支卷烟样品参数设计值

Table 1 Design value of parameters for slim cigarettes

打孔方式	接装纸透气度设计值/CU	滤嘴通风率设计值/%
在线激光打孔	—	10
		20
		30
		40
激光预打孔	100	10
	300	20
	400	30
	800	40
静电打孔	100	10
	300	20
	400	30
	800	40
等离子体打孔	100	10
	300	20
	400	30
	800	40

表2 细支卷烟样品的接装纸透气度、
滤嘴通风率实测值

Table 2 Measured values of filter ventilation rate and
air permeability of tipping paper of slim cigarettes

打孔方式	接装纸透气度 实测值/CU	滤嘴通风率实测 值/%
在线激光打孔	—	8.9
		20.5
		30.1
		41.6
激光预打孔	101	8.1
	308	18.7
	402	25.2
	785	38.4
静电打孔	113	10.4
	315	22.1
	390	27.7
	779	38.3
等离子体打孔	97	11.5
	308	20.5
	402	28.7
	780	40.5

2.2 打孔方式对细支卷烟滤嘴通风率稳定性的影响

为进一步研究打孔方式对滤嘴通风率稳定性的影响,分别对激光预打孔、静电打孔、等离子体打孔3种打孔方式制得的细支卷烟样品的滤嘴通风面积、打孔数、孔面积进行了测定,并对4种打孔方式的滤嘴通风率变异系数进行计算,结果见表3。

滤嘴通风率变异系数的计算公式为

$$\text{滤嘴通风率变异系数} = \frac{S}{U} \times 100\%$$

其中, S 为30支细支卷烟滤嘴通风率的标准差; U 为30支细支卷烟滤嘴通风率的平均值。

由表3可知,随着滤嘴通风率的增加,4种打孔方式制得的细支卷烟的滤嘴通风率变异系数均呈降低趋势。在设计值为20%~40%的滤嘴通风率范围内,激光预打孔和静电打孔的细支卷烟滤嘴通风率变异系数较大,在线激光打孔和等离子体打孔的细支卷烟滤嘴通风率变异系数较小。因此,相对于静电打孔和激光预打孔,

表3 不同打孔方式细支卷烟样品的相关数据

Table 3 Related data of different
perforation of slim cigarettes

打孔方式	滤嘴通 风率实 测值/%	通风 面积/mm ²	孔数/ 个	孔面积 平均值/ mm ²	滤嘴通 风率变 异系数/%
在线激 光打孔	8.9	—	—	—	11.69
	20.5				9.62
	30.1				7.68
	41.6				4.37
激光预 打孔	8.1	0.026 4	6	0.004 4	19.39
	18.7	0.061 2	12	0.005 1	15.68
	25.2	0.097 2	18	0.005 4	13.34
	38.4	0.192 0	32	0.006 0	9.39
静电 打孔	10.4	0.052 5	15	0.003 5	26.55
	22.1	0.128 0	32	0.004 0	14.46
	27.7	0.193 2	46	0.004 2	11.14
	38.3	0.276 0	60	0.004 6	5.86
等离子 体打孔	11.5	0.035 7	21	0.001 7	9.82
	20.5	0.073 6	23	0.003 2	7.71
	28.7	0.135 2	26	0.005 2	6.48
	40.5	0.282 8	28	0.010 1	5.57

在线激光打孔和等离子体打孔均能获得较稳定的滤嘴通风率。

从打孔原理上来看,静电打孔是利用正负电极间放电形成的电晕击穿接装纸,从而实现“区域打孔”^[4]。但该方式存在孔径大小和打孔位置较难控制的问题,从而造成打孔后的接装纸透气度稳定性较差,因此制得的细支卷烟滤嘴通风率变异系数较大。等离子体打孔是在惰性气体保护下,高压放电产生等离子体蒸发物料而产生微孔(无燃烧过程、无热解副作用),具有孔密度高、透气度稳定的特点,因此制得的细支卷烟滤嘴通风率变异系数较小。激光打孔主要利用透镜将激光聚焦到接装纸上加热,使打孔部位瞬间达到汽化温度形成小孔^[4]。通过改变激光脉冲频率和强度可实现对打孔位置和透气度的控制,使接装纸透气度稳定,变异系数减小。但从表3可以看出,相对于静电打孔和等离子体打孔方式,激光预打孔的孔面积较大、孔数较少,气流扩散不均匀。这是由于在接装纸上

进行打孔,在烟支卷制时,细支卷烟搭口处易产生堵孔现象;此外,接装纸上施胶量较大时,孔带位置有渗胶、漏胶问题,使得采用激光预打孔方式生产的烟支滤嘴通风率的变异系数相对较高.而在线激光打孔方式不是在接装纸上打孔,是在卷成的烟支上打孔,不存在堵孔现象,因此,采用在线激光打孔方式生产的烟支滤嘴通风率变异系数较小、稳定性更高^[15].

2.3 打孔方式对细支卷烟感官品质的影响

对不同打孔方式制得的细支卷烟样品进行感官品质评价,结果见表4.由表4可知,在设计值为20%~40%的滤嘴通风率范围内,在滤嘴通风率基本相同的条件下,采用在线激光打孔和等离子体打孔制得的细支卷烟样品的感官评价总分均高于激光预打孔和静电打孔制得的细支卷烟样品.当滤嘴通风率接近40%时,采用静电打孔制得的细支卷烟样品的感官评价总分降幅较大.这可能是因为当滤嘴通风率较高时,打孔数量多,接装纸经高压静电灼烧后会产生焦糊味,从而对细支卷烟的吸味产生影响.激光预打孔细支卷烟的感官评价总分也有一定程度的降低,这主要是由于此时打孔面积和打孔数量均有较大增幅,气流扩散均匀性下降,增加

了烟气的粗糙感.就等离子体打孔和在线激光打孔两种方式而言,当滤嘴通风率较低时,两种打孔方式的细支卷烟样品的感官品质相当;当滤嘴通风率较高时,采用在线激光打孔方式制得的细支卷烟样品的感官品质优于等离子体打孔.

3 结论

本文研究了在线激光打孔、激光预打孔、静电打孔和等离子体打孔4种方式对细支卷烟滤嘴通风率、通风率稳定性和感官品质的影响,结果表明:1)4种打孔方式均可满足细支卷烟滤嘴通风率的设计需要;2)对于同一接装纸透气度,采用等离子体打孔和静电打孔制得的细支卷烟可获得较高的滤嘴通风率;3)采用等离子体打孔和在线激光打孔两种打孔方式制得的细支卷烟滤嘴通风率稳定性较好;4)等离子体打孔和在线激光打孔更有利于改善细支卷烟的感官品质,当滤嘴通风率较低时,两种打孔方式的细支卷烟感官品质相当,而当滤嘴通风率较高时,在线激光打孔方式制得的细支卷烟感官品质优于等离子体打孔.综上,等离子体打孔和在线激光打孔整体优于静电打孔和激光预打孔,是细支卷烟生产中的优选打孔方式.

表4 不同打孔方式制得细支卷烟样品的感官品质评价

Table 4 Sensory evaluation score of slim cigarettes by different perforation

打孔方式	滤嘴通风率 实测值/%	香气特性				烟气特性						口感特性			感官评价得分	
		香气质	香气量	丰满程度	杂气	浓度	劲头	细腻程度	成团性	刺激性	干燥感	清爽程度	甜度	余味		
在线激光打孔	41.6	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	91.00
	30.1	7.00	7.00	7.00	7.00	7.06	7.00	6.96	7.00	6.85	7.00	7.06	6.96	7.00	90.89	
	20.5	7.00	7.00	7.00	6.96	7.00	7.00	6.89	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	90.85	
激光预打孔	38.4	7.00	6.72	6.94	6.89	6.94	7.06	7.33	7.00	6.89	6.83	6.94	6.78	6.56	89.88	
	25.2	7.00	6.89	7.17	6.98	7.17	7.00	7.22	6.89	6.61	6.61	7.17	7.00	7.00	90.71	
	18.7	7.00	6.94	7.00	6.94	6.94	7.06	6.94	7.00	6.83	6.89	6.94	7.09	7.06	90.63	
静电打孔	38.3	7.00	6.72	6.94	6.78	7.00	7.11	7.17	6.94	6.56	6.61	6.89	6.61	6.44	88.77	
	27.7	6.94	6.83	7.11	6.89	7.17	7.00	7.17	6.83	6.78	6.94	7.11	6.89	6.78	90.44	
	22.1	6.98	6.96	7.06	6.95	6.98	7.06	6.98	7.00	6.88	6.85	7.00	7.12	6.85	90.67	
等离子体打孔	40.5	7.06	6.94	7.06	6.94	7.11	7.11	7.00	6.94	6.94	6.78	6.94	6.72	6.78	90.32	
	28.7	7.00	7.00	7.17	6.86	7.22	7.00	7.02	7.00	6.72	6.94	7.11	6.94	6.94	90.92	
	20.5	7.06	7.11	7.06	6.96	7.02	7.04	7.11	7.00	6.86	6.93	7.00	7.06	6.85	91.06	

参考文献:

- [1] 陈欢,姜兴益,王颖,等.两种抽吸模式下卷烟烟气有害成分释放量与滤嘴通风率的关系[J].烟草科技,2015,48(9):45.
- [2] 谢玉龙,朱先约,蔡君兰,等.滤嘴通风对卷烟烟气酸性成分的影响[J].烟草科技,2018,51(3):30.
- [3] 金勇,王诗太,李克,等.接装纸打孔参数对卷烟烟气焦油及7种有害成分释放量影响的PLS回归分析[J].烟草科技,2016,49(4):37.
- [4] 曹伏军,解晓翠,汪旭,等.在线激光打孔参数对卷烟通风率及常规烟气成分释放量的影响[J].烟草科技,2014(11):45.
- [5] 段沅杏,张涛,陈进雄,等.接装纸激光、静电打孔对烟气释放量的影响[J].湖北农业科学,2012,51(23):5403.
- [6] 陈慧斌,胡素霞,叶明樵,等.接装纸打孔对卷烟质量的影响研究[C]//中国烟草学会.中国烟草学会工业专业委员会烟草工艺学术研讨会论文集.青岛:[出版者不详],2010:227-233.
- [7] 魏玉玲,徐金和,廖臻,等.卷烟材料多因素对卷烟通风率及过滤效率的影响[J].烟草科技,2008(11):9.
- [8] 高明奇,顾亮,李明哲,等.在线打孔参数对细支卷烟理化指标的影响[J].食品与机械,2017,33(11):200.
- [9] 冯文,廖臻,徐世涛,等.接装纸激光、静电打孔方式对卷烟烟气影响的对比研究[J].云南大学学报(自然科学版),2010,32(S1):115.
- [10] 刘建福,金勇,李克,等.接装纸对卷烟烟气焦油及7种有害成分的影响[J].烟草科技,2013(8):67.
- [11] 解晓翠.在线激光打孔卷烟通风率与卷烟理化指标的关系[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2015,30(3/4):52.
- [12] 严志景,邵名伟,查勇,等.通风卷烟2种不同打孔方式的比较[J].湖南文理学院学报(自然科学版),2018,30(1):53.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.卷烟纸、成形纸、接装纸及具有定向透气带的材料 透气度的测定:GB/T 23227—2018[S].北京:中国标准出版社,2018.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.卷烟和滤棒物理性能的测定 第15部分:卷烟 通风的测定 定义和测量原理:GB/T 22838.15—2009[S].北京:中国标准出版社,2009.
- [15] 国家烟草专卖局.烟草在制品 感官评价方法:YC/T 415—2011[S].北京:中国标准出版社,2011.



引用格式: 张晓旭, 万宇超, 李园园, 等. 不同提取工艺制备的果干复合香料化学成分与致香效果分析[J]. 轻工学报, 2020, 35(4): 46-53.

中图分类号: TS411 文献标识码: A

DOI: 10.12187/2020.04.007

文章编号: 2096-1553(2020)04-0046-08

不同提取工艺制备的 果干复合香料化学成分与致香效果分析

Analysis of chemical composition and aroma effect of dried fruit compound spices extracted by different process

张晓旭¹, 万宇超¹, 李园园², 郭磊¹, 罗娟敏¹, 徐达¹, 苏加坤¹
ZHANG Xiaoxu¹, WAN Yuchao¹, LI Yuanyuan², GUO Lei¹, LUO Juanmin¹,
XU Da¹, SU Jiakun¹

1. 江西中烟工业有限责任公司 技术中心, 江西 南昌 330096;

2. 江西中烟工业有限责任公司 南昌卷烟厂, 江西 南昌 330096

1. Technology Center, China Tobacco Jiangxi Industrial Co., Ltd., Nanchang 330096, China;

2. Nanchang Cigarette Factory, China Tobacco Jiangxi Industrial Co., Ltd., Nanchang 330096, China

摘要:以大枣为主要原料, 辅以苹果干和枸杞, 分别采用水提、醇提、酶解3种提取工艺制备果干复合香料. 运用GC-MS检测技术对复合香料的化学成分进行对比分析, 并对复合香料进行嗅香评价和卷烟加香效果评价. 结果表明: 水提法制备的复合香料中共检出化学成分54种, 醇提法共检出25种, 酶解法共检出61种; 其中酶解法产生了苯乙醇、己醛、丁香酚等新的香气物质, 醇提法产生了独有的2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-咪喃酮. 3种复合香料的嗅香香韵略有差别: 水提复合香料有枣的清香, 酸香明显; 醇提复合香料清甜感明显; 酶解复合香料枣香最为浓郁, 有焦甜味. 酶解复合香料可丰富烟香, 改善余味, 在卷烟中的加香效果最佳, 醇提复合香料卷烟加香效果次之, 水提复合香料卷烟加香效果最差. 总体上酶解复合香料的致香效果较好, 可作为一种新型复合香料应用于卷烟生产.

关键词:

复合香料; 醇提;
水提; 酶解; 致香效果

Key words:

compound spice;
alcohol extraction;
water extraction;
enzymatic hydrolysis;
aroma effect

收稿日期: 2019-12-24

基金项目: 江西中烟工业有限责任公司科技项目(赣烟工科计2017-03)

作者简介: 张晓旭(1989—), 女, 河南省驻马店市人, 江西中烟工业有限责任公司助理工程师, 硕士, 主要研究方向为香精香料、烟草生物技术.

通信作者: 苏加坤(1981—), 男, 安徽省蚌埠市人, 江西中烟工业有限责任公司工程师, 博士, 主要研究方向为烟草化学.

Abstract: With jujube as the main raw material, dried apple and Chinese wolfberry as the auxiliary materials, the dry fruit compound spices were prepared by water extraction, alcohol extraction and enzymatic hydrolysis. The chemical compositions of the compound spices were compared and analyzed by GC-MS, and the odor evaluation and cigarette flavoring application of the compound spice were evaluated. The results showed that 54 kinds of chemical components were detected in the compound spice prepared by water extraction, 25 kinds were detected by alcohol extraction, 61 kinds were detected by enzymatic hydrolysis, new aromatic substances such as phenylethanol, hexanal and eugenol were produced by enzymatic hydrolysis, and its unique 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone was produced by alcohol extraction. There was a little difference in the aroma of the three kinds of compound spices. The water extract compound spice had the fragrance of jujube and the sour flavor was obvious, the alcohol extract compound spices had the clear and sweet taste, the enzymatic compound spice had the most rich jujube fragrance and the burnt sweet taste. The enzymatic compound spice could enrich the aroma and improve the aftertaste of cigarette. The best flavor adding effect was obtained in cigarette, the second was alcohol extract compound spice, and the worst was water extract compound spice. In general, the aroma effect of enzymatic compound spice was better, and it could be used as a new compound spice in cigarette production.

0 引言

烟用香精香料对烟草制品的致香作用至关重要。天然香原料的丰富性和有效性是卷烟增香提质的基础,也是提升中式低焦油卷烟抽吸品质、形成中式卷烟特征香型/香韵的关键^[1]。天然香原料的芳香成分对卷烟有柔和烟气、增强烟香的作用^[2-3],是烟草生产过程中常用的添加剂。我国天然植物资源丰富,目前各卷烟企业依托当地资源优势,开发了一些具有特色香味或在卷烟中具有显著加香效果的植物香料,以达到提扬香韵、强化卷烟产品特色的目的^[4-9]。

挥发性成分既是体现香料品质的重要因素,也是影响卷烟感官特征的重要因素^[10]。天然香原料的提取方法目前主要有溶剂萃取法、酶解法、生物法等^[11-14],其中萃取法和酶解法较为常用。由于提取方法不同,香料品质特征各异,挥发性成分也会有所不同。复合香料香气整体优于单体香料,具有香气浓郁、多样化、使用范围广等优点,但以往研究多集中于单一香料成分分析^[15-20]或者不同品种之间的比较^[21-22],对用不同提取工艺制得的复合香料挥发性成分的综合比较分析,目前鲜有报道。

鉴于此,本文拟以大枣为主要原料,并选取苹果干和枸杞2种具有清、甜、香特征天然植

物与之复配,分别采用较为常用的水提、醇提、酶解3种提取工艺制备不同风味的果干复合香料,利用GC-MS检测技术进行化学成分分析,考察用不同提取工艺制备的果干复合香料的成分差异及其卷烟加香效果,以期为进一步提升卷烟自主调香水平,挖掘可作为烟用香料原料的特色天然植物资源及其工业化应用推广提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

大枣,温县鼎鑫商贸有限公司产;苹果干,江苏中蔬农业有限公司产;枸杞,安徽汇中州中药饮片有限公司产;果胶酶(酶活力5000 U/mg),丹麦诺维信酶制剂公司产。

乙醇,1,2-丙二醇,丙三醇,二氯甲烷,无水 Na_2SO_4 ,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司产。

1.2 实验仪器

DZF-6030A型真空干燥箱,天津通净仪器设备有限公司产;KBF240型恒温恒湿箱,FED240型烘箱,德国Binder公司产;Mettler AE200型电子天平,感量0.0001 g,瑞士Mettler Toledo公司产;MH-1000型调温电热套,北京市永光明医疗仪器厂产;Hei-VAP型旋转蒸发器,MR Hei-End型磁力搅拌器,德国Heidolph

公司产;Z326型离心机,德国Hermle公司产;SHB-Ⅲ循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司产;HH-8型数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司产;7890A/5975C型气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 不同提取工艺果干复合香料的制备

水提复合香料的制备:筛选质量合格、无明显霉点、去核干净的苹果干、枸杞、大枣,以3:3:4的质量比(总质量1 kg)混合均匀置于锅中,加入5 kg水,控制锅中心温度70℃,加热4 h,期间间歇性搅拌,保持物料加热温浸均匀;温浸完成后,将物料取出,用150目筛过滤,滤液抽滤收集,即得水提复合香料。

醇提复合香料的制备:筛选质量合格、无明显霉点、去核干净的苹果干、枸杞、大枣,以3:3:4的质量比(总质量1 kg)混合均匀置于锅中,加入 $V(\text{丙二醇}):V(\text{甘油})=7:3$ 的混合溶剂2 kg,控制锅中心温度70℃,加热4 h,期间间歇性搅拌,保持物料加热温浸均匀;温浸完成后,将物料取出,用150目筛过滤,滤液抽滤收集,即得醇提复合香料。

酶解复合香料的制备:按照3:3:4的质量比(总质量1 kg)称取质量合格、无明显霉点、去核干净的苹果干、枸杞、大枣,把大枣和苹果干切成边长约0.5~1.0 cm的小块(不要切得过碎),与枸杞混匀后加入等质量的水,在不锈钢锅中预煮15~30 min,温度控制在60~70℃,使果肉充分软化。然后加入相当于软化后物料质量1.5倍的无菌水打浆,放入预先设定为35℃的恒温水浴锅中,按照每L果浆25.1 mg的添加量加入果胶酶,酶解时间2 h,酶解完成后过滤取滤液,即为酶解复合香料。

1.3.2 复合香料化学成分 GC-MS 分析 水提复合香料和酶解复合香料化学成分提取:分别取水提复合香料和酶解复合香料100 mL置于同时蒸馏萃取装置一端的250 mL圆底烧瓶中,

电热套加热至沸腾,将50 mL二氯甲烷放入另一端100 mL圆底烧瓶中,60℃水浴加热,待中间分液管处液面出现分层后开始计时,萃取3 h,提取液用无水 Na_2SO_4 干燥后过滤,浓缩至1 mL,浓缩液用GC-MS联用仪分析。

醇提复合香料化学成分提取:取适量醇提复合香料,用5倍体积的乙醇稀释后,用GC-MS联用仪分析。

GC 检测条件:进样口温度280℃,色谱柱为DB-5MS(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)毛细管柱,柱温50℃保持2 min,以4℃/min的速率升至280℃保持25 min,分流比10:1,进样量1 μL;载气He,传输线温度280℃。

MS 检测条件:EI为70 eV,离子源温度230℃,四极杆温度150℃,扫描范围50~650 amu,溶剂延迟5 min。

检索NIST08谱库,选择匹配度较高(大于70%)的化合物作为复合香料可能的化学成分。

1.4 评价方法

嗅香评价:用体积分数为50%的丙二醇溶液将所提复合香料溶解为体积分数为5%的复合香料溶液,按照《烟用香精 香气质量通用评定方法》(YC/T 145.6—1998)^[23]的方法,由7名专业评吸人员对其进行嗅香评价。

卷烟加香效果评价:以蒸馏水为对照,将蒸馏水和3种复合香料分别按烟丝质量的0.05%添加到“金圣”某款卷烟叶组中,卷制成烟支后密封存储,并于温度(22±1)℃,相对湿度(60±2)%的恒温恒湿箱中平衡48 h。由7名专业评吸人员参照《卷烟 中式卷烟风格感官评价方法》(YC/T 497—2014)^[24],对添加了3种复合香料卷烟的香气品质、刺激性、协调性进行描述并作对比评价。卷烟样品打分参照文献[25-26]的方法进行。

2 结果与讨论

不同提取工艺制备的复合香料化学成分及

其相对含量见表1.

表1 不同提取工艺制备的复合香料化学成分及其相对含量

Table 1 Chemical composition and relative content of compound spices extracted by different process

序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%			序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%		
			水提法	醇提法	酶解法				水提法	醇提法	酶解法
1	4.652	2-丁烷醛	—	—	0.086	39	27.886	2-(1-甲基-2-吡咯烷基)吡啶	0.078	—	—
2	5.515	己醛	—	—	0.077	40	28.349	苯甲醇	0.080	—	1.534
3	5.706	2-甲基-1-丙醇	—	—	0.362	41	28.890	2-(2-羟丙氧基)-1-丙醇	3.019	—	—
4	8.108	吡啶	—	—	1.134	42	29.229	苯乙醇	—	—	0.090
5	8.880	3-甲基-1-丁醇	—	—	2.382	43	30.306	庚酸	0.203	—	—
6	10.155	1-戊醇	—	—	0.066	44	30.751	1-(1H-吡咯-2-基)乙酮	1.128	—	0.634
7	10.518	二氢-2-甲基-3(2H)-呋喃酮	0.298	—	0.108	45	31.191	4-(2,2,6-三甲基-7-氧双环[4.1.0]庚-1-基)-3-丁烯-2-酮	0.057	—	—
8	11.145	3-羟基-2-丁酮	1.244	—	1.107	46	31.385	2,3-二羟基丙醛	14.362	—	—
9	11.238	(2,3-二甲基环氧乙烷)甲醇	—	0.325	—	47	32.013	4-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-2-丁酮	0.107	—	—
10	11.613	1-羟基-2-丙醇	0.557	4.010	0.251	48	32.383	2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮	—	1.123	—
11	13.343	1-己醇	—	—	0.619	49	32.56	苯丙醇	—	—	1.234
12	15.189	(E)-4-己烯-1-醇	—	—	1.430	50	32.927	辛酸	0.239	—	—
13	16.444	乙酸	0.225	14.443	0.344	51	34.006	正二十一烷	0.252	—	—
14	16.758	糠醛	14.181	—	10.956	52	34.097	4-甲基戊基戊酸酯	—	0.455	—
15	17.968	1-(2-呋喃基)乙酮	0.620	—	0.353	53	34.691	1,3-辛二醇	0.360	—	0.224
16	18.164	甲酸	—	4.414	—	54	35.412	丁香酚	—	—	0.116
17	19.014	2,4-二甲基-1,3-二氧环烷-2-甲醇	—	4.564	—	55	35.417	壬酸	0.130	—	—
18	19.068	丙酸	—	—	0.078	56	36.094	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	3.107	—	2.975
19	19.924	2-甲基丙醇	0.073	—	0.064	57	36.323	正二十二烷	0.681	—	—
20	20.024	5-甲基-2-呋喃甲醛	0.676	—	0.597	58	36.690	十六烷酸甲酯	0.068	—	0.143
21	20.332	2-环戊烯-1,4-二酮	0.349	0.405	0.135	59	37.552	十六烷酸乙酯	0.184	—	0.086
22	21.677	丁酸	—	—	0.089	60	37.695	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮	15.367	—	—
23	21.465	1,4-丁内酯	0.066	—	—	61	37.817	正癸酸	0.988	—	—
24	21.960	苯乙醛	0.526	—	0.359	62	38.063	甘油单乙酸酯	—	1.289	—
25	22.597	2-呋喃甲醇	0.379	9.685	0.197	63	38.551	正二十八烷	1.507	—	—
26	22.852	3-甲基戊酸	0.370	—	0.235	64	38.599	正二十烷	—	—	0.180
27	23.967	4-甲氧基丁酸	—	0.455	—	65	38.919	1,4:3,6-二氢- α -D-吡喃葡萄糖	—	—	0.475
28	24.321	5-甲基-2-呋喃甲醇	0.287	0.485	0.116	66	39.111	5,6,7,7a-四氢-4,4,7a-三甲基-2(4H)-苯并呋喃酮	0.286	—	0.325
29	25.243	3,4-二氢-2-吡喃	—	0.305	—	67	39.904	邻苯二甲酸二乙酯	—	—	0.941
30	25.594	N,N-二丁基-甲酰胺	0.089	—	—	68	40.406	2,3-二氢苯并呋喃	1.232	—	1.114
31	25.725	1,2-环戊二酮	—	1.604	—	69	40.701	正二十四烷	2.539	—	—
32	26.107	乙烯基醚	—	0.349	—	70	41.054	苯甲酸	0.108	—	—
33	26.649	3-甲氧基-1,2-丙二醇	—	0.456	—						
34	26.834	1-(2,6,6-三甲基-1,3-环己二烯-1-基)-(e)-2-丁烯-1-酮	0.144	—	0.110						
35	27.072	3-甲基-1,2-环戊二酮	0.077	—	—						
36	27.429	1,1'-双氧基-2-丙醇	—	2.805	—						
37	27.567	己酸	0.762	—	—						
38	27.628	丙二醛	—	—	0.060						

表1(续)

序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%			序号	保留时间/min	化合物名称	相对含量/%		
			水提法	醇提法	酶解法				水提法	醇提法	酶解法
71	41.254	吡嗪	0.096	—	—	87	49.134	己二酸双(2-乙基己基)酯	—	—	11.344
72	42.367	十二酸	2.223	—	0.336	88	49.564	高香草醇	—	—	0.273
73	42.576	(Z,Z)-9,12-十八烷二烯酸甲酯	—	—	0.328	89	50.470	棕榈酸	28.065	—	19.321
74	42.748	5-(羟甲基)-2-呋喃甲醛	—	10.787	—	90	50.641	乙酰柠檬酸三丁酯	0.656	—	—
75	42.771	正二十五烷	2.895	—	—	91	50.986	顺-9-六癸酸	2.474	—	—
76	42.826	正三十一烷	—	—	0.283	92	51.047	顺-9-十六碳烯酸	—	—	3.031
77	43.289	9,12-十八烷二烯酸乙酯	—	—	0.259	93	51.907	1,4,7,10,13,16-六氧杂环十八烷	—	—	0.956
78	43.487	1,2-苯二甲酸二(2-甲基丙基)酯	—	—	0.168	94	52.905	15-冠醚-5	—	—	0.194
79	43.818	甲氧基乙酸-2-十三烷基酯	0.302	—	—	95	53.675	辛乙二醇单十二烷基醚	0.535	—	0.527
80	44.627	二氢-4-羟基-2(3H)-呋喃酮	—	2.376	—	96	53.850	六乙二醇十二烷基醚	—	—	0.515
81	44.822	正二十六烷	2.647	—	0.288	97	53.996	十八酸	2.275	—	—
82	44.989	1,2-苯二甲酸,丁基-2-甲基丙酯	—	—	0.163	98	54.606	油酸	3.509	—	3.041
83	46.522	十四酸	1.587	—	1.409	99	55.704	(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸	13.664	—	18.767
84	46.685	正二十七烷	1.886	—	—	100	56.964	1,4,7,10,13,16-己酰氯辛烷	—	3.595	—
85	47.050	硝酸异山梨酯	—	2.683	—	101	57.241	(Z,Z,Z)-9,12,15-十八碳三烯酸	1.732	—	4.807
86	47.403	Z-7-十四烯酸	1.197	—	0.284	102	58.715	D-阿洛糖	—	—	2.159
						103	58.836	十一乙二醇	—	0.637	—
						104	61.001	3,6,9,12,15-五氮杂十九烷-1-醇	—	—	0.159

注:“—”表示未检出。

2.1 不同提取工艺制备的复合香料化学成分种类对比分析

基于表1数据,对不同提取工艺制备的复合香料化学成分种类进行比较分析,结果见表2。由表2可知,复合香料中的挥发性成分,水提法共检出54种,醇提法共检出25种,酶解法共检出61种。酶解法制备的复合香料化学成分种类最多,其原因可能是酶解法条件温和,某些大分子物质被分解;由于溶剂相同,水提法和酶解法制备的复合香料化学成分种类相近,但提取

温度的差异又使二者种类略有不同;醇提法在提取过程中会造成某些水溶性物质的流失,此外,丙二醇、丙三醇沸点较高,故没有采用同时蒸馏萃取来捕集香气成分,一些挥发性较强的成分和一些半挥发性成分可能得不到捕集,由此造成醇提复合香料的化学成分种类偏少。

2.2 不同提取工艺制备的复合香料化学成分含量对比分析

基于表1数据,对不同提取工艺制备的复合香料化学成分种类的相对含量进行对比分析,

表2 不同提取工艺制备的复合香料化学成分种类

Table 2 Kinds of chemical composition of compound spices extracted by different process 种

香料名称	化学成分种类													化学成分种类总数
	酸类	醛酮类	烷类	醇类	酯类	酚类	醚类	呋喃类	吡啶类	吡嗪类	胺类	吡喃类	糖类	
水提复合香料	17	13	7	6	5	1	1	1	1	1	1	0	0	54
醇提复合香料	3	8	1	8	3	0	1	0	0	0	0	1	0	25
酶解复合香料	12	13	4	15	8	2	3	1	1	0	0	0	2	61

结果如表3所示.由表3可见,复合香料的化学成分主要为醛酮类、酸类、醇类、酯类、烷类等,这与之前的相关报道一致^[27-30].水提复合香料中含有较多的酸类、醛酮类和烷类;醇提复合香料中含有较多的酸类、醛酮类和醇类;酶解复合香料中含有较多的酸类、醛酮类和酯类.水提、醇提和酶解复合香料的酸类化学成分相对含量分别为59.751%,19.312%和51.742%;醛酮类化学成分相对含量分别为19.693%,50.034%和14.907%;醇类化学成分相对含量分别为1.736%,21.976%和9.001%;烷类化学成分相对含量分别为12.407%,3.595%和1.707%;酯类化学成分相对含量分别为1.276%,4.427%和13.432%.

水提复合香料中相对含量较高的化学成分包括棕榈酸(28.065%)、2,3-二羟基丙醛(14.362%)、糠醛(14.181%);醇提复合香料中相对含量较高的化学成分包括2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4H-吡喃-4-酮(15.367%)、乙酸化学成分(14.443%)、5-(羟甲基)-2-呋喃甲醛化学成分(10.787%);酶解复合香料中相对含量较高的化学成分包括棕榈酸(19.321%)、(Z,Z)-9,12-十八碳二烯酸(18.767%)、己二酸双(2-乙基己基)酯(11.344%).酸类香气成分可赋予产品一定的酸甜气息;糠醛有似焦糖、谷物烘烤气息,提供焦甜香和烤香^[30].

对比3种不同的提取工艺,水提复合香料

的化学成分与酶解复合香料的化学成分接近,但经酶解处理后,复合香料香气更丰富,产生了一些新的香气物质,如带有清甜玫瑰样花香气息的苯乙醇、带有青草气和苹果香味的己醛、具有干甜花香和辛香的丁香酚等.虽然醇提复合香料中化学成分种类较少,但产生了不同于另外两种提取工艺的香气物质,如2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-呋喃酮,具有强烈的焦糖样甜香,略带淡淡豆花香气息.这些不同的化学成分构成了复合香料特有的香韵.

2.3 复合香料的嗅香评价和卷烟加香效果评价结果

对分别用3种不同提取工艺制备得到的复合香料进行嗅香评价的结果表明,不同复合香料的香韵略有差别:水提复合香料有枣的清香,有甜润感,酸香明显;醇提复合香料清甜感明显;酶解复合香料枣香最为浓郁,有焦甜味.

复合香料的卷烟加香效果评价结果见表4.由表4可知,与对照样品相比,酶解复合香料效果最佳,卷烟评吸的各个指标都有所提升,烟气香韵丰富,烟香协调,香气量足,烟气细腻,余味干净,口感舒适.这可能是因为经过酶解后,提取物中的蛋白质和淀粉类转化成了氨基酸和小分子糖类,化学成分种类增多,也进一步促进了美拉德反应的发生;同时,酶解复合香料有更高含量的酯类、醚类等其他小分子物质,这些物质具有改善卷烟品质的作用.醇提复合香料效果次之,与对照样品相比,清甜感明显,香气质

表3 不同提取工艺制备的复合香料化学成分种类的相对含量

Table 3 The relative content of chemical composition kinds of compound spices extracted by different process

香料名称	化学成分种类												
	酸类	醛酮类	烷类	醇类	酯类	酚类	醚类	呋喃类	吡啶类	吡啶类	吡啶类	吡啶类	糖类
水提复合香料	59.751	19.693	12.407	1.736	1.276	3.107	0.535	1.232	0.078	0.096	0.089	0	0
醇提复合香料	19.312	50.034	3.595	21.976	4.427	0	0.349	0	0	0	0	0.305	0
酶解复合香料	51.742	14.907	1.707	9.001	13.432	3.091	1.236	1.114	1.134	0	0	0	2.634

表4 复合香料的卷烟加香效果评价

Table 4 Evaluation of cigarette flavoring application of compound spices 分

香料名称	感官评价指标						总分
	香气质	香气量	余味	杂气	协调性	刺激性	
水提复合香料	+0	+0.5	+0.5	-1.0	+0.5	-1.5	-1.0
醇提复合香料	+1.0	-0.5	+1.0	-0.5	+0.5	+0.5	+2.0
酶解复合香料	+1.0	+1.5	+1.0	+0.5	+1.5	+1.0	+6.5
对照	0	0	0	0	0	0	0

尚好,烟香较协调,余味舒适,但香气量稍有不足,略有杂气.水提复合香料效果最差,香气量略有增加,余味稍干净,烟香协调性较好,但略有杂气和刺激性,这可能与水提复合香料中存在吡啶和胺类等物质有关.

3 结论

本文以大枣为主要原料,辅以苹果干和枸杞,采用水提、醇提、酶解3种提取工艺制备果干复合香料.运用GC-MS检测技术对复合香料的化学成分进行对比分析,并对复合香料进行嗅香评价和卷烟加香效果评价,得到如下结论.

1)复合香料中主要的化学成分是醛酮类、酸类、醇类、酯类和烷类.酶解复合香料鉴定出的化学成分种类最多,有61种,其中新产生的苯乙醇、己醛、丁香酚等是构成卷烟香味的重要物质;醇提复合香料的化学成分种类最少,只有25种,但产生了不同于另外两种提取方式的物质,如略带淡豆花香气息的2,5-二甲基-4-羟基-3(2H)-咪喃酮;水提复合香料鉴定出54种化学成分,与酶解复合香料的化学成分接近,但不及酶解复合香料的香气丰富.

2)3种复合香料的香韵略有差别:水提复合香料有枣的清香,酸香明显;醇提复合香料清甜感明显;酶解复合香料枣香最为浓郁,有焦甜味.

3)与对照样品相比,酶解复合香料的加香效果最佳,卷烟评吸的各个指标都有所提升,烟气香韵丰富,烟香协调,香气量足,烟气细腻,余

味干净,口感舒适;醇提复合香料卷烟加香效果次之;水提复合香料卷烟加香效果最差,卷烟略有杂气和刺激性,可能与其含有的吡啶和胺类等物质有关.

本研究通过对比不同提取工艺,发现用酶解工艺制备的果干复合香料的致香效果较好,可作为一种新型复合香料应用于卷烟中.下一步将更深入地探索新的提取工艺,以期进一步开发更多的可应用于烟用香料制备的特色天然植物资源.

参考文献:

- [1] 王猛,杨乾栩,杨莹,等.复合香料植物颗粒的制备及在卷烟中的应用[J].精细化工,2016,33(3):326.
- [2] 杨金初,孙世豪,张启东,等.基于HPLC和GC/MS分析的加工原料筛选及天然烤甜香原料开发[J].烟草科技,2017,50(7):48.
- [3] 薛云,白家峰,严俊,等.烟用天然香料的研究进展[J].轻工科技,2015,31(10):11.
- [4] 刘绍华,毛多斌,李志华,等.天然烟用香料提取技术研究进展[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2013,28(4):24.
- [5] 文福姬,俞庆善.植物性天然香料的研究进展[J].现代化工,2005(4):25.
- [6] 林惠珍,白卫东,赵文红,等.我国天然香料的工业发展现状及对策[J].中国调味品,2010,35(8):29.
- [7] 张合川,徐如彦.大枣挥发油的提取分析及其在烟草中应用研究[J].轻工科技,2013,29

- (12):17.
- [8] 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.
- [9] 刘绍华,邹克兴,李志华,等.菠萝蜜烟用香料香气成分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(S1):78.
- [10] 洪钟容.薰衣草油香气分析及香气质量的评定(兼谈复体香料香气分析和香气质量评定)[J].香料香精化妆品,1986(1):42.
- [11] 何玉娟,李士雨.天然香料的提取技术[J].化工进展,2004(9):972.
- [12] 刘丹.天然健康原料——植物提取物的研发与市场概述[J].食品研究与开发,2010,31(8):3.
- [13] 黄致喜,徐晓瑾.烟用香料研究进展简介[J].香料香精化妆品,2003(2):25.
- [14] 薛云,刘绍华,龙章德,等.烟用天然香料新型提取分离技术的研究[J].轻工科技,2016,32(4):26.
- [15] 王甜,赵明月,何保江,等.滁菊亚临界净油挥发性和半挥发性成分分析及卷烟加香效果[J].烟草科技,2015,48(7):46.
- [16] 蔡波,杨清,杨蕾,等.香根草净油挥发性成分分析及其作为烟草香料的应用评价[J].云南大学学报(自然科学版),2013,35(S2):323.
- [17] 李成斌,李仙,刘煜宇,等.葡萄发酵烟用香料的制备及挥发性成分分析[J].食品与生物技术学报,2012,31(8):891.
- [18] 张峻松,贾春晓,戴勇,等.天然枣香料香味成分的分析及在卷烟中的应用[J].烟草科技,2003(3):28.
- [19] 韩航航,徐竖,白冰,等.不同工艺提取蝶豆花香料及在卷烟中的应用[J].湖北农业科学,2019,58(10):109.
- [20] 朱亚杰,于豪杰,谷令彪,等.不同方法所得小茴香籽净油成分的比较分析[J].食品科技,2018,43(8):248.
- [21] 周晓晶,张佩俊,任琴,等.三种香料蔬菜的营养及挥发性物质分析[J].北方园艺,2010(1):30.
- [22] 张富县,李娜,李妙清,等.三种红枣香气成分的分析及模块香精的调配[J].食品工业科技,2018,39(12):222.
- [23] 国家烟草专卖局.烟用香精 香气质量通用评定方法:YC/T 145.6—1998[S].北京:中国标准出版社,1998.
- [24] 国家烟草专卖局.卷烟 中式卷烟风格感官评价方法:YC/T 497—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- [25] 谢剑平,宗永立,屈展,等.单体香料在卷烟中作用评价方法的建立及应用[J].烟草科技,2008(4):5.
- [26] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.卷烟 第4部分:感官技术要求:GB 5606.4—2005[S].北京:中国标准出版社,2005.
- [27] LU Y,ZHAO Z H,LIU M J. Influences of drying on the volatile compounds in Chinese jujube [J]. Asia Journal of Chemistry, 2013, 25(7): 3765.
- [28] 田晶,李存满,王玉春,等.快速溶剂萃取 GC/MS 分析不同枣的挥发性成分[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(22):62.
- [29] 赵进红,赵勇,刘庆莲,等.宁阳不同枣品种品系主要营养和香气成分含量研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2017,37(11):789.
- [30] 朱晓兰,时亮,刘百战,等.利用 GC 和 GC/MS 分析枣子酞挥发性化学成分[J].分析仪器,2000(4):41.
- [31] 许戈文,李布青.合成香料技术手册[M].北京:中国商业出版社,1996.



引用格式:余述燕,张田田,金麒,等.一款祛痘调理精华乳的研制及其性能分析[J].轻工学报,2020,35(4):54-60.

中图分类号:TQ658;TS974.1 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.008

文章编号:2096-1553(2020)04-0054-07

一款祛痘调理精华乳的研制及其性能分析

Preparation and performance analysis of an acne-removing conditioning essence milk

余述燕,张田田,金麒,樊凯奇,兰宏兵,尹志刚

YU Shuyan, ZHANG Tiantian, JIN Qi, FAN Kaiqi, LAN Hongbing, YIN Zhigang

郑州轻工业大学 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:

精华乳;配方;活性成分;祛痘因子 EG;祛痘效果

Key words:

essence milk; formula; active ingredient; acne-removing factor EG; acne-removing effect

摘要:以精华乳基底配方为基础,研究了不同乳化剂体系对精华乳性能的影响,综合评价了分别含有祛痘因子 EG、SkinClean AC、SkinRelax LC 和 ProNature FX 4 种活性成分精华乳的祛痘调理效果,确定祛痘调理精华乳的最终配方.对该配方制备的祛痘调理精华乳进行理化性能和祛痘效果测定,结果表明,以清爽型混合油脂为油相,S2/S21 ($m(S2) : m(S21) = 1.0 : 1.5$) 为乳化剂,祛痘因子 EG 为活性组分,三者用量分别为 8.50%、3.00% 和 8.00%,再配以适量的保湿剂、增稠剂、螯合剂和防腐剂制备的祛痘调理精华乳,其性能温和、稳定性较好,具有理想的祛痘效果.

收稿日期:2020-05-25

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(21602207);2018年郑州轻工业大学省级大学生创新创业训练计划项目(201810462026);郑州轻工业大学博士科研基金项目(2014BSJJ009)

作者简介:余述燕(1985—),女,安徽省金寨县人,郑州轻工业大学讲师,博士,主要研究方向为功能性有机中间体和化妆品新剂型的开发.

通信作者:尹志刚(1965—),男,河南省禹州市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为有机中间体合成及其功能化、环保染料和化妆品配方设计与安全评价.

Abstract: Based on the base formula, the effect of different emulsifier systems on the performance of essence milk was studied, and the acne-removing conditioning effect of essence milk including 4 active ingredients of acne-removing factor EG, SkinClean AC, SkinRelax LC, and ProNature FX were comprehensively evaluated, the final formula of the essence milk was determined, and then the physical and chemical properties of acne-removing conditioning essence milk prepared under the formula was determined. The results showed that acne-removing conditioning essence milk was prepared by using refreshing mixed fat as the oil phase, S2/S21 ($m(S2) : m(S21) = 1.0 : 1.5$) as emulsifier, the acne-removing factor EG as active component, and the dosage of the three was 8.50%, 3.00% and 8.00% respectively, together with the proper amount of moisturizer, thickener, chelating agent and preservative, it had mild performance, good stability, and ideal acne-removing effect.

0 引言

痤疮,又名青春痘或粉刺,是毛囊皮脂腺单位的一种慢性炎症性皮肤病^[1-3]。痤疮皮肤常伴有红色丘疹,严重者甚至有脓包现象,是一种损美性皮肤病,多发于青春期前后,给患者特别是青少年患者带来较大的心理压力,甚至产生社交障碍。因此,祛痘类产品在化妆品市场上一直占有重要地位。

通常认为,痤疮的发生大致经过4个阶段^[4-8]。1) 皮脂腺的异常活跃期。流行病学调查发现,痤疮患者多伴有皮脂腺异常活跃导致皮脂分泌增加的现象,而皮脂腺的活跃程度受遗传、年龄、性别等因素的影响。其中,雄性激素是调控皮脂腺功能的主要激素,这也是痤疮好发于青春期人群的原因。2) 毛囊、皮脂腺导管角化过度期。角化过度会导致角质层细胞互相粘连,不能正常脱落,它们积聚在毛囊漏斗部,与皮脂、灰尘等结合形成小栓,无法及时排除,堵塞毛囊皮脂腺导管口,从而形成粉刺。3) 痤疮丙酸杆菌大量繁殖期。堵塞后的毛囊导管内部缺氧,诱发痤疮丙酸杆菌、表皮葡萄球菌等厌氧性细菌的大量增殖,进一步产生脂肪酶分解皮脂中的甘油三酯,生成游离脂肪酸,诱发炎症的发生。4) 脓包形成期。痤疮丙酸杆菌还会产生中性粒细胞趋化性因子,使受到浸润的中性粒细胞释放溶酶体和活性氧,从而对正常组织产

生伤害,使炎症进一步加剧甚至恶化,形成脓疱。由此可知,痤疮的形成受多种因素的影响,因此,若要根治痤疮,需从抑制皮脂过度分泌、疏通毛囊皮脂腺导管、杀菌、消炎等多个环节入手^[9-13]。这就要求研发人员在祛痘产品的设计与开发过程中注意多种活性成分的搭配和选用^[14-16]。

据调查^[17-18],目前市场上祛痘类化妆品大多只添加一类或两类功效成分,通过抑制痤疮发生过程中的部分环节来实现其功效。究其原因大概有两个:一是祛痘类功效原料大多存在一定的刺激性,而痤疮皮肤经常伴随耐受度降低等状态,种类过多的祛痘成分会增加皮肤的负担;二是添加功效成分种类过多会出现功效成分与其他组分之间难以配伍等问题,增加研发工作的难度。但痤疮的发生是多因素多阶段作用的结果,需要多种功效成分之间良好的协同作用,才能达到理想的祛痘调理效果。随着人们对美好生活追求的日益强烈,化妆品行业进入了蓬勃发展的新时代,越来越多的学者参与到功能性化妆品原料的研发工作中,开发了多种复合型或多功能型化妆品原料。将多种单一功能的化妆品原料复配为一种具有多种效果的复合制剂,或者开发具有多种功效的植物提取物,以减少配方优化时间、改善部分成分配伍性差等问题,有助于产品的开发,并进一步促进化妆品市场的快速发展。基于本课题组前期研究成

果^[19-21],本文选取目前市场上新推的4种复合型祛痘活性成分(祛痘因子 EG、SkinClean AC、SkinRelax LC 和 ProNature FX),以精华乳的产品形式研究其对痤疮皮肤的实际调理祛痘效果,旨在获得一款使用肤感佳、稳定性好和祛痘效果理想的祛痘调理精华乳产品,为实现其未来工业化生产提供理论数据和参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂:卡波姆(CP),美国 Lubrizol 公司产;黄原胶(CP),美国 CPKelco 公司产;1,3-丙二醇(CP),广州市昊毅化工有限公司产;EDTA-2Na(AR),CLARIANT(中国)有限公司产;三乙醇胺(AR)、鲸蜡硬脂醇(AR)、聚二甲基硅氧烷(AR)、棕榈酸乙基己酯(AR)、异构十六烷(AR)、苯氧乙醇(AR)和乙基己基甘油(CP),德国 BASF 公司产;Span80(AR)、Tween80(AR)、A165(CP)、M68(CP)、A6(CP)、A25(CP)、Brij72(CP)、Brij721(CP)、S2(CP)和 S21(CP),法国 SEPPIC 公司产;SkinClean AC(CP)、SkinRelax LC(CP)、ProNature FX(CP)和祛痘因子 EG(CP),广州祈缘生物科技有限公司产;去离子水,郑州轻工业大学实验室自制。

主要仪器:AL104 电子天平、S400 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产;HH-S6/ZK6 电热恒温水浴锅,巩义市予华仪器有限责任公司产;SGX500/750 封闭式高剪切乳化机,上海尚贵流体设备有限公司产;TDL80-2B 台式离心机,上海安亭科学仪器厂产;DHG 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司产;VISIA-CR 面部图像分析仪,美国 Canfield 公司产;Cutometer[®] MPA 580 皮肤测试仪,德国 CK 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 祛痘调理精华乳基底配方的拟定 通

过对现有产品组分进行剖析可知,祛痘调理精华乳是在适合痤疮皮肤人群使用的精华乳基底配方的基础上,通过添加具有祛痘调理活性成分的化妆品原料配制而成。精华乳的基底配方通常由水相、油相、乳化剂、增稠剂、防腐剂等组分组成。考虑到痤疮皮肤的特点及其对产品特性的需求,所开发的精华乳应具有清爽不油腻的使用肤感,因此在乳液类型、所用油脂和乳化剂种类上需有所甄别。在油脂的选择方面注重使用油腻感低、封闭性小且吸收性好的油脂。通过初步的筛选发现,鲸蜡硬脂醇、聚二甲基硅氧烷、棕榈酸乙基己酯、异构十六烷等油脂均能满足上述需求,本实验采用多种油脂复配,以求获得更好的稳定性、配伍性和使用性;在乳化剂选择方面,以亲水性乳化剂为主,辅配以适当的亲油性乳化剂,便于获得性能稳定和肤感优异的油/水型乳液。通过对相应化妆品原料特性的了解和精华乳类产品的认识,确定初步的祛痘调理精华乳的基底配方见表1。

1.2.2 祛痘调理精华乳基底配方的优化

在基底配方的基础上,考察6种乳化剂体系(Span80/Tween80、A6/A25、M68、S2/S21、A165

表1 祛痘调理精华乳的基底配方

Table 1 The basic formula of acne-removing conditioning essence milk

相别	原料名称	原料作用	质量分数/%
A	去离子水	赋形剂	加至 100
	卡波姆	增稠、调节流变性	0.15
	黄原胶	增稠、调节流变性	0.10
	1,3-丙二醇	保湿	5.00
	EDTA-2Na	螯合剂	0.03
B	鲸蜡硬脂醇	油脂、滋润	1.00
	聚二甲基硅氧烷	油脂、滋润	2.00
	棕榈酸乙基己酯	油脂、滋润	5.00
	异构十六烷	油脂、滋润	5.00
	乳化剂	乳化、分散	4.00
C	三乙醇胺	调节精华乳 pH 值	0.15
D	乙基己基甘油	防腐剂	0.50

和 Brij72/Brij721)对祛痘调理精华乳产品性能的影响,筛选出适宜的乳化剂体系及其用量,以实现基底配方的优化。

1.2.3 最优祛痘活性成分的确定 在上述已优化基底配方的基础上,分别考察含有4种活性成分(祛痘因子 EG、SkinClean AC、SkinRelax LC 和 ProNature FX)祛痘调理精华乳产品的试用效果,确定最优的祛痘活性成分。

1.2.4 祛痘调理精华乳的配制 按配方分别称取所需的各组分原料,备用。将A相中的黄原胶和 EDTA-2Na 依次加入多元醇中,搅拌分散均匀后,加入去离子水,再将卡波姆加入水相,搅拌均匀后升温至 80~85℃,保温 10 min,备用;将B相原料混合后加热至 75~80℃,完全溶解并搅拌均匀;将B相加入A水相中,在 2800 r/min 的转速下均质 3 min,搅拌冷却至 45℃,加入C相和D相,搅拌均匀后冷却至室温,即得祛痘调理精华乳。

1.2.5 受试者的挑选 本项目所挑选的受试者均为在校大学生志愿者,包括一至四年级的男女生共 40 名,随机分为 4 组,分别试用含有 4 种不同活性成分的产品。受试者入选条件为:1)面部皮脂分泌旺盛并伴有一定程度的痤疮;2)非过敏性肤质;3)近 3 个月未参加过其他临床测试;4)愿意积极配合并遵循受试产品使用要求。

1.2.6 祛痘调理精华乳有效性的主观评价 试用期限为 28 d,分别在第 7 d、第 14 d、第 21 d 和第 28 d 采集受试者的主观评价数据。请每组 10 名受试者结合自身使用情况,对所试用产品的祛痘调理效果进行评分,分无效(0)、不确定(2)、有一定效果(4)和有效(6)共 4 个等级,将每组每次评分数据取平均值。

1.2.7 祛痘调理精华乳的控油效果测试 通过皮肤油脂含量测试探头分别采集受试者使用产品第 0 d、第 7 d、第 14 d、第 21 d 和第 28 d 同一时段面部、额头的油脂量,以油脂分泌量的

变化来评价该祛痘调理精华乳的控油效果。具体测试方法:要求受试者停用所有其他面部护肤产品,早晚清洗面部后按建议用量将祛痘调理精华乳涂抹于面部皮肤。每次采集数据前,要求受试者统一用温水清洗面部并用干面巾纸擦拭后,在恒温恒湿的等待室内放松静候 2 h。每位受试者每次需采集 3 次数据,取其平均值。然后对每周每组 10 人数据再取平均值。

1.2.8 祛痘调理精华乳的理化性能测试 测试产品的 pH 值、高低温稳定性和离心稳定性,以评价该产品的理化性能。

采用稀释法,使用 pH 计测定产品的 pH 值:准确称量所开发的祛痘调理精华乳 10.0 g,加入经煮沸冷却后的去离子水 100.0 g 进行稀释,加热至 40℃,期间不断搅拌使其分散均匀,然后冷却至室温,插入校正过的 pH 计,待读数稳定后读取数值,测量两次取其平均值。

高低温稳定性测试:将产品先置于 -15℃ 冰箱中 24 h,取出后放置在 45℃ 烘箱中 24 h,重复 3 次,观察产品的状态。

离心稳定性测试:将适量祛痘调理精华乳置于离心管中,以 3000 r/min 的转速离心 30 min,观察离心后精华乳的状态。

1.2.9 祛痘调理精华乳的祛痘效果测试 通过面部图像分析仪采集受试者使用祛痘调理精华乳一周前后的面部图片,直接观察受试者面部痤疮的变化情况,以评价祛痘调理精华乳的祛痘效果。

2 结果与讨论

2.1 祛痘调理精华乳基底配方的优化结果

在基底配方的基础上,按照 4.00% (若无特指,百分数均指质量分数,下同)的乳化剂使用总量,分别探究了 6 种乳化剂体系对产品性能的影响,结果见表 2。

由表 2 可知,使用这 6 种乳化剂体系制作

表2 不同乳化剂体系对产品性能的影响

Table 2 The effect of different emulsifier systems on cosmetics performance

乳化剂体系	配比	外观	离心稳定性	肤感
Span80/Tween80	$m(\text{Span80}) : m(\text{Tween80}) = 1.0 : 1.0$	细腻、光泽好	稳定	厚重感太强
A6/A25	$m(\text{A6}) : m(\text{A25}) = 1.0 : 1.0$	光亮、偏白	稳定	肤感一般
M68		厚重、太稠	稳定	黏度大,肤感一般
S2/S21	$m(\text{S2}) : m(\text{S21}) = 1.0 : 1.5$	明亮,细腻	稳定	肤感清爽
A165		偏暗,偏黄	稳定	略显油腻
Brij72/Brij721	$m(\text{Brij72}) : m(\text{Brij721}) = 1.0 : 1.0$	明亮、细腻	稳定	不易涂覆,起白条,吸收差

的乳状液在外观和使用肤感方面均有较大差异. 尽管使用 Span80/Tween80 为乳化剂体系的乳状液很细腻,光泽度也较好,但肤感较差,厚重感很强,皮肤有不透气感,不适合痤疮皮肤人群使用;以 M68 为乳化剂体系的产品,在使用时不易匀开,肤感适中;以 Brij72/Brij721 为乳化剂体系的产品比较细腻,但涂抹时有起白条现象,且难以吸收;表现较为理想的为 S2/S21 组合的乳化剂体系,产品不仅具有理想的外观,且比较容易涂抹,吸收性较好,肤感也较清爽,因此选择 S2/S21 为乳化剂体系较适宜.

为进一步优化 S2/S21 的用量,在控制其他组分用量不变的情况下,制备了 S2/S21 用量分别为 2.00%、3.00%、4.00%、5.00% 和 6.00% 的精华乳. 经过对比发现,随着乳化剂用量的增加,产品外观更加明亮,但清爽肤感逐渐变差,当乳化剂用量超过 5.00% 时,产品变得比较稠厚,偏膏霜外观,且涂覆性下降,当 S2/S21 用量为 2.00% 时,产品比较稀薄,离心实验后有分层现象,稳定性差. 因此综合考虑,确定 S2/S21 ($m(\text{S2}) : m(\text{S21}) = 1.0 : 1.5$) 的用量为 3.00%.

2.2 最优祛痘活性成分的选择结果

按照 8.00% 祛痘活性成分的添加量,在已优化的基底配方中分别添加祛痘因子 EG、SkinClean AC、SkinRelax LC 和 ProNature FX 4 种活性成分,制成相应产品,并分别提供给 4 组(每组 10 名)受试者试用,通过受试者对产品有效性的主观评分和监测受试者使用产品前后

面部、额头的油脂分泌量变化情况,综合评价 4 种活性成分的祛痘调理效果,其结果见表 3 和图 1.

由表 3 可知,4 种活性成分均有一定的祛痘效果,且试用时间越长,祛痘效果越明显. 这符合痤疮肌肤的护疗特点,即促发痤疮的原因很多,痤疮皮肤的治愈非短时间内可以实现,需从源头抑制皮脂的过量分泌、疏通毛囊皮脂腺导管、杀菌和消炎几个环节综合作用,才能达到比较理想的控油祛痘效果. 在 4 种活性成分中,

表3 受试者主观评分结果

Table 3 Subjective scoring results of test-users 分

活性成分	评分			
	第 7 d	第 14 d	第 21 d	第 28 d
祛痘因子 EG	3	4	5	5
SkinClean AC	3	3	4	4
SkinRelax LC	3	3	4	4
ProNature FX	3	4	4	4

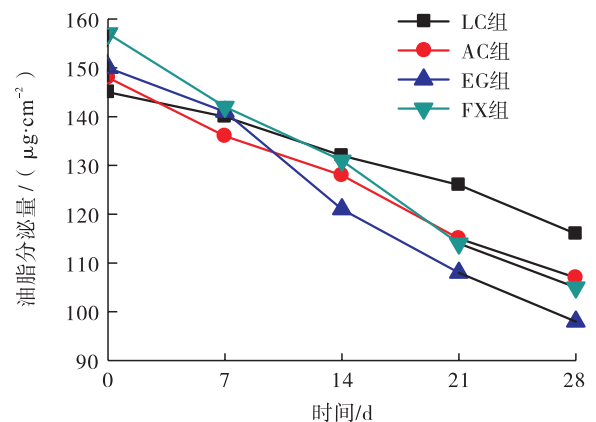


图1 皮肤油脂分泌量的变化

Fig. 1 The changes of skin oil secretion

祛痘因子 EG 试用组的主观评分最高,试用14 d 后,即表现出了明显的祛痘效果.

由图 1 可以看出,4 组受试者皮肤的油脂分泌量均有不同程度的下降,这说明 4 种活性成分均具有一定的控油调理效果.其中,试用含有祛痘因子 EG 产品组的油脂分泌量变化最明显,综合受试者主观评分结果,最终确定选择祛痘因子 EG 作为祛痘调理精华乳的活性成分,并将配方组分进行了微调,确定混合油脂用量为 8.50%,同时加入 0.25% 的苯氧乙醇作为防腐剂,以保证精华乳良好的肤感和祛痘效果.祛痘调理精华乳的最终配方见表 4.

2.3 祛痘调理精华乳的理化性能测试结果

对按照最终配方制备的祛痘调理精华乳进行理化性能测试,其 pH 值为 6.5,经高低温和离心实验后,其稳定性较好,未观察到油水分离现象.

2.4 祛痘调理精华乳的试用效果

对按照最终配方制备的祛痘调理精华乳进行试用.随机选取两名受试者,通过面部图像分析仪拍摄其使用该产品前后的面部图片,试用

效果如图 2 所示.从图 2 可以看出,试用该产品一周后,受试者额头和下巴部位的痤疮均明显减轻,表明该产品具有较好的祛痘效果.

3 结论

本文依据精华乳的基础配方,通过研究不同乳化剂体系对精华乳性能和使用肤感的影响,以及对比分析分别含有祛痘因子 EG、Skin-Clean AC、SkinRelax LC 和 ProNature FX 4 种活性成分的精华乳的祛痘调理效果,得出了较为理想的祛痘调理精华乳配方,即清爽型混合油脂的用量为 8.50%,S2/S21 ($m(S) : m(S21) = 1.0 : 1.5$) 的用量为 3.00%,祛痘因子 EG 的用量为 8.00%,再配以适量的保湿剂、增稠剂、螯合剂和防腐剂.在此基础上,结合人体试用主观评分和仪器测量控油效果的方法,对祛痘调理精华乳的理化性能和祛痘效果进行

表 4 祛痘调理精华乳的最终配方

Table 4 The final formula of acne-removing conditioning essence milk

相别	原料名称	质量分数/%
A	去离子水	加至 100
	卡波姆	0.10
	黄原胶	0.05
	1,3-丙二醇	5.00
	EDTA-2Na	0.03
B	鲸蜡硬脂醇	0.50
	聚二甲基硅氧烷	2.00
	棕榈酸乙基己酯	3.00
	异构十六烷	3.00
	S2	1.20
	S21	1.80
C	三乙醇胺	0.10
	苯氧乙醇	0.25
D	乙基己基甘油	0.15
	祛痘因子 EG	8.00

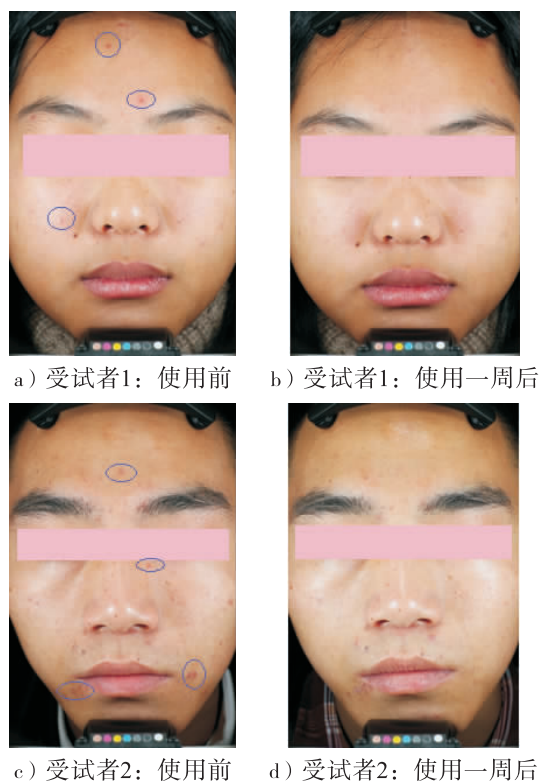


图 2 祛痘调理精华乳的试用效果

Fig. 2 Trial effect of acne-removing conditioning essence milk

测定,结果表明,该精华乳性能温和、稳定性较好,具有较为理想的祛痘调理效果,是一款具有工业化前景的祛痘类护肤产品。

参考文献:

- [1] 陈翠珊,王建琴. 痤疮及相关因素对患者生活质量的影响[J]. 国际皮肤性病学杂志,2008,34(6): 379.
- [2] 张璨丹,徐济达,何源. 中学生和大学生痤疮患者焦虑与抑郁状况[J]. 中国学校卫生,2020,41(4): 531.
- [3] 杜耀武,寇鹏涛. 青春期痤疮患者抑郁状况的观察[J]. 国际精神病学杂志,2019,46(6): 1092.
- [4] 姜春明. 痤疮的发病机制研究进展[J]. 皮肤病与性病,2003,25(3): 16.
- [5] 欧阳飞,房慧,曾慧,等. 玫瑰痤疮的发病机制[J]. 临床医药文献电子杂志,2020,7(20): 190.
- [6] 徐迪,史同新,王君. 青春期后痤疮发病相关因素研究[J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2019,18(6):645.
- [7] 弓娟琴. 痤疮与雄激素关系的研究进展[J]. 国外医学:皮肤性病学分册,1997,23(2): 65.
- [8] 汪薇,付萍. 痤疮丙酸杆菌致病机制研究进展[J]. 国际皮肤性病学杂志,2010,36(2): 86.
- [9] 陈晓朋,李雪竹. 油性及痤疮皮肤特点和保养综述[J]. 广东化工,2020,47(6):122.
- [10] 殷迪,牛松青. 痤疮的病因及治疗进展[J]. 吉林医药学院学报,2009,30(3):166.
- [11] 涂平. 痤疮治疗新进展——中国痤疮治疗共识会推荐治疗方案[J]. 中华皮肤科杂志,2003,54(7): 62.
- [12] 项蕾红,马英. 痤疮治疗的进展[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2017,24(4): 227.
- [13] 林彤,周展超. 痤疮的光学治疗[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2006,22(10):840.
- [14] 朱杰连,广丰. 祛痘产品的配方设计[J]. 中国化妆品,2006,12(7):74.
- [15] 刘晓敏. 三黄祛痘凝胶的研制及其安全性与功效性评价[D]. 广州:广东药科大学,2018.
- [16] 陈立琼,张榕文,万玉华,等. 中药祛痘膏的制备与应用[J]. 香料香精化妆品,2014,41(3): 39.
- [17] 姚丽. 韩茜美韩李 祛痘护肤,走专业化品牌之路[J]. 中国化妆品,2020(4): 90.
- [18] 涿波. 100位消费者的战"痘"调查[J]. 中国化妆品,2020(3):72.
- [19] 兰宏兵,余述燕,黄秋荣,等. 维生素C多重乳状液的制备及其稳定性研究[J]. 轻工学报,2019,34(4):43.
- [20] 樊凯奇,王晓波,刘邦,等. 高效保湿霜的制备及保湿性能研究[J]. 轻工学报,2019,34(4): 37.
- [21] 兰宏兵,余述燕,李嘉琪,等. 便携式免洗织物去污喷剂的研制[J]. 轻工学报,2019,34(1): 57.



引用格式:张珍林,闵运江,刘明宇,等.铁皮石斛花保湿柔肤水配方工艺优化[J].轻工学报,2020,35(4):61-66.

中图分类号:TQ658.2;TS974.1 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.009

文章编号:2096-1553(2020)04-0061-06

铁皮石斛花保湿柔肤水配方工艺优化

Optimization of formulation process for dendrobium officinale flower moisturizing toner

张珍林^{1,2,3}, 闵运江¹, 刘明宇¹, 王梦荷¹

ZHANG Zhenlin^{1,2,3}, MIN Yunjiang¹, LIU Mingyu¹, WANG Menghe¹

1. 皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽 六安 237012;
 2. 植物细胞工程安徽省工程技术研究中心, 安徽 六安 237012;
 3. 安徽省中药资源保护与持续利用工程实验室, 安徽 六安 237012
1. *College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Liu'an 237012, China;*
2. *Engineering Technology Research Centre of Plant Cell Engineering, Liu'an 237012, China;*
3. *Anhui Engineering Laboratory for Conservation and Sustainable Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Liu'an 237012, China*

关键词:

铁皮石斛花; 保湿柔肤水; 配方优化

Key words:

dendrobium officinale flower;
moisturizing toner;
formulation optimization

摘要:以铁皮石斛干花为原料,辅以体积分数为95%的乙醇、甘油、丁二醇、尿囊素、锁水磁石等配料,制备一款具有保湿护肤效果的铁皮石斛花柔肤水,通过单因素试验和正交试验对该柔肤水的配方进行优化。结果表明:当体积分数为95%的乙醇添加量为10%,铁皮石斛花多糖原液添加量为12%,甘油添加量为5%时,再添加适量辅料制备的铁皮石斛花保湿柔肤水的感官评价最好,其品质良好且性能稳定。

收稿日期:2020-01-10

基金项目:安徽省自然科学基金项目(KJ2018A0420);皖西学院国家级大学生创新训练计划项目(201910376058)

作者简介:张珍林(1985—),女,安徽省六安市人,皖西学院讲师,主要研究方向为天然植物资源、化妆品配方设计等。

Abstract: A dendrobium officinale flower toner with moisturizing skin care effect was prepared by using dried dendrobium officinale flower as raw material, supplying with ethanol of mass fraction 95%, glycerin, butylene glycol, allantoin, hydrocline and other ingredients, and the formula of the toner was optimized through the single factor test and orthogonal test. The results showed that when the added amount of ethanol with mass fraction 95% was 10%, dendrobium officinale flower polysaccharide stock solution was 12%, glycerin was 5%, adding appropriate amount of ingredients, the prepared dendrobium officinale flower moisturizing toner had the best sensory evaluation, good quality and stable performance.

0 引言

柔肤水是指 pH 值接近 7 的温和化妆水,其主要成分为营养剂、保湿剂、表面活性剂、辅助添加剂、稳定剂、溶剂等^[1-2]。1980 年代初期,我国化妆品行业开始出现柔肤水,到了 1990 年代末,柔肤水产品的品种仍比较单一,主要起补充和保持人体皮肤水分的作用,因大多是在化妆前使用,故统称为化妆水^[3-5]。随着市售柔肤水产品种类的增多,适用范围也在不断扩大,柔肤水已成为人们日常皮肤保养不可或缺的部分^[6-7]。

目前,关于铁皮石斛提取物在保湿护肤方面的应用研究已有报道。例如,陈默等^[8]在对铁皮石斛提取物的保湿性能进行研究时发现,铁皮石斛水提物具有较好的皮肤保湿效果;易智彪^[9]研究发现,铁皮石斛叶提取物具有优异的保湿美白作用,可以安全应用到护肤品中;宋夏钦等^[10]研究发现,铁皮石斛蜂蜜复合提取物具有良好的保湿功效,且制成护肤品后安全无毒、效果稳定。也有研究证明^[11-13],铁皮石斛花提取液中含有丰富的多糖,具有一定的保湿功效。然而,关于铁皮石斛花在化妆品领域的应用鲜有报道。鉴于此,本文拟以铁皮石斛干花为原料,辅以体积分数为 95% 的乙醇、甘油、丁二醇、尿囊素、锁水磁石等配料制备铁皮石斛花保湿柔肤水,通过单因素试验和正交试验确定该柔肤水的最优配方工艺,以期对铁皮石斛花多糖提取物在保湿类化妆品中的应用展开研究,进而为天然植物成分化妆品的开发提供参考与借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

材料:铁皮石斛花,干制,由安徽省霍山县国家基本药物所霍山石斛原种基地提供。

主要试剂:丁二醇,上海展云化工有限公司产;无水乙醇,天津市致远化学试剂有限公司产;尿囊素,郑州津北化工有限公司产;锁水磁石,广州朋远化工有限公司产;泛醇,浙江绿洲生物技术有限公司产;甘油,山东优索化工科技有限公司产。以上试剂均为分析纯。双蒸馏水,皖西学院生物与制药工程学院实验室自制。

1.2 主要仪器

HH-S8 型数显恒温水浴锅,常州国宇仪器制造有限公司产;FA2204N 型电子天平,上海菁海仪器有限公司产;HR3865/00 型榨汁机,飞利浦电子中国有限公司产;GJB1500 L/h-40 MPa 型均质机,常州市超力均质泵厂产;SHB-III 型循环水式多用真空泵,郑州长城科工贸有限公司产;KQ300DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 铁皮石斛花多糖原液的制备 称取一定量干制的铁皮石斛花,用冷水冲洗干净后,加入双蒸馏水浸泡 1 h;然后把混合物全部转移至榨汁机中,以 2000 W 的功率榨汁 10 min 后,用多层纱布过滤,除去其中颗粒较大的纤维物质;再用循环水式多用真空泵将混合物进行多次过滤,收集滤液;向上述滤液中加入 40 mL 体积分数为 70% 的乙醇,超声(超声功率为 180 W)提

取 30 min 后,将所得提取液置于 10 mL 的容量瓶中,定容,即得铁皮石斛花多糖原液,置于冰箱冷藏室保存,备用。

1.3.2 铁皮石斛花保湿柔肤水的制备 首先,量取一定量的泛醇置于烧杯底部,用保鲜膜密封;接着,用吸量管依次吸取一定量体积分数为 95% 的乙醇、丁二醇、甘油加入烧杯中,并用玻璃棒搅拌均匀;然后,加入一定量的锁水磁石、铁皮石斛花多糖原液;最后,一边加入一定量的尿囊素和双蒸馏水一边搅拌,直至完全溶解后,用双蒸馏水定容至 20 mL,即得铁皮石斛花保湿柔肤水。

1.3.3 单因素试验设计 固定铁皮石斛花柔肤水总量为 20 g,石斛花多糖原液添加量为 12%,甘油添加量为 5%,考察体积分数为 95% 的乙醇添加量(0%、5%、10%、15%、20%)对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响。

固定铁皮石斛花柔肤水总量为 20 g,石斛花多糖原液添加量为 12%,体积分数为 95% 的乙醇添加量为 10%,考察甘油添加量(2%、4%、6%、8%、10%)对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响。

固定铁皮石斛花柔肤水总量为 20 g,体积分数为 95% 的乙醇添加量为 10%,甘油添加量为 5%,考察石斛花多糖原液添加量(4%、8%、12%、16%、20%)对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响。

1.3.4 正交试验设计 在单因素试验结果的基础上,采用 $L_9(3)^3$ 进行三因素三水平的正交试验,其因素水平见表 1。

1.3.5 感官评价 根据《化妆水》(QB/T 2660—2004)^[15] 的要求,结合铁皮石斛花保湿柔肤水的性能特点,将柔肤水的敏感性、香气、均匀性、细腻度、油腻感、保湿性作为感官评价标准^[16]。按照铁皮石斛花保湿柔肤水感官评分标准(见表 2),邀请 20 位受过专业培训的具备

感官评价能力的学生进行感官评价工作,其中男生和女生各 10 名。在感官评价的过程中,严格按照评价的规定程序,先按要求对评价人员进行合理分组,各组均隔离进行评价,互不干扰,以保证评价结果的公平性、科学性、合理性。采用 100 分制的评分系统,记录每组评分结果并计算平均值。

1.3.6 理化评价 根据《化妆水》(QB/T 2660—2004)的要求,进行铁皮石斛花保湿柔肤水酸碱度、耐热性、耐寒性的检测,具体评价表见表 3。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Orthogonal test factor level table %

水平	因素		
	体积分数为 95% 的乙醇添加量(A)	铁皮石斛花多糖原液添加量(B)	甘油添加量(C)
1	9	10	5
2	10	11	6
3	11	12	7

表 2 铁皮石斛花保湿柔肤水感官评分标准

Table 2 Sensory evaluation standard of dendrobium officinale flower moisturizing toner

评价指标	评价标准	评分范围/分
敏感性、香气	无明显刺激性,具有石斛花特有香味	15~20
	稍微有刺激性,石斛花香味较淡	7~14
	有严重刺激性,无石斛花香味	0~6
均匀性	无不溶解物,颜色澄清透明,放置 0.5 h 无明显分层	15~20
	无不溶解物,颜色稍澄清透明,放置 0.5 h 无明显分层	7~14
	无不溶解物,颜色稍浑浊,放置 0.5 h 无较明显分层	0~6
细腻度	皮肤柔嫩、光滑而且润泽	15~20
	皮肤较柔嫩、稍微光滑而且润泽	7~14
	皮肤不太柔嫩、不太光滑且不润泽	0~6
油腻感	油性适中,无不适感	15~20
	油性稍重或稍轻,无明显不适感	7~14
	油性过重或者太轻,无明显不适感	0~6
保湿性	涂在手上 0.5 h 后,皮肤湿润	15~20
	涂在手上 0.5 h 后,皮肤稍干燥	7~14
	涂在手上 0.5 h 后,皮肤完全干燥	0~6

表3 铁皮石斛花保湿柔肤水理化评价表

Table 3 Physical and chemical evaluation form of dendrobium officinale flower moisturizing toner

指标	检测方法	检测标准
酸碱度	将铁皮石斛花保湿柔肤水与水按照体积比1:9进行混合,检测混合溶液的pH值	3.5~8.5
耐热性	将铁皮石斛花保湿柔肤水置于40℃环境中24h后,取出,待恢复至室温后,观察其性状	无分层,无变质
耐寒性	将铁皮石斛花保湿柔肤水置于-10℃环境中24h后,取出,恢复至室温后,观察其性状	无分层,无变质

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 乙醇添加量对柔肤水感官特性的影响

图1为体积分数为95%的乙醇添加量对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响.由图1可以看出,当体积分数为95%的乙醇添加量为10%时,铁皮石斛花保湿柔肤水的感官评价平均分为89.00分,具有较好的感官品质.该条件下所得柔肤水无明显刺激性,具有石斛花特有香味;无不溶解物,颜色澄清透明,放置0.5h后,无明显分层;涂在手上油性适中,无不快感,且皮肤柔嫩、光滑,保湿性较好.

2.1.2 铁皮石斛花多糖原液添加量对柔肤水感官特性的影响 图2为铁皮石斛花多糖原液添加量对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响.由图2可以看出,当铁皮石斛花多糖原液添加量为12%时,铁皮石斛花保湿柔肤水具有良好的感官品质,感官评价平均分为86.00分.将该条件下所得柔肤水涂抹在手上,无明显刺激性,具有石斛花特有香味,均匀性好,细腻度高,无油腻感,保湿性较好.预实验过程中发现,当石斛花多糖原液添加量超过12%时,柔肤水的均匀性和细腻度明显变差,品质有所下降,故后续正交试验中的石斛花多糖原液添加量未选取大于12%的值.

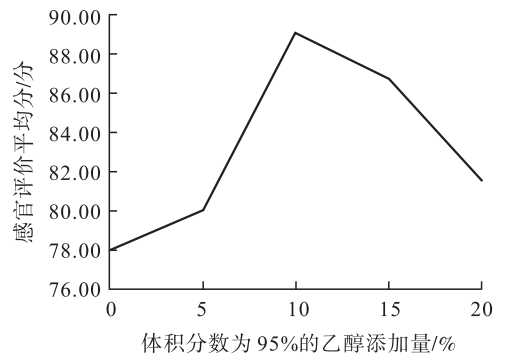


图1 体积分数为95%的乙醇添加量对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响

Fig. 1 Effects of 95% ethanol addition on the sensory properties of dendrobium officinale flower moisturizing toner

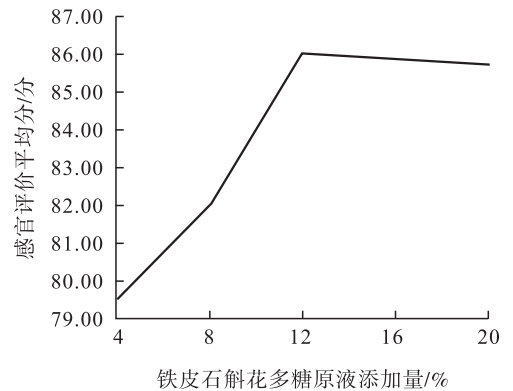


图2 铁皮石斛花多糖原液添加量对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响

Fig. 2 Effects of dendrobium officinale flower polysaccharide stock solution on the sensory properties of dendrobium officinale flower moisturizing toner

2.1.3 甘油添加量对柔肤水感官特性的影响

图3为甘油添加量对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响.由图3可以看出,当甘油添加量为6%时,感官评价平均分最高,为87.00分.将该条件下所得柔肤水涂抹在手上,保湿性较好,无明显刺激性,具有石斛花特有香味,细腻、均匀,无油腻感.因此,添加适量的甘油能明显增强此款柔肤水的保湿效果.

2.2 正交试验结果分析

正交试验结果见表5.由表5可知,3个主

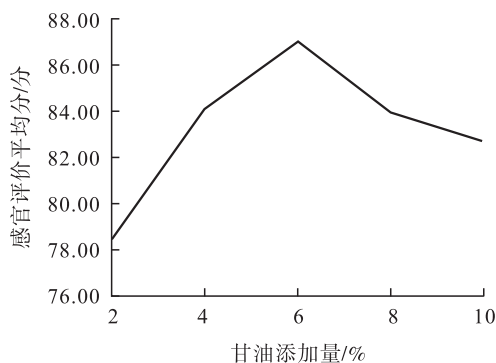


图3 甘油添加量对铁皮石斛花保湿柔肤水感官特性的影响

Fig. 3 Effects of glycerin addition on the sensory properties of dendrobium officinale flower moisturizing toner

要因素对铁皮石斛花保湿柔肤水感官品质的影响大小为:甘油添加量 > 体积分数为 95% 的乙醇添加量 > 铁皮石斛花多糖原液添加量. 铁皮石斛花保湿柔肤水的最优组合为 $A_2B_3C_1$, 即体积分数为 95% 的乙醇添加量为 10%, 铁皮石斛花多糖原液添加量为 12%, 甘油添加量为 5%. 再辅以适量泛醇、锁水磁石、尿囊素等辅料, 所制备的柔肤水成品感官评价结果最佳.

2.3 验证实验结果

为了进一步验证正交试验的正确性和合理性, 按照最佳配方做 3 次重复实验, 并进行感官评价和理化检测, 结果见表 6. 由表 6 可知, 以最优配方制备的铁皮石斛花保湿柔肤水品质良好且性能稳定.

3 结论

本文制备了一款具有保湿护肤效果的铁皮石斛花保湿柔肤水, 通过单因素试验和正交试验对该柔肤水的配方进行优化得出, 当体积分数为 95% 的乙醇添加量为 10%, 铁皮石斛花多糖原液添加量为 12%, 甘油添加量为 5% 时, 再添加适量辅料制备的铁皮石斛花保湿柔肤水感官评价最好, 品质良好且性能稳定. 然而, 一个

表5 正交试验结果表

Table 5 The results table of orthogonal test

试验号	因素			感官评分/分
	A	B	C	
1	1	1	1	80.23
2	1	2	3	81.17
3	1	3	2	80.46
4	2	1	3	80.92
5	2	2	2	80.08
6	2	3	1	85.77
7	3	1	2	79.15
8	3	2	1	82.00
9	3	3	3	79.62
K_1	241.86	240.31	248.00	
K_2	246.77	243.25	239.69	
K_3	240.77	245.85	241.71	
k_1	80.62	80.10	82.67	
k_2	82.26	81.08	79.90	
k_3	80.26	81.95	80.57	
极差 R	2.00	1.85	2.77	
主次顺序	C > A > B			
最优水平	A_2	B_3	C_1	
最优组合	$A_2B_3C_1$			

表6 最优配方验证实验结果

Table 6 Optimal formula verification results

编号	感官评分/分	酸碱度	耐热性	耐寒性
1	86.01	7	无分层, 无变质	无分层, 无变质
2	85.79	7	无分层, 无变质	无分层, 无变质
3	85.77	7	无分层, 无变质	无分层, 无变质

市场化的保湿柔肤水, 其成分是复杂多样的, 除含有主要营养剂、保湿剂外, 还包含表面活性剂、稳定剂、溶剂等. 根据铁皮石斛花多糖原液具有抗氧化性的结论^[11-12], 可以预测其具有修复皮肤、增强皮肤抗衰老的功效, 从而起到改善肌肤暗沉无光泽的作用. 因此, 后续还需对该款柔肤水中主要营养剂铁皮石斛花多糖原液的抗衰老、抗氧化活性等性能进行研究, 为该款保湿柔肤水的量产面市提供实验基础.

参考文献:

- [1] 夏可. 绝非鸡肋的化妆水[J]. 中国药店, 2013(6):78.
- [2] 方芳. 柔肤水的研制[J]. 香料香精化妆品, 1997(4):39.
- [3] 徐良. 走近润肤水[J]. 中国化妆品, 1999(3):34.
- [4] 钱志荣. “化妆水”的研究与发展[J]. 中国化妆品, 1997(4):19.
- [5] 沙克. 化妆水及面霜的成分分析[J]. 日用化学品科学, 2011, 34(6):42.
- [6] 余慧. 化妆品抗衰老功效评价的研究[D]. 上海:上海应用技术学院, 2012.
- [7] 田爽. 化妆品中防腐剂的应用和发展趋势[J]. 当代化工研究, 2018, 2(1):127.
- [8] 陈默, 孙懿, 赵亚. 铁皮石斛提取物保湿性能研究[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 6(29):70.
- [9] 易智彪. 一种具有保湿功效的铁皮石斛叶提取物及其在制备护肤品中的应用:201610155974.6[P]. 2016-05-04.
- [10] 宋夏钦, 边枫选, 周坚宏, 等. 一种具有保湿功效的铁皮石斛蜂蜜复合提取物及其制备方法以及在护肤品中的应用:108113953A[P]. 2018-06-05.
- [11] 龚庆芳, 何金祥, 黄宁珍, 等. 铁皮石斛花化学成分及抗氧化活性研究[J]. 食品科技, 2014, 39(12):106.
- [12] 缪园欣, 廖明星, 孙爱红, 等. 关于铁皮石斛花多糖提取工艺及体外抗氧化性研究报道[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(2):52.
- [13] 王玢, 任清, 李奇, 等. 香菇多糖的提取及其抗氧化性和保湿性评价[J]. 食用菌, 2008(5):58.
- [14] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 化妆水:QB/T 2660—2004[S]. 北京:中国轻工业出版社, 2004.
- [15] 丛琳, 邓慧, 邓燕柠, 等. 感官评价及其在化妆品上的应用[J]. 广东化工, 2015, 42(13):161.



引用格式:梁瑜海,肖咏茵. 养猪废水处理技术的研究进展[J]. 轻工学报,2020,35(4):67-80.

中图分类号:X703 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.010

文章编号:2096-1553(2020)04-0067-14

养猪废水处理技术的研究进展

The advance of swine wastewater treatment technology

梁瑜海,肖咏茵

LIANG Yuhai, XIAO Yongyin

华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642

College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

关键词:

养猪废水; 废水处理
技术; 资源化利用;
脱氮

Key words:

swine wastewater;
wastewater treatment
technology; utilization
of resources; nitrogen
removal

摘要:综述了不同养猪废水处理技术的基本原理和优缺点,发现,传统处理技术多侧重于对废水中污染物的去除,但未考虑总氮的控制,难以实现节能降耗和资源的回收利用;新型处理技术不仅可以减少总氮去除过程中的能耗、物耗,还可以实现资源的回收利用.为了实现可持续发展战略,未来达到更高的出水排放标准,现有处理技术还需在优化运行条件、增加预处理措施、组合多技术处理等方面做出相应改进;而未来养猪废水处理新技术也会朝着低耗、高效和高质的方向发展.

收稿日期:2020-04-30

基金项目:国家自然科学基金项目(51708229);广东省珠江人才计划“青年拔尖人才”项目(2017GC010157)

作者简介:梁瑜海(1986—),男,广西壮族自治区崇左市人,华南农业大学首聘副教授,博士,主要研究方向为污水处理新技术.

Abstract: By reviewing the basic principle, advantages and disadvantages of different swine wastewater treatment technologies, it was found out that traditional treatment technologies mainly focused on the removal of pollutants from wastewater, but did not consider the control of total nitrogen, which was difficult to achieve energy saving and resource recycling. New treatment technologies not only reduced the energy and material consumption in the process of total nitrogen removal, but also realized the recycling of resources. So these technologies had a broad application prospect in the future swine wastewater treatment. In order to realize sustainable development strategy and achieve higher effluent discharge standards in the future, existing treatment technologies can be improved in optimizing operating conditions, adding pretreatment measures, and combining multi-technology treatment. In the future, new technologies of swine wastewater treatment will develop towards low consumption, high efficiency and high quality.

0 引言

随着人们生活水平的提高,猪肉食品的需求量不断增加,生猪养殖业也因此越发集中,并逐渐实现规模化,而这种规模化养殖却带来了严重的环境污染问题^[1]. 2010年,全国污染源普查公报显示,畜牧养殖业的粪便产生量为 2.43×10^8 t,尿液产生量为 1.63×10^8 t. 其中,总氮和总磷的排放量可达 1.02×10^6 t和 1.60×10^5 t^[2]. 生猪养殖作为畜牧业的重要组成部分,其产生的废水污染问题不容忽视. 养猪废水主要由猪的粪便和尿液组成,臭味很重,但同时富含有机物、营养物质(氮、磷)和未消化的饲料^[3]. 其中,高质量浓度的氮、磷等营养物质进入水体后,会导致水体富营养化,水生生物大量死亡,从而破坏水体的生态平衡^[4]. 但如果能将养猪废水中的有机物、氮、磷等污染物进行高效处理,不仅可以降低养猪废水对环境的污染,还能实现资源的回收利用. 因此,如何对养猪废水进行科学的处理和利用已成为当前生态环境保护领域的重要研究课题.

目前,养猪废水的处理以生物方法为主,物理方法和化学方法为辅. 本文拟在对比分析传统养猪废水处理技术的基本原理和优缺点的基础上,重点阐述养猪废水的资源化利用和新型处理技术,并对未来养猪废水处理技术的发展趋势进行展望.

1 传统养猪废水处理技术

1.1 厌氧生物处理技术

厌氧生物处理技术是指在厌氧条件下,通过厌氧菌和兼性菌的代谢作用,对废水中的有机物进行生化降解. 该技术具有能耗低、有机负荷高、剩余污泥少、抗冲击负荷强、生物能源可再利用等优点,在畜禽养殖废水处理领域中较为常用^[5].

沼气池是养猪废水处理中应用较多的厌氧生物处理装置,具有施工方便、工艺流程简单、所产沼气可以用于发电等优点,具有良好的环境效益和社会效益^[6-7],但其在应用过程中也存在发酵原料不足、沼气池产气率低等问题. 因此,部分学者将研究重点集中在优化沼气池处理效果方面. 已有研究表明,玉米秸秆与猪粪混合、酒糟与猪粪混合、香菇与猪粪混合都可明显提高沼气的产气率^[8-10]. 此外, Y. Liu等^[11]还发现,采用两步加热的方式可提高养猪废水厌氧消化过程中甲烷的产量,与一步加热方式相比,当环境温度降低到5℃时,其甲烷产率可提高14.74%.

上流式厌氧污泥床 UASB (up-flow anaerobic sludge bed) 是厌氧生物处理技术中的常见工艺之一,其主要处理过程为:待处理的污水从反应器底部进入,与反应器内呈膨胀状态的污泥充分反应后进入沉淀区;混合液流经三相分

离器,产生的沼气从其上部进入集气系统,污泥靠重力再返回反应区.该工艺具有处理效率高、结构紧凑、费用少等优点,但同时也存在耐冲击力差、进水中的悬浮物不宜过高等问题.UASB已成功应用于食品加工、酿造、医药化工等诸多行业 and 高质量浓度的废水处理领域.赵青玲等^[12]发现,根据化学需氧量 COD(chemical oxygen demand)去除率的情况适时提高进水质量浓度,不仅可以促进污泥的颗粒化,还可以避免污泥结构松散.郑仁宏^[13]研究发现,UASB反应器运行的适宜温度为 35 ℃左右,适宜 pH 值为 7.0 左右,当容积负荷为 10 kgCOD/(m³·d)时,对畜禽养殖业废水的处理效果较理想.万莉等^[14]利用电增强零价铁-升流式厌氧污泥床 EEZVI-UASB(electrical field and zero-valent iron enhanced up-flow anaerobic sludge bed)处理实际养猪废水时发现,EEZVI-UASB 对废水中氮素的去除率较高.Z. Zeng 等^[15]在 UASB 中使用驯化的外源颗粒污泥处理养猪废水,第 10 d COD 的去除率为 85%,去除效果明显优于使用土著厌氧污泥的对比组.

但是,厌氧生物处理技术也面临一定的挑战.例如,难降解的膳食纤维是猪饲料中的主要物质,它们进入养猪废水后,可能会严重阻碍废水进行厌氧消化反应^[16].同时,该技术还存在出水难以达到现有养猪废水的排放标准等问题,因此,一般都需要与好氧生物处理技术或其他技术组合运行使用.

1.2 好氧生物处理技术

好氧生物处理技术是指在好氧条件下,通过好氧微生物的代谢作用,去除废水中的有机物、氮、磷等污染物^[5].该技术具有处理性能稳定、易于操作和管理、去除污染物能力强等优点.

在养猪废水处理中,多级 AO 工艺和 A²/O 工艺是应用较好的好氧生物处理技术^[17-18].郑

志彬^[19]采用“预处理/沼气池/两级 AO”工艺,陈凤祥^[20]采用 UASB + 两级 AO 工艺,陈威等^[21]采用 EGSB-A/O-MBR 工艺,曾哲伟^[22]采用 A²/O 混凝组合工艺处理养猪废水,都实现了良好的处理效果,出水中各项污染物指标也都优于排放标准.

序批式反应器 SBR(sequencing batch reactor)也是一种常用的养猪废水好氧生物处理装置,改变其运行模式可以在一定程度上提高养猪废水的处理效果.X. Wu 等^[23]发现,在间歇曝气的条件下,SBR 可更高效地去除养猪废水中的污染物.J. Liu 等^[24]则发现,在 SBR 中采用间歇曝气运行模式,可快速实现好氧污泥的颗粒化.X. L. Sheng 等^[25]和 X. Y. Song 等^[26]发现,与传统 SBR 连续曝气运行模式相比,采用间歇曝气运行模式的 SBR 具有较高的反硝化细菌丰度,且在脱氮方面效果更好.

上流式微好氧反应器 UMSR(upflow microaerobic sludge reactor)也能较好地同步去除养猪废水中的 COD、总磷和总氮 TN(total nitrogen).J. Z. Li 等^[27]采用 UMSR 处理养猪废水时发现,COD 的平均去除率为 74.5%,总磷的平均去除率为 52.5%,TN 的平均去除率为 75.4%;同时发现,反应器中不同类型菌群的竞争协同关系会对污染物的去除产生重要影响.J. Meng 等^[28]研究发现,在 UMSR 中,氨氧化菌、异养反硝化菌、自养反硝化菌与聚磷菌间的协同作用对 COD、氨氮、TN、磷酸盐等污染物的去除起重要作用.但 UMSR 中氨氧化菌、亚硝酸盐氧化菌和异养菌对氧的竞争却又限制了养猪废水中氮素的去除^[29].

除上述工艺外,施云芬等^[30]在移动床生物膜反应器中进行不同悬浮填料的对比实验时发现,碳纤维球填料不仅挂膜速度快,且在不同运行条件下对 COD、氨氮、TN、总磷等的去除效果均好于聚乙烯塑料填料.J. Meng 等^[31]研究发

现,向 UMSR 反应器中加入聚氯乙烯填料后,可增强硝化细菌、反硝化细菌、厌氧细菌等生长缓慢细菌的富集,氨氮、TN 的去除率分别达到 93.1% 和 89.9%。万莉^[32]采用生物接触氧化池和序批式生物膜反应器处理养猪沼液,出水再经过人工湿地处理,可使出水水质优于排放标准。

由此可见,好氧生物处理是养猪废水处理技术的核心之一。但好氧生物处理技术也存在剩余污泥量多、能耗较高等问题。在养猪废水的实际处理中,好氧工艺一般会与厌氧工艺结合以降低能耗,再与其他深度处理工艺结合进一步提高出水水质。

1.3 人工湿地处理技术

人工湿地系统是模拟湿地生态系统建造的一种污水处理系统,其作用原理主要是,在一定的填料上种植湿地植物,当污水通过人工湿地时,可利用湿地中填料的物理、化学作用和植物与微生物的生物协同作用降解污染物。人工湿地系统具有总体投资低、运行费用少等优点^[33],多种类型的人工湿地系统均可对养猪废水进行有效处理。混合潜流人工湿地系统对养猪废水中大部分污染物均具有较好的去除效果^[34];多级表面流人工湿地系统对养猪废水不仅具有良好的处理效果,而且湿地基质中还具有较丰富的细菌群落^[35];沼泽-池塘-沼泽人工湿地系统可以降低养猪废水中的 TN、氨氮、总磷和 PO_4^{3-} 的平均质量浓度^[36];潮汐流人工湿地在厌氧消化后的养猪沼液处理中,具有良好的脱氮效果^[37]。

植物种植可改善人工湿地系统中养猪废水的处理效果。其中,种植浮萍的人工湿地对溶解性有机物的平均去除率提高了 28%,但废水中的氨氮质量浓度会对浮萍的处理效果产生一定的影响^[38]。W. Wang 等^[39]以 *Spirodela polyrrhiza* 浮萍为模型物种进行养猪废水处理实验时发

现,氨氮质量浓度的升高会延缓浮萍的生长、降低固碳和能量的产生速率。除浮萍外,绿狐尾藻也是一个研究热点。P. Luo 等^[40]研究发现,种植有绿狐尾藻的表面流人工湿地能有效地去除养猪废水中的磷。X. Li 等^[41]发现,绿狐尾藻净化系统可以提高养猪废水中的溶解氧 DO (dissolved oxygen),从而促进硝化过程。

此外,为了阐明人工湿地的污染物去除机理,部分研究者将目光转向了人工湿地中微生物的种群结构。X. Li 等^[42]研究发现,在养猪废水处理实验中,DO 对反硝化菌的种群分布有负面影响。L. Chen 等^[43]分析表明,厌氧氨氧化菌的活性和丰度与人工湿地中沉积物的 pH 值、氨氮含量和 NO_2^- -N 含量密切相关。X. Huang 等^[44]研究表明,在垂直流动人工湿地中,基质类型对细菌种群的变化有显著影响。

将人工湿地处理技术应用于养猪废水处理,不仅可以获得稳定的出水水质,还可以美化周边环境^[45]。但人工湿地处理技术也存在不足之处,如易受气候、温度、污染负荷的影响,易发生堵塞等^[46],这些都阻碍了其更广阔的应用前景。

综上,在实际应用中,养猪废水的传统处理工艺一般都是厌氧-好氧-人工湿地系统的组合工艺(见图 1)^[47-48]。其主要步骤为:首先,待处理的污水先通过格栅井,去除粗大的悬浮物或漂浮物;接着,进入厌氧处理系统,通过厌氧菌和兼性菌降解有机物,同时产生沼气和沼渣;然后,厌氧系统出水再进入好氧处理系统,污染物被好氧微生物进一步降解;最后,好氧处理系统出水进入人工湿地系统,进行深度处理,进一步提高出水的水质。目前,传统工艺多侧重于对污染物的去除,大多没有考虑到 TN 的控制,难以达到节能降耗和资源回收利用的目的。为了缓解日趋恶化的水污染问题,增加 TN 的控制指标,提高养猪废水的排放标准势在必行。若使

用现有工艺实现 TN 的去除,还需增强反硝化脱氮.然而,养猪废水中碳氮含量比较低,废水中的有机物难以满足氮素反硝化需求,只有投加大量外加碳源才能实现控制 TN 的目标,这会导致废水处理成本大幅增加.因此,研发低耗、高效的养猪废水资源回收和处理新工艺迫在眉睫.

2 养猪废水的资源回收利用和新型处理技术

2.1 养猪废水的资源回收利用技术

2.1.1 磷酸铵镁结晶法回收养猪废水中的氮磷

目前,养猪废水中的 NH_4^+ 和 PO_4^{3-} 可通过与 Mg^{2+} 结合形成沉淀的方法去除,其沉淀物为磷酸铵镁 MAP (magnesium ammonium phosphate),英文俗名为 struvite,中文俗称为鸟粪石^[49],可作为氮肥和磷肥使用.该方法也称 MAP 结晶法,其反应原理见图 2.影响 MAP 结晶法回收效率的因素较多.H. Huang 等^[50]研究发现,海藻酸钠和牛血清白蛋白的存在可轻微抑制 MAP 的结晶.D. Kim 等^[51]研究发现,当 $n(\text{Mg}^{2+}) : n(\text{NH}_4^+) : n(\text{PO}_4^{3-}) = 1.2 : 1.0 : 1.0$ 时,MAP 结晶效果最佳.Z. Wu 等^[52]研究发现,正渗透可促进 MAP 的原位生成和牲畜养殖废水的养分回收.Z. Luo 等^[53]研究发现,在 MAP 预处理中,与添加磷肥相比,添加发酵过的磷酸可得到更高的氨氮去除率和 MAP 回收率.

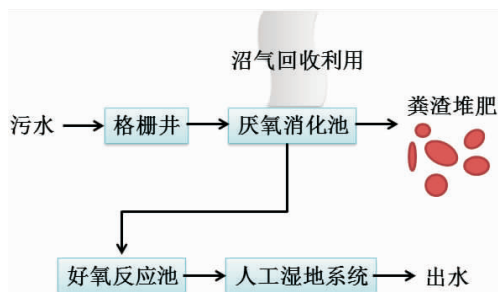


图 1 厌氧-好氧-人工湿地系统的组合工艺

Fig. 1 Combined process of anaerobic-aerobic-constructed wetland system

2.1.2 膜技术回收养猪废水中的氨氮 养猪废水中的氨氮可以通过膜接触器加以回收,其回收原理(见图 3)是:通过提高废水的 pH 值或温度,使得 NH_4^+ 转化为 NH_3 ; NH_3 通过膜孔向通有 H_2SO_4 侧扩散,使得 NH_3 转化为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.采用膜接触器回收氨氮不仅可以达到 90% 的氨氮去除率,而且回收产物 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 还可作为农业肥料进行销售.目前,如何提高氨氮回收率是该技术的研究重点.赵倩倩等^[54]使用 PVDF 膜接触器处理经预处理的垃圾渗滤液,通过提高料液的 pH 值、温度,控制合适的吸收液流量,提高了氨氮的回收率.张宗阳等^[55]研究发现,双套膜接触器可以克服传统膜接触器中由于壳程非理想流动导致的传质阻力.刘芮等^[56]通过比较分析发现,错流式膜组件比平流式膜组件更易获得较高的氨

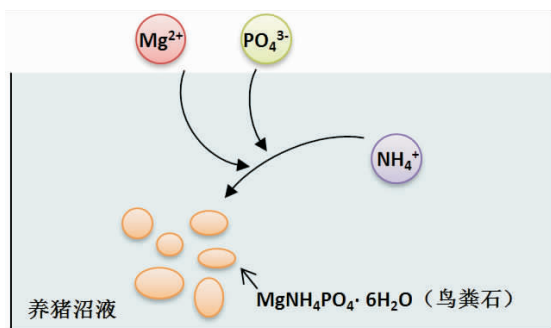


图 2 MAP 结晶法的反应原理

Fig. 2 Reaction principle of MAP crystallization

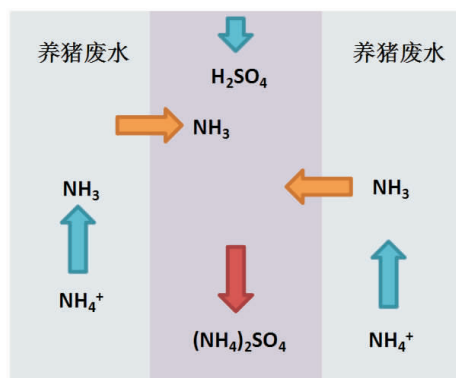


图 3 膜接触器的回收原理

Fig. 3 The recycling principle of membrane contactor

氮总传质系数.膜接触器回收氨氮技术具有高效、经济等特点,但在处理养猪废水时,应进行相应的预处理,避免养猪废水中其他污染物对膜组件和回收率的影响.

2.1.3 电化学法回收养猪废水中的氨氮

目前,应用于养猪废水处理的电化学处理技术主要有电渗析技术和微生物电化学技术.

电渗析技术的基本原理是利用电场使废水中不同电荷的离子透过不同选择性离子交换膜,使废水得到净化,向电极迁移的离子可以进一步回收利用(见图4).电渗析技术在养猪废水处理领域有一定的应用潜力.例如,两段双极膜电渗析系统被用于猪粪水解物养分的回收,通过控制运行条件,可以达到较好的处理效果^[57].S. Lim 等^[58]研究发现,电流密度对养猪废水脱氮有显著影响,当电流密度为 1.09 A/m²时,TN 的去除率最大,可达 75%.H. Huang 等^[59]研究发现,在废水中加入白云石可提高废水的电解性能,进而提高氨氮的去除率.由此可见,通过电渗析技术可有效回收养猪废水中的氮素,但多种污染物并存时,回收产物的纯度会受到影响.

微生物电化学技术的基本原理是利用固定在电极上的微生物之间的电化学作用来降解废水中的污染物,它是一种能量自给的废水处理

技术,可以应用于养猪废水的处理,其作用原理见图5.H. M. Wang 等^[60]研究发现,连续搅拌的微生物电化学系统耦合潮汐式生物阴极微生物电化学系统可以同时实现发电和养猪废水处理.W. J. Ding 等^[61]采用单室空气阴极微生物燃料电池处理养猪废水时发现,该系统可去除废水中的氮和有机物.M. Cerrillo 等^[62-63]研究发现,与厌氧消化结合的生物电化学系统有利于养猪废水中氨的回收;厌氧消化-微生物电解槽联合系统不仅可以提高养猪废水的出水水质,还可回收其中的营养物质.

2.1.4 耦合好氧-缺氧氮分解工艺回收氧化养猪废水中的氮素

耦合好氧-缺氧氮分解工艺 CANDO (coupled aerobic-anoxic nitrous decomposition operation)是一种新型的废水氮回收工艺(见图6),它的主要目的是将废水中的氮素转化成 N₂O 气体^[64],而产生的 N₂O 气体又可作为助燃剂、火箭氧化剂、食品加工助剂等进行回收利用.在 CANDO 工艺中,一般先将 NH₄⁺ 氧化成 NO₂⁻,然后再将 NO₂⁻ 还原为 N₂O 气体,所以,CANDO 工艺可对富氨废水进行脱氮处理和能量的回收^[65-66].随着研究的不断深入,发现 CANDO 工艺对废水的处理效果受多种因素影响.M. Meissbach 等^[67]研究发现,聚丙烯微孔中空纤维膜接触器具有增强回收 N₂O

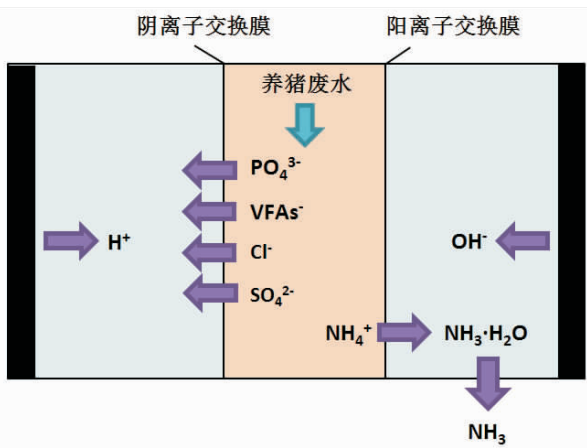


图4 电渗析技术的基本原理

Fig. 4 The principle of electrodialysis technology

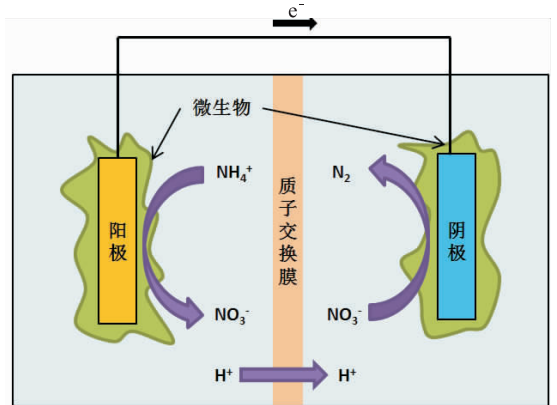


图5 微生物电化学技术的作用原理

Fig. 5 Action principle of microbial-electrochemical technology

气体的潜力.此外,缺氧反应期的亚硝酸盐质量浓度也会影响 N_2O 气体的产量^[68]. J. Mayung 等^[69]研究发现,在 II 型甲烷氧化过程中可以通过将聚 3-羟基丁酸酯氧化与 NO_2^- 还原偶联,从而介导 NO_2^- 还原为 N_2O 气体. H. Gao 等^[70]证明了反硝化聚磷菌本身也可以产生 N_2O . 由此可见,将废水中的氮素转化成 N_2O 气体,已经成为废水资源回收的一个新方向,而 CANDO 工艺有望应用于富含氮素的养猪废水处理中.

2.1.5 藻类反应器回收养猪废水中的生物质

藻类反应器是一种利用微藻处理废水的新型反应器,多种藻类反应器已应用于养猪废水的处理.研究发现,*Chlorella vulgaris* JSC-6 藻能有效利用经过稀释的养猪废水中的营养物质和有机物,合成细胞物质^[71]; *Chlorella* sp. MM3 藻可去除养猪场和酿酒厂混合废水中的养分,并产生脂类物质^[72]; MBFJNU-1 藻(小球藻的一种)可高效去除养猪废水中的 TN 和总磷^[73]. 将微藻处理工艺与其他工艺相结合也可产生类似的处理效果,如微藻-细菌共生光生物反应器,可有效降解养猪废水中的污染物^[74];耦合生物炭的藻类-细菌系统可提高养猪废水中养分的回收率^[75];真菌-微藻颗粒可同时去除养猪沼液中的营养元素和沼气中的 CO_2 ^[76];将物理化学预处理措施与藻类反应器结合起来,可明显提高养猪废水的处理效果^[77]. 但采用藻类反应器处理养猪废水也存在一些问题.例如,大多数微藻不易在未经稀释的养猪废水中存活,高质量

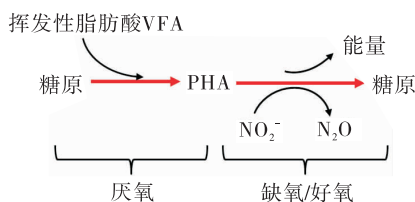


图 6 CANDO 工艺的基本原理

Fig. 6 The principle of coupled aerobic-anoxic nitrous decomposition operation

浓度的污染物会抑制它们的生长.对此, M. Wang 等^[78]开发了一种两阶段方法,即经紫外线照射和逐渐驯化后,所选微藻可在未经稀释的养猪废水中正常生长.由此可见,藻类反应器不仅可以有效去除养猪废水中的污染物,还可以将藻类作为生物柴油的原料,实现资源的回收利用.

2.2 新型养猪废水处理技术

为了适应更为严格的养猪废水排放标准,特别是考虑废水中 TN 的控制需求,新型处理技术的关键是在已有工艺的基础上强化 TN 的去除.但养猪废水的碳氮比较低,新型技术应着重考虑有机碳源需求较少或有替代碳源的脱氮工艺.

2.2.1 短程硝化反硝化工艺 短程硝化反硝化工艺(见图 7)是将硝化反应控制在亚硝酸盐阶段,随后直接进行反硝化反应的工艺^[79],可节省硝化阶段的部分曝气能耗和反硝化阶段的有机碳源.该工艺的关键是短程硝化的控制,目前多用 SBR 反应器来实现.而大量研究表明,进水氨氮质量浓度、温度、运行调控等可对 SBR 短程硝化反硝化的效果产生影响:在 SBR 反应器中,过高的进水氨氮质量浓度或氨氮负荷会降低氨氮的去除率^[80];温度降低对氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的活性均有影响,但对氨氧化菌的影响要大于亚硝酸盐氧化菌^[81];采用两段 SBR 法处理有机物和氮含量较高的废水,可有效提高氮素的去除率^[82];过度曝气容易引起短程硝化向全程硝化转变^[83].

2.2.2 甲烷反硝化工艺 目前,以甲烷作为反

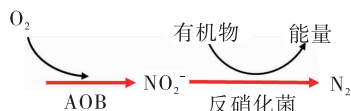


图 7 短程硝化反硝化工艺的基本原理

Fig. 7 The principle of short-cut nitrification and denitrification

硝化碳源的主要工艺有好氧甲烷氧化耦合反硝化工艺、厌氧甲烷氧化耦合反硝化 DAMO (denitrifying anaerobic methane oxidation) 工艺、甲烷氧化耦合同步硝化反硝化工艺^[84]. 对于好氧甲烷氧化耦合反硝化工艺而言, 体积分数为 21% 的 O₂ 可以促进甲烷的氧化^[85]. 近年来, DAMO 工艺成为了研究热点, 该工艺是指在厌氧条件下, 以甲烷作为电子供体, 以 NO₂⁻ / NO₃⁻ 作为电子受体的反硝化过程(见图 8)^[86]. DAMO 工艺多在膜生物反应器中实现. 此外, 将厌氧氨氧化与 DAMO 反应相结合, 可实现更高效的脱氮反应^[87]. S. Fan 等^[88] 采用一种新型膜颗粒污泥反应器, 实现了厌氧氨氧化与 DAMO 的耦合, 获得了较好的脱氮效果. 同时, DAMO 工艺中甲烷分压的变化也会影响微生物的活性^[89-90]. 以上研究表明, 甲烷也可作为反硝化脱氮的有机碳源, 而养猪废水传统处理工艺中的厌氧产甲烷阶段会产生大量的甲烷, 可为后续的甲烷反硝化脱氮提供充足的碳源, 大大减少养猪废水脱氮中外加碳源的消耗, 降低养猪废水的处理成本.

2.2.3 自养脱氮工艺 自养脱氮工艺是指通过短程硝化和厌氧氨氧化两个反应去除废水中的氮素(见图 9). 该工艺不仅能节省曝气能耗, 还不需要有机碳源, 尤其适合处理低碳氮比的养猪废水^[91-93]. 已有研究表明, 部分无机物、有

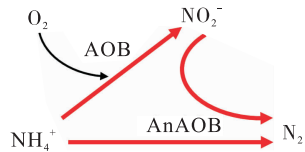


图 9 自养脱氮工艺的基本原理
Fig. 9 The principle of autotrophic nitrogen removal process

机物、重金属和抗生素会抑制自养脱氮工艺中的厌氧氨氧化反应. 例如, 何占飞^[94] 研究发现, 过量的亚硝酸盐和有机机会抑制厌氧氨氧化反应. 张正哲^[95] 研究发现, 当废水中 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 的质量浓度分别为 16.3 mg/L 和 20.0 mg/L 时, 联合抑制厌氧氨氧化的作用最强. 李晶^[96] 研究发现, 含量较高的抗生素诺氟沙星和左氧氟沙星可抑制厌氧氨氧化菌的活性. 此外, 温度、pH 值、水力停留时间等因素对自养脱氮工艺处理效果也有较大影响. 赵楠婕等^[97] 研究发现, 在序批式厌氧氨氧化反应器中, 厌氧氨氧化的适宜温度为 (35 ± 1) °C, 适宜 pH 值为 7.5 ~ 8.0. 荀方飞等^[98] 通过多因素试验得出, 在 pH 值为 (7.5 ± 0.1), 温度为 (33 ± 1) °C, 水力停留时间为 1.2 d 的情况下, 厌氧氨氧化反应达到最佳运行状态. S. Wang 等^[99] 使用自养脱氮工艺处理养猪沼液, 通过逐渐缩短水力停留时间, 使 TN 去除负荷达到 3.9 kgN/(m³ · d). 由此可见, 在应用自养脱氮工艺时, 应综合考虑养猪废水中其他污染物和工艺运行参数的影响.

3 结语

本文综述了不同养猪废水处理技术的基本原理和优缺点, 指出传统处理技术多侧重于废水中污染物的去除, 但未考虑 TN 的控制, 难以实现节能降耗和资源的回收利用, 随着养殖业向集约化和工厂化方向的发展, 传统处理技术已经无法满足可持续发展的要求. 而新型处理技术的关键是在已有工艺的基础上强化 TN 的

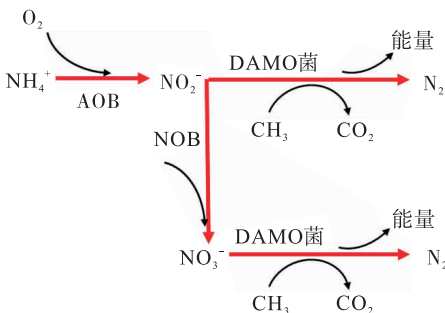


图 8 厌氧甲烷氧化耦合反硝化工艺的基本原理
Fig. 8 The principle of denitrifying anaerobic methane oxidation

去除,不仅可以减少总氮去除过程中的能耗、物耗,还可实现资源的回收利用,在未来的养猪废水处理中具有广阔的应用前景.可以预见,为实现可持续发展战略,实现更严格的出水排放标准,现有处理技术还需在优化运行条件、增加预处理措施、组合多技术处理等方面做出相应的改进;而未来还会涌现出更多的新型养猪废水处理技术,促进养猪废水处理向低耗、高效和高质方向发展.

参考文献:

- [1] 马彦涛,薛金凤. 养猪废水处理技术进展[J]. 环境与可持续发展,2009,34(5):29.
- [2] 中华人民共和国国家统计局. 第一次全国污染源普查公报[J]. 新华月报,2010(6):65.
- [3] 潘庆. 养猪场的废水污染及防治对策[J]. 环境污染治理技术与设备,2002(9):66.
- [4] 万风,王海燕,周岳溪,等. 养猪废水处理技术研究进展[J]. 农业灾害研究,2012,2(1):25.
- [5] 欧阳婷,王涛,樊华. 养猪废水深度治理技术研究进展[J]. 安徽农业科学,2016,44(35):81.
- [6] 张德林. 养猪养殖户沼气池的建设[J]. 现代农村科技,2012(15):78.
- [7] 韦成乔. 生态养猪沼气池的建设和管理研究[J]. 畜禽业,2018,29(11):59.
- [8] 李轶,刘雨秋,张镇,等. 玉米秸秆与猪粪混合厌氧发酵产沼气工艺优化[J]. 农业工程学报,2014,30(5):185.
- [9] 孙全平,邱凌,李自林,等. 酒糟与猪粪混合厌氧发酵产沼气的研究[J]. 西北农业学报,2013,22(3):199.
- [10] 邓媛方,邱凌,孙全平,等. 蘑菇废弃菌棒及其与猪粪混合发酵对沼气产量及质量的影响[J]. 农业环境科学学报,2012,31(3):613.
- [11] LIU Y, MA S C, HUANG L, et al. Two-step heating mode with the same energy consumption as conventional heating for enhancing methane production during anaerobic digestion of swine wastewater [J]. Journal of Environmental Management,2018,209:301.
- [12] 赵青玲,杨世关,张百良. UASB 处理养猪废水条件下进水浓度对污泥颗粒化的影响[J]. 可再生能源,2005(5):38.
- [13] 郑仁宏. UASB 处理畜禽养殖废水的启动研究[D]. 雅安:四川农业大学,2007.
- [14] 万莉,邹义龙,弓晓峰,等. 电增强零价铁强化厌氧氨氧化处理高氮养猪废水[J]. 环境科学研究,2015,28(8):1302.
- [15] ZENG Z, ZHANG M, KANG D, et al. Enhanced anaerobic treatment of swine wastewater with exogenous granular sludge: Performance and mechanism [J]. Science of the Total Environment,2019,697:1.
- [16] ZHOU Z, PING Z, CHENG S, et al. A challenge in anaerobic digestion of swine wastewater: Recalcitrance and enhanced-degradation of dietary fibres [J]. Biodegradation,2019,30(5/6):389.
- [17] CHEN J L, XU Y B, LI Y X, et al. Effective removal of nitrate by denitrification re-enforced with a two-stage anoxic/oxic (A/O) process from a digested piggery wastewater with a low C/N ratio [J]. Journal of Environmental Management,2019,240:19.
- [18] 夏经纬. 倒置 A²/O² 与人工湿地处理猪场废水的试验研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [19] 郑志彬. 预处理/沼气池/两级 AO 工艺处理养殖废水[J]. 资源节约与环保,2018(4):88.
- [20] 陈凤祥. UASB/两级 AO 工艺处理养猪废水的应用研究[J]. 广州化工,2014,43(4):89.
- [21] 陈威,施武斌,龚松,等. EGSB-A/O-MBR 工艺处理规模化猪场废水[J]. 给水排水,2014,40(3):45.

- [22] 曾哲伟. A²/O - 混凝工艺处理养猪场废水 [J]. 广州化工, 2016, 44(11): 185.
- [23] WU X, ZHU J, CHENG J H, et al. Optimization of three operating parameters for a two-step fed sequencing batch reactor (SBR) system to remove nutrients from swine wastewater [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(6): 2857.
- [24] LIU J, LI J, WANG X D, et al. Rapid aerobic granulation in an SBR treating piggery wastewater by seeding sludge from a municipal WWTP [J]. Journal of Environmental Sciences, 2017, 51(1): 332.
- [25] SHENG X L, LIU R, SONG X Y, et al. Comparative study on microbial community in intermittently aerated sequencing batch reactors (SBR) and a traditional SBR treating digested piggery wastewater [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2017, 11(3): 8.
- [26] SONG X Y, LIU R, CHEN L J, et al. Advantages of intermittently aerated SBR over conventional SBR on nitrogen removal for the treatment of digested piggery wastewater [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2017, 11(3): e13.
- [27] LI J Z, MENG J, LI J L, et al. The effect and biological mechanism of COD/TN ratio on nitrogen removal in a novel upflow microaerobic sludge reactor treating manure-free piggery wastewater [J]. Bioresource Technology, 2016, 209: 360.
- [28] MENG J, LI J L, LI J Z, et al. Efficiency and bacterial populations related to pollutant removal in an upflow microaerobic sludge reactor treating manure-free piggery wastewater with low COD/TN ratio [J]. Bioresource Technology, 2016, 201: 166.
- [29] MENG J, LI J L, LI J Z, et al. The role of COD/ N ratio on the start-up performance and microbial mechanism of an upflow microaerobic reactor treating piggery wastewater [J]. Journal of Environmental Management, 2018, 217: 825.
- [30] 施云芬, 魏冬雪. MBBR 两种填料对养猪废水脱氮除磷效果对比 [J]. 化学通报, 2014, 77(6): 562.
- [31] MENG J, LI J L, LI J Z, et al. Enhanced nitrogen removal from piggery wastewater with high NH₄⁺ and low COD/TN ratio in a novel upflow microaerobic biofilm reactor [J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 935.
- [32] 万莉. 规模化养猪场废水(沼液)BCO + SBBR 好氧处理新工艺研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [33] 宋承谋, 蔡映红, 吴正杰, 等. 规模化养猪废水处理问题及对策 [J]. 中国猪业, 2016, 11(2): 66.
- [34] ZHANG X, INOUE T, KATO K, et al. Performance of hybrid subsurface constructed wetland system for piggery wastewater treatment [J]. Water Science and Technology, 2016, 73(1): 13.
- [35] LI X, LI Y Y, LI Y, et al. Diversity and distribution of bacteria in a multistage surface flow constructed wetland to treat swine wastewater in sediments [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102: 10755.
- [36] DONG X, REDDY G. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(4): 1175.
- [37] HAN Z, DONG J, SHEN Z, et al. Nitrogen removal of anaerobically digested swine wastewater by pilot-scale tidal flow constructed wetland based on in-situ biological regeneration of zeolite [J]. Chemosphere, 2019, 217: 364.
- [38] LI L, LIU M, WU M, et al. Effects of duckweed

- (*Spirodela polyrrhiza*) remediation on the composition of dissolved organic matter in effluent of scale pig farms [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 55(5):247.
- [39] WANG W, YANG C, TANG X, et al. Carbon and energy fixation of great duckweed *Spirodela polyrrhiza* growing in swine wastewater [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(20):15804.
- [40] LUO P, LIU F, LIU X, et al. Phosphorus removal from lagoon-pretreated swine wastewater by pilot-scale surface flow constructed wetlands planted with *Myriophyllum aquaticum* [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 576:490.
- [41] LI X, ZHANG M, LIU F, et al. The significance of *Myriophyllum elatinoides* for swine wastewater treatment: Abundance and community structure of ammonia-oxidizing microorganisms in sediments [J]. *PLOS ONE*, 2015, 10(10):e0139778.
- [42] LI X, ZHANG M, LIU F, et al. Abundance and distribution of microorganisms involved in denitrification in sediments of a *Myriophyllum elatinoides* purification system for treating swine wastewater [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(22):17906.
- [43] CHEN L, LIU F, JIA F, et al. Anaerobic ammonium oxidation in sediments of surface flow constructed wetlands treating swine wastewater [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(3):1301.
- [44] HUANG X, ZHENG J, LIU C, et al. Performance and bacterial community dynamics of vertical flow constructed wetlands during the treatment of antibiotics-enriched swine wastewater [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 316:727.
- [45] 敖子强,付嘉琦,桂双林,等. 处理养猪废水的人工湿地植物筛选综述 [J]. *家畜生态学报*, 2016, 37(7):87.
- [46] 许惠英,朱新富,王志荣. 人工湿地技术在养猪废水处理中的应用 [J]. *浙江树人大学学报(自然科学版)*, 2010, 10(4):15.
- [47] 童凯,李俊斌. 养猪废水处理工程实例介绍 [J]. *北方环境*, 2011, 23(7):179.
- [48] 万莉,章洪涛,弓晓峰,等. 鄱阳湖流域养猪废水治理概况与进展 [J]. *南水北调与水利科技*, 2015, 13(4):798.
- [49] 邓玉君,叶志隆,叶欣,等. 流化床造粒法回收猪场废水中氮磷:鸟粪石颗粒的形貌与组成 [J]. *环境工程学报*, 2016, 10(6):2933.
- [50] HUANG H, LIU J, WANG S, et al. Nutrients removal from swine wastewater by struvite precipitation recycling technology with the use of $Mg_3(PO_4)_2$ as active component [J]. *Ecological Engineering*, 2016, 92:111.
- [51] KIM D, MIN K, LEE K, et al. Effects of pH, molar ratios and pre-treatment on phosphorus recovery through struvite crystallization from effluent of anaerobically digested swine wastewater [J]. *Environmental Engineering Research*, 2017, 22(1):12.
- [52] WU Z, ZOU S, ZHANG B, et al. Forward osmosis promoted in-situ formation of struvite with simultaneous water recovery from digested swine wastewater [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 342:274.
- [53] LUO Z, WANG D, YANG J, et al. Nitrogen removal from digested piggery wastewater using fermented superphosphate within the pretreatment stage and an MAP fertilizer pot test [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 212:372.
- [54] 赵倩倩,顾玲. PVDF膜接触器脱除回收垃圾渗滤废液中的氨氮 [J]. *天津化工*, 2014, 28(1):53.
- [55] 张宗阳,郝兴阁,赵建敏,等. 双套型中空纤维

- 膜接触器用于脱除水溶液中氨氮[J]. 高校化学工程学报, 2016, 30(5): 1213.
- [56] 刘芮, 陆军, 李保, 等. 错流式中空纤维膜接触器脱除水中氨氮的实验研究[J]. 工业水处理, 2015, 35(3): 52.
- [57] SHI L, HU Y, XIE S, et al. Recovery of nutrients and volatile fatty acids from pig manure hydrolysate using two-stage bipolar membrane electrodialysis[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 334: 134.
- [58] LIM S, KIM T, KIM J, et al. Enhanced treatment of swine wastewater by electron beam irradiation and ion-exchange biological reactor[J]. Separation and Purification Technology, 2016, 157: 72.
- [59] HUANG H, ZHANG D, GUO G, et al. Dolomite application for the removal of nutrients from synthetic swine wastewater by a novel combined electrochemical process[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 335: 665.
- [60] WANG H M, MIAO Z, LI Y F, et al. Energy self-sustained treatment of swine wastewater in a microbial electrochemical technology-centered hybrid system [J]. Environmental Science: Water Research & Technology, 2020, 6(3): 747.
- [61] DING W J, CHENG S A, YU L L, et al. Effective swine wastewater treatment by combining microbial fuel cells with flocculation[J]. Chemosphere, 2017, 182: 567.
- [62] CERRILLO M, OLIVERAS J, VINAS M, et al. Comparative assessment of raw and digested pig slurry treatment in bioelectrochemical systems [J]. Bioelectrochemistry, 2016, 110: 69.
- [63] CERRILLO M, VINAS M, BONMATI A. Overcoming organic and nitrogen overload in thermophilic anaerobic digestion of pig slurry by coupling a microbial electrolysis cell [J]. Bioresource Technology, 2016, 216: 362.
- [64] SCHERSON Y, WELLS G, WOO S, et al. Nitrogen removal with energy recovery through N_2O decomposition[J]. Energy Environ Sci, 2013, 6(1): 241.
- [65] SCHERSON Y, WOO S, CRIDDLE C. Production of nitrous oxide from anaerobic digester centrate and its use as a co-oxidant of biogas to enhance energy recovery [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(10): 5612.
- [66] WESSBACH M, THIEL P, DREWES J, et al. Nitrogen removal and intentional nitrous oxide production from reject water in a coupled nitrification/nitrous denitrification system under real feed-stream conditions [J]. Bioresource Technology, 2018, 255: 58.
- [67] MEISSBACH M, GOSSLER F, DREWES J, et al. Separation of nitrous oxide from aqueous solutions applying a micro porous hollow fiber membrane contactor for energy recovery [J]. Separation and Purification Technology, 2018, 195: 271.
- [68] WEISSBACH M, DREWES J, KOCH K. Application of the oxidation reduction potential (ORP) for process control and monitoring nitrite in a coupled aerobic-anoxic nitrous decomposition operation (CANDO) [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 343: 484.
- [69] MAYUNG J, WANG Z, YUAN T, et al. Production of nitrous oxide from nitrite in stable type ii methanotrophic enrichments [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(18): 10969.
- [70] GAO H, LIU M, GRIFFIN J, et al. Complete nutrient removal coupled to nitrous oxide production as a bioenergy source by denitrifying polyphosphate-accumulating organisms [J]. American Chemical Society, 2017(8): 4531.
- [71] WANG Y, GAO W, YEN H, et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* JSC-6 with swine wastewater

- for simultaneous nutrient/COD removal and carbohydrate production[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 198:619.
- [72] VIMALKUMAR G, SURESH S, DHARMARJAN R, et al. Use of mixed wastewaters from piggery and winery for nutrient removal and lipid production by *Chlorella* sp. MM3 [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 256:254.
- [73] WEN Y, HE Y, JI X, et al. Isolation of an indigenous *Chlorella vulgaris* from swine wastewater and characterization of its nutrient removal ability in undiluted sewage[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243:247.
- [74] LEE Y, HAN G. Complete reduction of highly concentrated contaminants in piggery waste by a novel process scheme with an algal-bacterial symbiotic photobioreactor [J]. *Journal of Environmental Management*, 2016, 177:202.
- [75] YU J, HU H, WU X, et al. Coupling of biochar-mediated absorption and algal-bacterial system to enhance nutrients recovery from swine wastewater [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 701:1.
- [76] GUO G, CAO W, SUN S, et al. Nutrient removal and biogas upgrading by integrating fungal-microalgal cultivation with anaerobically digested swine wastewater treatment [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2017, 29(6):2857.
- [77] KIM H, CHOI W, CHAE A, et al. Evaluating integrated strategies for robust treatment of high saline piggery wastewater [J]. *Water Research*, 2016, 89:222.
- [78] WANG M, YANG Y, CHEN Z, et al. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 222:130.
- [79] 袁林江, 彭党聪, 王志盈. 短程硝化-反硝化生物脱氮 [J]. *中国给水排水*, 2000(2):29.
- [80] 于德爽, 彭永臻, 张相忠, 等. 中温短程硝化反硝化的影响因素研究 [J]. *中国给水排水*, 2003(1):40.
- [81] 尚会来, 彭永臻, 张静蓉, 等. 温度对短程硝化反硝化的影响 [J]. *环境科学学报*, 2009, 29(3):516.
- [82] 曾薇, 彭永臻, 王淑莹, 等. 两段 SBR 法去除有机物及短程硝化反硝化 [J]. *环境科学*, 2002(2):50.
- [83] 高大文, 彭永臻, 杨庆, 等. 应用实时控制实现和稳定短程硝化反硝化 [J]. *中国给水排水*, 2003(12):1.
- [84] 董文艺, 赵志军, 李继. 甲烷作为反硝化气体碳源的研究进展 [J]. *安全与环境工程*, 2011, 18(4):64.
- [85] 王东豪, 廖方成, 邓正栋, 等. 氧气浓度对好氧甲烷氧化耦合反硝化过程的影响 [J]. *净水技术*, 2019, 38(7):101.
- [86] 范秋香, 吴箐, 常佳丽, 等. 反硝化型甲烷厌氧氧化的研究进展 [J]. *生态学杂志*, 2015, 34(6):1747.
- [87] XIE G, LIU T, CAI C, et al. Achieving high-level nitrogen removal in mainstream by coupling anammox with denitrifying anaerobic methane oxidation in a membrane biofilm reactor [J]. *Water Research*, 2018, 131:196.
- [88] FAN S, XIE G, LU Y, et al. Granular sludge coupling nitrate/nitrite dependent anaerobic methane oxidation with anammox: From proof-of-concept to high rate nitrogen removal [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(1):297.
- [89] HU Z, RU D, WANG Y, et al. Optimization of a nitrite-dependent anaerobic methane oxidation (n-damo) process by enhancing methane availability [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 275:101.
- [90] CAI C, HU S, CHEN X, et al. Effect of methane

- partial pressure on the performance of a membrane biofilm reactor coupling methane-dependent denitrification and anammox[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 639:278.
- [91] BEATRIZ M, CRUZ G, DIMITAR K, et al. Anammox for ammonia removal from pig manure effluents: Effect of organic matter content on process performance [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(7):2171.
- [92] ZHANG Z, ZHANG Q, XU J, et al. Long-term effects of heavy metals and antibiotics on granule-based anammox process: Granule property and performance evolution [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5):2417.
- [93] NI S, YANG N. Evaluation of granular anaerobic ammonium oxidation process for the disposal of pre-treated swine manure [J]. *PeerJ*, 2014, 2(1):e336.
- [94] 何占飞. 厌氧氨氧化处理养殖废水启动实验研究[D]. 西安:西南交通大学, 2008.
- [95] 张正哲. 重金属离子对厌氧氨氧化颗粒污泥的影响及其修复策略研究[D]. 杭州:杭州师范大学, 2016.
- [96] 李晶. 氟喹诺酮抗生素对厌氧氨氧化菌活性抑制研究[D]. 大连:大连理工大学, 2015.
- [97] 赵楠婕, 解庆林, 游少鸿, 等. 厌氧氨氧化工艺处理猪场废水沼液的试验研究[J]. *四川环境*, 2012, 31(5):4.
- [98] 荀方飞, 何占飞, 葛亚军, 等. 厌氧氨氧化处理猪场养殖废水最佳运行工艺研究[J]. *广东农业科学*, 2010, 37(7):174.
- [99] WANG S, WANG L, DENG L W, et al. Performance of autotrophic nitrogen removal from digested piggery wastewater [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 241:465.

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, 国家科技学术期刊开放平台, 博视网, 超星, 中国科技论文在线, 中教数据库, EBSCOhost, CA, Ulrichs, FSTA 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:金保华,张明星,吴怀广,等.一种基于电力大数据的反窃电预测方法[J].轻工学报,2020,35(4):81-87.

中图分类号:TM73 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.011

文章编号:2096-1553(2020)04-0081-07

一种基于电力大数据的反窃电预测方法

A prediction method of anti-electricity stealing based on big data of electric power

金保华,张明星,吴怀广,石永生

JIN Baohua, ZHANG Mingxing, WU Huaiguang, SHI Yongsheng

关键词:

反窃电预测;异常规则分析;电力大数据;线损率增长率

郑州轻工业大学 计算机与通信工程学院,河南 郑州 450001

College of Computer and Communication Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

Key words:

prediction of anti-electricity stealing; abnormal rule analysis; big data of electric power; growth rate of line loss rate

摘要:针对传统的反窃电预测方法准确度低的问题,提出了一种基于电力大数据的反窃电预测方法.该方法根据异常规则构造窃电数据样本,引入线损率增长率这一约束条件,使用4种机器学习分类算法分别在电压、电流和功率因数数据集上构建预测模型,将其输出的数据异常用户与线损异常用户相结合,输出疑似窃电用户清单.实验结果表明,该方法预测准确度令人满意,在疑似窃电用户识别方面是高效可行的.

收稿日期:2020-03-27

基金项目:国家自然科学基金项目(61672470,61802350);国家重点研发计划项目(2016YFE0100600,2016YFE0100300)

作者简介:金保华(1966—),男,河南省郑州市人,郑州轻工业大学教授,主要研究方向为人工智能、计算机决策支持系统、计算机软件和理论、应急管理.

Abstract: Aiming at the problem of low accuracy of traditional prediction methods of anti-electricity stealing, a prediction method of anti-electricity stealing based on big data of electric power was proposed. This method firstly constructed samples of electricity stealing data according to abnormal rules, and introduced the growth rate of line loss rate constraint conditions. Then it used four machine learning classification algorithms to build a prediction model on the voltage, current and power factor data sets respectively, combined the users with abnormal data output and users with abnormal line loss to output a list of users suspected of stealing electricity. Experimental results showed that the prediction accuracy of the method was satisfactory, and it was efficient and feasible in identifying users suspected of stealing electricity.

0 引言

麦肯锡研究所认为:大数据已经成为能够改变世界的第一科学技术^[1-2]。2008年,Nature在其杂志里提到“Big Data”这一概念,描述了现代互联网技术和计算机系统面对未来海量数据时将面临的种种挑战。随后,Amazon、IBM、Google等跨国公司纷纷加入到对大数据的研究队伍中,推动了大数据技术的快速发展,并将其普及至行业应用^[3-9]。大数据技术和智能电网的融合就是大数据理念和方法在电力行业的实践和应用。目前,我国拥有丰富的数据资源、用户资源和应用市场优势,促使大数据的关键技术研发取得了重大突破。随着国家电网智能化和信息化程度的加深,智能电网的管理也进入到了大数据时代。

近年来,电力与经济社会发展的关系密不可分,人们的生产生活对电能的依赖程度也越来越高^[10-11],但窃电行为的存在使得世界各国都承受着巨大的损失。我国每年因为窃电造成的经济损失高达200亿元左右^[12-13],除此之外,由于窃电导致的各种事故所造成的间接损失更加巨大。当前窃电行为的主要特点是窃电过程隐蔽化、窃电手段高科技化、窃电数量大额化。目前,欧美等发达国家走在高科技反窃电技术的前沿,已经研发出了用于降低非技术损耗的反窃电装置,并在北美的各大电力部门进行使用,反窃电产品还被大量销往巴西、委内瑞拉、哥伦比亚等国家^[14-17]。

长期以来,我国在反窃电方面已取得了一些成效,但是传统的检测手段逐渐无法满足当前反窃电的需求。随着信息科技的进步,很多学者开始结合数据挖掘、分析技术来预测可能存在的窃电行为。窦健等^[18]在异常检测模型里加入了线损异常这一约束条件,提高了异常检测的准确率。吴迪等^[19]利用鱼骨图表示特征参量,建立了多维度电参量的相关特征参量集合,并提出基于大数据的防窃电结构化模型。庄池杰等^[20]提出了基于无监督学习的异常用电检测模型,包括特征提取、主成分分析、网格处理等模块。程超等^[21]为了解决传统方法时效低的问题,由实际案例统计确定研究重点,根据计量装置的特点、电压电流值的规律和离群点理论,提出了基于距离的离群点检测法来判定是否存在窃电行为。王新霞等^[22]也提出根据离群点检测的方式来挖掘窃电用户。以上方法均可在一定程度上识别窃电行为,但是时间复杂度较高,且仅对采集系统中的数据进行预处理,可能会遗漏很多有价值的信息,从而导致模型准确率不高。当前电力系统建设尚不完善导致采集系统数据类型繁多、数据结构复杂,如果将异常规则分析与电压、电流、线损等数据相结合构建反窃电模型,将会覆盖更多的异常情况。

鉴于此,本文拟提出基于电力大数据的反窃电预测方法,该方法将异常识别规则和机器学习算法结合起来,并引入线损率增长率进行综合分析,以期更加高效地识别窃电用户。

1 反窃电预测方法设计

1.1 设计思路

基于电力大数据的反窃电预测方法设计思路如图 1 所示,具体可分为以下 4 个步骤。

步骤 1 确定能反映用户用电行为的特征,从采集系统中提取相关数据.本文用于模型训练的数据是电压、电流和功率因数。

步骤 2 对数据进行预处理,查看数据中是否存在缺失值、异常值,以及数据类型不统一等问题,并对数据进行清洗,使用拉格朗日插值法填充缺失值,使用独热编码(one-hot)对不同特征中的数据格式进行转换,使之全部变成数值型数据.根据异常规则分析构造窃电数据,非窃电数据从没有窃电记录的用户数据中获得,窃电数据和非窃电数据共同组成建模数据。

步骤 3 使用多种机器学习分类算法对数据进行训练以构建反窃电预警模型,计算各个线路前、后几天的线损率平均值,并计算两个平均值的增长率,如果线损率平均值增长率过大,即可认为该线路上的用户有可能发生窃电行为.综合考虑算法模型输出的数据异常用户和线损异常用户,输出最终的疑似窃电用户清单。

步骤 4 对比分析多个模型的实验结果,分别从算法角度和数据角度对反窃电预警模型进行评估,最终实现对多种算法和多种数据建

模效果的对比分析.如果窃电用户的识别正确率比较低,则将实验分析结果反馈给异常规则、算法模型和线损异常判断模块,根据结果对异常规则中的阈值作相应的调整,并调节算法模型和线损异常判断中的参数,以达到不断优化模型的目的,直到取得较好的实验结果。

1.2 数据的获取

在步骤 3 中,构建反窃电算法模型需要正、负两类样本,其中正样本是指正常用电数据,负样本是指窃电数据.但是由于前期反窃电工作的不完善,导致采集系统中无法直接根据窃电起始日期截取窃电数据,这也是模型建立过程中的难点之一.考虑到目前反窃电研究中使用比较多的手段是异常规则分析^[23],为了获取窃电数据,本文使用几种常见的异常规则对数据进行分析;非窃电数据就从没有窃电记录的用户数据中获得。

异常规则分析就是根据电能表中的电流数据、电压数据、功率因数数据对用电客户的用电情况进行检测分析.在实际应用中,如果用户的用电数据符合相应的异常规则,那么就认为该用户符合窃电的异常情况.常见的异常规则是电压断相异常、电压越限异常和三相不平衡异常,具体异常规则描述如表 1 所示,其中, U' 为额定电压;规则中 K 的取值范围为 50% ~ 70%, $K_1 = 110%$, $K_2 = 90%$, $K_3 = 60%$,这些取值

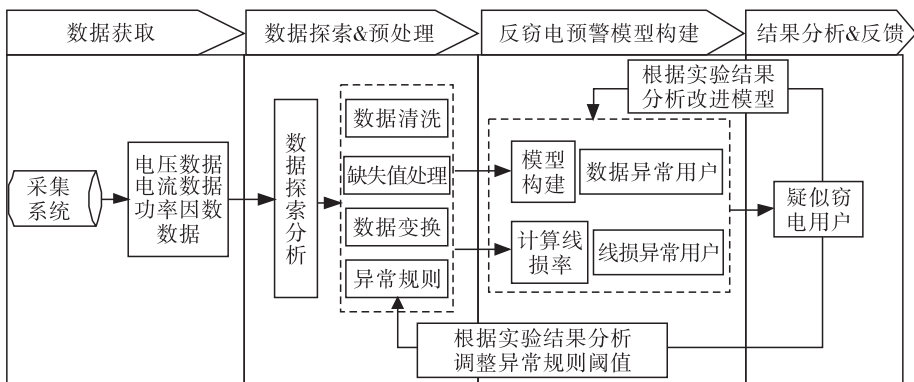


图 1 反窃电预测方法设计思路

Fig. 1 Design idea of the prediction method of anti-electricity stealing

参考了文献[24]在异常用电方面的研究结果; m 、 n 、 i 都是需要调节的整数型阈值,根据步骤4的分析结果反馈调整取值,调整时步长均为1,直到达到较好的预测效果.由于电能表计量方式和接线方式不同,表1中的额定电压取值也有所不同,其取值如表2所示.

1.3 线损率增长率

本文在使用机器学习算法进行模型构建时,引入了线损率增长率,综合考虑算法模型输出的数据异常用户和线损异常用户,输出最终的疑似窃电用户清单.由于在确定疑似窃电用

表1 异常规则描述

Table 1 Description of the abnormal recognition rules

规则名称	规则描述	备注
电压 断相	三相三线: $\min(U_a, U_c) < K \times U'$ $U_b \geq K \times U'$	如果1 d内有连续 m 个以上的数据点出现断相异常,且该状态持续 n d,即可确定该用户为异常用电
	三相四线: $\min(U_a, U_b, U_c) < K \times U'$ & $\max(U_a, U_b, U_c) \geq K \times U'$	
电压 越限	三相三线: $\max(U_a, U_c) > K_1 \times U'$ $\max(U_a, U_c) \geq K_3 \times U'$ & $\min(U_a, U_c) \leq K_2 \times U'$	如果1 d内有连续 m 个以上的数据点符合越限异常,且该状态持续 n d,即可确定该用户为异常用电
	三相四线: $\max(U_a, U_b, U_c) > K_1 \times U'$ $\max(U_a, U_b, U_c) \geq K_3 \times U'$ & $\min(U_a, U_b, U_c) \leq K_2 \times U'$	
三相 不平衡	三相三线: $imbalance_rate = \frac{\max(I_a, I_c) - \min(I_a, I_c)}{\max(I_a, I_c)}$ 三相四线: $imbalance_rate = \frac{\max(I_a, I_b, I_c) - \min(I_a, I_b, I_c)}{\max(I_a, I_b, I_c)}$	$imbalance_rate > i\%$ 即为异常点,如果1 d内的异常点大于 m 个,且该状态持续 n d,那么该用户的用电情况就被视为异常

表2 不同电能表额定电压的取值

Table 2 Value of rated voltage of different vott-hour meters

计量方式	接线方式	U'/V
高供高计	三相三线	100.0
高供高计	三相四线	57.7
高供低计	三相四线	220.0

户清单时,增加了线损异常这一限制条件,故较单纯的算法模型准确率更高.

电网的线损率是一项重要技术指标,可以直接反映供电线路中的电能损耗.虽然线损在电路输电过程中无法避免,但是线损率一般都会控制在合理范围内,如果线损率异常,即可视为该线路可能存在窃电用户.线损率计算公式为

$$t_l = \frac{s_l - f_l}{s_l} \times 100\%$$

其中, s_l 是第 l d 某线路的总供电量, f_l 是该线路上所有用户的总用电量.

通常情况下,用户如果发生窃电行为,则其所在线路的线损率应该也会下降,但是由于用户每天的用电量都存在波动,因此单纯地以当天线损率的下降作为是否窃电的评判标准并不合适.本文设置5 d的统计窗口期,用以计算线损率平均值,其中线损率增长率计算公式如下:

$$increase_rate = \frac{V_1 - V_2}{V_2} \times 100\%$$

其中, V_1 为前5 d的线损率平均值, V_2 为后5 d的线损率平均值.若 $increase_rate > 1\%$,则认为该线路上可能存在窃电用户.

2 实验结果与分析

2.1 实验数据

本文使用的数据是某市高压用户的电压数据、电流数据、功率因数数据和线损数据.其中,电流数据共12 455 147条,对应19 049个用户;电压数据共10 525 026条,对应19 048个用户;功率因数数据共13 269 943条,对应19 042个用户;线损数据共3 328 392条,对应16 946个线路的线损.由于电压数据、电流数据、功率因数数据特征之间关系较为复杂,这些数据在进行空值填充、数据格式转换等预处理后,还需要进行数据降维和数据合并.

1) 数据降维:在实际的反窃电工作中,窃电用户一旦开始实施窃电,一般都会维持至少

数个小时,因此只需要保留每天的24个整点时刻数据,即进行数据降维。

2) 数据合并:已有的数据中,电能表每隔15 min记录一次数据,因此一天中每个电能表的每一相都会有96点数据。每个电能表有三相(A相、B相、C相),即每天对应有3条数据,通过计算三相不平衡率将每天的3条数据合并成一条,可以降低数据复杂度,提高程序的运算效率。

本文数据点数 m 的取值范围是1—24,对应一天中的24 h;天数 n 的取值范围是1—10, n 值过大会漏掉一些短期窃电用户,因此最大调整到10即可; i 的取值范围是1—100。它们所对应的最佳阈值分别为: $m = n = 3, i = 80$ 。

2.2 模型评估指标

本文引入了召回率(recall rate)和精准率(precision rate)两项指标对模型预测能力进行评估。召回率越高,代表预测正确的窃电用户数量在真实窃电用户中所占的比例越高,反映了正确识别窃电用户的能力。精准率越高,代表预测窃电用户的准确性越高。召回率和精准率的公式分别为

$$\text{召回率} = n_{pre_real} / n_{real}$$

$$\text{精准率} = n_{pre_real} / n_{pre}$$

其中, n_{real} 是真实窃电用户的个数; n_{pre} 是模型预测的窃电用户个数; n_{pre_real} 是 n_{real} 和 n_{pre} 的交集,即预测结果与实际相符的窃电用户个数。

当召回率和精准率无法同时兼顾时,以度量值 F_1 来衡量模型的优劣:

$$F_1 = 2 \times \frac{\text{召回率} \times \text{精准率}}{\text{召回率} + \text{精准率}} \times 100\%$$

2.3 结果与分析

为了验证本文提出方法的有效性,使用随机森林、逻辑回归、决策树和支持向量机4种分类算法构建分类模型,将这4种算法模型分别应用在电流、电压、功率因数3种不同的数据集上,以此来比较不同算法模型在反窃电预测方

法中的实践效果。为了提高模型的泛化性,实验均采用五折交叉验证,实验结果如表3—5所示。对比表3—5中引入线损率增长率前后的 F_1 值可以看出,引用线损率增长率之后, F_1 均有不同幅度的提高,这说明引入线损率增长率有助于提高疑似窃电用户识别的准确率,因此接下来的对比分析均采用引入线损率增长率的实验结果。

由表3可知,相比较其他3种算法模型,决策树分类模型表现最好,其精准率虽然不是最高,但是其 F_1 和召回率都达到最高值,分别为79.07%和85.00%,意味着该模型可以找到85.00%的窃电用户;逻辑回归分类模型表现最差, F_1 和召回率最低,只有57.97%和50.00%,意味着该模型只能够找到一半的窃电用户。因此,在使用电流数据建模时,使用决策树分类算法来训练数据,构建的反窃电模型最为有效。

由表4可知,4种模型的 F_1 差距不大,均在70.00%左右,说明使用电压数据进行模型构建,结果相对稳定。其中,随机森林分类模型表现最好, F_1 为72.00%,且召回率和精准率也都能达到70.00%以上,3个度量指标比较集中稳定;逻辑回归分类模型和支持向量机分类模型效果最差。因此在使用电压数据做训练时,采用随机森林算法进行建模效果最好,可以准确地识别出70.00%以上的窃电用户。

由表5可知,4种算法模型的 F_1 都低于70.00%,说明使用功率因数数据进行窃电用户识别的模型构建并不理想。对比这4种算法的表现,支持向量机分类模型相对于另外3种稍占优势, F_1 为68.60%,虽然该模型的精准率只有52.2%,但是其召回率可以达到100.00%。因此在实际应用中,如果需要尽可能覆盖所有窃电用户,可以考虑使用支持向量机进行模型的构建。

根据表3—5,计算每种算法的实验结果在

表3 基于电流数据的多个算法模型评估结果

Table 3 The assessment results of multiple algorithm models based on the data of electric current %

算法模型	精准率		召回率		F_1	
	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后
随机森林	69.55	81.08	78.38	75.00	73.70	77.92
逻辑回归	52.98	68.97	60.04	50.00	56.29	57.97
决策树	72.33	73.90	85.67	85.00	78.44	79.07
支持向量机	43.45	58.70	78.77	67.50	56.01	62.79

表4 基于电压数据的多个算法模型评估结果

Table 4 The assessment results of multiple algorithm models based on the data of voltage %

算法模型	精准率		召回率		F_1	
	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后
随机森林	59.66	72.80	75.23	71.30	66.55	72.00
逻辑回归	49.07	52.50	100.00	100.00	65.83	68.90
决策树	52.33	69.90	76.47	69.10	62.14	69.50
支持向量机	51.32	52.50	100.00	100.00	67.83	68.90

表5 基于功率因数数据的多个算法模型评估结果

Table 5 The assessment results of multiple algorithm models based on power factor data %

算法模型	精准率		召回率		F_1	
	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后	引入线损率 增长率前	引入线损率 增长率后
随机森林	53.73	57.70	74.04	73.20	62.27	64.50
逻辑回归	35.02	55.70	92.06	89.00	50.74	68.50
决策树	57.01	61.40	66.34	65.90	61.32	63.50
支持向量机	43.02	52.20	100.00	100.00	60.16	68.60

不同数据集上的算术平均值,结果见表6.由表6可知,随机森林算法在3个数据集上的表现较优,精准率和 F_1 最高,分别为70.53%和71.47%,召回率也达到73.17%,因此从算法角度进行综合考量,可以认为随机森林是4种常见的分类算法中最为合适的模型构建算法.

本文用来训练的数据集主要是电流数据、电压数据和功率因数数据.从数据的角度分析,可以了解使用哪个数据集进行模型构建更为准确高效.根据表3—5,计算每种数据集上4种算法实验结果的算术平均值,结果见表7.由表7可知,相对于电流数据和功率因数数据,使用电压数据的模型精准率虽然不高,但是其召回

表6 使用不同算法模型的评估结果

Table 6 The assessment results of different

算法模型	algorithm models %		
	精准率	召回率	F_1
随机森林	70.53	73.17	71.47
逻辑回归	59.06	79.67	65.12
决策树	68.40	73.33	70.69
支持向量机	54.47	89.17	66.76

表7 使用不同数据集构建模型的评估结果

Table 7 The assessment results of model construction with different dataset %

数据集	精准率	召回率	F_1
电流	70.66	69.38	69.44
电压	61.93	85.10	69.83
功率因数	56.75	82.03	66.28

率和 F_1 都最高,说明可以覆盖更多的窃电用户,因此可以认为电压数据用于反窃电模型构建最合适;使用功率因数数据进行建模分析效果最差,精准率只有 56.75%,意味着实验中有近一半的疑似窃电用户识别错误, F_1 也只有 66.28%。综合 F_1 分析,可以认为在实际应用中,使用电压数据构建的反窃电模型最为高效可行。

无论是从算法角度分析不同机器学习模型的综合表现,还是从数据角度对比不同数据进行模型训练的实验结果,引入线损率增长率后,3个评估指标均可达到 70.00% 左右,因此可以认为本文提出的基于电力大数据的反窃电预测方法在疑似窃电用户识别方面高效可行。

3 结语

针对窃电事件屡禁不止、传统的反窃电手段准确度低的问题,提出了一种基于电力大数据的反窃电预测方法。该方法融合异常规则分析和机器学习技术,首先根据异常规则构造窃电样本,引入线损率增长率,然后使用多种算法分别在电压、电流和功率因数数据集上构建预测模型,将其输出的数据异常用户与线损异常用户相结合,输出疑似窃电用户清单。为了验证方法的可行性,分别从算法角度和数据角度对反窃电模型进行评估,结果表明,本文提出的基于电力大数据的反窃电预测方法在疑似窃电用户识别方面高效可行。但是该方法目前只是针对高压用户构建模型,后续将会针对低压用户的数据进行研究分析。

参考文献:

[1] PAN W, YANG Q, AGGARWAL C, et al. Big data [J]. IEEE Intelligent Systems, 2007, 32(2): 7.
 [2] 王红平,唐永锋.大数据思维在高校学生信息化管理中的支撑作用[J].科技创新导报, 2018, 15(13): 231.

[3] JOSHI P, RAO P. Global pulses scenario: Status and outlook [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2017, 1392(1): 6.
 [4] SEVERIN A J. Dealing with data: Training new scientists [J]. Science, 2011, 331(6024): 1516.
 [5] BIRNEY E. The making of ENCODE: Lessons for big-data projects [J]. Nature, 2012, 489(7414): 49.
 [6] 孙宏斌,郭庆来,潘昭光.能源互联网:理念、架构与前沿展望[J].电力系统自动化, 2015, 39(19): 1.
 [7] PULSE U. Big data for development: Challenges & opportunities [EB/OL]. (2012 - 11 - 05) [2018 - 09 - 10]. <http://www.unglobalpulse.org/projects/BigdataDevelopment>.
 [8] AGRAWAL D, BERNSTEIN P, BERTINO E, et al. Challenges and opportunities with big data [EB/OL]. (2012 - 02 - 01) [2018 - 09 - 15]. <http://www.cra.org/ccc/resources/ccc-led-white-papers>.
 [9] FANG X, MISRA S, XUE G, et al. Smart grid——The new and improved power grid: A survey [J]. IEEE Communications Surveys & Tutorials, 2012, 14(4): 944.
 [10] CHEN L J, XU X H, WANG C M. Research on anti-electricity stealing method base on state estimation [C] // Proceedings of Power Engineering and Automation Conference (PEAM). Piscataway: IEEE, 2011.
 [11] 李海.用电监察面临的问题及反窃电措施[J].企业改革与管理, 2014(4): 119.
 [12] 周瑾.窃电与防窃电[J].电力与电工, 2004, 24(3): 73.
 [13] 沈海泓.远方电能计量运行监测系统研究[D].保定:华北电力大学(河北), 2004.
 [14] 李小佳.对反窃电技术研究及“零距离”复录系统的实现[D].广州:华南理工大学, 2011.



引用格式:过金超,杨继纲. 基于改进的 SVD 算法和二分 K - 均值聚类算法的协同过滤算法 [J]. 轻工学报,2020,35(4):88 - 95.

中图分类号:TP301.6 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.012

文章编号:2096 - 1553(2020)04 - 0088 - 08

基于改进的 SVD 算法和 二分 K - 均值聚类算法的协同过滤算法

Collaborative filtering algorithm based on the improved SVD algorithm and binary K-means clustering algorithm

过金超,杨继纲

GUO Jinchao, YANG Jigang

关键词:

个性化推荐; SVD 算法; 二分 K - 均值聚类算法; 协同过滤; 矩阵分解

郑州轻工业大学 电气信息工程学院, 河南 郑州 450002

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

Key words:

personalized recommendation; SVD algorithm; binary K-means clustering algorithm; collaborative filtering; matrix factorization

摘要:针对传统的协同过滤算法存在稀疏性较大和扩展性较差的问题,提出了基于改进的奇异值分解(SVD)算法和二分 K - 均值聚类算法的协同过滤算法. 该算法首先利用改进的 SVD 算法对稀疏的用户 - 项目评分矩阵进行降维,获得用户隐含特征矩阵,然后运用二分 K - 均值聚类算法对相似用户进行聚类来提升算法的可扩展性,最后利用最近邻居集的评分修正目标用户的评分,以减小因矩阵分解导致用户信息丢失造成的误差. 利用 MovieLens 100K 数据集进行的实验结果表明,与传统的基于用户的协同过滤算法、基于 K - 均值聚类的协同过滤算法和隐语义模型(LFM)算法相比,本文提出的算法能够有效提高推荐结果的准确性.

收稿日期:2020 - 04 - 11

基金项目:国家自然科学基金河南省联合项目(U1704149)

作者简介:过金超(1978—),男,河南省开封市人,郑州轻工业大学副教授,博士,主要研究方向为机器人智能控制与信息融合.

Abstract: Aiming at the problem of large sparseness and poor scalability of traditional collaborative filtering algorithms, a collaborative filtering algorithm based on the improved singular value decomposition (SVD) algorithm and binary K-means clustering algorithm was proposed. The algorithm firstly used the improved SVD algorithm to reduce the dimensionality of the sparse user-item rating matrix to obtain the user implicit feature matrix, then used the binary K-means clustering algorithm to cluster similar users to improve the scalability of the algorithm, and finally used the nearest neighbor set score to correct the target user's score to make up for the error caused by the loss of user information due to matrix factorization. Experimental results on the MovieLens 100K data set showed that compared with the traditional user-based collaborative filtering algorithm, K-means clustering-based collaborative filtering algorithm and latent factor model (LFM) algorithm, this method could effectively improve the accuracy of recommendation results.

0 引言

当前,随着网络技术的迅猛发展,人们可获取的网络信息量日益增多.在这个信息过载的年代,人们对于信息的筛选、分辨变得异常困难,如何更快更高效地获取所需要的信息已成为人们关注的焦点^[1].

为缓解信息过载、数据冗杂、选择困难等问题,研究人员将目光投向个性化推荐系统.推荐系统可以根据每个用户的历史行为,分析出用户潜在的喜好,将用户可能感兴趣的内容推荐给用户^[2].个性化推荐系统目前已广泛应用于电影、新闻、音乐、电子商务、社交网络等领域.

推荐算法作为推荐系统的核心内容,一直是国内外研究的热点.常见的推荐算法有基于矩阵分解的推荐算法、基于混合算法的推荐算法、基于协同过滤的推荐算法、基于深度学习的推荐算法、基于内容的推荐算法、基于关联规则的推荐算法等^[3-4].

协同过滤 CF(collaborative filtering)算法,是运用较早也是推荐效果较好的一种推荐算法.CF算法主要基于用户的历史行为构建用户和项目之间的评分矩阵,根据评分矩阵的相似性向用户做出推荐,一般分为两种情况:一种是基于用户的协同过滤推荐,另一种是基于项目的协同过滤推荐^[5].但是随着数据量的不断增大、评分矩阵较稀疏等原因,CF算法的推荐效

果不是很理想.近年来,为了改善数据稀疏性和算法可扩展性,研究人员做了许多研究,例如通过降维技术或聚类技术来改善传统 CF算法的不足^[6-9].H. Koochi等^[6]提出了一种基于用户的模糊 C-均值方法,提高了推荐准确率和可扩展性,但没有解决数据稀疏的问题;X. Su等^[7]使用了基于用户聚类的协同过滤算法,通过对用户评分矩阵运用 K-均值聚类算法,把相似度较高的用户分到同一个簇中,以减少搜索最近邻的时间,但是由于初始质心是随机选取的,可能导致质心聚集造成推荐质量下降;孙小华等^[8]在协同过滤中结合奇异值分解 SVD(singular value decomposition)和 K-近邻(KNN)算法改善了数据稀疏性造成的影响,但传统的 SVD算法对较大数据集的处理效果仍不理想;刘艺等^[9]采用 BP神经网络来预测评分,虽然可以改善数据稀疏造成的影响,但需要花费更长的近邻查找时间.

鉴于此,本文拟提出一种基于改进的 SVD算法和二分 K-均值聚类算法的协同过滤算法,通过改进的 SVD算法获得用户隐含特征矩阵,然后使用二分 K-均值聚类算法将相似度较高的用户划分到同一个簇中,最后通过最近邻算法预测目标用户对项目的评分,以期降低由数据稀疏性带来的推荐结果误差,提高推荐准确率并提升算法的可扩展性.

1 算法设计

本文提出了基于改进的 SVD 算法和二分 K - 均值聚类算法的协同过滤推荐算法. 改进的 SVD 算法对高度稀疏的矩阵拥有较好的推荐效果; 二分 K - 均值聚类算法可以提高查找用户邻居集的效率, 提升算法的可扩展性.

1.1 传统 SVD 技术及其改进

SVD 是线性代数中常见的重要矩阵分解技术之一. 矩阵分解通过降低数据的维度提高算法的运行速度, 同时能够得出数据的主要信息, 减少数据特征的数量. 在推荐系统中, 基于 SVD 的矩阵分解算法一直以来都具有良好的性能和表现.

由于 SVD 分解矩阵需要矩阵的全部数据, 所以要先将稀疏的初始评分矩阵 \mathbf{R} 中的每一个缺失数据都补充上相应的用户评分. B. Sarwar 等^[10] 提出, 可以将 \mathbf{R} 做归一化处理, 将评分矩阵的每一个元素都减去所有已知用户评分的平均值, 再对其做 SVD 分解. SVD 的分解公式为

$$\mathbf{R}_{n \times r} = \mathbf{U}_{n \times s} \mathbf{\Sigma}_{s \times s} \mathbf{V}_{s \times r}^T$$

其中, \mathbf{R} 是一个 n 行 r 列的矩阵, 左奇异矩阵 \mathbf{U} 是一个 n 行 s 列的标准正交矩阵, 右奇异矩阵 \mathbf{V}^T 是一个 s 行 r 列的标准正交矩阵, $\mathbf{\Sigma}$ 是一个 s 行 s 列的对角矩阵. $\mathbf{\Sigma}$ 矩阵对角元素是从大到小排列的, 被称为初始矩阵 \mathbf{R} 的奇异值. 在实际应用中, 通常只取前 m 个奇异值, 它们保留了矩阵中 90% 的能量信息, 剩余的奇异值置零, 这就意味着在这个数据集中只有 m 个重要的数据特征, 其余的特征则是噪声或者是冗余的特征.

由于传统 SVD 技术需要将稀疏矩阵填充为稠密矩阵, 运算量较大, 计算过程较为复杂, 所以本文提出了一种新的矩阵分解方式: 将初始的评分矩阵 \mathbf{R} 分解成两个小的矩阵 \mathbf{X} 和 \mathbf{Y} , \mathbf{X} 为用户隐含特征矩阵, \mathbf{Y} 为物品隐含特征矩阵. 其建模公式为

$$\mathbf{R}_{n \times r} = \mathbf{X}_{n \times J} \mathbf{Y}_{r \times J}^T$$

其中, J 表示隐含特征因子的个数, 矩阵 $\mathbf{X}_{n \times J}$ 每一行为用户的隐含特征向量, 矩阵 $\mathbf{Y}_{r \times J}$ 的每一行为项目的隐含特征向量. 利用用户和项目的隐含特征向量可以求解用户 u 对还未评分的项目 i 可能的预测评分, 其公式为

$$\hat{R}(u, i) = \sum_{j=1}^J X_{uj} Y_{ij} \quad (1)$$

其中, $\hat{R}(u, i)$ 是模型预估的用户 u 对项目 i 的预测评分, X_{uj} 表示用户 u 的第 j 个特征值, Y_{ij} 表示物品 i 的第 j 个特征值.

1.2 二分 K - 均值聚类算法

随着推荐系统中用户和项目数量指数式上涨, 导致算法的计算量大增, 查找邻居集所花的时间也越来越长. 所以本文采用聚类技术来缩短查找邻居集所用的时间, 进一步提高推荐的速度和实时性^[7]. 聚类算法属于一种无监督学习算法, 其基本思路是把一堆物品或者数据按一些特定的规则进行分类, 从而使相似的物品或数据尽可能分在同一类别(簇)中.

K - 均值聚类算法是较流行的聚类算法之一, 其优点是实现难度较低, 聚类效果较好^[11]. K - 均值聚类算法的基本思想是通过迭代将数据集划分为 k 个簇, 使得相同簇中数据之间的相似性较大, 不同簇中数据之间的相似性较小. 但是 K - 均值聚类算法存在收敛于局部最小值的问题, 因此, 研究人员提出了一种优化的算法, 即二分 K - 均值聚类算法. 该算法首先把所有点作为一个簇, 之后把这个簇一分为二, 然后再选择其中一个簇进行 K - 均值聚类 ($k = 2$), 选取簇的标准是对该簇进行划分是否能最大可能地降低误差平方和的值, 误差平方和是一种用来度量聚类效果的指标, 其值越小说明数据点离所属簇的质心越近, 聚类效果越好. 通过这种方法不断划分, 直到最终得到的簇的数目与用户最开始给定的 k 值相等. 二分 K - 均值

聚类算法与K-均值聚类算法相比,不但受初始质心的影响更小,而且聚类速度更快,效果更好.

1.3 本文算法流程

1.3.1 降维处理 首先通过改进的SVD算法对稀疏的用户-项目评分矩阵进行降维,得到用户隐含特征矩阵.由式①可以得到改进的SVD的损失函数:

$$Loss = \sum_{(u,i) \in D} (R(u,i) - \hat{R}(u,i))^2 \quad (2)$$

其中, D 为训练集中所有用户对项目的评分集合, $R(u,i)$ 是用户 u 对项目 i 的实际评分, $\hat{R}(u,i)$ 是模型预估的用户 u 对项目 i 的预测评分.为了防止过拟合,对式②进行 L_2 正则化:

$$Loss = \sum_{(u,i) \in D} (R(u,i) - \sum_{j=1}^J X_{uj} Y_{ij})^2 + \alpha \|X_u\|^2 + \alpha \|Y_i\|^2 \quad (3)$$

其中, α 为正则化参数.

对式③采用随机梯度下降法进行优化,分别对参数 X_{uj} 和 Y_{ij} 求偏导:

$$\frac{\partial Loss}{\partial X_{uj}} = -2(R(u,i) - \hat{R}(u,i))Y_{ij} + 2\alpha X_{uj}$$

$$\frac{\partial Loss}{\partial Y_{ij}} = -2(R(u,i) - \hat{R}(u,i))X_{uj} + 2\alpha Y_{ij}$$

通过梯度下降得到 X_{uj} 和 Y_{ij} 的第 $n+1$ 次迭代结果:

$$X_{uj}^{(n+1)} = X_{uj}^{(n)} - \beta \frac{\partial Loss}{\partial X_{uj}^{(n)}}$$

$$Y_{ij}^{(n+1)} = Y_{ij}^{(n)} - \beta \frac{\partial Loss}{\partial Y_{ij}^{(n)}}$$

其中, β 代表的是学习率.

在式③中,损失函数Loss中加入了正则化项,用于控制模型的复杂度.参数 α 的大小决定了正则化项对于模型复杂度的约束能力, α 过大可能导致约束力太大,造成一些重要参数的缺失,影响模型的精度; α 过小则会导致约束力无法减小模型的复杂度,造成过拟合.而参数 β 则会影响损失函数找到极值点的概率, β 越小,

越容易找到极值点,但也会需要更多的迭代次数.因此,选取合适的 α 和 β 可以更好地提升模型的精度.

1.3.2 聚类 通过改进的SVD算法得到用户隐含特征矩阵之后,再通过二分K-均值聚类算法对矩阵进行聚类,得到相似用户的簇和质心.用户到质心的距离通过Pearson相关系数隐含,Pearson相关系数的计算公式为

$$P(A,B) = \frac{\sum_{f=1}^F (A_f - \bar{A})(B_f - \bar{B})}{\sqrt{\sum_{f=1}^F (A_f - \bar{A})^2} \times \sqrt{\sum_{f=1}^F (B_f - \bar{B})^2}}$$

其中, A_f 表示用户 A 对项目 f 的评分, B_f 表示用户 B 对项目 f 的评分, \bar{A} 和 \bar{B} 分别表示用户 A 和用户 B 对项目打分的平均值, $P(A,B)$ 即为所求Pearson相关系数的相似度.

1.3.3 预测评分 根据Pearson相关系数计算出用户与同簇中其他用户的相似度,再根据相似度的大小,选取与用户相似度最高的 N_u 个用户作为用户的最近邻居集.通过基于最近邻居集的预测方法来计算目标用户 u 对尚未评分项目 i 的预测评分.具体评分公式如下:

$$\hat{R}(u,i) = \frac{\sum_j X_{uj} Y_{ij} + \sum_{v \in N_u} P(u,v) (R(v,i) - \sum_j X_{vj} Y_{ij})}{\sum_{v \in N_u} |P(u,v)|}$$

其中, $P(u,v)$ 代表的是用户 u 和用户 v 之间的相似性, $R(v,i)$ 是用户 v 对项目 i 的实际评分.

最后根据预测的结果进行Top-N推荐,生成推荐列表.本文算法流程如图1所示.

2 实验结果与分析

2.1 实验数据集与评估指标

本次实验采用的数据集是由美国明尼苏达大学GroupLens项目组的研究人员所收集的

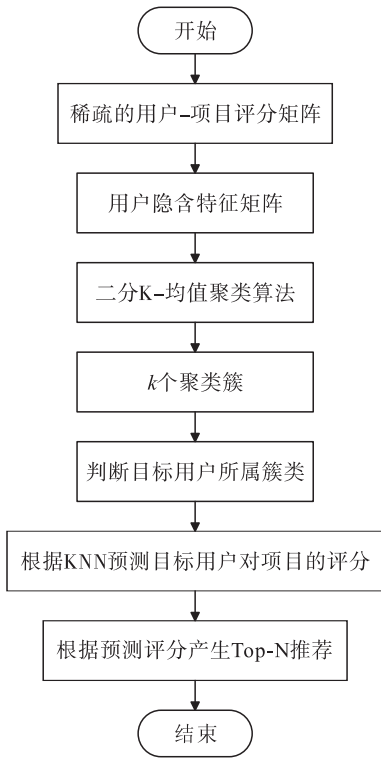


图1 本文算法流程图

Fig. 1 Algorithm flow chart

MovieLens 100K 数据集^[12]. 该数据集包含 943 名用户对 1682 部电影的评分数据, 共计 100 000 条, 其中每一个用户都至少对其中 20 部以上的电影做出了评分, 数据集的稀疏性约为 93.695 3%. 用户的评分为 1—5 之间的整数, 评分越高代表用户对电影的喜爱程度越高.

本实验分别采用平均绝对误差和准确率作为预测精度和分类误差的衡量标准. 在推荐系统中, 定义 N 为测试集中所有用户对项目做出评分的集合, 计算出每一个实际评分与推荐算法预测出的评分之间的绝对误差, 最后求出其平均值, 得到平均绝对误差, 计算公式为

$$MAE = \frac{\sum_{(u,i) \in N} |R(u,i) - \hat{R}(u,i)|}{|N|}$$

其中, $|N|$ 为测试集的数据大小. MAE 越小, 表示模型预测值与真实值之间的差值越小, 表明推荐算法的准确度越高.

准确率可以直接反映推荐列表对于用户来

说是否满意, 如果推荐列表的准确率较低, 说明在这个推荐列表中用户喜欢的项目较少, 用户体验较差. 准确率计算公式为

$$Precision = \frac{\sum_{u \in U} |P(u) \cap T(u)|}{\sum_{u \in U} |P(u)|}$$

其中, $P(u)$ 代表的是训练集中根据用户的行为做出的推荐列表, 而 $T(u)$ 则是测试集中用户的行为列表.

2.2 参数选取

本文提出的基于改进的 SVD 算法和二分 K - 均值聚类算法的协同过滤算法中的主要参数包括: 隐含特征个数 J 、正则化参数 α 、聚类簇数 k 、学习速率 β 、迭代次数 M 和最近邻个数 N_u . 由于学习速率 β 和迭代次数 M 不会对推荐算法的质量产生太大的影响, 根据前期实验和经验, 本文选取 $M = 80, \beta = 0.015$ ^[13]. 根据算法准确度评估指标 MAE 的变化来调整本文算法的其他参数.

2.2.1 隐含特征个数 隐含特征个数 J 的大小会影响矩阵分解过程中保留特征信息的多少. J 越大, 可以保留更多的原始矩阵信息, 但也会造成模型的时间和空间复杂度过高; J 越小, 会造成原始矩阵信息丢失过多, 增大模型最终预测推荐结果的误差. 为了确定本文算法中 J 的最优取值, 在 $k = 10, N_u = 25, M = 80, \beta = 0.015, \alpha = 0.01$ 的条件下进行实验, 结果如图 2 所示.

由图 2 可知, 随着 J 不断增大, 原始评分矩阵中被保留下来的隐含信息逐渐增多, 最终推荐结果的准确度也越高, 从 $J = 60$ 开始, 本文算法的推荐准确度逐渐趋于稳定.

2.2.2 正则化参数 正则化参数 α 的大小决定了正则化项对于模型复杂度的约束能力. 为了确定本文算法中 α 的最优取值, 在 $k = 10, N_u = 25, M = 80, \beta = 0.015, J = 60$ 的条件下进行实验, 结果如图 3 所示.

由图3可知,当正则化参数 $\alpha = 0.02$ 时,改进算法的MAE达到最小值,当 α 继续上升时,由于参数太大使得算法出现欠拟合的现象,导致算法的预测能力越来越差。

2.2.3 聚类簇数 为了确定本文算法中聚类簇数 k 的最优取值,在 $N_u = 25, M = 80, \beta = 0.015, J = 60, \alpha = 0.02$ 的条件下进行实验,结果如图4所示。

由图4可知,本文算法的MAE值随着聚类簇数 k 的不断增大先减小后增大,当 $k = 16$ 时,MAE达到最小值。

2.2.4 最近邻个数 最近邻个数 N_u 表示选取与目标用户相似度最高的 N_u 个用户,如果选取的相似用户太多,则会消耗大量的时间,影响

推荐的实时性;如果选取的相似用户太少,则会使得最近邻居集对最终预测评分的影响较小。为了确定本文算法中 N_u 的最优取值,在 $\alpha = 0.02, k = 16, M = 80, \beta = 0.015, J = 60$ 的条件下进行实验,结果如图5所示。

由图5可知,本文算法的MAE值随着最近邻个数 N_u 的不断增大而减小,矩阵分解过程中用户特征信息的损失问题得到一定改善。当 $N_u = 40$ 时趋于平稳,之后继续增加对预测评分产生的影响较小。

综上,本文算法的最优参数确定为 $J = 60, \alpha = 0.02, k = 10, \beta = 0.015, N_u = 40, M = 80$ 。

2.3 实验结果

为了验证本文算法在实际应用中的推荐效果,将本文算法与基于用户的协同过滤算法、基于K-均值聚类的协同过滤算法、隐语义模型

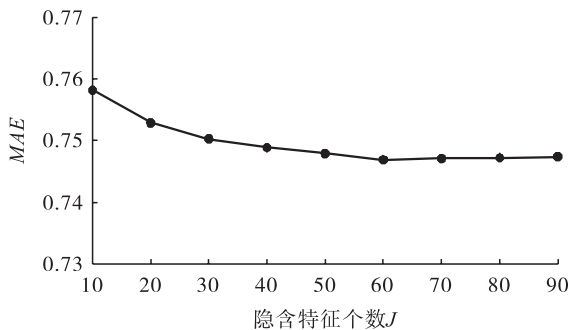


图2 本文算法在不同隐含特征个数 J 下的 MAE

Fig. 2 MAE of improved algorithm under different number of hidden features J

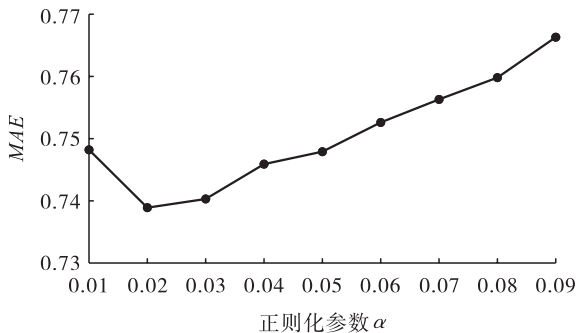


图3 本文算法在不同正则化参数 alpha 下的 MAE

Fig. 3 MAE of improved algorithm under different regularization parameters alpha

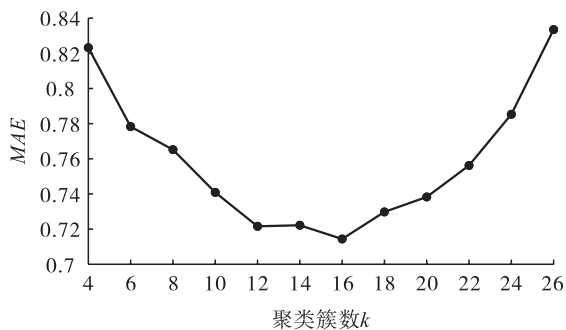


图4 本文算法在不同聚类簇数 k 下的 MAE

Fig. 4 MAE of improved algorithm under different clustering number k

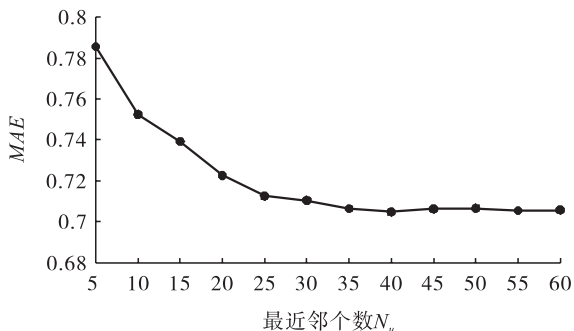


图5 本文算法在不同最近邻个数 Nu 下的 MAE

Fig. 5 MAE of improved algorithm under different numbers of nearest neighbors Nu

(LFM)算法进行对比实验,结果如图6和图7所示.

由图6可知,本文算法的MAE始终低于基于用户的协同过滤算法和基于K-均值聚类的协同过滤算法.LFM算法的推荐准确度与最近邻个数 N_u 无关,不会随着 N_u 的变化而变化.在 $N_u < 20$ 时,LFM算法的推荐效果最好,但是随着 N_u 的不断增加,本文算法逐渐优于LFM算法,当 $N_u = 40$ 时,LFM算法的 $MAE = 0.7189$,本文算法的 $MAE = 0.7048$,推荐效果提升了约1.4%.

由图7可知,当最近邻个数 $N_u < 25$ 时,本文算法的准确率低于LFM算法,但高于基于K-均值聚类的协同过滤算法和基于用户的协同过滤算法;当 $N_u > 25$ 时,本文算法的准确率

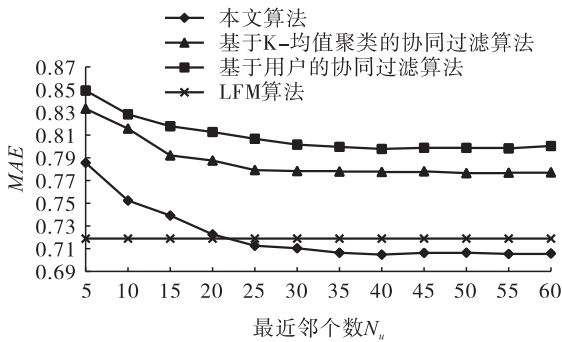


图6 各个算法在不同最近邻个数 N_u 下的MAE

Fig. 6 MAE of each algorithm under different numbers of nearest neighbors N_u

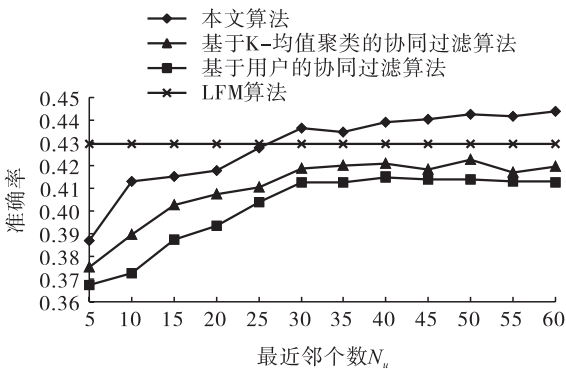


图7 各个算法在不同最近邻个数 N_u 下的准确率

Fig. 7 Precision of each algorithm under different numbers of nearest neighbors N_u

明显优于其他3种算法,并且在 $N_u = 50$ 时趋于稳定,说明本文算法具有良好的推荐效果.

3 结语

本文将矩阵分解与聚类技术相结合,提出了基于改进的SVD算法和二分K-均值聚类算法的协同过滤算法,该算法使用改进的SVD算法得到用户隐含特征矩阵,改善了数据集稀疏导致推荐结果误差较大的问题,并且通过二分K-均值聚类算法提升了推荐算法的可扩展性,通过实验对比证实了本文算法的推荐性能优于基于用户的协同过滤算法、基于K-均值聚类的协同过滤算法和LFM算法.用户的显性行为数据虽然能够直接用于推荐算法的计算,但是这些数据只是实际应用场景数据中的一小部分,用户的点击次数、浏览记录等隐性行为数据也会对推荐算法的准确度提升产生至关重要的影响,后续将进一步研究如何将显性行为数据和隐性行为数据相结合以提升推荐算法的准确率.

参考文献:

[1] SUN P, LI Z, HAN Z, et al. An overview of collaborative filtering recommendation algorithm [J]. Advanced Materials Research, 2013, 756 - 759: 3899.

[2] 张琳, 闫强. 基于管理和消费者行为视角的个性化推荐研究与展望[J]. 北京邮电大学学报(社会科学版), 2016, 18(6): 24.

[3] BRUSILOVSKY P, KOBSA A, NEJDL W. The adaptive web: Methods and strategies of web personalization [J]. Lecture Notes in Computer Science, 2007, 2002(5): 377.

[4] LI B, ZHU X Q, LI R J, et al. Cross-domain collaborative filtering over time [C] // Proceedings of the 22nd International Joint Conference on Artificial Intelligence. Palo Alto: AAAI Press,

- 2011;2293.
- [5] SUGANESHWAR G, IBRAHIM S P. A survey on collaborative filtering based recommendation system[C] // 3rd International Symposium on Big Data and Cloud Computing. Chengdu: Springer-Verlag, 2016:503.
- [6] KOOHI H, KIANI K. User based collaborative filtering using fuzzy C-means[J]. Measurement, 2016, 91(1):134.
- [7] SU X, KHOSHGOFTAAR T M. Collaborative filtering for multi-class data using belief nets algorithms[J]. International Journal on Artificial Intelligence Tools, 2008, 17(1):71.
- [8] 孙小华, 陈洪, 孔繁胜. 在协同过滤中结合奇异值分解与最近邻方法[J]. 计算机应用研究, 2006, 23(9):206.
- [9] 刘艺, 冯钧, 魏童童, 等. 一种改进的协同过滤推荐算法[J]. 计算机与现代化, 2017(1):1.
- [10] SARWAR B, KARYPIS G, KONSTAN J, et al. Item-based collaborative filtering recommendation algorithms[C] // Proceedings of the 10th International Conference on World Wide Web. New York: ACM, 2001:285.
- [11] PANDEY A, PANDEY R. Elective recommendation support through K-means clustering using R-tool[C] // International Conference on Computational Intelligence and Communication Networks. Kolkata: ICRICIN, 2016:851.
- [12] HARPER F M, KONSTAN J A. The MovieLens datasets: History and context[J]. ACM Transactions on Interactive Intelligent Systems, 2015, 5(4):1.
- [13] 陈清洁. 基于SVD的协同过滤推荐算法研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2017.
-
- (上接第87页)
- [15] 李大勇, 王瑜, 黎灿兵, 等. 基于无线射频技术的防窃电开箱记录仪设计[J]. 电测与仪表, 2008, 45(10):51.
- [16] 孙凤杰, 刘争芳, 张永灿. 基于GPRS无线传输的防窃电系统[J]. 电力系统通信, 2007, 28(171):53.
- [17] 余昌华, 谢剑英. Winsocket技术在电力远程监控系统中的应用[J]. 计算机工程, 2000, 26(10):81.
- [18] 窦健, 陈秀群, 张海龙, 等. 一种具有约束条件的用电异常检测模型: 201711154836. 7[P]. 2018-05-22.
- [19] 吴迪, 王学伟, 窦健, 等. 基于大数据的防窃电模型与方法[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2018, 45(6):79.
- [20] 庄池杰, 张斌, 胡军, 等. 基于无监督学习的电力用户异常用电模式检测[J]. 中国电机工程学报, 2016, 36(2):379.
- [21] 程超, 张汉敬, 景志敏, 等. 基于离群点算法和用电信息采集系统的反窃电研究[J]. 电力系统保护与控制, 2015, 43(17):69.
- [22] 王新霞, 王珂, 焦东翔, 等. 基于正态分布离群点算法的反窃电研究[J]. 电气应用, 2017, 36(7):60.
- [23] 窦健, 刘宣, 卢继哲, 等. 基于用电信息采集大数据的防窃电方法研究[J]. 电测与仪表, 2018, 55(21):43.
- [24] 任玮蒙, 许庆, 谢智奕, 等. 基于电量、电压和电流异常分析的异常用电判断方法: 201410706073. 2[P]. 2015-03-11.



引用格式:王宣立,张安琳,黄道颖,等. SDN 环境下不同机器学习算法的网络流量分类分析 [J]. 轻工学报,2020,35(4):96-102.

中图分类号:TP393 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.013

文章编号:2096-1553(2020)04-0096-07

SDN 环境下不同机器学习算法的网络流量分类分析

Network traffic classification analysis of different machine learning algorithms in SDN environment

王宣立¹,张安琳²,黄道颖¹,董帅¹,刘江豪¹

WANG Xuanli¹,ZHANG Anlin²,HUANG Daoying¹,DONG Shuai¹,LIU Jianghao¹

关键词:

软件定义网络;网络流量分类;机器学习;梯度提升决策树;Moore 数据集

Key words:

software defined network (SDN);network traffic classification; machine learning; gradient boosting decision tree; Moore dataset

1. 郑州轻工业大学 计算机与通信工程学院,河南 郑州 450001

2. 郑州轻工业大学 工程训练中心,河南 郑州 450001

1. College of Computer and Communication Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Engineering Training Center, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China

摘要:为对比分析软件定义网络(SDN)环境下不同机器学习算法的网络流量分类效果,对 Moore 数据集进行了平衡处理,在机器学习平台 RapidMiner 上对 K-近邻(KNN)、随机森林(RF)、支持向量机(SVM)和梯度提升决策树(GBDT)4种经典机器学习算法选取不同的分类特征进行分类实验.实验结果表明,较其他3种算法,GBDT算法可以在较短的时间内获得更好的分类效果.

收稿日期:2020-03-31

基金项目:河南省重点科技攻关项目(132102210418)

作者简介:王宣立(1995—),男,河南省嵩县人,郑州轻工业大学硕士研究生,主要研究方向为软件定义网络.

通信作者:黄道颖(1967—),男,河南省信阳市人,郑州轻工业大学教授,博士,主要研究方向为计算机网络、分布式计算.

Abstract: In order to compare and analyze the network traffic classification effect of different machine learning algorithms in the software defined network (SDN) environment, the Moore dataset was balanced, and four classic machine learning algorithms including KNN, random forest (RF), support vector machine (SVM) and gradient lifting decision tree (GBDT) were supported on the machine learning platform RapidMiner to select different classification features for classification experiments. Experimental results showed that compared with the other three algorithms, the GBDT algorithm could obtain better classification results in a shorter time.

0 引言

随着网络技术的发展、网络规模的扩大、网络协议的增多,以 TCP/IP 协议族为核心的传统网络变得臃肿不堪,管理难度越来越大. 针对传统网络的弊端,软件定义网络 SDN (software defined network) 应运而生,因其开放、灵活的特点而被视为下一代的互联网架构.

SDN 通过解耦传统网络中的控制功能与数据转发功能,形成了集中式的控制平面和由分布式 OpenFlow 交换机组成的数据平面,且两个平面之间依据 OpenFlow 规范进行通信^[1]. 相较于传统网络,SDN 的集中式控制平面在对整个网络资源的调度、网络的管理和配置等方面都具有巨大的优势. Google 公司通过 SDN 技术部署的 B4 网络更是展示了 SDN 的巨大潜力.

SDN 注重对网络的可重构能力,致力于整个网络处理逻辑的可编程性和网络设备的白盒化,随着人工智能等技术的发展,学者们对 SDN 的智能化方面进行了大量的尝试. SDN 的架构决定了其可通过在应用层添加功能组件,十分便捷地实现特定需求. 吴艳^[2]发现利用 SDN 可以获得网络全局视图、感知链路负载情况的特点,并使用神经网络获得流量分类模型,为不同类型的网络流量提供差异化的 QoS 质量保证;胡孟婷^[3]通过在控制器中写入流量态势收集模块,利用 LSTM 算法预测网络流量态势,获得较好的预测效果;刘佳美等^[4]提出的 PPME 模型,利用最大熵算法对网络流量变化情况进行预测,优化了分布式 SDN 控制平面 SHLB 的负载

问题,在离线数据集上具有优异的表现.

在网络技术发展的同时,网络规模在新型应用的影响下发生了变化,移动互联网、云计算、大数据等的出现使得网络流量在近几年呈指数式增长,网络流量特征也随之发生了变化. 传统网络对网络流量进行更细粒度流量转发时捉襟见肘,且用户无法根据需要自行定义转发规则,因此对具有不同要求的网络流量无法实现差异化的 QoS 保障. 对网络流量进行识别并提供相应的保障机制,会使网络更高效地运行,对于网络管理、网络安全和网络计费等都具有重要的意义. 利用 SDN 集中控制、易于获取链路状态、流量统计信息等特点,进行网络流量识别研究非常具有可行性,而机器学习在流量识别分类问题上具有更高的准确性.

鉴于此,本文拟选取几种经典机器学习算法在网络流量数据集 Moore^[5]上进行网络流量识别分析,验证在 SDN 环境中不同机器学习算法的识别效果,为在 SDN 网络中选取合适的机器学习算法提供参考.

1 基于机器学习的网络流量识别

网络技术的发展影响着网络流量分类方法的发展. 最初的网络流量分类方法是通过国际互联网代理成员管理局注册的端口映射表,将特定网络应用与端口绑定,通过查询数据包中的端口号信息即可获悉网络流量类型,这种方法被称为基于端口的网络流量分类方法^[6]. 该方法实现简单,可以快速识别网络流量类型,因此在高速网络流量环境中具有较广泛的应用.

但随着随机端口技术、P2P 应用等新型网络应用的出现,基于端口的网络流量分类准确率受到了极大的影响,一般只有 50% ~ 70%^[6]。

针对基于端口的网络流量分类方法存在因端口伪装技术无法准确识别网络流量的问题,研究者们提出了基于载荷的识别方法^[7]。通过分析数据包中有效负载的应用签名进行分类,可以获得较高的准确率。但基于载荷的网络流量识别方法在提高准确率的同时,牺牲了识别速度,且提取有效负载的方式会侵犯用户隐私安全,对于加密流量的检测效果并不理想,不适用于高速网络环境的流量分类。

近年来,随着机器学习技术的发展,人们将机器学习应用到网络流量识别中,并取得了很多成果。文献[8-9]提取了网络流的子流并统计其流量特征,结合机器学习方法实现了在高速网络环境中的网络流量准确识别。文献[10]结合模糊集合理论和 K-means 分类方法,改善了 K-means 分类方法初始聚类中心选取困难的问题,并降低了聚类迭代次数,具有更快的收敛速度,在 Moore 数据集上取得了较好的分类效果。文献[11]通过统计流量特征实现了 SSL 流量分类,根据 SSL 流量的前 3 个应用数据包的大小和传递方向,利用高斯混合模型(GMM)建立分类模型,可实现加密流量较准确的分类。文献[12]使用 C4.5 决策树对 P2P 流量进行分类,还通过对 P2P 流量特征的分析识别出未知的 P2P 流量,相较于非监督学习流量分类方法,C4.5 决策树具有更高的准确性、更少的训练时间和识别时间。支持向量机(SVM)学习方法在网络流量分类中具有较好的泛化能力和鲁棒性,但受限于监督学习需要大量标记样,文献[13]通过引入增量学习和半监督学习,对 SVM 进行优化,提高了 SVM 分类的准确度,但并未指出该分类方法的具体实施效果。

机器学习方法以其较高的准确率成为解决

SDN 场景中遇到的问题的新途径。SDN 集中式的控制平面决定了其极易受到 DDOS 攻击,文献[14]通过在控制器中增加流量统计模块,利用 C4.5 算法对 DDOS 攻击流量进行检测,相较于 SVM 和 KNN 算法,C4.5 对攻击流量具有更好的识别效果;文献[15]根据网络视频流量的特点选取分类特征,利用随机森林(RF)算法实现了 SDN 中对视频流量和下载流量的识别;文献[16]在 SDN 环境中采用集成学习算法,在对网络流量进行分类的前提下,利用强化学习对路由进行规划,从而使不同类型的网络流量获得了相应的 QoS 保障。

本文采用 K-近邻(KNN)、SVM、RF 和梯度提升决策树(GBDT)这 4 种经典的机器学习算法进行对比实验。KNN 算法实现简单,在多分类问题上具有较好的分类效果;SVM 泛化能力较好,适合用于小数量的数据集;RF 算法是一种集成学习算法,分类准确率更高;GBDT 算法是对真实分布拟合得最好的算法之一,具有较高的分类速度和较好的鲁棒性。

2 数据集预处理

Moore 数据集是网络流量分类领域的经典数据集,涵盖网络流量多个方面详细的特征信息,为了使这些特征可以进行量化比较,A. W. Moore 等^[5]对其进行了傅里叶变换,这使得 Moore 数据集在网络流量分类实验中得以大量使用。经分析,Moore 数据集集中的大部分特征均为在 SDN 环境中通过功能模块或根据计数器的统计信息获得,故本文采用 Moore 数据集进行实验具有可行性。

Moore 数据集是在某骨干网络采集的 10 个时间段的网络流量信息。数据集中每个样本包含 248 个流量特征和 1 个流量类别标签,且对样本的每个特征进行详细描述。Moore 数据集共由 10 个子集组成,每个子集均包含对应的应

用,Moore 数据集各类型的流量样本统计如表 1 所示。

表 1 Moore 数据集各类型的流量样本统计

Table 1 Traffic sample statistics of various types in Moore dataset

流量类型	应用	数量/ 条	占比/ %
WWW	www	328 091	86.906
MAIL	Imap, pop2/3, SMTP	28 567	7.567
BULK	FTP	11 539	3.056
DATABASE	Postgres, sqlnet oracle, ingress	2648	0.701
SERVICES	X11, dns, ident, ldap, ntp	2099	0.556
P2P	KazaA, bittorrent, gnutella	2094	0.555
ATTACK	Internet worm and virus attacks	1793	0.475
MUITIMEDIA	Windows media player, real	576	0.153
INTERACTIVE	Ssh, klogin, rlogin, telnet	110	0.029
GAME	Half-life	8	0.002
总计		377 526	100.000

由表 1 可以看出,在 Moore 数据集中,不同类型的应用样本比例并不均衡,如被标记为 WWW 和 MAIL 的两类数据样本共占整个数据集的 94.473%,而 GAME 类的样本比例仅为 0.002%,这样的数据集被称为不平衡数据集。对于不平衡数据集,若直接对其进行分类实验,会因为数量较多的样本能正确分类而获得较高的准确率,但忽略了小数量样本的准确率,实际的分类效果并不理想,因此需要对该数据集进行预处理。

通常采用欠采样、过采样、改变分类算法、生成合成数据 4 种方法对不平衡数据集进行预处理。欠采样是从多数样本类中随机抽取部分样本进行训练;过采样是在少数类样本中随机采样,增加少数类样本的数量以达到平衡数据集的效果;改变分类算法是在样本中引入代价函数,增大少数类样本的权重,对多数类样本的权重赋予较小的值,从而避免忽略少数类样本;生成合成数据是以从少数类中创建合成样本,从而增加少数类样本基数来平衡数据集的。

欠采样和过采样使用的随机采样方法实现简单,效果也比较理想,但这种通过改变数据集中样本数量的方式也改变了原有数据集的样本分布,可能会增大误差,从而影响分类效果;而改变分类算法引入的代价函数则会产生权重值难以确定的问题,故本文采用 Borderline-SMOTE 算法^[17]合成数据以平衡数据集。SMOTE 算法利用 KNN 算法从少数类样本选择出 k 个近邻后,从中随机选取 n 个样本进行特征值的随机线性插值,从而构造新样本,实现数据集的平衡。但这种随机插值的方式增大了类间重复的可能性,因此需对 SMOTE 算法进行优化。Borderline-SMOTE 算法通过对少数类样本的边界样本进行随机插值处理,使合成的数据样本更有效。Borderline-SMOTE 算法的流程如图 1 所示。

Borderline-SMOTE 处理不平衡数据集的过程可分为两步:1)利用 KNN 算法对每个少数类样本随机选取 n 个近邻,若这 n 个近邻均为多数类样本,则说明可能是异常数据,将其标记为噪声类;若这 n 个近邻均为少数类样本,则将其标记为安全类,噪声类和安全类均不做处理;若这 n 个近邻中一半以上为多数类样本,则将其标记为边界类样本。2)对于边界类样本,使用随机插值算法生成新的数据。

因本文中使用的 Moore 数据集中 GAME 类型与其他类型样本量差距太大,即使使用 Borderline-SMOTE 算法也无法避免样本重叠,所以在进行实验时,剔除了标记为 GAME 类型的样本,然后选取 WWW 类型部分样本和其他类型的全部样本组成新的训练数据集,采用 Borderline-SMOTE 算法对其进行平衡化处理。平衡后的数据集各类型及其样本数量如表 2 所示。因平衡后的数据集样本数量不足百万,属于小数量数据集,所以将数据集的 80% 作为训练数据集,剩余的 20% 作为测试数据集。

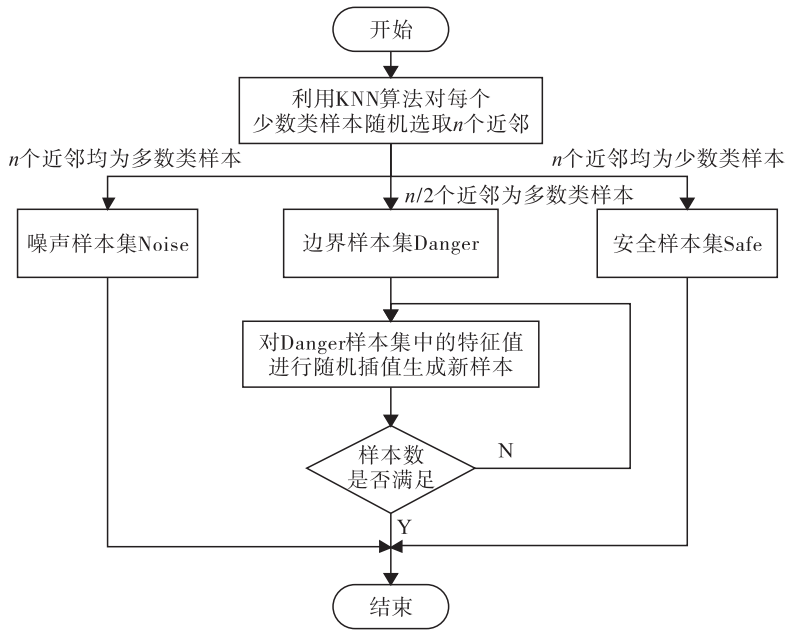


图1 Borderline-SMOTE 算法流程

Fig. 1 Borderline-SMOTE algorithm flow

表2 平衡后的数据集类型及其样本数量

Table 2 The number of samples of each type in the balanced dataset

流量类型	数量/条
WWW	65 000
MAIL	65 000
BULK	30 000
DATABASE	30 000
SERVICES	30 000
P2P	30 000
ATTACK	20 000
MUITIMEDIA	10 000
INTERACTIVE	10 000
总计	270 000

3 分类特征的选取

虽然 Moore 数据集的每个样本都有 248 个特征,但其中有 100 多个特征是通过傅里叶变换得到的,再用于实时的网络流量分类,网络设备中待分类数目可能达到数十万条,若对所有的数据流进行傅里叶变换,对于硬件设备会是一个巨大的挑战.文献[18]指出,对网络流量

进行统计后也可获得可靠性较好的特征,将端口号、有效负载、流量统计信息等特征结合可以获得更好的分类效果.为选取分类效果更好的机器学习算法,本文从 Moore 数据集中选取了 5 组分类特征,分别为端口号、数据包数量、数据包大小、时间相关特征和数据包信息标志位,具体内容如表 3 所示.

4 实验结果与分析

本实验的硬件环境为 AMD r7 2700X 的 CPU,AMD rx580 显卡,所用的数据分析平台为 RapidMiner.采用 KNN、SVM、RF 和 GBDT 这 4 种经典的机器学习算法,选取不同的特征进行分类实验,以分析 SDN 环境下不同算法的分类效果,以及不同特征对分类效果的影响.

不同算法对各种特征的分类准确率如图 2 所示.由图 2 可以看出,在对网络流量进行分类时,不同的特征对识别准确率的影响很大,基于端口号的识别方法、基于时间信息的识别方法和基于信息标志位的识别方法无论在何种机器学习方法下识别率均不高,而将数据包数量、数

据包大小等网络流量统计信息作为分类特征, 则会有较好的分类效果;在 4 种分类算法中,相

表 3 选取的分类特征

Table 3 Selected classification features

特征分组	特征缩写	说明
端口号	server-port	服务器端口号
	client-port	客户端端口号
	total_pkts	数据包总数
数据包数量	actual_data-pkts	携带负载的数据包总数
	rexmt_data-pkts	重传的数据包总数
	URGENT_data-pkts	首部含有 URG 标志的数据包总数
	zwnd_probe-pkts	窗口探测数据包总数
	outoforder_pkts	未按序到达的数据包总数
数据包大小	min/med/mean/max_data_wire	以太网数据包长度的最小、中位数、平均值和最大值
	min/med/mean/max_data_ip	IP 数据包负载长度的最小、中位数、平均值和最大值
	min/med/mean/max_data_ctrl	TCP 控制报文首部长度的最小、中位数、平均值和最大值
	init_wnd_bytes	在 TCP 初始窗口发送的字节总数
时间相关特征	duration	连接持续时间
	time_spent_in_bulk	单向传输数据的总时间
	time_spent_in_idle	无数据传输的总空闲时间
数据包信息标志位	min/max/avg/sdv_retr_time	在所有重传的数据包中,任意两个数据包间隔时间的最小值、最大值、平均值和均方差
	ack/SYN/FIN_pkts_sent	TCP 首部含有 SYN(FIN) 标志位的数据包总数

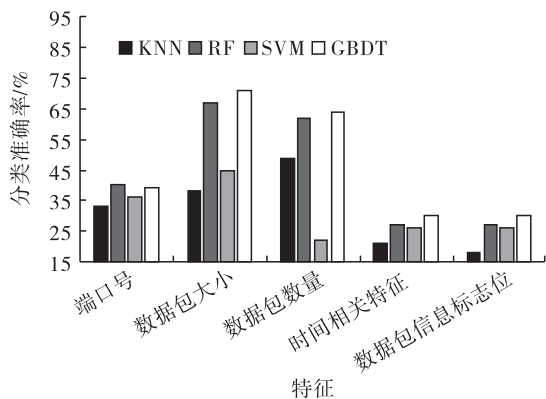


图 2 不同算法对各种特征的分类准确率

Fig. 2 Accuracy of various eigenvalues of different algorithms

较于 KNN 算法和 SVM 算法,RF 和 GBDT 两种算法的分类效果更为理想,这是因为这两种算法均采用了集成学习的方式构造分类器.

不同算法对组合特征的分类准确率如图 3 所示.由图 3 可以看出,在获得足够的样本特征时,4 种算法都有较好的分类效果,相差不大.结合不同算法的训练时间(见图 4),RF 算法和 GBDT 算法均在较少的时间内获得了 97% 以上的分类准确率,且 GBDT 算法可以在最少的训练时间内获得最好的分类效果.

5 结语

本文在机器学习平台 RapidMiner 上验证了 SDN 环境下 KNN、SVM、RF 和 GBDT 这 4 种算法的网络流量分类效果.实验结果表明,GBDT 算法利用每次学习的残差进行迭代训练,相较于其他 3 种算法具有更好的分类效果和较短的训练时间.SDN 的网络可重构能力为将 GBDT 算法作为功能模块融入到整个网络的

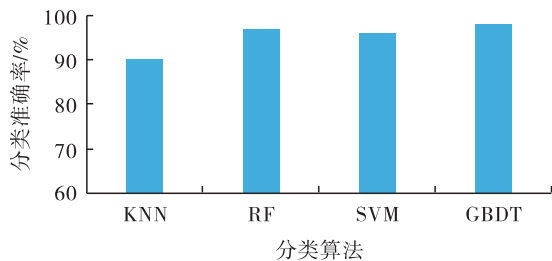


图 3 不同算法对组合特征的分类准确率

Fig. 3 Accuracy of combined feature classification of different algorithms

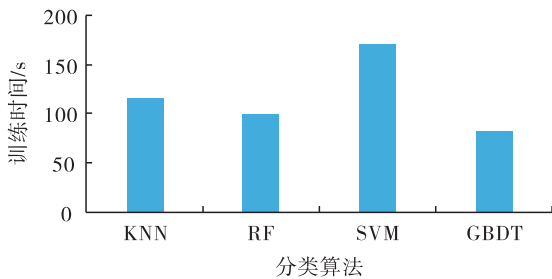


图 4 不同算法的训练时间

Fig. 4 Training time of different algorithms

管理策略中提供了可行性,两者的进一步融合是后续研究的重点。

参考文献:

- [1] MCKEOWN N, ANDERSON T, BALAKRISHNAN H, et al. OpenFlow: Enabling innovation in campus networks [J]. *ACM SIGCOMM Computer Communication Review*, 2008, 38(2): 69.
- [2] 吴艳. 基于流量分类的智能 SDN 路由优化技术研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
- [3] 胡孟婷. SDN 网络流量态势评估及预测技术研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2019.
- [4] 刘佳美, 徐巧枝. 基于机器学习的 SDN 网络流量预测与部署策略 [J/OL]. *计算机工程*: 1-7 [2020-03-16]. <https://doi.org/10.19678/j.issn.1000-3428.0056436>.
- [5] MOORE A W, PAPAGIANNAKI K. Toward the accurate identification of network applications [C] // *Proceedings of International Workshop on Passive and Active Network Measurement*. Heidelberg: Springer, 2005: 41.
- [6] 彭芸, 刘琼. Internet 流分类方法的比较研究 [J]. *计算机科学*, 2007(8): 58.
- [7] SEN S, SPATSCHECK O, WANG D. Accurate, scalable in-network identification of p2p traffic using application signatures [C] // *Proceedings of the Web Conference*. Manhattan: [s. n.], 2004: 512.
- [8] NGUYEN T T T, ARMITAGE G. Training on multiple sub-flows to optimise the use of machine learning classifiers in real-world ip networks [C] // *Proceedings of 2006 31st IEEE Conference on Local Computer Networks*. Piscataway: IEEE, 2006: 369.
- [9] BERNAILLE L, TEIXEIRA R. Early recognition of encrypted applications [C] // *Proceedings of International Conference on Passive and Active Network Measurement*. Heidelberg: Springer, 2007: 165.
- [10] 吴辉. 基于模糊 K-Means 的网络流分类系统研究与实现 [D]. 广州: 广东工业大学, 2016.
- [11] LI J, ZHANG S, LU Y, et al. Real-time P2P traffic identification [C] // *Proceedings of 2008 IEEE Global Telecommunications Conference*. Piscataway: IEEE, 2008: 1.
- [12] QUINLAN J R. C4. 5: Programs for machine learning [M]. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- [13] 李平红, 王勇, 陶晓玲. 支持向量机的半监督网络流量分类方法 [J]. *计算机应用*, 2013, 33(6): 33.
- [14] 何建涛. SDN 中基于机器学习的 DDoS 攻击检测与防御方法研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2019.
- [15] 李兆斌, 韩禹, 魏占祯, 等. SDN 中基于机器学习的网络流量分类方法研究 [J]. *计算机应用与软件*, 2019, 36(5): 75.
- [16] 王赋翼. 机器学习在流量分类中的应用 [D]. 成都: 电子科技大学, 2019.
- [17] HAN H, WANG W Y, MAO B H. Borderline-SMOTE: A new over-sampling method in imbalanced data sets learning [C] // *Proceedings of International Conference on Intelligent Computing*. Heidelberg: Springer, 2005: 878.
- [18] 张龙璨, 柳斌, 李芝棠. 机器学习分类下网络流量的特征选取 [J]. *广西大学学报(自然科学版)*, 2011, 36(S1): 6.



引用格式:陈继光,苏冰山. 基于改进总广义变分的单幅红外图像超分辨率算法[J]. 轻工学报,2020,35(4):103-108.

中图分类号:TP391 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.014

文章编号:2096-1553(2020)04-0103-06

基于改进总广义变分的 单幅红外图像超分辨率算法

Single infrared image super-resolution algorithm based on improved total generalized variation

陈继光,苏冰山

CHEN Jiguang, SU Bingshan

关键词:

红外图像超分辨率;
总广义变分;
梯度锐化算子;
正则化

郑州航空工业管理学院 智能工程学院,河南 郑州 450046

School of Intelligent Engineering, Zhengzhou University of Aeronautics, Zhengzhou 450046, China

Key words:

infrared image
super-resolution;
total generalized
variation(TGV);
graduate sharpening
operator;regularization

摘要:针对传统总广义变分(TGV)算法在红外图像超分辨率重建过程中难以有效抑制噪声的问题,提出了一种基于改进TGV的单幅红外图像超分辨率算法.该算法首先将二阶TGV模型与一阶梯度锐化算子相结合,在算法实现的梯度上升阶段加上一阶梯度锐化算子,在梯度下降阶段的系数中加上一阶梯度锐化算子的系数,得到一种新的红外图像超分辨率正则化模型;然后采用一阶主-对偶优化算法求得高分辨率红外图像.实验结果表明,该算法的主观视觉效果和客观评价指标均优于其他传统算法,可获得质量较高的高分辨率红外图像,能有效抑制噪声,降低硬件实现的复杂度,有较强的实用性.

收稿日期:2020-03-13

基金项目:河南省科技攻关计划(高新技术领域)项目(172102210529);河南省高等学校重点科研计划项目(17A520062)

作者简介:陈继光(1982—),男,河南省睢县人,郑州航空工业管理学院讲师,博士,主要研究方向为图像处理、无线传感网络.

Abstract: Aiming at the problem that the traditional total generalized variation (TGV) algorithm could not restrain noise effectively in the process of infrared image super-resolution, a single infrared image super-resolution algorithm based on improved TGV was proposed. Firstly, the algorithm was built by second-order TGV regularization model and first-order gradient sharpening operator. First-order gradient sharpening operator was added during the process of gradient ascent, and the factor of first-order gradient sharpening operator was added during the process of gradient descent, so this algorithm acquired a new kind of infrared image super-resolution regularization model. Then it inferred the high-resolution infrared image with a first-order primal-dual optimization scheme. The experimental results showed that the algorithm was superior to other traditional algorithms in terms of subjective visual effect and objective evaluation index, and could obtain high-quality high-resolution infrared images, effectively suppress noise and reduce the complexity of hardware implementation, and had strong practicality.

0 引言

红外图像能够反映出成像场景的热力学信息,在快速体温检测、军事信息侦察等方面应用广泛,但是由于受红外成像原理和硬件设备技术水平的限制,红外相机直接获得的红外图像分辨率较低,边缘模糊且存在噪声.因此,提高红外图像的分辨率成为亟待解决的问题^[1-5].文献[1]将总广义变分 TGV (total generalized variation) 正则化方法与各向异性张量^[2]相结合,由高分辨率可见光图像引导低分辨率图像进行超分辨率重建,但各向异性张量在获取可见光图像边缘的同时,也增加了噪声的来源和种类,致使重建的图像被多种噪声污染.文献[3]通过一种改进的二阶 TGV 正则化模型重建红外图像,重建的高分辨率图像中红外图像自身的噪声得到抑制,采用相位一致^[4]边缘提取算法减少了可见光图像噪声的干扰,但由于引入了同场景的可见光图像信息,致使重建结果出现一定程度的失真.文献[5]将红外图像和同场景的可见光图像的边缘进行相关性分类,得到红外图像的高频信息,而后将其与 TGV 模型相结合得到最终的高分辨率红外图像.以上算法均为基于多传感器的红外图像超分辨率重建算法,可见光图像的信息会对红外图像的重建结果产生干扰,同样会携带噪声.在实际应用中,

基于多传感器的红外图像超分辨率算法在硬件系统实现时较为复杂,并且不同类的图像需经过配准才能结合起来实现算法,实用性不强.

基于单一类型传感器的超分辨率算法具备噪声来源少、设备复杂度低等优点,因此得到广泛关注.文献[6]通过最小角度回归算法和基于稀疏表示的超分辨率方法重建了红外图像;文献[7]借助孔径编码器和稀疏表示实现了对红外图像的超分辨率重建;文献[8]通过划分区域求得自适应全变分因子,以此合成高分辨率红外图像;文献[9]将 Huber 范数与全变分模型结合起来得到新的正则化模型,以此获得重建的高分辨率红外图像;文献[10]利用傅里叶变换和互关联法配准有亚像素偏移的低分辨率图像,采用基于重构的方法获得高分辨率红外图像.以上方法虽均可实现基于单一传感器的红外图像超分辨率重建,但未能针对红外图像的自身特点有效抑制图像中存在的噪声.

传统 TGV 正则化模型可以有效保留超分辨率重建图像的边缘,实现基于单一红外传感器的红外图像超分辨率重建,但是不能有效抑制红外图像的噪声^[11].鉴于此,本文拟提出一种基于改进 TGV 的单幅红外图像超分辨率算法,对单一红外传感器获取的图像进行处理,将二阶 TGV 模型与一阶梯度锐化算子相结合,重建高分辨率红外图像,以期降低硬件设备复杂

度并有效抑制图像噪声。

1 算法设计与实现

本文在文献[1]的基础上提出一种基于改进 TGV 的单幅红外图像超分辨率算法,去除在红外图像超分辨率重建过程中的可见光图像信息,同时将一阶梯度锐化算子引入 TGV 正则化模型,得到一种新的红外图像超分辨率重建模型,进而采用一阶主-对偶^[12]优化算法求得高分辨率红外图像。

1.1 超分辨率图像重建原理

在图像的获取过程中,外界的干扰和成像条件的限制导致不能获取原始场景中的所有真实信息,采集到的图像质量较低。一般而言,引起图像退化的原因有很多,比如传感器自身相对场景运动产生的运动系统噪声、模糊,光学成像系统的下采样、衍射等。在进行图像超分辨率实验时,低分辨率图像是原始高分辨率图像经过运动效应(包括平移和旋转)、模糊效应、下采样、加噪声处理后得到的图像。图像退化模型为

$$I_s = JBMX + n$$

其中, I_s 表示低分辨率图像, X 表示高分辨率图像, J 表示下采样矩阵, B 表示模糊算子, M 表示几何运动算子, n 表示噪声。图像超分辨率重建就是通过一个低分辨率图像 I_s 重建相应的高分辨率图像 X 的过程。

图像超分辨率重建问题的数学本质是一个不适定的逆问题,一般将低分辨率图像的获取看成是正问题,即低分辨率图像是系统输出,而

待重建的高分辨率目标图像是系统输入,那么求解高分辨率图像的过程就是逆问题的解决过程。为了解决这个逆问题,结合图像的一些先验知识对超分辨率重建算法的重建结果进行约束,进而获取图像采集时丢失的高频信息,重建高分辨率图像的最优解。

1.2 算法框架

本文算法框图如图 1 所示,该算法迭代求解出最优化条件下的超分辨率重建图像:

$$I_H = \arg \min_I \{R(I) + S(I, I_s)\}$$

上式由正则约束项 $R(I)$ 和数据项 $S(I, I_s)$ 组成, I 为红外图像超分辨率重建的中间结果。正则约束项利用图像的先验约束条件对重建的近似解空间进行约束,得到边缘相对清晰的唯一解,本文对传统 TGV 正则约束项做出改进,增加了一阶梯度锐化算子;数据项主要用于控制重建后的高分辨率红外图像与原始低分辨红外图像的逼近程度,得到接近低分辨率原图的高分辨率图像。

1.3 算法实现

对于红外图像超分辨率来说,二阶 TGV 正则化效果较好,且运算量适合实际应用,其表达式为

$$TGV = \min_v \{a|\nabla I - v| + b|\nabla v|\}$$

其中, v 为 TGV 正则约束项中的对称矩阵, a 和 b 分别为用于控制二阶项与一阶项所占比重的标量参数。

图像梯度运算通过微分计算,可以突出图像的边缘信息并抑制随机噪声。红外图像存在噪声,并且具有边缘模糊、对比度低的特点,而

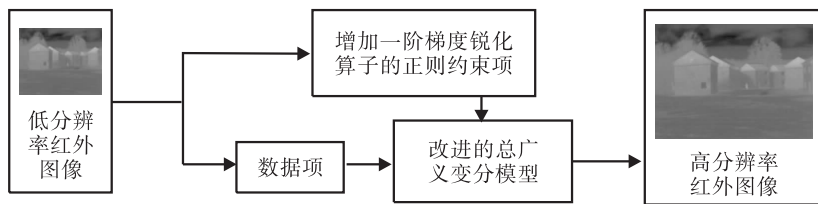


图 1 本文算法框图

Fig. 1 Block diagram of algorithm

一阶梯度锐化算子可以抑制随机噪声,增强模糊的细节或者低对比度图像的边缘,因此本文利用一阶梯度锐化算子改进 TGV 正则约束项,其表达式为

$$GTGV = \min_v \{ a |\nabla I - v| + b |\nabla v| + c \nabla I \}$$

其中, ∇ 为梯度运算符号,标量 c 为权重参数. 改进后的正则约束项可有效保留重建图像的边缘并抑制噪声.

本文将数据项与正则约束项相结合,得到算法的目标函数:

$$I_H = a |\nabla I - v| + b |\nabla v| + c \nabla I + |(D(I) - I_s)|^2 \quad (1)$$

其中, D 代表数据项中对待求解高分辨率红外图像信息的处理过程,使得低分辨率红外图像和高分辨率红外图像的像素处于同一个空间. 目标函数采用一阶主 - 对偶优化方法实现,然后利用梯度下降法求得最优解. 由此,式 (1) 可转化为

$$I_H = \min_{I,v} \max_{p,q} \langle [a(\nabla I - v) + c \nabla I], p \rangle + b \langle \nabla v, q \rangle + \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N (I_{i,j} - I_{s,i,j})^2$$

其中, $M \times N$ 即为待求的高分辨率红外图像的分辨率, p 和 q 为主 - 对偶优化算法中的对偶变量.

在主 - 对偶优化算法中,主变量 I, v 和对偶变量 p, q 通过迭代计算求得本文算法的收敛优化解. 第一次迭代时, $I = I_s$, 令 $v, p, q = 0$, 步长 θ_p, θ_q 均设为大于 0 的常数,迭代计算的 3 个过程如下.

1) 梯度上升迭代更新对偶变量:

$$\begin{cases} p^{n+1} = \frac{p^n + \theta_p [c \nabla I_0^n + a(\nabla I_0^n - v_0^n)]}{\max(1, |p^n + \theta_p [c \nabla I_0^n + a(\nabla I_0^n - v_0^n)]|)} \\ q^{n+1} = \frac{q^n + \theta_q b \nabla v_0^n}{\max(1, |q^n + \theta_q b \nabla v_0^n|)} \end{cases}$$

2) 梯度下降迭代更新主变量:

$$\begin{cases} I^{n+1} = \frac{I^n + k_l [(c + a) \nabla^T p^{n+1} + I_s]}{1 + k_l} \\ v^{n+1} = v^n + k_v (a p^{n+1} + b \nabla^T q^{n+1}) \end{cases}$$

其中, k_l 和 k_v 为步长^[13].

3) 进一步优化主变量:

$$\begin{cases} I_0^{n+1} = I^{n+1} + \mu (I^{n+1} - I_0^n) \\ v_0^{n+1} = v^{n+1} + \mu (v^{n+1} - v_0^n) \end{cases}$$

其中, I_0 和 v_0 为迭代计算的中间结果, μ 的值在每次迭代时进行更新^[13].

2 实验结果与分析

将最近邻插值算法、双立方插值算法、基于传统 TGV 模型的算法与本文算法进行实验对比,从主观视觉效果和客观评价指标两方面对本文算法进行评价. 在实验中,各参数取经验值,分别为 $a = 0.6, b = 3, c = 0.24, \theta_p = 0.33, \theta_q = 0.5, \mu$ 的初值取 0.77,实验平台为 Matlab R2010a.

实验图像源于俄勒冈州立大学的可见光和红外图像库. 图 2 为实验用的部分低分辨率红外图像,图像分辨率均为 160 像素 \times 120 像素.



图 2 低分辨率红外图像

Fig. 2 Low-resolution infrared images

图3—5中a)—d)分别是4种算法对应于图2中3个图像的2倍超分辨率重建的实验结果,其中,图片的分辨率均为320像素×240像素。不同超分辨率算法的峰值信噪比(PSNR)如表1所示。

由图3—5可知,从主观视觉效果来看,最近邻插值算法和双立方插值算法未能有效抑制噪声,也未能保留图像边缘;基于传统TGV模型的算法有效保留了图像边缘,但对噪声的抑

制不够;本文算法图像边缘清晰,视觉效果更好,这是因为红外图像中的噪声有相当一部分是随机噪声,一阶梯度锐化算子的引入有效抑制了随机噪声并锐化图像边缘。

PSNR值越大,说明图像质量越高。由表1可知,最近邻插值算法和双立方插值算法的PSNR值较低;基于传统TGV模型算法的PSNR值高于最近邻插值算法和双立方插值算法,质量较好;本文算法的PSNR平均值高于其他3种算法,重建图像质量最高。

综上,实验结果从客观评价指标方面验证了

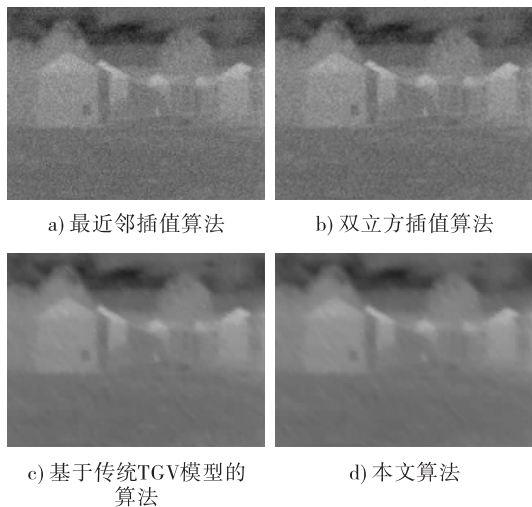


图3 不同算法所得房屋图像超分辨率重建结果
Fig. 3 The super-resolution results of house image of different algorithms

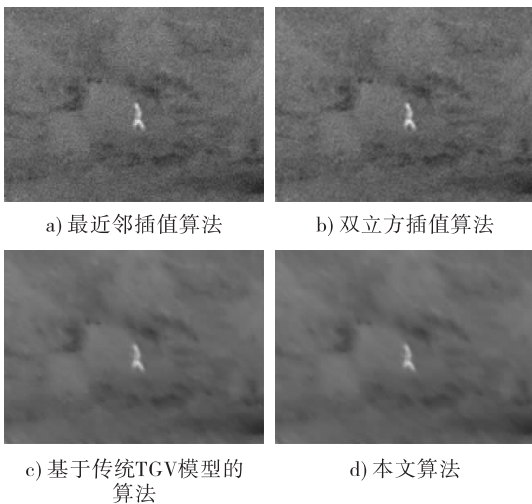


图4 不同算法所得森林图像超分辨率重建结果
Fig. 4 The super-resolution results of woods image of different algorithms

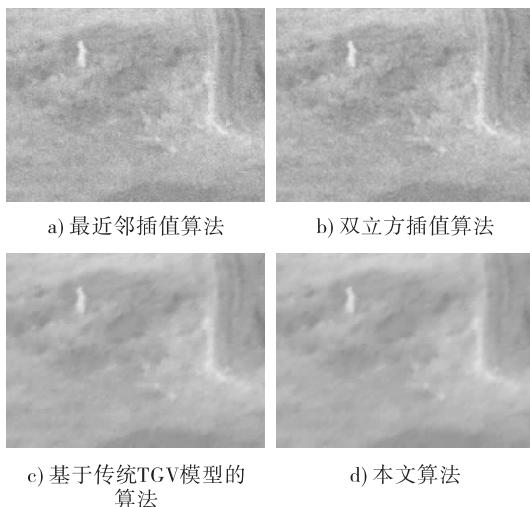


图5 不同算法所得山岭图像超分辨率重建结果
Fig. 5 The super-resolution results of hill image

表1 不同超分辨率算法的PSNR值

Table 1 PSNR values of different super-resolution algorithms

图像	最近邻插值算法	双立方插值算法	基于传统TGV模型的算法	本文算法
轮船	28.707 3	30.187 7	31.759 9	31.760 6
广场	28.165 6	29.603 7	29.860 3	29.778 9
房屋	29.318 7	30.956 3	34.283 1	34.562 5
雾中的房屋	29.214 4	30.851 4	34.087 3	34.275 7
河岸	28.891 6	30.497 6	32.683 1	32.718 0
树林和行人	28.965 2	30.508 9	32.522 4	32.598 9
树林	29.106 2	30.716 0	32.337 6	32.559 6
树林和道路	29.097 5	30.630 9	32.936 7	33.066 0
PSNR 平均值	28.933 3	30.494 1	32.558 8	32.665 0

本文算法在抑制红外图像噪声的同时,提高了超分辨率红外图像的质量。

3 结语

本文提出的基于改进 TGV 的单幅红外图像的超分辨率算法将二阶 TGV 模型和一阶梯度锐化算子相结合,一阶梯度锐化算子的引入使得本文算法有效地抑制了图像中的噪声. 实验结果表明,本文算法效果优于传统算法,并且降低了硬件实现的复杂度,实用性较强. 下一步可将其他图像超分辨率模型的正则约束项与 TGV 正则约束项相结合,改进正则约束项和数据项,建立对红外图像特点更加有针对性的正则化模型。

参考文献:

- [1] FERSTL D, REINBACHER C, RANFTL R, et al. Image guided depth upsampling using anisotropic total generalized variation [C] // IEEE International Conference on Computer Vision. Piscataway: IEEE, 2013: 993.
- [2] WERLBERGER M, TROBIN W, PORK T, et al. Anisotropic huber-L1 optical flow [C] // Proceedings of the British Machine Vision Conference. [S. l. : s. n.], 2009: 1.
- [3] 苏冰山, 吴炜, 杨晓敏, 等. 一种基于多传感器的红外图像正则化超分辨率算法 [J]. 光电子激光, 2015, 26(2): 368.
- [4] KOVESI P. Phase congruency detects corners and edges [C] // Proceedings of Digital Image Computing: Techniques and Applications. Sydney: [s. n.], 2003: 309.
- [5] 苏冰山, 陈继光, 陈雨. 基于改进总广义变分的红外图像超分辨率算法 [J]. 电脑知识与技术, 2019, 15(22): 193.
- [6] 戚曹, 朱桂斌, 唐鉴波, 等. 基于稀疏表示的红外视频图像超分辨率算法 [J]. 计算机工程, 2016, 42(3): 278.
- [7] 王新华, 欧阳继红, 庞武斌. 压缩编码孔径红外成像超分辨率重建 [J]. 吉林大学学报(工学版), 2016, 46(4): 1239.
- [8] 翟海天, 李辉, 李彬. 基于区域划分的红外超分辨率重建 [J]. 光学精密工程, 2015, 23(10): 2989.
- [9] PANAGIOTOPOULOU A, ANASTASSOPOULOS V. Super-resolution reconstruction of thermal infrared images [C] // Proceedings of the 4th WSEAS International Conference on REMOTE SENSING. [S. l. : s. n.], 2011: 40.
- [10] WANG J, RALPH J F, GOULERMAS J Y. An analysis of a robust super resolution algorithm for infrared imaging [C] // Proceedings of the 6th International Symposium on Image and Signal Processing and Analysis. Piscataway: IEEE, 2009: 158.
- [11] KONGSKOV D R, DONG Y Q, KNUDSEN K. Directional total generalized variation regularization [J]. BIT Numerical Mathematics, 2019, 59(4): 903.
- [12] ESSER E, ZHANG X Q, CHAN T F. A general framework for a class of first order primal-dual algorithms for convex optimization in imaging science [J]. SIAM Journal on Imaging Sciences, 2010, 3(4): 1015.
- [13] CHAMBOLLE A, PORK T. A first-order primal-dual algorithm for convex problems with applications to imaging [J]. Journal of Mathematical Imaging and Vision, 2011, 40: 120.